

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR  
INSTITUTO DE PESQUISAS EM PATOLOGIAS TROPICAIS - IPEPATRO  
CENTRO DE PESQUISAS EM MEDICINA TROPICAL – CEPEN  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
NÚCLEO DE SAÚDE - DEPMED**

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CORISMATO SINTASE DE  
*Plasmodium falciparum* A PARTIR DA OTIMIZAÇÃO E SÍNTESE DO GENE  
PARA SISTEMA PROCARIÓTICO.**

**TEODORO LEANDRO**

**Porto Velho-RO  
2010**

**TEODORO LEANDRO**

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CORISMATO SINTASE DE  
*Plasmodium falciparum* A PARTIR DA OTIMIZAÇÃO E SINTESE DO GENE  
PARA SISTEMA PROCARIOTICO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia - UNIR, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental.

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Eduardo Rezende Honda

**Porto Velho-RO  
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

Leandro, Teodoro.

L437e

Expressão e purificação da proteína corismato sintase de *plamodium falciparum* a partir da otimização e síntese do gene para sistema procariotico. / Teodoro Leandro. Porto Velho, Rondônia, 2010.

75f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Núcleo de Saúde, Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, 2010.

CDU: 577.2

**Bibliotecária Responsável:** Eliane Gemaque / CRB 11-549

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CORISMATO SINTASE DE *Plasmodium falciparum* A PARTIR DA OTIMIZAÇÃO E SINTESE DO GENE PARA SISTEMA PROCARIOTICO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia - UNIR, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental.

APROVADA POR:

---

PRESIDENTE: Prof<sup>o</sup>. Dr. Eduardo Rezende Honda

---

MEMBRO TITULAR: Prof<sup>o</sup>. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon

---

RO TITULARMEMB: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Freire Celedônio Fernandes

**Porto Velho-RO  
2010**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. **Dr. EDUARDO REZENDE HONDA**, Diretor Técnico CEPEM, pela orientação dedicada na realização desta dissertação, pela amizade e companheirismo na convivência diária e pela confiança em mim depositada;

Ao Prof. Dr. Rodrigo G. Stábeli - IPEPATRO, por está sempre à disposição para solucionar os entraves ocorridos, somados aos esforços do Prof. Dr. Eduardo Rezende Honda, que resultou nesta dissertação, parceria e amizade;

Ao Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva, por acreditar na minha capacidade de finalizar este trabalho;

Ao Prof. Dr. Gerhard Wunderlich da ICB-USP - Universidade de São Paulo - Instituto de Ciências Biomédicas, pelo apoio científico;

A Rudson J. Holanda e Patrícia Soares (Plataforma Técnica - CEPEM) pela convivência do dia-a-dia e pelas informações valiosas referentes aos experimentos de expressão e purificação de proteínas;

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação/PGBIOEXP pelos ensinamentos e dedicação transmitidos nas disciplinas cursadas, amizade, tempo cedido ao esclarecimento de dúvidas e pela receptividade acolhedora.

Aos colegas da pós-graduação do curso de mestrado pela convivência, pelas conversas e principalmente pela integração científica e disseminação de conhecimentos;

Aos meus grandes amigos do CEPEM: Quéssia Débora, Elieth Mesquita, Joana D'arc, Elci, Rosemeire Dalla Martha, Deusilene Vieira, Rosimar Esquerdo, Carina Picelli, Alcione Oliveira, Francisco Silva, pelos estímulos, colaboração e compreensão;

A três pessoas especiais: Elaine Silva, Éderson Lauri Leandro e Miriele Freitas, pelo apoio incondicional e por estar ao meu lado nas horas mais difíceis;

A toda equipe técnica de apoio do CEPEM: Ângela Martins, Kiki, Odair, Joel de Souza e Danielly Sombra, pelo eficiente apoio;

E todas as demais pessoas, não citadas, que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu pudesse concluir este estudo;

E principalmente a Deus por me conceder serenidade, saúde e a possibilidade de realizar tudo o que desejo, sempre em direção à paz.

**A todos o meu muito obrigado.**

## RESUMO

A malária é uma doença de grande importância epidemiológica em termos de morbidade e mortalidade no mundo. O índice de resistência às drogas antimaláricas vem aumentando gradativamente ao longo das últimas décadas. A descrição de vias metabólicas exclusivas de *Plasmodium* está abrindo perspectivas para desenvolvimento de novas drogas contra alvos moleculares bem definidos. A via do chiquimato é uma dessas vias metabólicas, e nesta está presente a enzima corismato sintase (CS) que catalisa a transformação de 5-enolpiruvil chiquimato 3-fosfato em corismato, último precursor comum na biossíntese de compostos aromáticos, presentes em bactérias, fungos, plantas, protozoários apicomplexa e ausente em mamíferos. A síntese e otimização do gene da proteína (PfCS) foi necessária para expressão em sistema procaríoto. O produto gênico liofilizado foi inserido em vetor de clonagem PUC57 e vetor de expressão pGS21a. O plasmídeo foi transformado em células competentes TOP 10 F', em seguida realizou-se miniprep e confirmação com enzimas de restrição *NcoI* e *SalI*. A retransformação foi realizada em células competentes BL 21 DE3 pLys e a indução foi com IPTG. A expressão foi confirmada por gel de SDS-PAGE. A etapa de purificação foi realizada com Kit Qiagen 6x Histidina em coluna de Ni-NTA. A expressão foi obtida na forma de proteína recombinante de fusão com histidina, assumindo a forma de corpúsculos de inclusão, que foram desnaturadas com uréia 8M. Após purificação por coluna de afinidade obtivemos um nível aceitável de pureza. Estamos trabalhando para expressar essa proteína na forma solúvel e também em protocolos de renovelamento. Estudos *in vitro* englobando teste da atividade e inibição enzimática utilizando extratos vegetais encontrados na região Amazônica poderão identificar novos potenciais de fármacos para o tratamento da malária, inicialmente *P. falciparum*.

**Palavras chaves:** 1. Biologia molecular. 2 Bioinformática. 3 Síntese gênica. 4 Expressão de proteínas. 5 Procariotos.

## ABSTRACT

Malaria is a disease of great epidemic importance morbidity and mortality wise worldwide. The resistance rate to the drugs anti-malaria has been increasing gradually along the last decades. The description of exclusive metabolic ways of Plasmodium is opening perspectives for development of new drugs against very well defined molecular objectives. The pathway of the shikimate is one of those metabolic ways, and in this it is present the enzyme chorismate synthase (CS) that catalyzes the transformation of 5-enolpiruvil shikimate 3-phosphate in chorismate, last common precursor in the biosynthesis of aromatic compositions, presents in bacteria, fungus, plants, protozoa apicomplexan and absentee in mammals. The synthesis and optimization of the gene of the protein chorismate synthase of *P. falciparum* (PfCS) was necessary for expression in system prokaryote. The gene product was inserted in cloning vector PUC57 and vector of expression pGS21a, respectively. The plasmídeo was transformed into competent cells TOP10F', soon afterwards it was performed miniprep and confirmation with restriction enzymes *NcoI* and *SaI*. The retransformation was accomplished in competent cells BL 21 (DE3) pLys, the induction was with IPTG and the expression was confirmed by gel of SDS-PAGE. The purification stage was accomplished with Kit Qiagen 6x Histidine in nickel column Ni-NTA. The expression was obtained in the form of protein coalition recombining with histidine, assuming the form of inclusion corpuscles, which were denatured with 8M urea. After purification for likeness column we obtained an acceptable level of purity. We are working to express that protein in the soluble form and also in reorganization protocols. Studies in vitro including test of the activity and enzymatic inhibition using vegetable extracts found in the Amazonian area can identify new potentials medicines for the treatment of malaria, initially *P. falciparum*.

**key words:** 1 Molecular biology. 2 Bioinformatics. 3 Genetic synthesis. 4 Expressions of proteins. 5 Prokaryotic.

## LISTA DE FIGURA

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>Figura 01</b> | Incidência Estimada da Malária no Mundo por 1.000 habitantes em 2006.   | <b>2</b>  |
| <b>Figura 02</b> | Casos da malária causada pelo <i>P. falciparum</i> no mundo.  | <b>3</b>  |
| <b>Figura 03</b> | Variação no número de casos da malária na Amazônia legal, período de 1999 a 2007.   | <b>4</b>  |
| <b>Figura 04</b> | Mapa de risco de infecção da malária na Amazônia Legal em 2007. Índice: baixo risco IPA < 10; médio risco IPA 10-49; alto risco IPA ≥ 50. | <b>5</b>  |
| <b>Figura 05</b> | Incidência Parasitária Anual da Malária (IPA) por unidade de Federação da Amazônia Legal 2006 e 2007, por 1.000 habitantes.               | <b>6</b>  |
| <b>Figura 06</b> | Controle da Malária no mundo: países livres, em fases de controle, pré-eliminação, eliminação, prevenção e reintrodução em 2007.          | <b>10</b> |
| <b>Figura 07</b> | Via Metabólica do chiquimato.   | <b>15</b> |
| <b>Figura 08</b> | Mapa do vetor de expressão pRSETA (Invitrogen-USA).   | <b>27</b> |
| <b>Figura 09</b> | Mapa do Vetor de Expressão pGS21a (Invitrogen-USA).   | <b>29</b> |
| <b>Figura 10</b> | PCR para amplificação do gene (PfCS).   | <b>38</b> |
| <b>Figura 11</b> | Miniprep do vetor pGEM-T Easy (Promega-USA).  | <b>38</b> |
| <b>Figura 12</b> | Digestão enzimática do vetor pGEM-T Easy com <i>Bam</i> HI e <i>Xho</i> I.  | <b>39</b> |
| <b>Figura 13</b> | Digestão Enzimática do vetor pGS21a com <i>Nco</i> I e <i>Sal</i> I.  | <b>39</b> |
| <b>Figura 14</b> | Transformação em Células BL21 (DE3) pLys de <i>E. coli</i> .  | <b>40</b> |
| <b>Figura 15</b> | Expressão PfCS e confirmação em Gel SDS-PAGE 12%.   | <b>40</b> |
| <b>Figura 16</b> | Solubilização PfCS e confirmação em Gel SDS-PAGE 12%.   | <b>41</b> |
| <b>Figura 17</b> | Purificação da PfCS.  | <b>41</b> |
| <b>Figura 18</b> | Western Blot da PfCS.   | <b>42</b> |



## LISTA DE TABELA

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>Tabela 01</b> | Distribuição das espécies de parasitas da malária humana no mundo.   | <b>3</b>  |
| <b>Tabela 02</b> | Fármacos antimaláricos: vantagens e desvantagens.  | <b>8</b>  |
| <b>Tabela 03</b> | Fármacos, introdução e primeiros casos registrados de resistência de <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos mais utilizados. | <b>9</b>  |
| <b>Tabela 04</b> | Classificação de antimaláricos de acordo com sua categoria química e mecanismo de ação.                                      | <b>11</b> |
| <b>Tabela 05</b> | Programas, bancos de dados e endereços eletrônicos utilizados.   | <b>21</b> |
| <b>Tabela 06</b> | Protocolo de Amplificação do gene da Proteína CS por PCR.  | <b>23</b> |
| <b>Tabela 07</b> | Programa do Termociclador Biosystems Mod. MJ96+/MJ96G para desnaturação, anelamento e extensão.                              | <b>24</b> |
| <b>Tabela 08</b> | Padronização e composição do gel de poliacrilamida SDS-PAGE gel de corrida 12% e gel de empacotamento 4%.                    | <b>31</b> |
| <b>Tabela 09</b> | Caracterização da proteína PfCS por bioinformática.  | <b>33</b> |
| <b>Tabela 10</b> | Seqüências Produzindo Alinhamentos Significativos de homologia.  | <b>34</b> |
| <b>Tabela 11</b> | Resumo dos códons usados na seqüência submetida e otimizada  | <b>35</b> |

## ABREVIATURAS

**ACT:** Terapia Combinada com Artemisinina  
**AIDS:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
**AS:** Antisense (Fita)  
**ATP:** Adenosina Tri-Fosfato  
**BCIP:** 5-Bromo-4-Cloroindolil Fosfato  
**CaCl:** Cloreto de Cálcio  
**CAI:** Índice de Adaptação de Códon  
**cDNA:** DNA Complementar  
**CH<sub>3</sub>COOK:** Acetato de Potássio  
**CS:** Corismato Sintase  
**C-Terminal:** Região Carboxi-Terminal  
**DAHPS:** 3-deoxi-D-arabino- heptulosonato 7-fosfato Sintase  
**DHQD:** 3-Desidroquinato Desidratase  
**DHQS:** 3-Desidroquinato Sintase  
**DNA:** Ácido Desoxirribonucléico  
**dNTP:** Desoxinucleosídeo Trifosfato  
**DOXP:** Enzima da Via Metabólica MEP de *P. falciparum*  
**EDTA:** Ácido Etilenodiaminotetracético  
**ELISA:** Ensaio de Enzima Ligada Imunoabsorção  
**ENc:** Número Efetivo de Códon  
**EPSPS:** 5-Enoilpiruvilchiquimato 3-fosfato Sintase  
**FMN:** Mononucleotídeo de Flavina Redutase  
**gDNA:** DNA genômico  
**His-Tag:** Segmento de 6 resíduos de histidina  
**IC<sub>50</sub>:** Metade da Concentração Inibitória Máxima  
**IPA:** Incidência Parasitária Anual  
**IPTG:** Isopropil β-D-Tiogalactopiranosídeo  
**IspG:** Enzima da Via Metabólica MEP de *P. falciparum*  
**IspH:** Enzima da Via Metabólica MEP de *P. falciparum*  
**KAc:** Acetato de Potássio  
**KCl:** Cloreto de Potássio  
**kDa:** Quilo Daltons

**LB:** *Luria bertani*

**MEP:** Via Metil-Eritrol Fosfato

**Miniprep:** Mini Preparação de Plasmídeos por Lise Alcalina

**MnCl<sub>2</sub>:** Cloreto de Manganês

**MS:** Ministério da Saúde

**N-Terminal:** Região Amino-Terminal

**OD:** Densidade Óptica

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**ORF:** Região de Leitura Aberta

**PAGE:** Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Solução Tampão e Fosfato

**PBST:** Solução Salina Tamponada Fosfatada com Tween 20

**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase

**PfCS:** proteína Corismato Sintase de *Plasmodium falciparum*

**pGs21a-CS:** plasmídeo de expressão da Corismato sintase de *P. falciparum*.

**pH:** Potencial Hidrogeniônico

**PNCM:** Plano Nacional de Controle á Malária

**PNP:** Purina Nucleosídeo Fosforilase

**RNA:** Ácido Ribonucléico

**rpm:** rotações por minuto

**RT-PCR:** Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase

**S:** Sense (Fita)

**SD:** Chiquimato-5-Desidrogenase

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio

**SIVEP:** Sistema de Informação da Vigilância Sanitária

**SK:** Chiquimato Quinase

**SVS:** Secretaria de Vigilância Sanitária

**TA:** Temperatura Ambiente

**TBE:** Tris Borato EDTA

**TE:** Tampão Tris mais EDTA

**TEMED:** N'N'N'N' Tetrametilenodiamino

**Tris-HCl:** Tris (hidroximetil) Aminometano Hidroclórico

## SUMÁRIO

|  |             |
|--|-------------|
| <b>RESUMO</b>  | <b>vi</b>   |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>vii</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURA</b>   | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE TABELA</b>   | <b>ix</b>   |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | <b>x</b>    |
| <br>   |             |
| <b>1.0 INTRODUÇÃO</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1 Distribuição Geográfica e Incidência da Malária no Mundo         | 1           |
| 1.2 Incidência da Malária no Brasil                                  | 4           |
| 1.3 Controle da Malária  | 7           |
| 1.4 Vias Metabólicas do <i>P. Falciparum</i>                         | 11          |
| 1.5 Via Bioquímica do Chiquimato                                     | 14          |
| 1.6 Bioinformática   | 17          |
| 1.7 Biologia Sintética   | 18          |
| 1.8 Síntese Gênica   | 19          |
| <br>   |             |
| <b>2.0 OBJETIVOS</b>   | <b>20</b>   |
| 2.1 Geral  | 20          |
| 2.2 Específicos  | 20          |
| 2.2.1 Primeira Etapa   | 20          |
| 2.2.2 Segunda Etapa  | 20          |
| <br>   |             |
| <b>3.0 MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                       | <b>21</b>   |
| 3.1 Ferramentas de Bioinformática                                    | 21          |
| 3.2 Técnica de Extração e Quantificação de gDNA                      | 21          |
| 3.3 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR                             | 23          |
| 3.4 Purificação do Produto da PCR                                    | 24          |
| 3.5 Ligação do Amplicon aos Vetores de Clonagem e Subclonagem        | 24          |
| 3.6 Preparo de Células Quimiocompetentes                             | 25          |
| 3.7 Transformação em Células Competentes DH5 $\alpha$ e DH10 $\beta$ | 25          |
| 3.8 Extração de DNA Plasmidial por Lise Alcalina. - Miniprep         | 26          |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.9        | Digestão com Enzima de Restrição   | 27        |
| 3.10       | Aquisição do Gene Sintético da CSPf.   | 27        |
| 3.11       | Otimização do Gene da PfCS Através da Bioinformática   | 28        |
| 3.12       | Replicação do Gene Sintetizado da PfCS.  | 28        |
| 3.13       | Extração de DNA Plasmidial – Miniprep do gene Sintético da PfCS.   | 29        |
| 3.14       | Digestão Enzimática do Plasmídio pGS21a CS com <i>NcoI</i> e <i>SaII</i>   | 30        |
| 3.15       | Transformação do Plasmídio pGS21a –CS Recombinante   | 30        |
| 3.16       | Expressão da PfCS com Gene Sintetizado   | 30        |
| 3.17       | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida <i>SDS-PAGE</i>  | 31        |
| 3.18       | Solubilização e Purificação da PfCS Kit Qiagen 6x Histidina Coluna de níquel – Ni-NTA.                           | 31        |
| 3.19       | Western Blot   | 32        |
| <b>4.0</b> | <b>RESULTADOS</b>  | <b>33</b> |
| 4.1        | Descrição da PfCS por Ferramentas de Bioinformática  | 33        |
| 4.1.2      | Seqüência em Formato FASTA do Gene da PfCS Submetida e Otimizada   | 34        |
| 4.1.3      | Alinhamentos das Seqüências do Gene Submetidos e Otimizados da CSPf.   | 36        |
| 4.2        | Amplificação e Clonagem do Gene da PfCS.   | 37        |
| 4.3        | Miniprep do gene PfCS em vetor pGEM-T Easy (Promega-USA).  | 38        |
| 4.4        | Digestão Enzimática do Vetor pGEM-T Easy com <i>BamHI</i> e <i>XhoI</i> (Promega-USA) com o Gene Natural da PfCS | 39        |
| 4.5        | Digestão Enzimática do Vetor pGS21a-CS com <i>NcoI</i> , <i>SaII</i> com o Gene Sintético da PfCS                | 39        |
| 4.6        | Transformação do Plasmídio pGS21a-CS em Células Competentes BL21(DE3) pLys                                       | 40        |
| 4.7        | Expressão da PfCS.   | 40        |
| 4.8        | Solubilização da PfCS.   | 41        |
| 4.9        | Purificação da PfCS em coluna de níquel Ni-NTA (Qiagen-USA)  | 41        |
| 4.10       | Western Blot da Amostra Solubilizada da PfCS.  | 42        |
| <b>5.0</b> | <b>DISCUSSÃO</b>   | <b>43</b> |
| 5.1        | Gene da Corismato Sintase do <i>P. Falciparum</i> PfCS.  | 45        |
| 5.2        | Gene Sintético e Otimizado da Corismato sintase PfCS.  | 46        |
| <b>6.0</b> | <b>CONCLUSÃO</b>   | <b>52</b> |
| <b>7.0</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>53</b> |

## 1. 0 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Distribuição Geográfica e Incidência da Malária no Mundo.

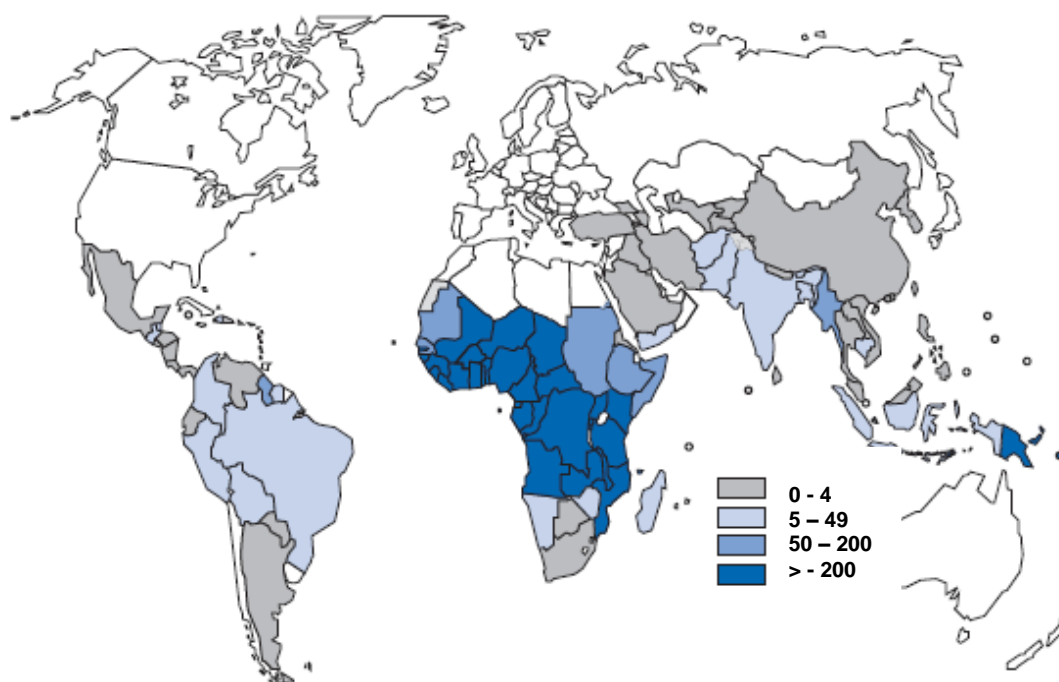
A malária é uma doença conhecida pela sua elevada morbidade e mortalidade, acarretando consigo problemas sócio-econômicos, prejudicando diretamente de forma visível o desenvolvimento dos países afetados (CRAVO & ROSÁRIO, 2003).

Considerada pela Organização Mundial da Saúde - OMS a principal doença infecciosa causada por protozoário que acomete a humanidade há séculos. Os parasitas estão presentes em todos os trópicos sendo endêmico no Sul da África, Sudeste da Ásia, Oceania e nas Américas Central e do Sul (OMS, 2005).

Em 2006, os casos de malária no mundo foram estimados em 247 milhões, causando quase um milhão de mortes na sua maioria crianças menores de cinco anos. A malária mata anualmente duas vezes mais do que a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS e muito mais do que qualquer outra doença infecciosa (OMS, 2006).

Estimativa da OMS em 2008 relata que em 2006, 3,3 bilhões de pessoas corriam o risco de contrair a doença. Deste total, 2,1 bilhões tinham um baixo risco, ou seja, menos de 1/1.000 habitantes, 1,2 bilhões de pessoas correm alto risco de contrair malária, ou seja, mais que 1/1.000 habitantes, destes habitantes, 49% vivem em regiões da África e 37% no Sudeste da Ásia; dos 212 milhões de casos que ocorreram no continente africano 80% ocorreram em 13 países, entre os países mais endêmicos estão à Nigéria, República Democrática do Congo, Etiópia, Tanzânia e Quênia. Entre os casos ocorridos fora do continente africano 80% foram na Índia, Sudão, Mianmar, Indonésia, Nova Guiné e Paquistão **Figura 01** (OMS, 2008). Em 2008 havia 109 países endêmicos, 45 no continente Africano em áreas de atuação da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008).

Conforme Relatório Mundial da Malária de 2009, Dez países estão implementando programas nacionais de eliminação da malária, sendo que seis entraram em fase de eliminação, oito países estão no estágio de pré-eliminação e nove países conseguiram interromper a transmissão e estão na fase de prevenção da reintrodução da malária (OMS, 2009).



**Figura 01.** Incidência Estimada da Malária no Mundo por 1.000 habitantes em 2006. OMS (2008).

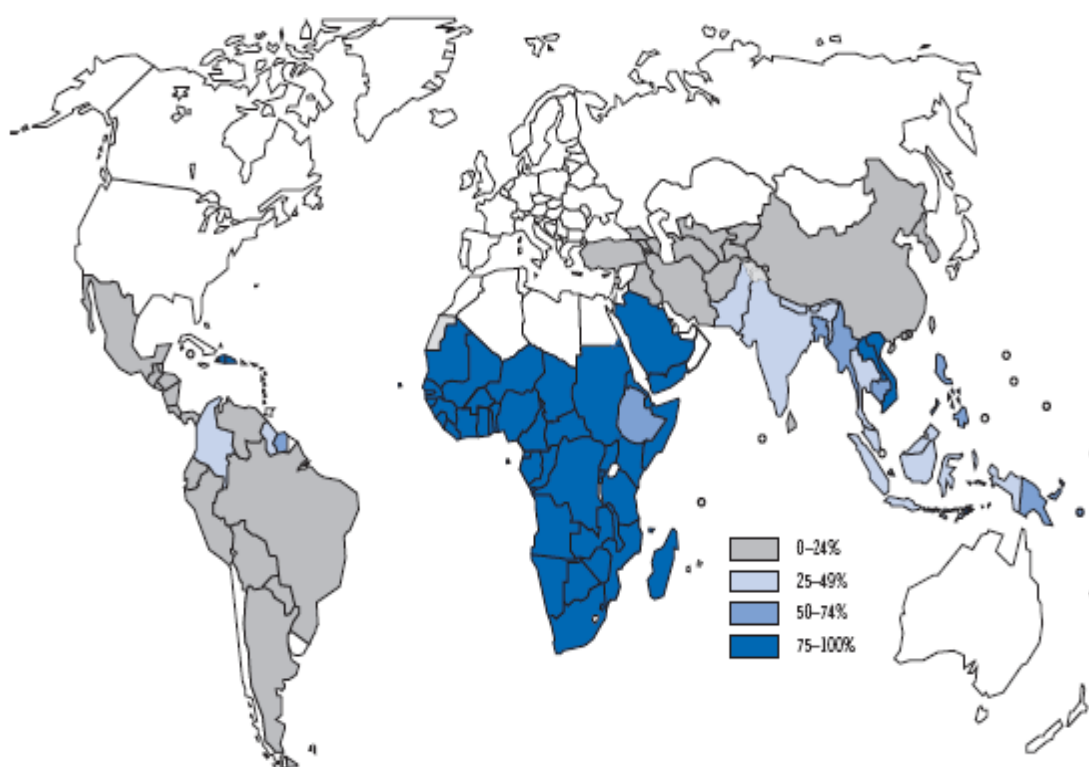
A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Sendo conhecidas quatro espécies que acometem o homem: *Plasmodium malariae* - *Pm* Laveran (1881), *Plasmodium falciparum* - *Pf* Welch (1897), *Plasmodium vivax* - *Pv* Grassi & Feletti (1890) e *Plasmodium ovale* - *Po* Stephens (1922). O *P. ovale* ocorre apenas na África e raramente no Pacífico Ocidental. Os protozoários compartilham dos mesmos sintomas (CAMARGO, 1999).

O *P. vivax* e *P. falciparum* são os parasitas da malária que apresentam maior distribuição geográfica. Nas regiões tropicais o *P. falciparum* tem alta prevalência sendo responsável pelo surgimento de casos graves da doença, podendo ser fatal Figura 02. No continente africano predomina o *P. falciparum*, na América Central, América do Sul, região Sul e Central da Ásia, o *P. vivax* é predominante (CARTER & MENDIS, 2002; SNOUNOU, 2005) **Tabela 01.**

No contexto mundial, entre os vetores mais importantes, se acham os grupos *A. maculipennis* (Europa), *culicifacies* (Índia), *minimus* (China e Filipinas), *gambiae* e *funestus* na África. No Neotrópico, *A. albimanus* (México), *A. nuñeztovari* (Venezuela e Colômbia), *A. darlingi* e *A. aquasalis* (Brasil), são bem conhecidas como vetores de plasmódios maláricos (REBÊLO *et al.*, 1997).

**Tabela 01-** Distribuição das espécies de parasitas da malária humana no mundo (%). Fonte: Adaptado de Carter e Mendis (2002).

| <b>Região/Espécie</b>         | <b><i>P. falciparum</i></b> | <b><i>P. vivax</i></b> | <b><i>P. malariae</i></b> | <b><i>P. ovale</i></b> |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| <b>África Central/Oeste</b>   | 88,2                        | 1,2                    | 2,2                       | 8,4                    |
| <b>África Sul e Leste</b>     | 78,8                        | 9,8                    | 3,0                       | 8,4                    |
| <b>Ásia total</b>             | 4,2                         | 95,6                   | 00                        | 0,2                    |
| <b>Ásia Sul e central</b>     | 19,8                        | 80,2                   | 00                        | 00                     |
| <b>Ásia Sudeste</b>           | 51,4                        | 46,6                   | 0,9                       | 00                     |
| <b>Pacífico Oeste</b>         | 43,0                        | 56,1                   | 0,9                       | 00                     |
| <b>América Central/Caribe</b> | 12,9                        | 87,1                   | 00                        | 00                     |
| <b>América do sul</b>         | 29,2                        | 70,6                   | 0,2                       | 00                     |



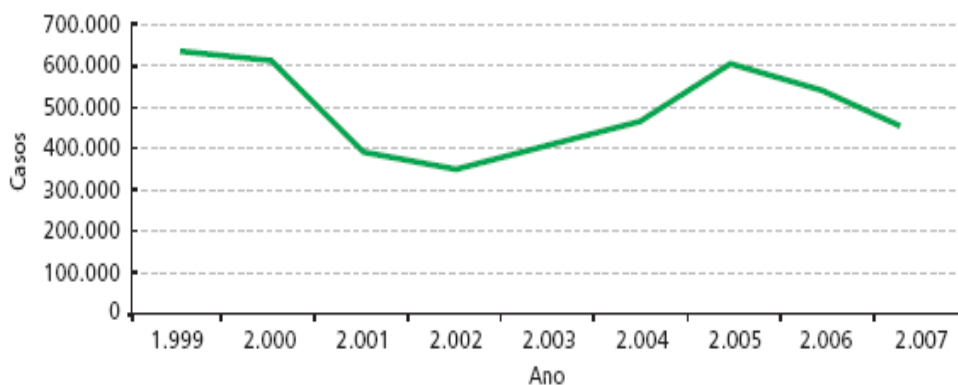
**Figura 02:** Percentagem de casos da malária causada pelo *P. falciparum* no mundo em 2006. Fonte: OMS, 2008.



## 1. 2- Incidência da Malária no Brasil.

No Brasil mais de 60% do território é favorável à transmissão da malária, isto ocorre em decorrência da ocupação desordenada da Amazônia brasileira e se constitui em um dos principais problemas de saúde na região. Na Amazônia brasileira existem fatores favoráveis à transmissão da doença como temperatura, umidade, altitude, cobertura vegetal adequada à proliferação do mosquito vetor, condições habitacionais e de trabalho facilitadoras ao contato do vetor com os seres humanos (CAMARGO, 1999; SILVEIRA & REZENDE, 2001).

Aproximadamente 95% dos casos no país ocorrem na Amazônia Legal. O número de casos registrados no Brasil nos últimos anos teve uma variação significativa, em 1999 foram 610.000, reduzindo para aproximadamente 250.000 em 2002 e recrudescendo a partir de 2003 quando foram registrados aproximadamente 400.000 casos **Figura 03**. Não obstante, dentre estes casos 99% são decorrentes da região amazônica (MS, 2005; COURA *et al.*, 2006 ). Em 2005, dos 603.127 casos registrados na região amazônica 77,2% se concentram nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia (MS, 2008).



**Figura 03:** Variação no número de casos da malária na Amazônia Legal, período de 1999 a 2007. (Fonte: Sismal e Sivep - Malária/SVS/MS, 2008).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS do Ministério da Saúde - MS revelam queda expressiva dos casos da malária na região Amazônica brasileira, entre janeiro e setembro de 2008 foram notificados 241.420 casos da doença, em 2007 no mesmo período foram registrados 362.518 casos, isto equivalente a uma redução de 33,4%. Nesse período, o Sistema de Informações da Vigilância Epidemiológica - SIVEP e os Planos Nacionais de Controle a Malária - PNCM registraram uma diminuição de 50,3% dos casos de infecção por *P.*

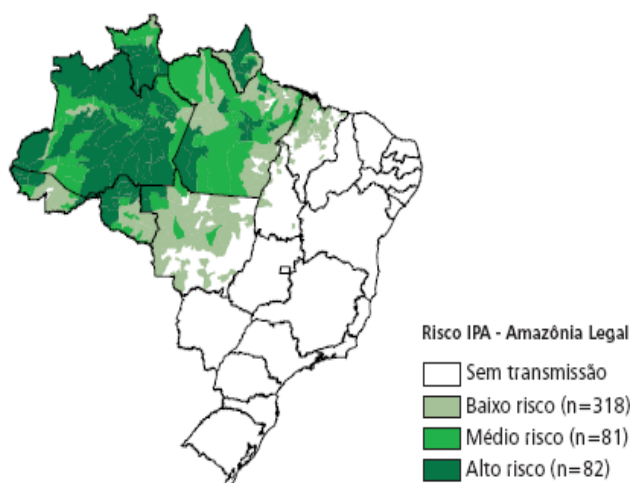
*falciparum*, responsável pela forma mais grave da doença. Foram 74.808 casos em 2007 e 37.200 em 2008 (MS/SVS, 2008).

A malária no Brasil em condições naturais é transmitida por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. O principal transmissor na região amazônica é o *Anopheles darlingi* que tem como criadouro grandes coleções de água. A transmissão é mais comum no interior das habitações em áreas rurais e semi-rurais, mas pode ocorrer em áreas urbanas, principalmente na periferia. (DEANE, 1989; MS/SVS, 2005; SANTOS *et al.*, 2005; PÓVOA *et al.*, 2006).

No Brasil a doença é causada por *P. falciparum*, *P. vivax* e mais raramente por *P. malariae*. O *P. vivax* é responsável pelo maior número de casos, enquanto o *P. falciparum* é responsável por menor número de casos, porém, maior número de casos graves e mortes (MS, 2008).

A região também registrou o maior número de internações em decorrência da doença, 44.543 em 2006 e 35.403 em 2007. Atualmente, cerca de 43.280 agentes de saúde atuam na Amazônia Legal (MS/SVS, 2008).

O grau de risco de contrair a malária no Brasil é classificado de acordo com a Incidência Parasitária Anual – IPA, na Amazônia Legal onde a doença é endêmica, e o risco de adoecer por malária é considerado médio com 18,6 casos por 1.000 habitantes (MS Sivep - Malaria/SVS, 2008).

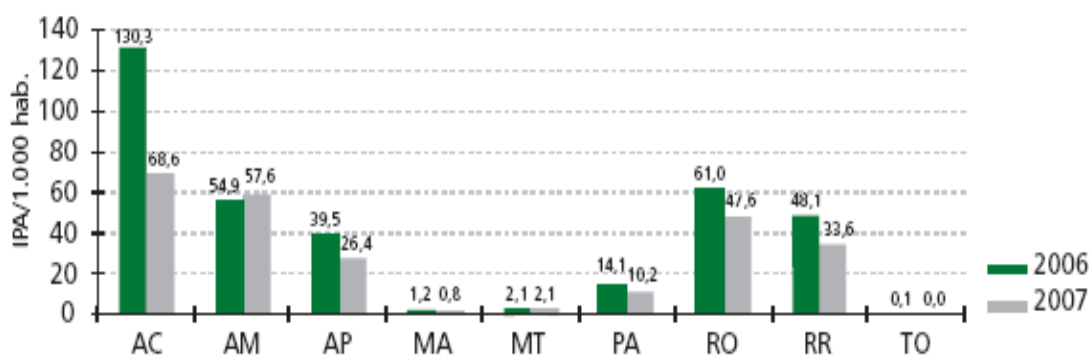


**Figura 04:** Mapa de risco de infecção da malária na Amazônia Legal em 2007. Índice: baixo risco IPA < 10; médio risco IPA 10-49; alto risco IPA ≥ 50. Fonte: (MS/SVS, 2008).

A ascensão da transmissão na Amazônia Legal brasileira ocorreu principalmente pelos incentivos à colonização que modificaram profundamente a região criando um ambiente propício à disseminação da doença, como a abertura

de rodovias que facilitaram o acesso à região, a ocupação da floresta por projetos agropecuários, mineração e construção de usinas hidrelétricas nos rios amazônicos (McGREEVY *et al.*, 1989; MARQUES & GUTIERREZ 1994; FUNASA/MS, 1999a; FUNASA/MS, 1999b) com conseqüência inclusive para povos indígenas da região (PITHAN, 1994) **Figura 04.**

Segundo dados atuais da SVS todos os estados da Amazônia Legal brasileira apresentaram queda significativa na incidência de casos no período de 2006 para 2007. A maior queda foi no estado do Acre (45,4%). Em seguida destacam-se Rondônia (44,4%), Amapá (43,2%), Roraima (40,8%), Tocantins (38,8%), Mato Grosso (38,4%), Maranhão (34,4%), Amazonas (32,2%) e Pará (11,8%) (SVS/MS, 2008) **figura 05.**



**Figura 05:** Incidência Parasitária Anual da Malária (IPA) por unidade de Federação da Amazônia Legal 2006 e 2007, por 1.000 habitantes. Fonte: Sivep- Malária/SVS/MS, 2008.

A malária não se distribui geograficamente de forma homogênea, tampouco os vetores ou cepas circulantes (SILVEIRA & REZENDE, 2001). A malária é um problema global, mas com características locais. Sendo assim, é importante conhecer a epidemiologia da doença em cada lugar para medidas de prevenção e controle adequados. As diferenças nos perfis de eficácia e efetividade dos tratamentos podem ser explicadas pelo contexto epidemiológico (SUÁREZ-MUTIS *et al.*, 2007). Neste mesmo sentido, Andrade (2003) observou que situações epidemiológicas distintas dão à malária uma distribuição heterogênea na Amazônia, porém, tem sido alvo de estratégias homogêneas de controle.

Os dados acima evidenciam que o controle ainda não alcançou seus objetivos, existindo ainda desafios que devem ser superados como diagnóstico de malária assintomática (ALVES *et al.*, 2005; COURA *et al.*, 2006; RODRIGUES,

2008) e uma melhor forma de repasse de recursos financeiros para os municípios a fim de permitir sustentabilidade e efetividade dos programas voltados ao controle de doenças negligenciadas, entre estas a malária (SANTOS *et al.*, 2005).

### 1.3 - Controle da Malária.

A longa associação entre seres humanos e as quatro espécies de plasmódios que infecta o homem é evidenciada pela existência da especificidade de hospedeiros para as inúmeras espécies que ocorrem na natureza (ANDRADE, 2005).

Os PNCM adotaram políticas sobre prevenção e cura recomendadas pela OMS, mas com variações entre países e regiões. A aplicação de inseticidas de ação residual intradomiciliar e extradomiciliar é geralmente utilizado no caso de grande transmissão da malária, sendo o método padrão de controle do vetor na região europeia, e pouco utilizado na África, Américas e no Sudeste Asiático e muito menos ainda na região do Pacífico Ocidental (OMS, 2008).

*Outra medida de controle da malária adotada pela OMS é a cobertura com mosquiteiros tratados com inseticida e seu uso está aumentando rapidamente em alguns países da África e a posse doméstica de mosquiteiros cresceu para 31% nos países de elevada morbidade ao final de 2008. Quase 140 milhões de mosquiteiros tratados com inseticida de longa duração foram entregues aos países com elevada morbidade na região da África em 2006–2008 (OMS, 2009).*

Relatório da OMS de Junho de 2008, todos os países e territórios (com pouca exceção) adotaram o tratamento multidroga baseado em artemisinina – ACT isolada a partir da planta *Artemisia annua L.*, (OMS, 2008) **figura 06.**

Os fármacos antimaláricos expandem-se em um grande número de moléculas orgânicas e são normalmente distribuídas em três famílias: os aminoalcoois, que incluem os alcalóides da quina (*Cinchona sp.*) que temos a quinina como exemplo clássico e todas as aminoquinolinas sintéticas, os derivados artemisínicos que englobam a artemisinina e seus derivados e os antifolatos, onde incluem também os antibióticos com atividades antimaláricas, como os biguanidas e os sulfonamidas (BERMAN *et al.*, 1991; VALE *et al.*, 2005; ARAÚJO, 2008). Alguns exemplos de fármacos antimaláricos as vantagens e desvantagens de seu uso clínico estão descritos na **tabela 02.**

**Tabela 02:** Fármacos antimaláricos: vantagens e desvantagens de seu uso clínico. (Adaptado de de Pimentel, *et al.*, 2007).

| <b>Composto</b>     | <b>Vantagens</b>   | <b>Desvantagens</b>  |
|---------------------|--|--|
| <b>Cloroquina</b>   | Rápida atividade esquizonticida; atividade gametocitocida para <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i> ; ação antipirética e antiinflamatória         | Poucas cepas de <i>P. falciparum</i> são ainda sensíveis à cloroquina  |
| <b>Amodiaquina</b>  | Rápida atividade esquizonticida; atividade gametocitocida para <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i> ; ação antipirética e antiinflamatória         | <i>P. falciparum</i> já é resistente em todas as áreas endêmicas do mundo  |
| <b>Primaquina</b>   | Ação profilática causal, sendo altamente ativa contra gametócitos de todas as espécies de plasmódios e contra hipnozoítos do <i>P. vivax</i>       | Alta toxicidade em uso prolongado nas fases assexuadas sanguíneas; contra indicada na gravidez (hemólise em fetos) e menores de 6 anos       |
| <b>Quinina</b>      | Eficaz contra <i>P. falciparum</i> (fármaco de escolha para a malária <i>falciparum</i> em associação com doxiciclina ou tetraciclina)             | Alta capacidade de se ligar a proteínas em geral; atravessa a barreira placentária e a hematoencefálica; uso associado a outros fármacos,    |
| <b>Mefloquina</b>   | Potente esquizonticida sanguíneo, altamente ativo contra <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i> ; eficaz contra os gametócitos de <i>P. vivax</i>    | Alta capacidade de ligação a proteínas em geral; meia vida muito longa (10–40 dias); potencial para induzir manifestações neuropsiquiátricas |
| <b>Halofantrina</b> | Ação esquizonticida sanguínea sobre todas as espécies de plasmódio   | Não atua sobre gametócitos e hipnozoítos; resistência cruzada com mefloquina; uso não recomendado por gestantes ou lactentes                 |
| <b>Artemisinina</b> | Esquizonticidas sanguíneos de ação rápida  | Neurotoxicidade /dose dependente   |
| <b>Tetraciclina</b> | Antimicrobiano de amplo espectro com ação potente contra as fases sanguíneas e intra-hemáticas do <i>P. falciparum</i> (em combinação com quinina) | Contra indicado na gravidez e menores de 8 anos, prejudica a calcificação óssea no feto, uso sempre em combinação com outro antimalárico     |
| <b>Doxiciclina</b>  | Difere das tetraciclinas por ser mais completamente absorvida, usada no tratamento da malária por <i>P. falciparum</i>                             | Mesmas contra-indicações da tetraciclina; deve ser sempre empregada em combinação com outro agente antimalárico                              |
| <b>Clindamicina</b> | Antimicrobiano de amplo espectro esquizonticida sanguíneo eficiente; tratamento da malária por <i>P. falciparum</i>                                | Mais cara e mais tóxica que doxiciclina e tetraciclina; uso em combinação com outro agente antimalárico                                      |

A casca do quinina foi incluída na farmacopéia de Londres em 1677, com a designação de córtex peruano, sendo este o primeiro registro da quimioterapia da malária (RANG *et al.*, 1997).

Foi na II guerra mundial que surgiram os maiores avanços no desenvolvimento de pesquisas de novas substancia ativa no controle da malaria, a cloroquina foi utilizada como quimioterápico contra a malaria, porém, foi rapidamente abandonado seu uso devido seus efeitos tóxicos (TAYLOR & WHITE, 2004; VALE *et al.*, 2005).

A quimioterapia da malária é uma área de investigação que envolve esforços em escala mundial, a resistência aos fármacos surge em todas as regiões onde se manifesta o *Plasmodium*, os compostos antimaláricos têm representado as esperanças e desilusões de um trabalho difícil e percurso longo (PIMENTEL *et al.*, 2007).

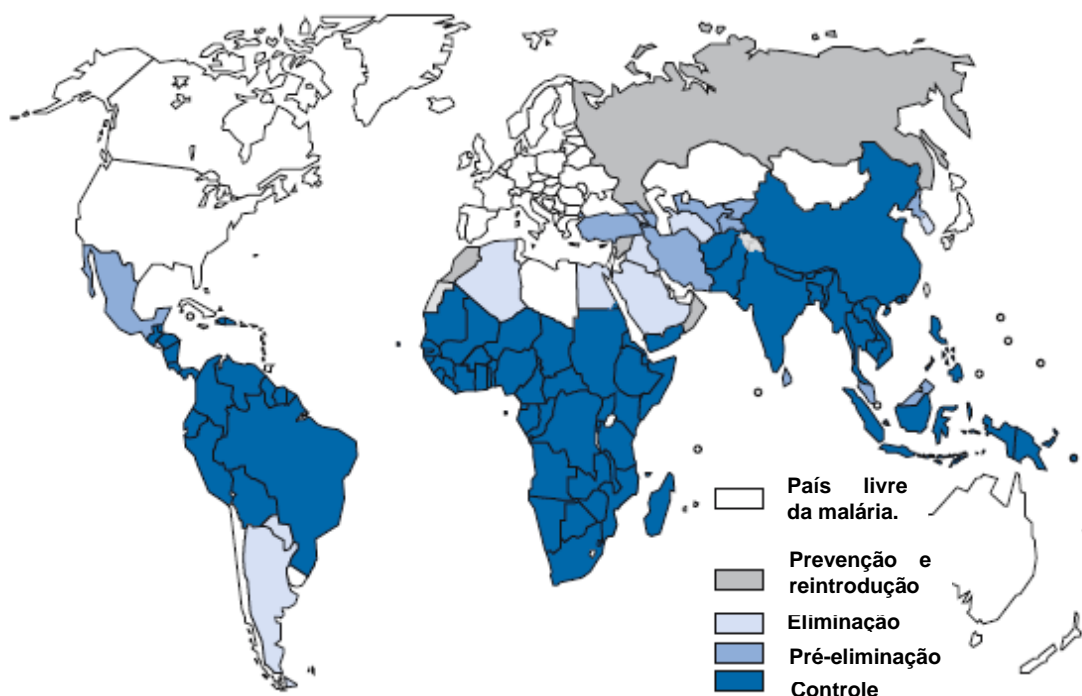
Nesse contexto, técnicas inovadoras estão sendo aplicadas na obtenção de novas formas farmacêuticas de liberação controlada de fármacos capazes de manter ou ampliar a ação de agentes promissores utilizados no combate e controle da malária (CHEDGZOY *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2005;; PIMENTEL *et al.*, 2007). O *P. falciparum* desenvolveu resistência à cloroquina e a 4-aminoquinolina há aproximadamente 50 anos e a resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos é considerada o maior problema no controle da malária (CRAVO & ROSÁRIO, 2003).

A resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos e às condições sócio-econômicas das populações atingidas agrava as dificuldades para a erradicação da malária no mundo (FREITAS *et al.*, 2007). Wongsrichanalai *et al.*, (2002) descreveram alguns fármacos e o período até o primeiro caso de resistência do *Plasmodium* **tabela 03**.

**Tabela 03:** Fármacos, introdução e primeiros casos registrados de resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos mais utilizados (adaptado de Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

| <b>Fármaco</b>                  | <b>Introduzido</b> | <b>Resistência</b> | <b>Período</b> |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| <b>Quinino</b>                  | 1632               | 1910               | 278            |
| <b>Cloroquina</b>               | 1945               | 1957               | 12             |
| <b>Proguanil</b>                | 1948               | 1949               | 1              |
| <b>Sulfadoxina-pirimetamina</b> | 1967               | 1967               | 0              |
| <b>Mefloquina</b>               | 1977               | 1982               | 5              |
| <b>Atovaquona</b>               | 1996               | 1996               | 0              |
| <b>Artemisinina e derivados</b> | 1980               | -                  | -              |

A investigação de novos agentes antimaláricos, baseia-se em rotas bioquímicas, enzimas e receptores específicos do parasita. Moléculas como a dapsona, o proguanil, a pironaridina, a lumefantrina, a artemisinina e seus derivados, ou os novos análogos da cloroquina, estão atualmente sendo submetidas a ensaios clínicos e utilizadas no tratamento como antimaláricos (BIAGINI *et al.*, 2005).



**Figura 06:** Controle da Malária no mundo: países livres, em fases de controle, pré-eliminação, eliminação, prevenção e reintrodução em 2007 (OMS, 2008).

O desenvolvimento da multi-resistência aos antimaláricos determina a urgência de novos regimes de tratamento visando o controle da propagação da doença. A combinação de antimaláricos pode ser utilizada no tratamento de infecções de *P. falciparum* multi-resistentes (PIMENTEL *et al.*, 2007). Alguns antimaláricos, categoria química e seus mecanismos de ação estão descritos na **tabela 04**.

Deste modo, inibidores específicos e adequados que permitem afetar o metabolismo normal do parasita em vias metabólicas específicas estão sendo estudados, entre eles a regulação de processos metabólicos essenciais, como a glicólise, a inibição da biossíntese da pirimidina, vias de ácidos graxos, via do chiquimato, entre outros (KAPOR *et al.*, 2004).

**Tabela 04:** Classificação de antimaláricos de acordo com sua categoria química e mecanismo de ação (adaptado de FUNASA, 2001), citado por Pimentel *et al.*, 2007).

| <b>Composto</b>                           | <b>Categoria química</b>              | <b>Mecanismo de ação</b>             |
|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Cloroquina e amodiaquina</b>           | 4-aminoquinolina                      | Digestão de produtos da hemoglobina  |
| <b>Primaquina</b>                         | 8-aminoquinolina                      | Inibe a respiração mitocondrial      |
| <b>Quinina, mefloquina e halofantrina</b> | Quinolinametanóis e fenantrenometanol | Digestão de produtos da hemoglobina  |
| <b>Artemisinina e seus derivados</b>      | Éter de lactona sesquiterpênica       | Metabolismo de proteínas do parasito |
| <b>Tetraciclina e doxiciclina</b>         | Derivados de naftaceno                | Síntese das proteínas do parasito    |
| <b>Clindamicina</b>                       | Lincosaminas                          | Síntese das proteínas do parasito    |

Um aspecto importante no que se refere ao tratamento da malária é a descoberta de antimaláricos obtidos a partir de produtos naturais da flora amazônica. Extratos de inúmeras espécies vegetais têm mostrado atividade antiplasmodial em variadas concentrações contra cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina (ANDRADE-NETO *et al.*, 2004).

Diversos alcalóides e outras moléculas isolados de plantas e organismos da região amazônica já apresentaram atividade biológica contra cepas de *P. falciparum* e são alvos de estudo quimioterápico, como exemplo os extratos e os metabólitos secundários purificados das plantas do gênero *Abuta* (Menispermaceae), *Aspidosperma* (Apocynaceae), o *Bidens* (Asteraceae), a *chinchona* (Rubiaceae), *Erythrina* (Fabaceae), *Picrolemma* (Simaroubaceae), o *gaiteiro* (Piperaceae), *Pothomorphe* (Piperaceae), *Remijia* (Rubiaceae), *Simaba* (Simaroubaceae), *Tabebuia* (Bignoniaceae), *Xylopia* (anonáceas), e *Zanthoxylum* (Rutaceae), citado por Calderon *et al.*, (2009).

A malária foi protegida por muitos anos dos perigos da resistência devido às propriedades notáveis da cloroquina, porém, nas últimas décadas a resistência tem aumentado e há a necessidade de tratamentos alternativos contra a doença (WELLEMS & PLOWE, 2001).

#### **1.4 - Vias Metabólicas do *P. Falciparum*.**

Nas células as reações enzimáticas não ocorrem isoladamente, mas são organizadas em seqüências de múltiplas etapas denominadas rotas ou vias, nas



quais o produto de uma reação serve como substrato da reação subsequente. Por sua vez, diferentes vias se inter-relacionam, formando uma rede integrada e objetiva de reações químicas, coletivamente denominada metabolismo. Cada via é composta de seqüências multienzimáticas e, cada enzima, pode exibir importantes características catalíticas ou regulatórias (SILVEIRA, 2005).

Através da análise de biologia celular, molecular e bioquímica foi compreendido que provavelmente a maioria dos membros do filo apicomplexa, no qual está inserido o *P. falciparum*, abriga uma organela semelhante com um plastídio, chamada de apicoplasto. Embora o apicoplasto contenha um genoma circular pequeno a maioria do proteoma desta organela é codificada no genoma nuclear e as proteínas são subsequentemente transportadas para o apicoplasto. Presume-se que exista um número de vias metabólicas únicas não encontradas em hospedeiros vertebrados, tornando fonte ideal para alvos de drogas (SEEBER, 2003).

O Filo apicomplexa é altamente divergente, tanto entre as Ordens Coccidia (*Toxoplasma*, *Eximiria*, *Babesia*, *Theileria* e *Sarcocystis*) e Haemosporidia (*Plasmodium*), quanto entre várias espécies de um mesmo gênero. Muitos organismos apresentam mecanismos moleculares básicos similares, todavia a divergência existente propicia a existência/ausência de vias metabólicas específicas (GORNICKI, 2003).

Entre as principais vias metabólicas do *P. falciparum* está a biossíntese de ácidos graxos tipo II, via metil-eritrol fosfato - MEP biossíntese de isoprenóides, metabolismo de purinas e a via do chiquimato na qual está contida a enzima corismato sintase - CS, proteína alvo deste estudo.

A via biossíntese de ácidos graxos tipo II que está presente no *P. falciparum* possui sete enzimas, entre essas há três enzimas acetil-CoA carboxilase, b-cetoacil-ACP sintase e enoil-ACP redutase, que em uma revisão realizada por Seeber (2003) sugeriu que ácidos graxos e biossíntese de lipídios seja uma função principal do apicoplasto. A enzima enoil-ACP redutase possui como inibidor o triclosan, um bisfenol clorado, inibe o crescimento *in vitro* de *P. falciparum* com valor de IC<sub>50</sub> de 150-2000 ng mL<sup>-1</sup> (McLEOD *et al.*, 2001) e oferece proteção contra estágios sanguíneos da malária sendo alvo de drogas contra o *Plasmodium* (SUROLIA & SUROLIA, 2001).

Conseqüentemente, a enoil-ACP redutase em *P. falciparum* é também um alvo válido para o desenvolvimento de agentes antimaláricos podendo ser usado na triagem de novas drogas IPEPATRO/CEPEM/Porto Velho/RO.

O *P. falciparum* é totalmente dependente da via do MEP do apicoplasto para a biossíntese de terpenos. Já foram determinadas as estruturas cristalográficas de quatro das sete enzimas da via do MEP, restando por determinar as estruturas da primeira DOXP sintase e das duas últimas enzimas IspG e IspH (TAYLOR *et al.*, 2004).

A via metabólica de purinas também é composta por sete enzimas e o estágio sanguíneo assexuado do *P. falciparum* necessita de grandes quantidades de purinas para síntese de RNA e DNA. O *P. falciparum* não apresenta a síntese de purinas *de novo* (purina auxotrófica) (REYES *et al.*, 2002, KICSKA *et al.*, 2002b).

A demanda por bases púricas faz com que o crescimento do *Plasmodium* seja sensível à interrupção das vias para o salvamento de purinas, uma enzima da via de salvamento de purinas já foi detectada em *P. falciparum* a fosforilase de nucleosídeos purínicos (PNP), (REYES *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2004).

A hipoxantina é o maior precursor púrico para o salvamento de purinas, e que o crescimento do *P. falciparum* é reduzido quando cultivado na presença da xantina oxidase, a qual esgota tanto o meio como o eritrócito de hipoxantina (BERMAN *et al.*, 1991). Outro inibidor o immunicilin-H, um análogo do estado de transição que inibe a atividade da PNP, tanto reduz a incorporação de iosina em ácidos nucleicos no *P. falciparum* pela PNP alvo, como mata o *P. falciparum* cultivado em eritrócitos humanos (KICSKA *et al.*, 2002a). O 5'-metilthio-immunicilin-H mata culturas da cepa 3D7 de *P. falciparum*, *inibe fortemente a PNP de P. falciparum, mas não a de humanos* (KETOLA *et al.*, 1999)

Alem disso, a finalização da seqüência genômica do *P. falciparum* por Gardner *et al.*, (2002) e a disponibilidade dos bancos genômicos de *Plasmodium* (<http://www.PlasmoDB.org>) Bahl *et al.*, (2002) fornece ferramentas valiosas para o descobrimento de novos alvos de drogas contra o *Plasmodium* e neste contexto está inserido este trabalho com estudos da Corismato Sintase - CS enzima da via do chiquimato do *P. falciparum*.

## 1.5- Via Bioquímica do Chiquimato.

A via do chiquimato é um alvo atrativo para o desenvolvimento de herbicidas e agentes antimicrobianos por serem essenciais em algas, plantas superiores, bactérias, protozoários apicomplexa, fungos e ausentes em mamíferos (BENTLEY, 1990; HERMANN & WEAVER, 1999; Fitzpatrick et al., 2001; COGGINS *et al.*, 2003; McConkey *et al.*, 2004).

A descrição da via funcional do chiquimato em parasitas apicomplexa, *P. falciparum* e *Toxoplasma gondii*, fornece valiosos alvos para o desenvolvimento de novos agentes anti-parasita sendo um alvo novo para o desenvolvimento da quimioterapia antimalárica para a biosíntese dos aminoácidos aromáticos (ROBERTS *et al.*, 1998). A inibição do crescimento *in vitro* de *P. falciparum* pelo herbicida glifosato foi revertida pelo tratamento com *p*-aminobenzoato, (pABA precursor do folato) sugerindo que a via do chiquimato fornece o precursor do folato para o crescimento do *P. falciparum* (McCONKEY, 1999). Foi demonstrado também que dois análogos do ácido chiquímico, 6-S-fluorchiquimato e 6-R-fluorchiquimato, inibem o crescimento de *P. falciparum* e que a inibição é específica na via do chiquimato (McCONKEY, 1999).

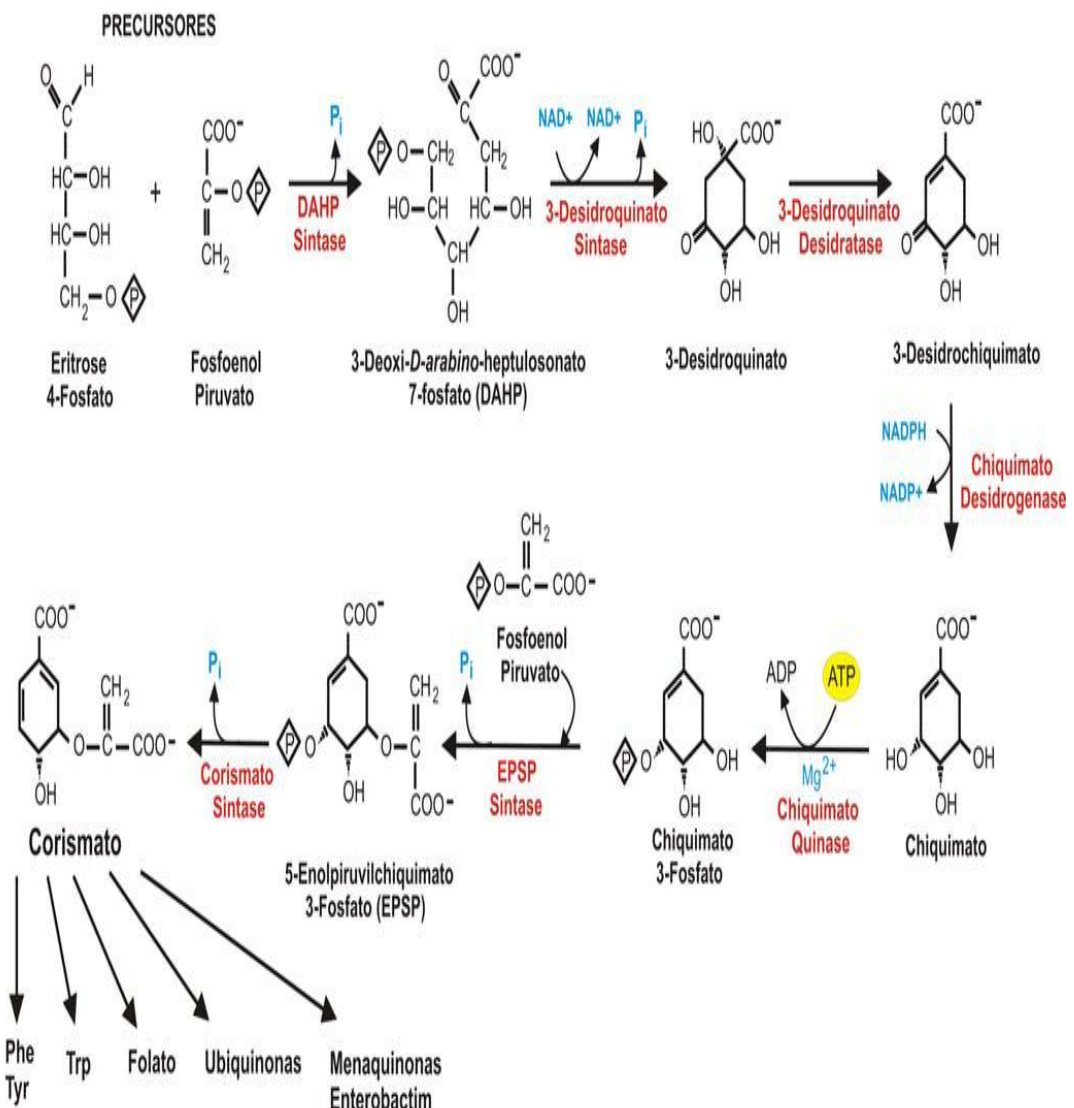
A detecção da atividade enzimática de seis das sete enzimas da via do chiquimato em extratos brutos de *P. falciparum* e *T. gondii* (DIECKMAN & JUNG, 1986; ROBERTS *et al.*, 1998), somente o gene codificando a enzima CS da via do chiquimato foi identificado no genoma do *P. falciparum* (FITZPATRICK *et al.*, 2001). A seqüência de DNA codificante da CS foi identificada e está localizada no citosol do parasita (FITZPATRICK *et al.*, 2001; MACHEROUX, 2003).

A CS de *P. falciparum* é “monofuncional”, necessitando de fonte externa de mononucleotídeo de flavina reduzido, similar a plantas e bactérias (FITZPATRICK *et al.*, 2001). Tem se demonstrado que a CS é necessária para um crescimento normal, e que a interrupção da expressão por técnica de “RNAi” RNA de interferência diminui significativamente o crescimento do parasita (McROBERT *et al.*, 2002).

A via metabólica do chiquimato liga o metabolismo de carboidratos à biosíntese de compostos aromáticos e a organização molecular das enzimas altera-se de acordo com os grupos taxonômicos (COGGINS *et al.*, 1987).

As plantas possuem um arranjo similar às bactérias (BUTLER *et al.*, 1974), com a exceção da desidroquinase (terceira enzima) e a chiquimato desidrogenase (quarta enzima) que estão presentes como domínios separados em uma cadeia polipeptídica bifuncional (MOUSDALE *et al.*, 1990).

Em fungos e parasitas do filo Apicomplexa, a via do chiquimato apresenta a 3-deoxi-D-arabino- heptulosonato 7- fosfato sintase (DAHP) e a CS como enzimas monofuncionais e um polipeptídi pentafuncional chamado AROM, responsável pelas cinco reações restantes da via do ácido chiquímico (DUNCAN *et al.*, 1987)



**Figura 07:** via metabólica do chiquimato: Precursores Fosfoenol-piruvato e eritrose 4-fosfato são convertidos em ácido corísmico (corismato). A via é composta por 7 enzimas, as quais são: 3-deoxi-D-arabino- heptulosonato 7-fosfato Sintase (DAHPS), 3-Desidroquinato Sintase (DHQS), 3-Desidroquinato Desidratase (DHQD), Chiquimato-5-Desidrogenase (SD), Chiquimato Quinase (SK), 5-Enolpiruvilchiquimato 3-fosfato Sintase (EPSPS) e Corismato Sintase (CS). Figura modificada a partir de Mathews & van Holde (1990). Fonte: Pereira (2005).

A CS é a sétima enzima da via do chiquimato, catalisa a transformação de 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato ao corismato que é o último precursor comum na biosíntese de compostos aromáticos (BASSO *et al.*, 2005).

A biossíntese de aminoácidos aromáticos é essencial e são sintetizados por vegetais e microorganismos. É sintetizada por uma via comum, a via do chiquimato. A condensação da fosfoenolpiruvato (um intermediário da glicólise) com eritrose 4-fosfato (um intermediário da via pentose fosfato), depois de várias reações forma-se o chiquimato, esse é fosforilado pela ATP e condensa-se com uma segunda molécula de fosfoenolpiruvato. O produto formado 3-enolpiruvil perde fosfato gerando o corismato, precursor comum de todos os três aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, conforme pode ser observado na **figura 07**.

Estudos realizados por Fitzpatrick *et al.*, (2001), relata que a corismato sintase do *P. falciparum* - PfCS é encontrado no apicoplasto e que esta localizado no citosol do parasita, ao contrário do que foi relatado para fungos que possui uma atividade intrínseca da redutase da flavina (FMN) (isto é bifuncional) no *P. falciparum* existe uma característica que o distingue de outros parasita, requer estritamente FMN para a atividade enzimática, identificando desse modo que a PfCS é monofuncional (McROBERT *et al.*, 2002; MACLEAN & SOHAIL, 2003).

A ausência de íntrons permite a expressão direta da CS em um sistema heterólogo através do gDNA, apesar de estar próximo dos fungos é bioquimicamente similar a proteína de plantas que é monofuncional (FITZPATRICK *et al.*, 2001).

Assim, a proteína corismato sintase de *P. falciparum* - PfCS é um possível alvo para o desenvolvimento de drogas. McConkey *et al.*, (2004) sugeriu em seus estudos a existência de uma enzima a EPSPS (5- enolpiruvil chiquimato 3-fosfato sintase) bifuncional em espécies de *Plasmodium*, contudo, evidências da atividade biológica do produto gênico ainda aguardam novos estudos.

McRoberts *et al.*, (2005) em experimentos realizados com análogos da enzima chiquimato (5ª enzima via do chiquimato) concluiu que com o avanço rápido da resistência do *Plasmodium* em relação a drogas usualmente utilizadas como a pirimetamina e o atovaquona , há uma grande necessidade para o desenvolvimento de drogas antimaláricas.

Os inibidores da via do chiquimato podem exibir baixa toxicidade porque esta via metabólica é ausente em humanos, evidenciando assim que os inibidores da via do chiquimato devem ser considerados para a terapia em combinação de antimaláricos.

Para validar a via do chiquimato como potencial inibidor para o *P. falciparum*, realizou-se neste estudo a caracterização da PfCS através de bioinformática, com a obtenção dos dados foi enfatizado a clonagem, expressão e purificação do gene otimizado da PfCS, visando obter, a proteína purificada para posteriores estudos de inibição *in-vitro* e *in-vivo*.

## **1.6 – Bioinformática.**

Segundo Arcuri (2008) bioinformática é um subgrupo do vasto campo da biologia computacional e pode ser sucintamente descrita como a utilização de técnicas computacionais para realizar a aquisição, análise e armazenamento de informações biológicas.

A bioinformática já foi utilizada na obtenção dos modelos estruturais das enzimas da via de biossíntese do chiquimato e também para a simulação por interação de inibidores com as respectivas enzimas (DE AZEVEDO *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2005; ARCURI *et al.*, 2008).

A bioinformática é essencial na busca para identificação de sensíveis homólogos de outras enzimas na via do chiquimato com baixa homologia no *Plasmodium* e em outros parasitas apicomplexa relacionados (McConkey *et al.*, 2004).

Arora *et al.*, (2007) caracterizaram seqüência de aminoácidos e estrutura 3D da proteína CS do *P. falciparum* 3D7 (XP\_966212), para explicar as funções usando ferramentas da bioinformática.

Neste trabalho, as ferramentas de bioinformática foram utilizadas rotineiramente na busca de dados, comparação de seqüências de gDNA, proteínas, produzir alinhamentos de homologia e otimização do gene da PfCS.

## 1.7 - Biologia Sintética.

Termo inicialmente utilizado para descrever uma abordagem da biologia no contexto da utilização de diferentes áreas de pesquisa para uma completa compreensão da vida, porém, recentemente a expressão tem sido usada para caracterizar uma nova área da pesquisa que combina biologia e engenharia genética para descobrir novas funções e sistemas biológicos.

Em um comentário editorial no jornal *Gene*, Waclaw Szybalski (Professor Emérito de Oncologia, da Escola Médica da Universidade de Wisconsin-Madison-USA) escreveu:

"O trabalho em nucleases de restrição não somente permite-nos construir facilmente moléculas de DNA recombinante e analisar genes individuais, mas também nos leva para *a nova era da biologia sintética* onde não somente genes existentes são descritos e analisados, mas também novos arranjos de genes podem ser construídos e avaliados"

A biologia sintética é um campo realmente interdisciplinar, envolvendo químicos, biólogos, engenheiros, físicos ou cientistas da computação, tem o potencial de impactar diversas áreas da sociedade. Avanços da biologia sintética, em particular a síntese calculada de complexos sistemas biológicos, têm a capacidade de mudar a forma de chegarmos a muitas tecnologias-chave e aplicações biotecnológicas, como é o caso neste estudo da otimização e síntese do gene da proteína corismato sintase de *P. falciparum* para expressão em sistema procaríoto.

Segundo Garfinkel *et al.*, (2007), um dos alvos principais da biologia sintética é facilitar e projetar a biologia. Os esforços principais na biologia sintética são feitos para desenvolver uma caixa de ferramentas para criar sistemas biológicos sem ter que atravessar uma pesquisa e um processo maciços da tecnologia e pode finalmente desencadear a capacidade plena da biotecnologia (GARFINKEL *et al.*, 2007).

Em relação a proteínas, a estrutura de domínio funcional independente do número de proteínas sugere a possibilidade para recombinações específicas que podem ser explorados reprogramando o DNA específico do domínio ou vias obrigatórias da sinalização (PANKE & HEINEMANN, 2006).

## 1.8 – Síntese Gênica.

Constitui várias técnicas de análises moleculares que permitem estudos de caracterização, expressão e modificações no genoma de organismos, com a conseqüente alteração das capacidades de cada espécie (CANDEIAS, 1991).

Um gene que contém códon raramente usado pelo hospedeiro, menos provável será a expressão heteróloga da proteína de interesse (KANE, 1995), citado por Gustafsson *et al.*, (2004), e que o baixo nível de expressão é agravado se os códons raros aparecer na porção N-terminal da proteína. Uma estratégia para melhorar a expressão nestes casos é alterar os códons raros do gene alvo de modo que tenha homologia mais próxima do gene de interesse, sem modificar a seqüência de aminoácido codificados da proteína e a técnica utilizada é a síntese do gene por completo (NAMBIAR *et al.*, 1984; KINK *et al.*, 1991).

Estudos realizados por Yadava & Ockenhouse (2003) com objetivo de selecionar um sistema de alto nível de expressão para exigir menos manipulação e adquirir à estrutura nativa do gene, os autores determinaram os efeitos da modificação dos códons na expressão do *P. falciparum*, que tem o genoma rico em A+T, *Pichia pastoris* e *E. coli*, constatou-se que é muito difícil a expressão em sistemas heterólogos e que a proteína produzida em *Pichia*, entretanto, era superior nos termos de seus níveis da expressão, solubilidade e atividade biológica quando utilizado a otimização do gene.

O uso de genes sintéticos oferece mecanismo importante e podemos ter maior controle da expressão heterólogas da proteína. Assim como as polarizações de manipulação dos códons. Os códons iniciadores dos peptídeos podem ser adicionados, os locais removidos, emendados e colocados os locais de paradas como desejados (GUSTAFSSON *et al.*, 2004).

A degeneração do código genético permite muitas seqüências alternativas dos ácidos nucléicos de codificar a mesma proteína. As freqüências com que os códons diferentes são usados variam significativamente entre organismos, entre a expressão de proteínas de baixo ou alto nível dentro do mesmo organismo, e às vezes dentro do mesmo Operon (GOUY & GAUTIER, 1982).



## **2.0 – OBJETIVOS.**

### **2.1 - Geral**

- Expressar e purificar a proteína corismato sintase do *P. falciparum* em sistema procaríoto.

### **2.2 – Específicos.**

#### **2.2.1 – Primeira Etapa**

- Caracterizar por bioinformática o gene da proteína corismato sintase;
- Desenhar os oligonucleotídeos e amplificar o gene da corismato sintase de *P. falciparum* através da técnica PCR;
- Clonar e expressar o gene da corismato sintase através de técnicas de biologia molecular.

#### **2.2.2 – Segunda Etapa**

- Otimizar, sintetizar e seqüenciar o gene da corismato sintase para sistema procaríoto;
- Clonar o gene sintético da corismato sintase em vetor PUC 57 e pGS21a;
- Transformar o gene recombinante pGS21a/CS em células competentes BL21 (DE3) pLys;
- Expressar a proteína corismato sintase do *P. falciparum* em *E. coli*;
- Purificar e quantificar a proteína corismato sintase.

### 3. 0 - MATERIAIS E MÉTODOS.

#### 3.1 – Ferramentas de Bioinformática.

Entre as atividades desenvolvidas neste trabalho o primeiro passo dado foi à caracterização da PfCS por ferramentas de bioinformática, utilizou-se parâmetros baseados nas características particulares da proteína do *P. falciparum*, como os dados mostrados na **tabela 09** no item 4.1 resultados.

A seqüência completa do genoma do *P. falciparum* está disponível (GARDNER *et al.*, 2002), sendo um fator favorável para o estudo. A seqüência de aminoácidos da proteína corismato sintase da cepa 3D7 (CDS) do *P. falciparum* foram localizados na base de dados do NCBI - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), número do código ID 86171441 ou XM\_961119.

A caracterização da CS foi obtida através de buscas em diversos endereços eletrônicos, entre os principais destacam-se os descritos na **tabela 05** e os resultados obtidos são os apresentados nas **tabelas 09 e 10**.

**Tabela 05:** programas e bancos de dados freqüentemente utilizados.

| Programas utilizados         | Função         | Endereço eletrônico   |
|------------------------------|----------------|---|
| <b>NetPhos 2. 0</b>          | Fosforilação   | <a href="http://www.cbs.dtu.dk">www.cbs.dtu.dk</a>                |
| <b>Clustalw 2.0</b>          | Alinhamentos   | <a href="http://www.clustal.org">www.clustal.org</a>              |
| <b>Optimizer</b>             | Otimização     | <a href="http://genomes.urv.cat">http://genomes.urv.cat</a>       |
| <b>DictyOGlyc 1.1</b>        | Glicosilação   | <a href="http://www.cbs.dtu.dk">www.cbs.dtu.dk</a>                |
| <b>PrePS</b>                 | Prenilação     | <a href="http://mendel.imp.ac.at">http://mendel.imp.ac.at</a>     |
| <b>PI-Compute pI/Mw tool</b> | pH             | <a href="http://ca.expasy.org">http://ca.expasy.org</a>           |
| <b>Webcutter 2.0</b>         | Mapeamento     | <a href="http://rna.lundberg.gu.se">http://rna.lundberg.gu.se</a> |
| <b>PlasmoDB</b>              | Banco de dados | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>    |

#### 3.2 - Técnica de Extração e Quantificação de gDNA.

Na extração de gDNA é fundamental manter a integridade das moléculas, as quais devem permanecer inalteradas durante os procedimentos de extração, pois as informações contidas no DNA dependem diretamente da seqüência. No isolamento e purificação de ácidos nucléicos, é necessário separar efetivamente todos os demais constituintes celulares.

Conforme Sambrook *et al.*, ( 2001), o primeiro passo é a ruptura de tecidos para a liberação dos componentes celulares com a lise da membrana celular com

detergentes como o sódio dodecil sulfato - SDS e ácido etilenodiamino tetraacético - EDTA, estes tampões devem possuir um pH entre 8,0 e 9,0 que é desfavorável à ação de nucleases. Em seguida, remover os resíduos celulares e precipitar as proteínas por centrifugação. Este processo é obtido através de um tratamento com fenol-clorofórmio, esses solventes orgânicos desnaturam as proteínas e enzimas, que através de centrifugação permanecem na fase aquosa superior enquanto os ácidos nucleicos permanecem na fase orgânica inferior, pode-se fazer uso de proteases (proteína K) para facilitar a separação do DNA das proteínas da cromatina.

A eliminação do RNA por solubilidade diferencial em sais sob altas concentrações de acetato de sódio 7,5 M, onde, sob a presença de alcoóis e sal forma um efeito precipitante e quando seco pode-se ressuspender o precipitado em tampão Tris-EDTA - TE e conservar em temperatura a  $-20^{\circ}\text{C}$  (BERTIOLI *et al.*, 1995).

Neste trabalho, para a extração do gDNA utilizou-se o método Fenol-Clorofórmio, partindo de um volume de 200  $\mu\text{L}$  com hemácia parasitada de *Plasmodium* na forma de trofozoítos a 5% em meio RPMI 1640 (GIBCO<sup>®</sup>), com cepa 3D7 de *P. falciparum*, elevando-se o volume para 1 mL com solução PBS 1X e acrescentando-se 100  $\mu\text{L}$  de saponina 1%; após hemólise, centrifugou-se e desprezou-se o sobrenadante, lavou-se o sedimento por duas vezes com PBS 1X; para desnaturar proteínas e enzimas foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O destilada, 25  $\mu\text{L}$  do tampão de lise e 2  $\mu\text{L}$  de proteinase K 10mg/mL e deixado a  $37^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 16 horas; após adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O destilada, deixando em repouso por 5 minutos, em seguida adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de fenol e 250  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, misturou-se em vortex, e centrifugou-se por 5 minutos, recuperando-se a fase aquosa ; foi transferido a fase aquosa para um tubo tipo eppendorf contendo 45  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio (pH 5,0) 3 M, adicionou-se 800  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto gelado misturando-se por inversão, colocando a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2 horas; na fase de recuperação do gDNA elevou-se o conteúdo com 800  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado, centrifugou-se por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , após descartou-se o sobrenadante, deixou-se os tubos invertidos para secagem do precipitado a temperatura ambiente - TA, quando seco ressuspendeu-se com 40  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA - TE e armazenou-se a  $-20^{\circ}\text{C}$ . (Adaptado de Snounou, 1996).

### 3.3 - Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.

Técnica descrita por Kary Mullis em meados da década de 80. Desde a sua elaboração causou uma verdadeira revolução nas pesquisas (BAUER *et al.*, 1994). Durante a PCR são utilizadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleotídeos iniciadores “*primers*” (MITCHELL *et al.*, 1997).

Para realizar a PCR foi utilizada uma pequena quantidade do DNA alvo, um tampão salino contendo a DNA polimerase, oligonucleotídeos iniciadores, os quatro desoxinucleotídeos constituintes do DNA e  $Mg^{2+}$ . Esta mistura foi submetida a 03 ciclos e 35 repetições que consistem em três fases distintas: desnaturação, anelamento e extensão. Os oligonucleotídeos iniciadores sintéticos foram desenhados baseados na seqüência do genoma completo do *P. falciparum* número ID XM\_961119. 1 (GARDNER *et al.*, 2002).

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores sense **Chor.sy – S 5’ CGC GGA TCC ATG AGC ACA TAT GGG ACT 3’** e antisense **Chor.sy – AS 5’ GCG GAG CTC TTA CAT ATT CCT AAA CAA 3’**, para serem complementares as extremidades 5’ e 3’, respectivamente, do gene *aroC* que codifica a enzima PfCS cepa (3D7) localizado no cromossomo 6, obtidos do banco genômico de *P. falciparum* <http://www.PlasmoDB.org> (BAHL *et al.*, 2002) nº **PF1105c**, contendo sítios de restrição ***Bam*HI – S GGA TCC** na região sense e ***Xho*I – AS GAG CTC** na região antisense. O uso de materiais e procedimentos está descritos conforme a **tabela 04, 05 e figura 10**.

**Tabela 06:** Protocolo de Amplificação do gene da Proteína CS por PCR.

| <b>Soluções</b>                       | <b>Branco</b> | <b>Teste</b>  |
|---------------------------------------|---------------|---------------|
| <b>Tampão 5x (50mM/mL)</b>            | <b>5 µL</b>   | <b>5 µL</b>   |
| <b>dNTPs 10x (10mM/mL)</b>            | <b>2,5 µL</b> | <b>2,5µL</b>  |
| <b>Primer Sense 0,5 pmoles/µL</b>     | <b>1 µL</b>   | <b>1 µL</b>   |
| <b>Primer AntiSense 0,1 pmoles/µL</b> | <b>1 µL</b>   | <b>1 µL</b>   |
| <b>Taq/DNA-polimerase 5U/µL</b>       | <b>0,2 µL</b> | <b>0,2µL</b>  |
| <b>Amostra gDNA</b>                   | <b>-</b>      | <b>1 µL</b>   |
| <b>H2O</b>                            | <b>15,3µL</b> | <b>14,3µL</b> |
| <b>Volume total</b>                   | <b>25 µL</b>  | <b>25 µL</b>  |

**Tabela 07:** Programa do Termociclador Biosystems Mod. MJ96+/MJ96G \* para desnaturação, anelamento e extensão.

| <b>Primeiro ciclo</b> | <b>Temperatura °C</b> | <b>Tempo</b> | <b>Repetição</b> |
|-----------------------|-----------------------|--------------|------------------|
| Desnaturação          | 94°C                  | 45s          | -                |
| Anelamento            | 45°C                  | 45s          | -                |
| Extensão              | 72°C                  | 90s          | 10               |
| <b>Segundo ciclo</b>  | <b>Temperatura °C</b> | <b>Tempo</b> | <b>Repetição</b> |
| Desnaturação          | 94°C                  | 45s          | -                |
| Anelamento            | 55°C                  | 90s          | -                |
| Extensão              | 72°C                  | 90s          | 25               |
| <b>Terceiro ciclo</b> | 72°C                  | 10min        | 01               |

### 3.4 - Purificação do Produto da PCR.

O produto da PCR foi purificado pelo Kit QIAquick PCR Purificação 250 (QIAGEN – USA) , com algumas modificações: Seccionado o fragmento do gel com aproximadamente 150 µL e adicionou-se em 600 µL de tampão QG (Kit), aquecendo-o em banho seco a 50°C até dissolução completa da agarose, foram acrescentados 300 µL de álcool isopropanol e deixado em repouso por 10 minutos TA, foi transferido todo o material para coluna e centrifugou-se por 1 minuto a 8.000 rpm, após descartou-se o filtrado e a coluna foi lavada com 750 µL do tampão PE por duas vezes e uma terceira vez sem o tampão PE para secagem completa, a coluna foi transferida para um tubo tipo eppendorf novo e ressuspendeu-se o sedimento com 40 µL de tampão EB, conforme recomendado pelo fabricante, a amostra purificada foi estocada à -20°C.

### 3.5 - Ligação do Amplicon aos Vetores de Clonagem e Subclonagem.

O produto amplificado por PCR e purificado conforme item 3.4, foi utilizado para ligação do gene da proteína PfCS aos vetores de clonagem pGEM –T Easy (Promega-USA), pDRIVE (QIAGEN-USA), pTZ57R/T(Fermenta-USA) e TOPO TA (Invitrogen, USA) e vetores de subclonagem como pRSETA e pRSETC (Invitrogen-USA) foi usado 0,5 µL do vetor, 1,0 µL do amplicon purificado, 2,5 µL do tampão de ligação 2X, 0,5 µL de DNA ligase, completando com H<sub>2</sub>O para um volume final de 5,0 µL, incubou-se por duas horas em temperatura de 16 - 20°C, procedimento utilizado para todos os vetores.

### **3.6 - Preparo de Células Quimiocompetentes.**

O preparo das células quimiocompetentes realizou-se de acordo como descrito por Ausubel *et al.*, (1999) com algumas modificações, foram utilizadas as linhagens de DH5 $\alpha$ , DH10 $\beta$ , TOP10F', BL21 (DE3) pLys.

Em 10 mL de meio líquido Luria Bertani - LB acrescentou-se uma colônia da cepa de interesse para crescimento por 2 horas e 30 minutos a 37°C em movimento, evitando-se contaminações. Após este período acrescentou-se meio até um volume final de 50 mL e deixou-se as bactérias em crescimento a 37°C em movimentação até uma densidade ótica  $A_{600nm} = 0,6$ , em seguida coletou-se as bactérias centrifugando-se a 3.500 rpm por 5 minutos a 4°C, desprezou-se o sobrenadante e a partir desse passo o produto foi mantido sempre no gelo. Com 20 mL de tampão 1(TFB1) KOAc (0,294 g); MnCl<sub>2</sub> ( 0,99 g); KCl (0,746 g); CaCl<sub>2</sub> (0,147 g); Glicerol (15 mL) para 100 mL, homogeneizou-se o sedimento evitando grandes choques mecânicos, incubando-se por 30 minutos no gelo e posteriormente centrifugado-se a 3.500 rpm por 15 minutos a 4°C para coleta do precipitado e este foi suspenso com 2 mL de tampão 2 TFB2 10mM Na-MOPS pH 7,0; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10mM KCl e 15% de glicerol para 100 mL. Em eppendorf de 1,5 mL coletou-se alíquotas de 200  $\mu$ L e armazenou-se a - 80°C.

### **3.7 – Transformação em Células Competentes DH5 $\alpha$ e DH10 $\beta$ .**

Para a transformação foi utilizado o produto da ligação da proteína PfCS em vetor de clonagem pGEM – T Easy (Promega-USA), a transformação foi realizado com células competentes DH5 $\alpha$  e DH10 $\beta$  e a retransformação foi obtida com vetor de subclonagem pRSETA, observando o seguinte protocolo: 2  $\mu$ L da amostra, 50  $\mu$ L de células competentes, 20 minutos no gelo, choque térmico à 42°C por 1 minuto, retorno ao gelo por mais 15 minutos, após retirada do gelo foi adicionado 150  $\mu$ L de SOC, incubou-se a 37°C por 30 minutos; logo após foi semeadas as placas com LB-AGAR, ampicilina 100  $\mu$ g/mL e 20  $\mu$ L de X-gal 50  $\mu$ g/mL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside) e 4  $\mu$ L de IPTG 1M (isopropiltio- $\beta$ -D-galactosídeo), levou-se a estufa a 37°C durante 16 horas e conservado a 4°C.

### 3.8 - Extração de DNA Plasmidial por Lise Alcalina - Miniprep.

Entre as técnicas de DNA recombinante normalmente utilizada, a purificação de DNA plasmidial consiste naquela mais básica e fundamental, necessária para quase todos os fins, seja para clonagem, expressão ou seqüenciamento.

O método mais utilizado para o isolamento e purificação de DNA plasmidial se baseia na lise alcalina, proposto originalmente por Birnboim e Doly (1979) sendo um método que apresenta bons resultados qualitativos e quantitativos.

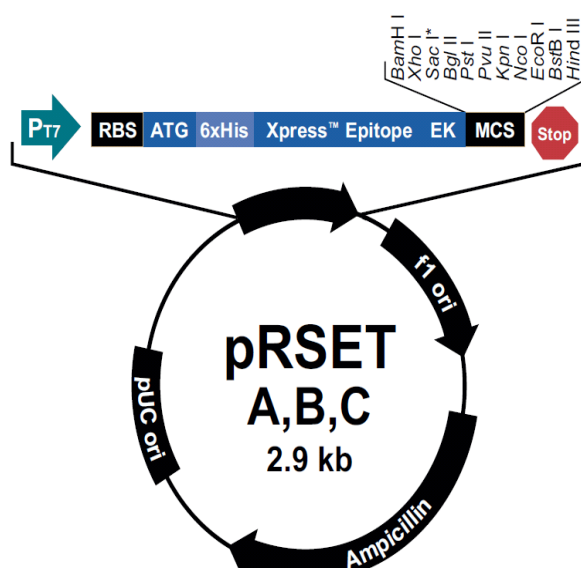
O método de extração utilizado neste estudo iniciou-se com a coleta do sedimento da cultura de bactérias DH5 $\alpha$  ou DH10 $\beta$ , foram inoculadas individualmente em 2 mL de meio LB líquido (triptona 1g, extrato de levedura 0,5g e NaCl 1g), contendo ampicilina 100  $\mu$ g/mL deixando crescer por 16 horas a 37°C. No dia seguinte transferiu-se a cultura de bactérias para tubo tipo eppendorf, centrifugou-se por 3 minutos a 12.000 rpm e desprezou-se o sobrenadante em local adequado.

O sedimento foi ressuspensão com 200  $\mu$ L do tampão 1 (TrisCL pH 7.5 1 M, 1g Glicose, 2 mL EDTA 0,5 M para 100 mL H<sub>2</sub>O destilada); as bactérias foram lisadas adicionando 400  $\mu$ L do tampão 2 (4 mL NaOH 5 M, 5 mL SDS 20% para 100mL H<sub>2</sub>O destilada), deixando-se em repouso em temperatura ambiente –TA por 10 minutos. Após agitar gentilmente por inversão e precipitar as proteínas adicionou-se 300  $\mu$ L do tampão 03, 60 mL 5 M KAc, 11,5 mL ácido acético glacial e 28,5 mL H<sub>2</sub>O, para volume final de 100 mL, homogeneizou fortemente e deixou-se 5 minutos no gelo; as proteínas foram sedimentadas centrifugando à 12.500 rpm durante 5 minutos à 4°C; coletou-se o sobrenadante para novo tubo tipo eppendorf e precipitou-se com 600  $\mu$ L de Isopropanol - PA gelado, deixando-se por 10 minutos em TA; depois do repouso centrifugou-se à 12.000 rpm durante 5 minutos à 4°C e o sobrenadante descartado; lavou-se o sedimento com 250  $\mu$ L de etanol 70% gelado com prévia agitação e posterior centrifugação durante 2 minutos à 12.000rpm; após secagem do sedimento em TA com tubo invertido sobre papel absorvente, solubilizou-se o sedimento com 30  $\mu$ L de TE 1X 10mM e 1mM EDTA com 1  $\mu$ L de RNase 10  $\mu$ g/mL e armazenou-se em temperatura de 20°C negativos, para posterior realização de gel agarose **figura 11**, posteriormente realizou-se a digestão enzimática para verificar a inserção do fragmento ao vetor.

### 3.9 –Digestão com Enzima de Restrição.

Utilizou-se 1  $\mu\text{L}$  do tampão 03 10x, 0,6  $\mu\text{L}$  das respectivas enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I 5U/ $\mu\text{L}$ , 6  $\mu\text{L}$  do produto miniprep 100 pg/ $\mu\text{L}$ , e 2,4  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O destilada. Em seguida este conteúdo foi incubado a 37°C por 2 horas, o resultado foi verificado com gel de agarose a 0,8% com 1  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio por 1 hora a 100V no aparelho Electrophoresis Power Supply – EPS 601 Amersham Biosciences. A digestão do plasmídeo recombinante com vetor de subclonagem pRSETA confirmou a inserção do gene da PfCS, o mapa do vetor pode ser observado na **figura 08** e o resultado pode ser visualizado na **figura 12**.

Além das tentativas descritas acima, outras foram realizadas e não descritas aqui. No entanto, após vários experimentos com ajuste de tempo, temperatura, quantidade enzimática, variação de vetores clonagem e expressão, bem como diversos kits de materiais, não foram obtidos os resultados esperados quanto à clonagem e expressão da PfCS com o gene não sintetizado, a partir deste ponto os experimentos foram realizados com o gene sintetizado.



**Figura 08:** Mapa do vetor de expressão pRSETA (Invitrogen-USA).

### 3.10 - Aquisição do Gene Sintético da PfCS.

Em reunião com a equipe técnica do CEPEM/IPEPATRO e consulta com o Prof. Dr. Spartaco da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, decidiu-se após análise geral que a síntese do gene da PfCS seria uma solução, devido há



determinados códons que são usados preferencialmente pelo *P. falciparum* e são usados raramente pelos genes de alta expressão pela *Escherichia coli*.

Foi então adquirido o gene sintético da PfCS junto a empresa GenScript Corporation-USA e o material foi entregue após 4 semanas por um valor de U\$ 0,35 por par de bases, foi otimizado 1595 pares de bases totalizando num valor final de U\$ 558,2 dólares, com o gene da corismato sintase já clonado em vetor PUC57 e pGS21a de expressão e liofilizado nos dois plasmídeo PUC57 (clonagem) e pGS21a (expressão). A partir deste ponto os trabalhos foram realizados com o gene da PfCS otimizado para expressão e purificação em sistema procarioto. Constatamos então as vantagens do custo x benefício x tempo.

### **3.11 - Otimização do Gene da PfCS Através da Bioinformática.**

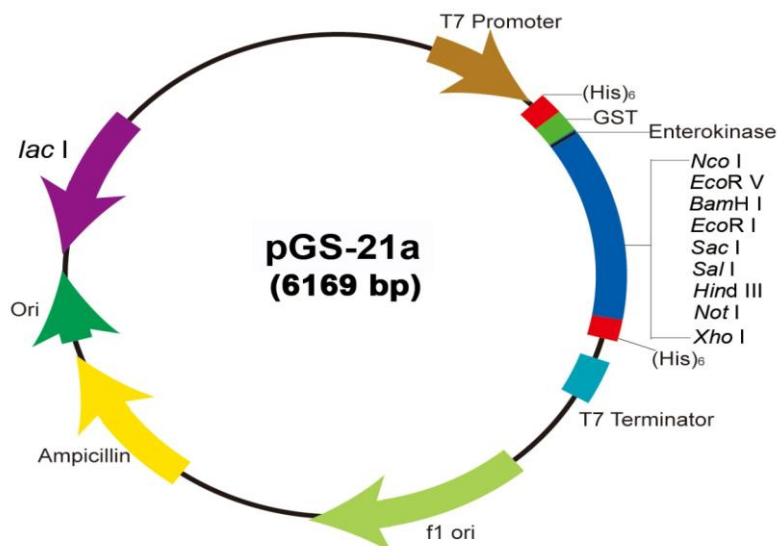
Utilizando o software <http://genomes.urv.cat/OPTIMIZER>, foi introduzido a seqüência de DNA do gene da PfCS, tendo como critérios de otimização “Um aminoácido - um códon”. Dos 1.593 nucleotídeos da seqüência do gene da PfCS, foram detectado 1302 nucleotídeos em harmonia, 200 transições e 91 transversão entre a seqüência submetida e a seqüência aperfeiçoada (otimizada) como pode ser visualizado nos **itens 4.1.2 e 4.1.3**.

### **3.12 – Replicação do Gene Sintetizado da PfCS.**

Foram recebidos da empresa o gene da PfCS clonados em PUC57 e pGS21a e transformados em bactérias TOP10F’.

Foi coletada com auxílio de alça microbiológica uma colônia dos respectivos recipiente e adicionada em tubo de ensaio, contendo 2 mL de LB-líquido, juntamente com 2 µL ampicilina (100 µg/mL), Incubou-se em estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas sob agitação, para posterior realização de extração de DNA plasmidial.

O plasmídeo liofilizado pGS21a foi ressuspenso em 10 µL de água milliq e retransformado em bactéria TOP 10F’. As características do vetor pGS21a pode ser verificada na **figura 09**.



**Figura 09:** Mapa do Vetor de Expressão pGS21a (Invitrogen-USA).

### 3.13 – Extração de DNA Plasmidial – Miniprep do gene Sintético da PfCS.

A extração plasmidial foi realizada com Kit QIAGEN-USA, conforme recomendado pelo fabricante com algumas modificações: centrifugou-se o inoculo á 14.000 rpm por 1 minuto, descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se com 250 µL de Tampão P1 (Glicose 50 mM Tris-HCl 1 M pH 8,0 ,25 mM Tris-HCl pH 8,0 e EDTA 0,5 M pH 8,0 10 mM Na<sub>2</sub>), logo após foi adicionado 250 µL do tampão P2 (NaOH 1N 0,2 M NaOH; SDS 10% para 1 mL SDS 10% e água deionizada para 10 mL) homogeneizou-se por inversão até se formar uma substancia viscosa, adicionou-se 350 µL do tampão N3 (3M KOAc, pH 5,5), homogeneizou-se delicadamente e centrifugou-se a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo eppendorf/coluna após centrifugação por 1 minuto descartou o filtrado, lavou-se a coluna com 500 µL do Tampão PB e descartou-se o filtrado. Em seguida lavou-se a coluna novamente por centrifugação com 750 µL de Tampão PE, para não permanecer nenhum resíduo de tampões centrifugou-se novamente a coluna por 1 minuto sem acréscimo de nenhuma substância. Colocou-se a coluna em um tubo eppendorf de 1,5 mL novo e adicionou-se 50 µL de Tampão EB, deixou-se em repouso por 1 minuto e centrifugou-se por 1 minuto. O produto final foi armazenado à -20°C, para posterior digestão enzimática.

### **3.14 - Digestão Enzimática do Plasmídio pGS21a-CS com *Nco*I e *Sa*II.**

Os plasmídeos extraídos do miniprep foram submetidos à digestão enzimática com 6 µL da amostra, 2 µL tampão 3, 1,5 µL enzima de restrição *Nco*I e 7 µL de H<sub>2</sub>O. Deixou-se esta mistura por 2 horas a 37°C em estufa, após este tempo inativou-se a 65°C por 10 minutos e adicionou-se 2 µL do tampão “D” e 1,5 µL de enzima restrição *Sa*II e incubou-se novamente a 37°C por mais 2 horas, em seguida submeteu-se a eletroforese em gel agarose 0,8% **figura 13**.

### **3.15 – Transformação do Plasmídio pGS21a-CS Recombinante.**

O Plasmídio pGS21a-PfCS recombinante foi transformado em células quimiocompetentes BL21 (DE3) pLys, como descrito no item 3.6 e **figura 14**.

### **3.16 - Expressão da PfCS com Gene Sintetizado.**

Foram realizados testes de indução/expressão para verificar qual o melhor tempo de expressão, temperatura e concentração de IPTG para indução do promotor do gene clonado da proteína. A cada hora de indução foi retirado uma alíquota, até o período de 6 horas. A constatação foi através de gel de poliacrilamida *SDS-PAGE*. Os testes foram realizados em 9 frascos tipo Erlenmeyer com 25 mL de LB-líquido, 25 µL de IPTG 0,1M e 25 µL de ampicilina 100 µg/mL, com diluição de 1:100, 1:10 e 1:1, respectivamente nas temperaturas 37°C, 30°C e 20°C, foram coletados a cada hora alíquota de 1 mL de cada frasco e centrifugados a 4°C por 5 minutos a 12.000 rpm, no sedimento adicionou-se 100 µL tampão azul de corrida e após aquecimento a 95°C por 5 minutos, realizou-se um gel de poliacrilamida *SDS-PAGE* 12%, para constatação, padronização da melhor temperatura e tempo médio em horas para expressão da PfCS, figura não mostrada.

Para a expressão foram coletadas 2 colônias de BL21(DE3) pLys com o vetor de expressão pGS21a, adicionou-se a um tubo de ensaio de 10 mL com 2,0 mL de LB-líquido, 2µL de ampicilina 100 mg/mL e 2µL de cloranfenicol 34 mg/mL. Incubou-se sob agitação 150 rpm durante 16 horas a 37°C. Após transferiu-se cada uma das amostras para um frasco com 250 mL de LB-líquido, 250 µL de ampicilina 100 mg/mL e 80 µL de cloranfenicol 34 mg/mL, incubou-se a 37°C para crescimento até a densidade ótica de 0,8 conseguida após 3 horas.

Após retirou-se de cada amostra 20 mL para controle negativo e o restante foi induzido com 210 µL de IPTG 0,1M por 3h30min a 37°C. (foi optado pela indução em 3h30min, pois nos testes de expressão apontou que os melhores resultados obtidos foram entre a terceira e quarta hora de indução) **Figura 15.**

### 3.17 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE.

Abaixo na **tabela 08** pode ser verificado o protocolo de padronização e confecção do gel de poliacrilamida utilizado neste estudo. Para revelação do gel poliacrilamida *SDS-PAGE* foi utilizado uma solução corante feita com 200 mL da solução descorante descrita abaixo e 240 mg de *coomassie* azul brilhante.

A solução descorante foi feita com 400 mL de álcool etílico absoluto, 100 mL de ácido glacial e 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

**Tabela 08:** Padronização e composição do gel poliacrilamida SDS-PAGE gel de corrida 12% e gel de empacotamento 4%.

| <b>Gel corrida 12%</b>                  | <b>Gel empacotamento 4%</b>      |
|---|----------------------------------|
| <b>Acrilamida 30% = 2,0 mL</b>          | Acrilamida 30% = 350 uL          |
| <b>Tris 1M pH 8,8 = 1,87 mL</b>         | Tris 1M pH 6,8 = 315 uL          |
| <b>Persulfato de amônia 2% = 250 uL</b> | Persulfato de amônia 2% = 120 uL |
| <b>H2O destilada = 750 uL</b>           | H2O destilada = 1,7 mL           |
| <b>SDS 10% = 100 uL</b>                 | SDS 10% = 25 uL                  |
| <b>Temed = 12 uL</b>                    | Temed = 12 uL                    |

### 3.18- Solubilização e Purificação da PfCS com Kit Qiagen 6x Histidina com Coluna de níquel – Ni-NTA.

No sedimento obtido da expressão foi adicionado o tampão de lise composto por 200 µL de EDTA 0,5 M, 1 mL de NaCl 5 M, 100 µL de Tris 1 M, 100 µL de Triton 1% e H<sub>2</sub>O destilada até completar o volume final de 10 mL. Deixou-se em repouso a temperatura ambiente por 1 hora, em seguida o conteúdo foi passado 10 vezes por uma agulha em seringa de 20 mL, em substituição a benzoanase nuclease; centrifugou-se a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C, coletou-se o sedimento onde supostamente estava presente a proteína recombinante.

O sedimento foi ressuspenso em 15 mL de tampão PBS 1 X, realizando-se 4 lavagens por centrifugação por 5 min., 4.000 rpm a 4°C, sendo o sedimento

ressuspenso e homogeneizado a cada lavagem. Após as lavagens a amostra foi solubilizada com 5 mL de tampão solubilizador em pH 9,0 (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCL, 8 M uréia, pH 9,0).

O produto solubilização foi aplicado na coluna Ni-NTA em condições desnaturante, realizando-se uma lavagem da coluna com tampão 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris.HCL, 8 M uréia, pH 6,3 em seguida foi aplicado na coluna 1 mL do tampão de eluição 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris.HCL, 8 M uréia, pH 4,5, coletado-se 5 µl de todas as etapas para realização de SDS-PAGE e as frações dos produtos finais foram armazenadas a - 20°C. Todas as etapas da purificação foram analisadas em *SDS-PAGE* 12%, resultados da solubilização e purificação da amostra podem ser visualizados nas **figuras 16 e 17**.

### **3.19- Western Blot da PfCS.**

Utilizando-se tampão transferência (Tris 49 mM, glicina 39 mM, 200 mL etanol P.A., para um volume final de 1000 mL com H<sub>2</sub>O e membrana nitrocelulose, realizou-se o arranjo no equipamento de transferência e o procedimento transcorreu por 1 hora a 15V; realizou-se o bloqueio com leite desnatado a 5% com PBS 1X pH 7,4, incubando-se por 16 horas a 20°C. Em seguida a membrana foi lavada por 3 vezes em PBS 1X pH 7,4 + Tween 0,05% durante 10 minutos sob agitação, após as lavagens incubou-se a membrana em 37°C com o anticorpo anti-histidina de camundongo por 1 hora com diluição 1:1000 em leite desnatado 5% + PBS 1X pH 7,4, ao término deste procedimento lavou-se a membrana por 3 vezes sob agitação com solução PBS 1X pH7,4 + Tween e incubou-se novamente com anticorpo secundário IgG anti-Mouse com diluição 1:2000 em leite desnatado 5% + PBS 1X pH 7,4 durante 1 hora e lavou-se novamente por 3 vezes com PBS 1X pH 7,4 + Tween por 10 minutos, foi revelado com substrato cromógeno durante 10 minutos **figura 18**.

## 4.0 - RESULTADOS.

### 4.1 - Descrição da PfCS por Ferramentas de Bioinformática.

Depois de acurada busca em diversos endereços eletrônicos e análises com vários programas de bioinformática como os descritos no item 3.1 chegamos aos resultados descritos na tabela 09 e 10, identificando as principais características da PfCS.

**Tabela 09:** Caracterização da proteína PfCS por bioinformática.

| <b>Proteína</b>                    | <b>Corismato sintase</b>   |
|------------------------------------|--|
| <b>Organismo</b>                   | P. falciparum cepa 3D7 (CDS)   |
| <b>Via metabólica</b>              | Via do chiquimato  |
| <b>Posição no gene</b>             | Cromossomo 6 aroC  |
| <b>Identificação PlasmoDB/NCBI</b> | PFF1105c (PlamoDB)   |
| <b>Identificação NCBI-gene ID</b>  | 86171441 e XM_961119   |
| <b>Tamanho</b>                     | 1584 pb  |
| <b>Nº de aminoácidos</b>           | 527  |
| <b>Peso molecular</b>              | 59,6 kDa   |
| <b>Fórmula</b>                     | C2629H4130N712O820S26  |
| <b>Enzima corismato sintase</b>    | 5-Enolpiruvilchiquimato3-Fosfato EPSP                                      |
| <b>Ponto isoelétrico</b>           | pH - 6.76  |
| <b>Processo de biossíntese</b>     | Família Aminoácidos Aromáticos   |
| <b>Doença</b>                      | Malária  |
| <b>Fosforilação</b>                | Ser: 21 Thr: 4 Tyr: 10   |
| <b>Homologia humana</b>            | Não  |
| <b>Notado no genoma</b>            | Sim  |
| <b>Aminoácidos + freqüentes</b>    | Asn (N) 56 10.6%,<br>Ile (I) 52 9.9%<br>Lys (K) 44 8.3%<br>Ser (S) 43 8.2% |
| <b>Resíduos carregados ( - )</b>   | (Asp + Glu): 62  |
| <b>Resíduos carregados ( + )</b>   | (Arg + Lys): 61  |

**Tabela 10:** Sequências Produzindo Alinhamentos Significativos de homologia com o *P. falciparum*:  
 Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov

| Acesso      | Descrição  | Contagem Máxima | Contagem Total | Cobertura | Valor | Ident. Máxima |
|-------------|--|-----------------|----------------|-----------|-------|---------------|
| XM_961119.1 | <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 Corismato sintase ( PFF1105c ) mRNA, completo CDS | <u>2926</u>     | 2926           | 100%      | 0.0   | 100%          |
| CR382400.1  | <i>Plasmodium falciparum</i> Cromossomo 6, completo - CDS; segmento 3/5            | 2926            | 2926           | 100%      | 0.0   | 100%          |
| F008549.1   | <i>Plasmodium falciparum</i> Corismato sintase, AroC mRNA, complete CDS.           | 2904            | 2904           | 100%      | 0.0   | 99%           |
| XM_738578.1 | <i>Plasmódio chabaudi</i> chabaudi, Corismato sintase (PC000086.03.0) mRNA parcial | 231             | 231            | 17%       | 5-57  | 82%           |

#### 4.1.2 – Sequência em Formato FASTA do Gene PfCS Submetida e Otimizada.

| Tipo      | Sequência do gene da Corismato sintase  | CAI   | ENC | %GC  | %AT  |
|-----------|---|-------|-----|------|------|
| Submetida | ATGGACATGAGTACCTATGGGACTCTGCTGAAAAGTAACTTCGTATGGTGAATCGCATGGC<br>AAAGCTATTGGCTGTGTTATTGATGGCTTTCTGCTAATATTGAGATTAATTTTGATCTG<br>ATCCAGAAACAGCTGGATCGCCGCCGTCCGAATCAAAGCAAACCTGACCTCGAATCGCAAT<br>GAAAAGGACAAACTGGTAATTTCTGAGCGGTTTTGATGAAAACAAAACCTGGGCACCCCG<br>ATCACCTTTCTGATCTATAACGAAGATATTAAGAAAGAGGATTATAACAGCTTTATTAAC<br>ATTCGCGCCCGGGCCACGGAGATTACAGTATTTTATGAAATATCATGTGAAAAACAAA<br>AGCGGATCATCTCGCTTCTCGGGCCGCGAAACAGCTACGCGTGTAGCAGCAGGCGCTGT<br>ATTGAGCAGTGGCTGTATAAATCGTATAACTGTAGCATTGTGTCCTATGTTTCATAGCGTT<br>GGTAATATCAAATCCCGGAACAAGTTAGTAAAGAACTGGAGAATAAAAACCCGCGTCA<br>CGCGATCTGGTTGATAGCTACGGCACAGTCCGTTATAATGAAAAGAAAAATCTTTATG<br>GATTGCTTTAACCGTATTTATGATATGAATGCCAGTATGCTGAAAACCTGATGAATATAAT<br>AAAAACACCCCTGACCATCCCATCAATTGATAATACGTATATTAATGTTAAGACCAATGAA<br>TGTAATATTAATCAAGTTGATAACAACCATAACAACATATTAACGACAAAGACAATACG<br>TTCAACAACCTCTGAAAAATCTGATGAATGGATCTACCTGCAGACCCGCTGTCCGCATCCA<br>TATACGGCTGTGCAAATCTGCTCCTATATCCTGAAACTGAAAAATAAAGGTGACTCTGTT<br>GGAGGCATTGCAACGTGTATCATTGAGAACCCACCTATTGGTATTGGCGAACCGATTTTC<br>GATAAACTGGAGGCGGAACTGGCGAAAATGATTCTGAGTATCCCGCGGTAAAAGGTATT<br>GAGTTTGGTTCAGGTTTTAACGGGACGTACATGTTCCGGTTCATGCACAACGATATCTTT<br>ATTCGGTTCGAAAACATGAGTACGAAAAAAGAATCTGATCTGCTGTACGACGACAAAGGC<br>GAATGCAAAAACATGAGCTACCATAGCACGATTGAGAACAAATGAAGATCAGATCCTGAAC<br>AGCACCAGGGCTTCATGCCACCAAGAACGACAAAACCTTAATAACATTGATGACTAT<br>AATGTGACATTCAACAATAACGAGGAAAAACCTGCTGATCACCAAAACAACAATTGTGGT<br>GGTATCTGGCAGGTATCTCTACCGGTAACAACATTGTTTTTCGCGCGCATCAAACCG<br>GTGAGCAGCATCCAGATCGAGAAGGAAACAGTGATTTTTATGGGAATATGTGCAATCTG<br>AAAGTTCAGGGTCTGACGATTCATGATTTCTGCCGCGTCTGCCGCCAATCATTGAAGCT<br>AGTTCGAGTATGGTAATTGGAGATCTGATTTCTGCGTCAGATCTCCAAGTATGGCGACAAA<br>AAACCTCCGACGCTGTTTCGCAACATGGTCGAC | 0.631 | 40  | 41.5 | 58.5 |

|                  |   |       |    |      |      |
|------------------|---|-------|----|------|------|
| <b>Otimizada</b> | <p>ATGGACATGTCTACCTACGGTACCCTGCTGAAAGTTACCTCTTACGGTGAATCTCACGGT<br/> AAAGCGATCGGTTGCGTTATCGACGGTTTCCTGCTAACATCGAAATCAACTTCGACCTG<br/> ATCCGAAACAGCTGGACCGTCGTCGTCGGAACAGTCTAAACTGACCTCTAACCGTAAC<br/> GAAAAAGACAACTGGTTATCCTGTCTGGTTTCGACGAAAAACAAACCCTGGGTACCCCG<br/> ATCACCTTCTGTATCTACAACGAAGACATCAAAAAAGAACTACAACCTTTTCATCAAC<br/> ATCCCGCGTCCGGGTACGGTACTACACCTACTTCATGAAATACCACGTTAAAAACAAA<br/> TCTGGTTCTTCTCGTTTCTCTGGTCTGAAACCGCGACCCGTTGCGGGGGTGCCTGC<br/> ATCGAACAGTGGCTGTACAAATCTTACAACCTGCTCTATCGTTTCTTACGTTACTCTGTT<br/> GGTAACATCAAAATCCCGGAACAGGTTTCTAAAGAACTGGAAAAACAAACCCTGCTCT<br/> CGTGACCTGGTTGACTCTTACGGTACCCTGTTTACAACGAAAAAGAAAAATCTTCATG<br/> GACTGCTTCAACCGTATCTACGACATGAACGCGTCTATGCTGAAAAACGACGAATACAAC<br/> AAAAACACCCTGACCATCCCGTCTATCGACACACCTACATCAACGTTAAAAACCAACGAA<br/> TGCAACATCAACCAGGTTGACAACAACCAACAACATACATCAACGACAAAGACAACACC<br/> TTCAACAACCTGAAAAATCTGACGAATGGATCTACCTGCAGACCCGTTGCGCGCACCCG<br/> TACACCGCGTTTACAGATCTGCTCTTACATCTGAAACTGAAAAACAAAGGTACTCTGTT<br/> GGTGGTATCGCGACCTGCATCATCCAGAACCAGCGGATCGGTATCGGTGAACCGATCTTC<br/> GACAACTGGAAGCGGAACTGGCGAAAAATGATCCTGCTATCCCGGGGTTAAAGGTATC<br/> GAATTCGGTTCTGGTTTCAACGGTACTACATGTTTCGGTTCTATGCACAACGACATCTTC<br/> ATCCCGGTTGAAAAACATGTCTACCAAAAAAGAACTGACCTGCTGTACGACGACAAAGGT<br/> GAATGAAAAACATGTCTTACCCTTACCATCCAGAACAACGAAGACCAGATCCTGAAC<br/> TCTACCAAGGTTTTCATGCCGCCGAAAAACGACAAAAACTTCAACAACATCGACGACTAC<br/> AACGTTACCTCAACAACAACGAAGAAAAACTGCTGATCACCAAAACCAACAACCTGCGGT<br/> GGTATCTTGGCGGGTATCTCTACCGGTAACAACATCGTTTTTCCGTTCTGCGATCAAACCG<br/> GTTTCTTCTATCCAGATCGAAAAAGAAACCTTCTGACTTCTACGGTAAACATGTGCAACCTG<br/> AAAGTTACGGTCTGACGACTCTTGCATCTGCCGCGTCTGCCGCCGATCATCGAAGCG<br/> TCTTCTTCTATGGTTATCGGTGACCTGATCTGCGTACATCTCTAAATACGGTGACAAA<br/> AAACTGCCGACCTGTTCCGTAACATGGTTGAC</p> | 1.000 | 22 | 46.8 | 53.2 |
|------------------|---|-------|----|------|------|

**LEGENDA:** **CAI:** Índice da adaptação de Códons; **ENc:** Números de Códons efetivo; **%GC:** Porcentagem de G+C; **%AT:** Porcentagem de A+T.

**Tabela 11:** Resumo dos Códons Usados na Seqüência Submetida e Otimizada.

| Códons         | Submetida | Otimizada | Códons         | Submetida | Otimizada | Códons         | Submetida | Otimizada | Códons         | Submetida | Otimizada |
|----------------|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------|
| <b>GCA (A)</b> | 4         | 0         | <b>GCC (A)</b> | 1         | 0         | <b>GCG (A)</b> | 4         | 14        | <b>GCT (A)</b> | 5         | 0         |
| <b>TGC (C)</b> | 4         | 12        | <b>TGT (C)</b> | 8         | 0         | <b>GAC (D)</b> | 11        | 34        | <b>GAT (D)</b> | 23        | 0         |
| <b>GAA (E)</b> | 22        | 30        | <b>GAG (E)</b> | 8         | 0         | <b>TTC (F)</b> | 6         | 21        | <b>TTT (F)</b> | 15        | 0         |
| <b>GGA (G)</b> | 4         | 0         | <b>GGC (G)</b> | 13        | 0         | <b>GGG (G)</b> | 3         | 0         | <b>GGT (G)</b> | 14        | 34        |
| <b>CAC (H)</b> | 3         | 9         | <b>CAT (H)</b> | 6         | 0         | <b>ATA (I)</b> | 0         | 0         | <b>ATC (I)</b> | 20        | 52        |
| <b>ATT (I)</b> | 32        | 0         | <b>AAA (K)</b> | 38        | 44        | <b>AAG (K)</b> | 6         | 0         | <b>TTA (L)</b> | 0         | 0         |
| <b>TTG (L)</b> | 0         | 0         | <b>CTA (L)</b> | 0         | 0         | <b>CTC (L)</b> | 0         | 0         | <b>CTG (L)</b> | 34        | 34        |
| <b>CTT (L)</b> | 0         | 0         | <b>ATG (M)</b> | 15        | 15        | <b>AAC (N)</b> | 32        | 56        | <b>AAT (N)</b> | 24        | 0         |
| <b>CCA (P)</b> | 6         | 0         | <b>CCC (P)</b> | 0         | 0         | <b>CCG (P)</b> | 15        | 22        | <b>CCT (P)</b> | 1         | 0         |
| <b>CAA (Q)</b> | 4         | 0         | <b>CAG (Q)</b> | 10        | 14        | <b>AGA (R)</b> | 0         | 0         | <b>AGG (R)</b> | 0         | 0         |
| <b>CGA (R)</b> | 0         | 0         | <b>CGC (R)</b> | 10        | 0         | <b>CGG (R)</b> | 0         | 0         | <b>CGT (R)</b> | 7         | 17        |
| <b>AGC (S)</b> | 13        | 0         | <b>AGT (S)</b> | 8         | 0         | <b>TCA (S)</b> | 5         | 0         | <b>TCC (S)</b> | 3         | 0         |
| <b>TGG (S)</b> | 6         | 0         | <b>TGT (S)</b> | 8         | 43        | <b>ACA (T)</b> | 4         | 0         | <b>ACC (T)</b> | 13        | 30        |
| <b>ACG (T)</b> | 10        | 0         | <b>ACT (T)</b> | 3         | 0         | <b>GTA (V)</b> | 5         | 0         | <b>GTC (V)</b> | 3         | 0         |
| <b>GTG (V)</b> | 5         | 0         | <b>GTT (V)</b> | 10        | 23        | <b>TGG (W)</b> | 2         | 2         | <b>TAC (Y)</b> | 6         | 25        |
| <b>TAT (Y)</b> | 19        | 0         | <b>TAA (.)</b> | 0         | 0         | <b>TGA (.)</b> | 0         | 0         | <b>TAG (.)</b> | 0         | 0         |



### 4.1.3 – Alinhamentos das Seqüências do Gene Submetidos e Otimizados da PfCS.

| Alinhamento | M   | D   | M   | S   | T   | Y   | G   | T   | L   | L   | K   | V   | T   | S   | Y   | G   | E   | S   | H   | G   |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Submetido   | ATG | GAC | ATG | AGT | ACC | TAT | GGG | ACT | CTG | CTG | AAA | GTA | ACT | TCG | TAT | GGT | GAA | TCG | CAT | GGC |
| Otimizado   | ATG | GAC | ATG | TCT | ACC | TAC | GGT | ACC | CTG | CTG | AAA | GTT | ACC | TCT | TAC | GGT | GAA | TCT | CAC | GGT |
| Submetido   | K   | A   | I   | G   | C   | V   | I   | D   | G   | F   | L   | S   | N   | I   | E   | I   | N   | F   | D   | L   |
| Otimizado   | AAA | GCT | ATT | GGC | TGT | GTT | ATT | GAT | GGC | TTT | CTG | TCT | AAT | ATT | GAG | ATT | AAT | TTT | GAT | CTG |
| Submetido   | I   | Q   | K   | Q   | L   | D   | R   | R   | R   | P   | N   | Q   | S   | K   | L   | T   | S   | N   | R   | N   |
| Otimizado   | ATC | CAG | AAA | CAG | CTG | GAT | CGC | CGC | CGT | CCG | AAT | CAA | AGC | AAA | CTG | ACC | TCG | AAT | CGC | AAT |
| Submetido   | E   | K   | D   | K   | L   | V   | I   | L   | S   | G   | F   | D   | E   | N   | K   | T   | L   | G   | T   | P   |
| Otimizado   | GAA | AAG | GAC | AAA | CTG | GTA | ATT | CTG | AGC | GGT | TTT | GAT | GAA | AAC | AAA | ACC | CTG | GGC | ACC | CCG |
| Submetido   | I   | T   | F   | L   | I   | Y   | N   | E   | D   | I   | K   | K   | E   | D   | Y   | N   | S   | F   | I   | N   |
| Otimizado   | ATC | ACC | TTT | CTG | ATC | TAT | AAC | GAA | GAT | ATT | AAA | AAA | GAG | GAT | TAT | AAC | AGC | TTT | ATT | AAC |
| Submetido   | I   | P   | R   | P   | G   | H   | G   | D   | Y   | T   | Y   | F   | M   | K   | Y   | H   | V   | K   | N   | K   |
| Otimizado   | ATC | CCG | CGT | CCG | GGT | CAC | GGT | GAC | TAC | ACC | TAC | TTC | ATG | AAA | TAC | CAC | GTT | AAA | AAC | AAA |
| Submetido   | S   | G   | S   | S   | R   | F   | S   | G   | R   | E   | T   | A   | T   | R   | V   | A   | A   | G   | A   | C   |
| Otimizado   | AGC | GGA | TCA | TCT | CGC | TTC | TCG | GGC | CGC | GAA | ACA | GCT | ACG | CGT | GTA | GCA | GCA | GGC | GCT | TGT |
| Submetido   | I   | E   | Q   | W   | L   | Y   | K   | S   | Y   | N   | C   | S   | I   | V   | S   | Y   | V   | H   | S   | V   |
| Otimizado   | ATC | GAA | CAG | TGG | CTG | TAC | AAA | TCT | TAC | AAC | TGC | TCT | ATC | GTT | TCT | TAC | GTT | CAC | TCT | GTT |
| Submetido   | G   | N   | I   | K   | I   | P   | E   | Q   | V   | S   | K   | E   | L   | E   | N   | K   | N   | P   | P   | S   |
| Otimizado   | GGT | AAT | ATC | AAA | ATC | CCG | GAA | CAA | GTT | AGT | AAA | GAA | CTG | GAG | AAT | AAA | AAC | CCG | CCG | TCA |
| Submetido   | R   | D   | L   | V   | D   | S   | Y   | G   | T   | V   | R   | Y   | N   | E   | K   | E   | K   | I   | F   | M   |
| Otimizado   | CGC | GAT | CTG | GTT | GAT | AGC | TAC | GGC | ACA | GTC | CGT | TAT | AAT | GAA | AAA | GAA | AAA | ATC | TTT | ATG |
| Submetido   | D   | C   | F   | N   | R   | I   | Y   | D   | M   | N   | A   | S   | M   | L   | K   | T   | D   | E   | Y   | N   |
| Otimizado   | GAT | TGC | TTT | AAC | CGT | ATT | TAT | GAT | ATG | AAT | GCC | AGT | ATG | CTG | AAA | ACT | GAT | GAA | TAT | AAT |
| Submetido   | K   | N   | T   | L   | T   | I   | P   | S   | I   | D   | N   | T   | Y   | I   | N   | V   | K   | T   | N   | E   |
| Otimizado   | AAA | AAC | ACC | CTG | ACC | ATC | CCA | TCA | ATT | GAT | AAT | ACG | TAT | ATT | AAT | GTT | AAG | ACC | AAT | GAA |
| Submetido   | C   | N   | I   | N   | Q   | V   | D   | N   | N   | H   | N   | N   | Y   | I   | N   | D   | K   | D   | N   | T   |
| Otimizado   | TGT | AAT | ATT | AAT | CAA | GTT | GAT | AAC | AAC | CAT | AAC | AAC | TAT | ATT | AAC | GAC | AAA | GAC | AAT | ACG |
| Submetido   | F   | N   | N   | S   | E   | K   | S   | D   | E   | W   | I   | Y   | L   | Q   | T   | R   | C   | P   | H   | P   |
| Otimizado   | TTC | AAC | AAC | TCT | GAA | AAA | TCT | GAT | GAA | TGG | ATC | TAC | CTG | CAG | ACC | CGC | TGT | CCG | CAT | CCA |
| Submetido   | Y   | T   | A   | V   | Q   | I   | C   | S   | Y   | I   | L   | K   | L   | K   | N   | K   | G   | D   | S   | V   |
| Otimizado   | TAT | ACG | GCT | GTG | CAA | ATC | TGC | TCC | TAT | ATC | CTG | AAA | CTG | AAA | AAT | AAA | GGT | GAC | TCT | GTT |
| Submetido   | G   | G   | I   | A   | T   | C   | I   | I   | Q   | N   | P   | P   | I   | G   | I   | G   | E   | P   | I   | F   |

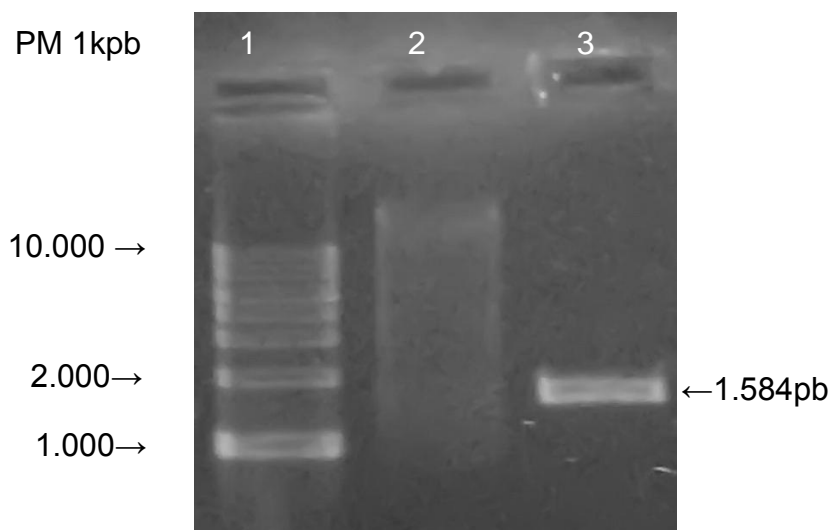
|           |  |
|-----------|--|
| Submetido | GGA GGC ATT GCA ACG TGT ATC ATT CAG AAC CCA CCT ATT GGT ATT GGC GAA CCG ATT TTC                    |
| Otimizado | *   #   #   #   *   #        #             #   *   #        #             #                        |
| Submetido | GGT GGT ATC GCG ACC TGC ATC ATC CAG AAC CCG CCG ATC GGT ATC GGT GAA CCG ATC TTC                    |
| Otimizado | D K L E A E L A K M I L S I P A V K G I  |
| Submetido | GAT AAA CTG GAG GCG GAA CTG GCG AAA ATG ATT CTG AGT ATT CCG GCG GTA AAA GGT ATT                    |
| Otimizado | #             #                            #      **    #             *             #              |
| Submetido | GAC AAA CTG GAA GCG GAA CTG GCG AAA ATG ATC CTG TCT ATC CCG GCG GTT AAA GGT ATC                    |
| Otimizado | E F G S G F N G T Y M F G S M H N D I F  |
| Submetido | GAG TTT GGT TCA GGT TTT AAC GGG ACG TAC ATG TTC GGT TCT ATG CAC AAC GAT ATC TTT                    |
| Otimizado | #   #   #   #   *   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #          |
| Submetido | GAA TTC GGT TCT GGT TTC AAC GGT ACC TAC ATG TTC GGT TCT ATG CAC AAC GAC ATC TTC                    |
| Otimizado | I P V E N M S T K K E S D L L Y D D K G  |
| Submetido | ATT CCG GTC GAA AAC ATG AGT ACG AAA AAA GAA TCT GAT CTG CTG TAC GAC GAC AAA GGC                    |
| Otimizado | #        #                **    *                       #                            #   #         |
| Submetido | ATC CCG GTT GAA AAC ATG TCT ACC AAA AAA GAA TCT GAC CTG CTG TAC GAC GAA AAA GGT                    |
| Otimizado | E C K N M S Y H S T I Q N N E D Q I L N  |
| Submetido | GAA TGC AAA AAC ATG AGC TAC CAT AGC ACG ATT CAG AAC AAT GAA GAT CAG ATC CTG AAC                    |
| Otimizado | **#        # **#   *   #             #        #  |
| Submetido | GAA TGC AAA AAC ATG TCT TAC CAC TCT ACC ATC CAG AAC AAC GAA GAC CAG ATC CTG AAC                    |
| Otimizado | S T K G F M P P K N D K N F N N I D D Y  |
| Submetido | AGC ACC AAG GGC TTC ATG CCA CCA AAG AAC GAC AAA AAC TTT AAT AAC ATT GAT GAC TAT                    |
| Otimizado | **#        #       |
| Submetido | TCT ACC AAA GGT TTC ATG CCG CCG AAA AAC GAC AAA AAC TTC AAC AAC ATC GAC GAC TAC                    |
| Otimizado | N V T F N N N E E K L L I T K T N N C G  |
| Submetido | AAT GTG ACA TTC AAC AAT AAC GAG GAA AAA CTG CTG ATC ACC AAA ACA AAC AAT TGT GGT                    |
| Otimizado | #   *   *             #        #                                 *        #   #                    |
| Submetido | AAC GTT ACC TTC AAC AAC GAA GAA AAA CTG CTG ATC ACC AAA ACC AAC AAC TGC GGT                        |
| Otimizado | G I L A G I S T G N N I V F R S A I K P  |
| Submetido | GGT ATT CTG GCA GGT ATC TCT ACC GGT AAC AAC ATT GTT TTT CGC AGC GCG ATC AAA CCG                    |
| Otimizado | #        #                                 #        #   # **#                                      |
| Submetido | GGT ATC CTG GCG GGT ATC TCT ACC GGT AAC AAC ATC GTT TTC CGT TCT GCG ATC AAA CCG                    |
| Otimizado | V S S I Q I E K E T S D F Y G N M C N L  |
| Submetido | GTG AGC AGC ATC CAG ATC GAG AAG GAA ACC AGT GAT TTT TAT GGG AAT ATG TGC AAT CTG                    |
| Otimizado | * **# **#                  #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #       |
| Submetido | GTT TCT TCT ATC CAG ATC GAA AAA GAA ACC TCT GAC TTC TAC GGT AAC ATG TGC AAC CTG                    |
| Otimizado | K V Q G R H D S C I L P R L P P I I E A  |
| Submetido | AAA GTT CAG GGT CGT CAC GAT TCA TGT ATT CTG CCG CGT CTG CCG CCA ATC ATT GAA GCT                    |
| Otimizado | #   *   #                            #        #        *   #                                       |
| Submetido | AAA GTT CAG GGT CGT CAC GAC TCT TGC ATC CTG CCG CGT CTG CCG CCG ATC ATC GAA CCG                    |
| Otimizado | S S S M V I G D L I L R Q I S K Y G D K  |
| Submetido | AGT TCG AGT ATG GTA ATT GGA GAT CTG ATT CTG CGT CAG ATC TCC AAG TAT GGC GAC AAA                    |
| Otimizado | **    * **         *   #   *   #        #                            #   #   #   #   #   #   #   # |
| Submetido | TCT TCT TCT ATG GTT ATC GGT GAC CTG ATC CTG CGT CAG ATC TCT AAA TAC GGT GAC AAA                    |
| Otimizado | K L P T L F R N M V D  |
| Submetido | AAA CTG CCG ACG CTG TTT CGC AAC ATG GTC GAC  |
| Otimizado | *        #   #                  #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #   #                      |
| Submetido | AAA CTG CCG ACC CTG TTC CGT AAC ATG GTT GAC  |
| Otimizado | AAA CTG CCG ACC CTG TTC CGT AAC ATG GTT GAC  |

**LEGENDA: CAI:** |: Nucleotídeos Inalterados ; \*: Mudança do Transversão (pirimidina < > purina) e #: Mudança da transição (purina < > purina/pirimidina < > pirimidina).

## 4.2 – Amplificação e Clonagem do Gene da PfCS.

Submetido a técnica da PCR, conforme item 3.3 e tabelas 06 e 07, os *primers* utilizados amplificaram uma seqüência de aproximadamente 1.584 pares de bases, correspondente ao gene da PfCS identificado no genoma do *P. falciparum*, resultado conforme **Figura 10**.

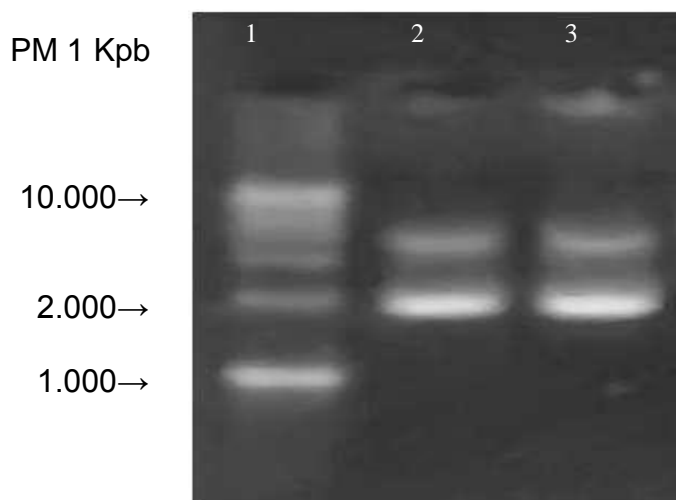
A concentração de DNA foi obtido através do teste manual de ácido nucléico, com o comprimento de onda para 320nm diluído em água 1:100, zerando o espectrofotômetro com água e realizado as leituras em absorvância (230 nm, 260 nm, 280 nm e 320 nm ) calculando-se a concentração de DNA pela fórmula  $(Abs_{260nm} - Abs_{320nm}) \times 50 \times \text{fator de diluição} = [DNA]$  em mg/mL, onde foi obtido o valor de 2,585 ug/mL.



**Figura 10:** PCR para amplificação do gene PfCS sendo: coluna 1 peso molecular de 1kb; coluna 2 controle negativo, coluna 3 gene da CS, com fragmento de 1.600 pb.

#### 4.3 – Miniprep do gene PfCS em vetor pGEM-T Easy (Promega-USA)

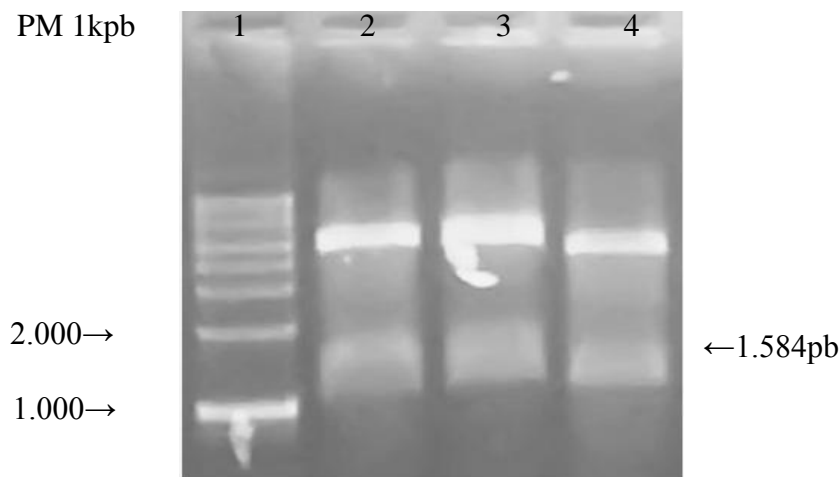
A extração plasmidial teve o objetivo de constatar os resultados da transformação da PfCS em células DH5 $\alpha$  e DH10 $\beta$ , conforme visualizado abaixo na **figura 11**.



**Figura 11:** Miniprep do vetor pGEM-T Easy, sendo: coluna 1 peso molecular 1Kpb, coluna 2 e 3 amostras duplicadas da proteína PfCS.

#### 4.4 - Digestão Enzimática do Vetor pGEM-T Easy com *Bam*HI e *Xho*I (Promega-USA) com gene natural da PfCS.

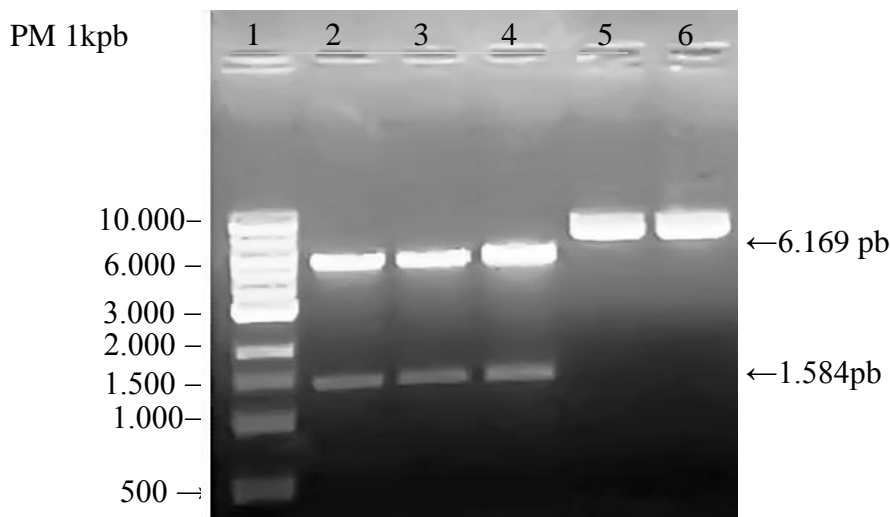
A digestão do plasmídeo recombinante **pGEM-T Easy** (Promega-USA) com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I, confirmou a inserção do gene da CS do *P. falciparum* no vetor de clonagem, resultado demonstrado na **figura 12**.



**Figura 12:** digestão enzimática do vetor pGEM-T Easy com *Bam*HI e *Xho*I. Sendo: coluna 1 peso molecular de 1Kpb, coluna 2, 3 e 4 amostras testes triplicadas.

#### 4.5 - Digestão Enzimática do vetor pGS21a com *Nco*I e *Sal*I com Gene Sintético da PfCS.

Os plasmídios pGS21a-CS extraídos das bactérias da linhagem TOP10F', foram submetidos a digestão enzimática com as enzimas *Nco*I e *Sal*I. Conforme resultado da **figura 13**.



**Figura 13:** Digestão Enzimática do vetor pGS21a com *Nco*I e *Sal*I. Eletroforese em gel agarose 0,8%: coluna 01 Marcador molecular 1kpb, coluna 2, 3 e 4 amostra testes (corte), colunas 5 e 6 amostras controle (plasmídeo não digerido).

#### 4.6 – Transformação do Plasmídio pGS21a-CS em Células Competentes BL21(DE3) pLys.

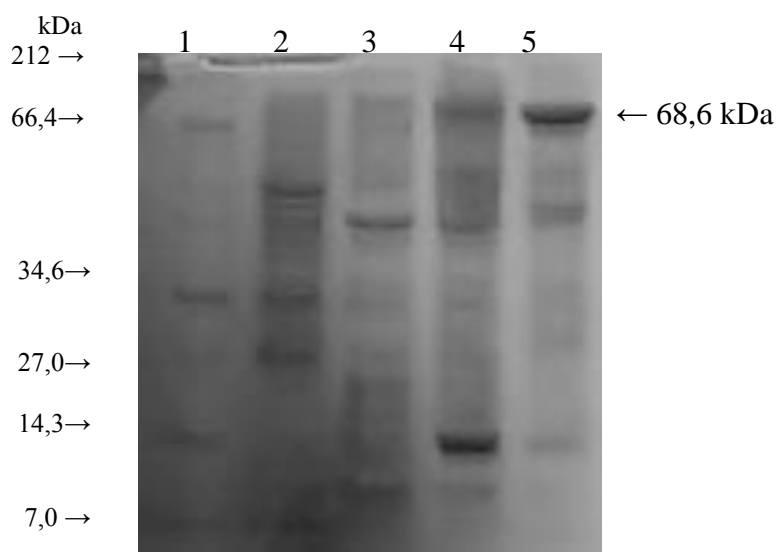
O plasmídio pGS21a-CS foi transformado em células competentes BL21(DE3) pLys para expressão, como mostrado na **figura 14**.



**Figura 14:** Transformação em Células Competentes **BL21 (DE3) pLys** de *E. coli*.

#### 4.7 - Expressão da PfCS.

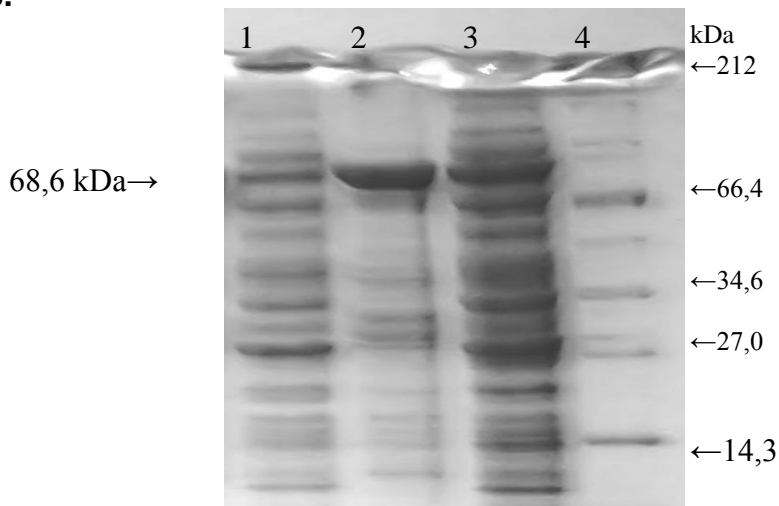
A expressão foi constatada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, após lise das células *E. coli* BL21 (DE3) pLys (Promega-USA), vetor de expressão pGS21a, conforme pode ser constatado na **figura 15**.



**Figura 15:** Expressão da PfCS em 3 horas e meia de indução com IPTG 1/1 à 37°C, Sendo: 01 marcador proteína P7702S (Invitrogen-USA), 02 sobrenadante não induzido, 03 sobrenadante induzido, 04 sedimento não induzido, 05 sedimento induzido.

#### 4.8 – Solubilização da PfCS.

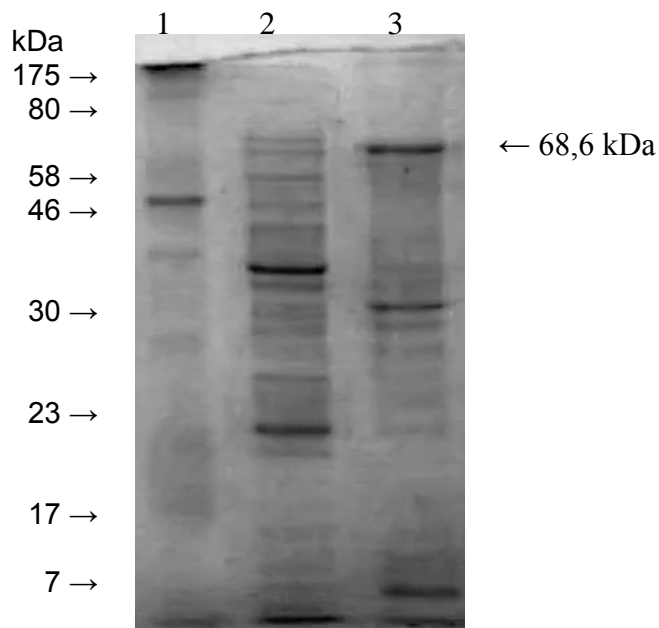
A obtenção da proteína solúvel foi constatada após incubação em tampão de solubilização com uréia 8M, conforme descrito no item 3.16 e mostrado na **figura 16**.



**Figura 16:** Solubilização da PfCS: coluna 01 sobrenadante induzido, 02 sedimento induzido, 03 sedimento induzido solubilizado com uréia 8M, 04 Marcador de Proteína P7702S (Invitrogen-USA) 112 kDa.

#### 4.9- Purificação da PfCS em Coluna de níquel Ni-NTA (Qiagen-USA).

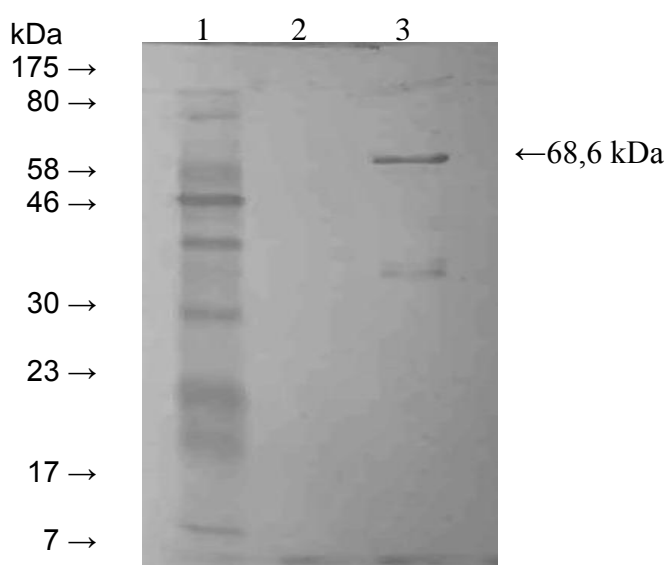
A amostra solubilizada foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de níquel Ni-NTA (QIAGEN-USA) imobilizada, conforme descrito no item 3.16. O resultado da purificação pode ser visualizado na **figura 17**.



**Figura 17:** Purificação da PfCS sendo 1 Marcador molecular P7709S BioLabs, 2 sedimento não induzido e 3 sedimento induzido.

#### 4.10 - Western Blot da Amostra Solubilizada da PfCS.

A análise por Western blot foi realizada com amostra de proteína total, conforme procedimento do item 3.19, separadas em gel *SDS-PAGE* 12%, conforme item 3.17 e transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência semi-hidratado onde os anticorpos primários monoclonais específicos ligam-se a uma calda de histidina e os anticorpos secundários anti-mouse peroxidase apresentou o resultado mostrado na **figura 18**.



**Figura 18:** Western Blot, 1 Marcador molecular BioLabs P7709S, 2 sedimento não induzido e 3 sedimento induzido.

## 5.0 - DISCUSSÃO

Mesmo antes da era cristã, há registro de que os chineses tratavam a malária com uma preparação da planta *Dichroa febrifuga* e antes da chegada dos europeus ao continente americano, os índios peruanos, usavam a casca da quina para o tratamento da malária. Em 1677, a quina foi incluída na farmacopéia de Londres (RANG *et al.*, 1997). Anos depois em 1820, foi isolado o princípio ativo da quina, o alcalóide quinina Ridley & Hudson (1998), citados por (VALE, MOREIRA & GOMES, 2005).

Porém, foi durante a segunda guerra mundial, que surgiram os maiores avanços na pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias ativas para o tratamento da malária, onde na Alemanha foi sintetizada a cloroquina, altamente eficaz contra a forma eritrocitária do *P. falciparum*, e rapidamente foi o fármaco mais utilizado até o primeiro registro de resistência pelo parasito no ano de 1957 (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

No ano de 1946, também durante a segunda guerra mundial nos USA foi sintetizada a primaquina, eficaz contra as formas exoeritocitárias do parasita, contudo, a primaquina também é tóxica e não é recomendada para pacientes com deficiência em glicose-6-fosfato eritrocitária que provoca anemia hemolítica que confere maior resistência ao parasita (BASCO *et al.*, 1998).

Passados vários anos, muitos antimaláricos foram desenvolvidos como o quinino e seus derivados amodiaquina, halofrantrina, mefloquina e primaquina, que agem na interferência para desintoxicação do grupo heme; os folatos pirimetamina e proguanil, que inibe a síntese de ácidos nucleicos; os sulfonamidas sulfadoxina e atovaquona, que também é utilizado na inibição da síntese de ácidos nucleicos; os artemisinina e derivados dihidroartemisinina, artesunato e artemeter, que tem função oxidativa, além dos antibióticos (tetraciclina, doxiciclina e clindamicina), que agem como inibidores da síntese proteica (FRÉDÉRICH *et al.*, 2002), no entanto o *plasmodium* ainda persiste e acumula mais resistências ao combate e ao tratamento.

A resistência adquirida pelo *Plasmodium* em relação à cloroquina em escala mundial expôs a facilidade com a qual se pode desenvolver resistências também com outras drogas, Assim, foi surgindo resistência do *P. falciparum* sucessivamente ao quinino, cloroquina, associação da sulfadoxina e pirimetamina



e mais recentemente à mefloquina e derivados da artemisinina (BOULOS *et al.*, 1997), sendo um alerta de que é essencial a pesquisa dirigida em medicamentos antimaláricos para a futura capacidade de tratar e controlar a malária em todos os continentes (RIDLEY, 2002).

Segundo a OMS, um fator que contribui para a resistência foi o uso inadequado desses antimaláricos, que evoluiu para a atual situação de elevados níveis de resistências, especialmente, nas últimas décadas, com a resistência da cloroquina e seus derivados (OMS, 2001).

Atualmente, o uso de fármacos antimaláricos está entre as soluções mais eficazes no controle da malária, porém, a resistência do *Plasmodium* contra as drogas utilizadas é a grande barreira a ser superada (CRAVO & ROSÁRIO, 2003)

A OMS já tem demonstrado preocupação e alerta para a necessidade de buscar novos caminhos para combater a malária. Porque é aceitável que o *P. falciparum* venha a desenvolver resistência a artemisinina e seus derivados, ficando a população desassistida por tratamento antimalárico eficaz para a doença.

Nos últimos anos a OMS tem sugerido o uso de combinações de antimaláricos, essencialmente, com derivados de artemisinina para o tratamento de primeira linha, conforme a OMS mais de 60 países já tinham adotado a combinação terapêutica no tratamento da malária (OMS, 2006).

Uma importante alternativa cogitada por vários cientistas é a inibição do crescimento do parasito através de vias metabólicas. Algumas vias já foram identificadas no genoma do *Plasmodium* e estão sendo estudadas para esse fim, destacam-se as vias de Metabolismo de Purinas, via de Biossíntese de Ácidos Graxos e via do Ácido Chiquímico ou Chiquimato, presentes no *Plasmodium* e ausente em humanos ( ROBERTS *et al.*, 1999; PEROZZO *et al.*, 2002; KICSKA *et al.*, 2002a).

McRobert (2005) estudou a via do chiquimato e utilizou a combinação de atovaquona e pirimetamina com análogos 6-*R*-F-chiquimato, 6-*R*-F-4-epichiquimato, 3-deoxi-3,3-difluoro-chiquimato, e 3-deoxi- 3,3-difluoro-4-epi-chiquimato, da chiquimato (SKH) 5<sup>a</sup> enzima da via e os compostos testados demonstraram ser eficientes inibidores *in vitro* do *P. falciparum* e podem ser um alvo para o desenvolvimento da quimioterapia antimalárica.

A proteína corismato sintase da via do chiquimato já identificada no genoma do *P. falciparum* (GARDNER, 2002) é monofuncional, similar a plantas e bactérias, tornando-se um possível alvo para o desenvolvimento de novas drogas (FITZPATRICK *et al.*, 2001).

Através de busca por ferramentas de bioinformática, conforme já descrito na página 20, foi realizado uma caracterização das enzimas da via do chiquimato e constatado que a CS é a única até o momento a ser identificada no genoma do *P. falciparum* (FITZPATRICK *et al.*, 2001; GLENN *et al.*, 2004). Segundos Fitzpatrick *et al.*, (2001) o gene não apresenta íntrons, o que possibilita a expressão direta em sistema procarioto.

A CS tem sido muito estudada em diversos organismos, como por exemplo, Caruso (2007) em *Xylella fastidiosa* (causa a doença popularmente conhecida como “amarelinho” em citros), após clonagem e expressão apresentou-se de forma solúvel, tornando-se um possível alvo para estudos posteriores, por demonstrar estas características à CS foi escolhida para este estudo

### **5.1 – Gene da Proteína Corismato Sintase do *P. falciparum* PfCS.**

A técnica de eletroforese em gel agarose é uma das ferramentas mais utilizadas para verificação da qualidade e pureza do DNA (Snounou, 1996).

O produto amplificado por PCR foram utilizados rotineiramente nos procedimentos de ligação, extração plasmidial e clonagem, porém, o gene da PfCS possui 1.584 pares de bases e apresentou grande dificuldade para ser corretamente clonado. Para clonar foram utilizados vários vetores como: pGEM-T Easy (Promega-USA), pTZ57R/T(Fermentas-USA) e pDRIVE (QIAGEN- USA) e TOPO TA (Invitrogen-USA).

A clonagem de genes em vetores procariotos é uma ferramenta importante em biologia molecular, contudo, algumas dificuldades são encontradas tais como a inserção de genes com tamanho superior a 1.000 pares de bases. Isto ocorre devido à desestabilização do plasmídeo (CORDEIRO, 2003).

Dos plasmídios de clonagem utilizados neste estudo o pGEM-T Easy foi o único clonado, sendo por este motivo selecionado para os procedimentos seguintes deste trabalho.

Após a clonagem do gene da proteína PfCS, a subclonagem em vetor de expressão também se mostrou de difícil execução. Apesar da utilização de vários protocolos de ligação não houve sucesso na inserção do gene da PfCS ao vetor de expressão pRSETA (Invitrogen-USA).

Este vetor foi selecionados dentre os demais, por proporcionar a correta fase de leitura para gene da proteína PfCS, além de possibilitar a produção de uma proteína fusionada a uma calda de poli-histidina. Contudo, há uma característica desfavorável deste vetor e acreditamos que foi determinante para o insucesso do resultado da subclonagem, o vetor é constituído por apenas 2,900 pares de bases e o gene da proteína PfCS a ser inserido possuía 1.584 pares de base, o que corresponde um acréscimo de aproximadamente 60% do tamanho do vetor, provavelmente impossibilitando a construção de um vetor recombinante pRSETA-PfCS.

Diante das dificuldades encontradas para subclonagem do gene da proteína PfCS em vetor de expressão e após esgotadas todas as possibilidades metodológicas disponíveis, buscou-se como estratégia a síntese do gene , visando ampliar as possibilidades de trabalho para este e futuros estudos a serem desenvolvidos.

## **5.2 – Gene Sintético e Otimizado da proteína Corismato Sintase PfCS.**

Conforme caracterização feita por ferramentas da bioinformática e por revisão bibliográfica, verificou-se que a proteína PfCS, além de ter alto peso molecular, o gene da proteína corismato sintase de *P. falciparum* apresenta regiões com códon raros para expressão em sistema procarioto.

O software OPTIMIZER foi utilizado para a otimização da seqüência de DNA do gene da proteína PfCS onde foi constatado varias regiões ricas com códons AGG, AGA, CGG e CGA = Arginina, CUA = leucina e AUA = Isoleucina com uma elevada porcentagem de de 41,5 % de GC e 58,5 % de AT, para 1.000 nucleotídeos otimizados com *E. coli*.

Jorgensen *et al.*, (2006) e Mattioli (2008), em seus estudos relataram que existem proteínas que são difíceis de expressar fora dos seus contextos originais. Elas podem conter elementos regulamentares limitando a expressão e um desses

elementos é proveniente de organismos que utilizam nucleotídeos de um gene com códon raramente utilizado pelo hospedeiro.

Os códons raros foram identificados como fator importante na expressão genética de procaríoto, por exemplo, *E. coli*. (RAMOS, 2006). O grau em que um determinado códon aparece no código genético varia significativamente entre os organismos, entre proteínas expressas em altos e baixos níveis, e mesmo entre diferentes partes do mesmo Operon (ANGELLOTTI *et al.*, 2007).

Considerando estes fatores, foi adquirido junto a empresa GenScript Corporation-USA, a síntese do gene da proteína PfCS para expressão em sistema procaríoto para sanar as dificuldades encontradas, em razão que este organismo não usa alguns códons que se faz presente no genoma do *P. falciparum*, como os já citados acima.

A partir deste ponto os trabalhos foram realizados com o gene sintético, onde as regiões ricas em A-T foram otimizadas com a síntese química não alterando os aminoácidos da proteína, apenas os códons raros para *E. coli*.

Novy *et al.*, (2001) também descreveram em seus estudos que existem organismos que apresentam preferência por códons (*códon bias*) distintos e estas diferenças podem ser fatores limitantes na expressão heteróloga da proteína que pode ser muito baixa quando um gene codifica códons raros.

Conforme relatado por Gustafsson *et al.*, (2004) uma porcentagem de 5% a 10% de códons raros em um organismo é o suficiente para afetar a expressão de uma proteína em determinados organismos.

Os códons raros podem ser interpretados como “*stop codons*” e pode interferir no baixo nível ou inibir a expressão de proteína recombinante em organismos heterólogos ou podem expressar enzimas sem atividades (WU *et al.*, 2003).

Os pares de códon de AGG/AGA representam códons raros, isso pode impactar negativamente a expressão de proteínas heterólogas. Outros códons raros como CUA e o AUA têm efeitos similares e causam problemas de tradução em *E. Coli*, durante a expressão de proteínas heterólogas (KANE, 1995).

Carsten-Peter (2000) relata em seus estudos que códons raros são um obstáculo para a eficiente expressão de genes heterólogos em *E. coli*. Nos genomas ricos em GC arginina ou AGG AGA e códon da prolina CCC como nos mamíferos, freqüentemente afetam expressão genética em bactéria.

Expressar o gene do *P. falciparum* em especial em *E. coli*, tem sido muitas vezes um desafio, devido à códon raros existentes nesses organismos (MUSTO et al., 1999).

O gene do *P. falciparum* tem uma região rica de A-T no genoma, cerca de 80%, o que tem feito em muitos casos a expressão heteróloga em *E. coli* muito difícil e certos códons que são preferencialmente utilizadas por *P. falciparum* raramente são utilizados por *E. coli*, em nível alto de expressão. (BACA & HOL, (2000).

Têm sido demonstrados que códons raros diminuem consideravelmente os níveis de expressão em proteínas recombinantes para *E. coli* por causa de translação, mais o problema pode ser superado com o uso da engenharia genética (MUSTO et al, 1999).

A polarização do códon afeta a expressão de proteínas heterólogas gerando um baixo nível expressão da proteína ou expressão truncada dos produtos em corpos de inclusão. Assim, as células de *E. coli*, essencialmente, não têm bastantes moléculas do tRNA para sintetizar eficientemente a proteína heteróloga (CINQUIN et al, 2001).

As polarizações do uso de códons raros são associadas com os vários fatores biológicos, tais como o nível da expressão de gene, o comprimento do gene, o sinal da iniciação da tradução do gene, a composição de ácido aminado da proteína, a estrutura da proteína, a abundância do tRNA e as composições de GC do organismo hospedeiro (RAMOS,2006).

Neste estudo, mesmo utilizando-se do gene sintético da PfCS foi necessário a realização de inúmeros testes de expressão, utilizando diferentes protocolos e condições como: temperatura, indução de expressão com diferentes concentrações de IPTG e diferentes cepas de *E. coli*.

Resultou destes experimentos que a melhor condição para expressão da proteína foi observada na cepa BL21(DE3) pLys por indução com IPTG 0,1M/mL por 3 horas e 30 minutos a 37C<sup>o</sup>, no entanto a proteína foi expressa na forma insolúvel, apresentando como corpos de inclusão.

Apesar disso, ao contrario dos estudos realizados anteriormente nesta dissertação com o gene natural, os estudos com o gene sintético da proteína PfCS foram obtidos resultados satisfatórios, como pode ser constatado pela transformação, digestão, expressão e purificação desta proteína.

O uso de organismos procariotos como hospedeiros desencadeia uma série de limitações dificultando o processo de expressão heteróloga de genes eucarioto, por não processarem adequadamente a informação genética e não configurarem corretamente a proteína recombinante sintetizada (MARQUES, 2005).

Esta técnica é amplamente utilizada devido à simplicidade, ao baixo custo e ao potencial em expressar grandes quantidades de proteína alvo. Entretanto, a produção de proteínas exógenas em *E. coli* pode conduzir à formação de corpos de inclusão (MARQUES, 2005), pois a maquinaria de ligação de proteína e a condição conformacional em procariotos são diferentes dos eucariotos, o que leva muitas vezes a expressão de proteínas inativa de agregados insolúveis, devido a formação de pontes de sulfeto e modificações pós-traducionais (BANEYX & MUJACIC, 2004)

Como relatado em seus estudos em expressão da proteína GM-CSF, Schwanke (2008), concluiu que a formação dos corpos de inclusão é considerada vantajosa uma vez que os isolamentos de agregados homogêneos são constituídos praticamente a proteína de interesse, segundo o autor é uma maneira conveniente e efetiva de purificar proteínas de interesse.

A formação de corpos de inclusão que transforma em muitas vezes a enzima inativa possui algumas vantagens, pois além de produzir altos níveis de expressão, esse processo pode ser revertido para o correto dobramento da proteína e sua forma biologicamente ativa podem ser obtidos a partir dos corpos de inclusão por completa desnaturação, seguida de renaturação *in vitro*, através da solubilização que pode ser alcançada com ajuda de agentes desnaturantes como: uréia e cloreto de guanidina (TSUMOTO *et al.*, 2003).

A renaturação segundo Vanz (2008) pode ser alcançada por diminuição gradativa da concentração do desnaturante utilizado troca de tampão, utilizando-se a diálise

A proteína PfCS com peso molecular de 68,6 kDa, foi expressa na forma de proteína recombinante fusionada a uma calda de poli-histidina, ficando na forma de corpúsculo de inclusão que foi desnaturada com uréia 8 M e purificada em coluna de afinidade em níquel NI-NTA, onde foi obtido um semi-purificado com nível elevado de pureza.

Este grau de pureza foi possível pela utilização de uma calda de polihistidina, que permite a utilização de tampões contendo uréia 8 M sem grandes interferências na afinidade da coluna.

Após purificação, o teste de Western Blot apresentou além da confirmação da purificação parcial da PfCS bandas inespecíficas, provavelmente derivadas de produtos da degradação da proteína recombinante, que pode ser solucionado adicionando-se inibidores de proteases durante a lise e transformação da *E. coli*, ou monitorando a velocidade e temperatura na purificação, como também outros protocolos disponíveis.

Yadava & Ockenhouse (2003) fez a comparação da expressão de gene otimizado em relação aos genes nativos do *P. falciparum* em *Pichia pastoris* e *E. coli*. O genoma do *Plasmodium* rico em AT e a disparidade resultante no uso com sistemas geral de expressão (*E. coli*) acarretam em dificuldades de expressão dos genes de *Plasmodium* em sistemas heterólogos, onde foi obtido um resultado superior em *P. pastoris*, porém, ambos apresentaram a proteína insolúvel.

Fitzpatrick *et al.*, (2001) usou em experimentos pGEX-G como vetor de expressão. A expressão neste vetor cria proteínas de fusões C-terminal a glutationa S-transferase da (GST), devido o gene do *P. falciparum* possuir códons raros para uso de resíduos da arginina e de isoleucina, a transformação no vetor pGEX-G-PfaroC em células de *E. coli* BL21 (DE3), que é o protocolo convencional para este sistema, conduziram a um resultado negativo, detectável em expressão da proteína de fusão do *P. falciparum*. No mesmo estudo Fitzpatrick *et al.*, (2001) conseguiram a expressão bem sucedida em *E. coli* BL21CodonPlus (DE3) RIL (Stratagene-USA), as quais carregam os tRNAs raros exigidos para eficiente tradução deste gene do *P. falciparum*.

Neste estudo, também foi obtido resultados bem sucedidos utilizando-se a cepa de células BL21 (DE3) pLys de *E. coli*. Estas reconhecem tRNAs arginina, isoleucina, leucina e códons AGA / AGG, AUA, e CUA, respectivamente, códons raramente utilizados pela *E. coli*.

A otimização do gene hospedeiro através da biologia sintética são modificações que permitem a expressão de nível elevado de muitas proteínas que são difíceis de expressar nos hospedeiros convencionais de *E. coli* (MATTIOLI, 2008).

Segundo Caruso (2007) há proteínas produzidas em bactérias que tem sua atividade completamente revertida, no entanto, outras são inativas. Também podem ser insolúveis, tóxicas para a célula hospedeira ou expressar em baixos níveis ou ainda se tornar proteínas de fusão inibindo-as de se ligar à resina de afinidade, tornando-se uma proteína de difícil purificação. Adverte que nestes casos, procedimentos para atenuar estes problemas devem ser bem estudados a fim de empregá-los convenientemente e não comprometer o estudo científico da proteína de interesse.



## 6.0 – CONCLUSÃO.

- ✓ A clonagem e expressão do gene natural da proteína Corismato Sintase de *P. falciparum* é de difícil realização, considerando o tamanho do gene com 1.584 pares de bases;
- ✓ A síntese gênica é uma técnica que se mostrou eficiente na clonagem e expressão do gene da proteína corismato sintase de *P. falciparum* em sistema procarioto, onde as etapas de clonagem e expressão heteróloga em *E. coli* BL21(DE3)pLys resultou em grandes quantidades de produto da proteína PfCS na forma insolúvel.
- ✓ O sistema de expressão em procarioto apresenta vantagem em relação a custos e grandes quantidades de proteínas obtidas, porém apresenta-se na maioria das vezes proteínas na forma de corpos de inclusão ou dificulta o processo de solubilização e purificação.
- ✓ A utilização de produto desnaturante pode afetar a atividade da proteína, cuja finalidade é o uso como alvo quimioterápico, necessitando de outros protocolos de solubilização.
- ✓ A purificação da proteína corismato sintase de *P. falciparum* PfCS, foi obtido um semi-purificado com nível de pureza elevado através da coluna níquel Ni-NTA, certificando-se que a metodologia pode ser aplicada para purificação de proteína recombinantes.

## 7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. P.; DURLACHER, R. R., MENEZES M. J.; KRIEGER, H., PEREIRA DA SILVA, L. H. AND CAMARGO, E. P. **High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66 (6): 641- 648 (2005).

ANDRADE, S. L. **Aspectos epidemiológicos da malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil / Simone Ladeia Andrade.** – Rio de Janeiro (2005).

ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G.; OLIVEIRA, F. Q.; CASALI, V. W.; JAINE, N. B.; ZALIS, M. G.; OLIVEIRA, L. A. AND KRETTLI, A. U. **Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil.** *Phytother Res* 18: 634-9 (2004).

ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA, L. A. AND KRETTLI A. U. **Antimalarial Activity of *Chinchona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil.** *J. Ethnopharmacol.* 87: 253-6 (2003).

ANGELLOTTI, M. C.; BHUIYAN, S. B.; CHEN, G. AND XIU-FENG, W. **Códon usage bias analysis within and across genomes.** Systems Biology Laboratory. Department of Microbiology, Miami University, Oxford, OH 45056, USA (2007).

ARAÚJO, M. E. M. Químicas dos Produtos Naturais. DQB 2008. Disponível em [www.dqb.fc.ul.pt](http://www.dqb.fc.ul.pt), acesso em 25-11-2009.

ARCURI H, A. **Bioinformática estrutural aplicada ao estudo de enzima da via metabólica do ácido chiquímico.** Tese em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade UNESP. São Paulo (2008)

ARORA, N.; CHARI, U. M.; BANERJEE, A. K. AND MURTY, U. **A computational approach to explore *Plasmodium falciparum* 3D7 Chorismate Synthase.** *The Internet Journal of Genomics and Proteomics.* Volume 3 Number 1 (2007).

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A. AND STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology (1999).**

BACA, A. M. AND HOL, W. G. J. **Overcoming codon bias: A method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*.** Department of Bioengineering, Howard Hughes Medical Institute, Biomolecular Structure Center, Box 357742, University of Washington, WA 98195 Seattle USA (2000).

BAHL, A.; BRUNK, B.; COPPEL, R. L.; CRABTRE, E. J.; DISKIN, S. J.; FRAUNHOLZ, M. J.; GRANT, G. R.; GUPTA, D.; HUESTIS, R. L.; KISSINGER, J.

C.; LABO, P.; LI, L.; MCWEENEY, S. K.; MILGRAM, A. J.; ROOS, D. S.; SCHUG, J.; STOECKERT, C. J. J. R. PlasmoDB: **The *Plasmodium* genome resource**. An integrated database providing tools for accessing, analyzing and mapping expression and sequence data (both finished and unfinished). *Nucleic Acids Res* 30: 87–90 (2002).

BANEYX, F. AND MUJACIC, M. **Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia Coli***. *Nat Biotechnol*. Nov; 22(11):1399-408 (2004).

BASCO, L.; BICKII, J. AND RINGWALD, P. **In vitro activity of lumefantrine (benflumetol) against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon**. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42.2347–2351 (1998).

BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO, A. G.; JUNIOR, W. F. A.; MOREIRA, I. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; SPARTACO, A. F.; SANTOS, R. R.; ARES S. O. A. S.; SANTOS, M. B. P. **The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review - Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, and Vol. 100 (6): 575-606, October (2005).

BAUER D., WARTHOF P., ROHDE L., STRUSS M. **PCR Methods and Applications** (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), Supplement, pp. S97– S108 (1994).

BENTLEY, R. **The shikimate pathway**. A metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 25: 307-84 (1990).

BERMAN, P. A.; HUMAN, L.; FREESE, J. A. **Xanthine oxidase inhibits growth of *Plasmodium falciparum* in human erythrocytes *in vitro***. *J. Clin. Invest*. 88: 1848-55 (1991).

BERTIOLI, D. J.; SCHICHTER, U. H. A.; ADAMS, M. J.; BURROWS, P. R.; STEINBISS, H. H.; ANTONIW, J. F. **Nucleic Acids Res**. 23: 4520–4523 (1995).

BIAGINI, G. A.; O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G. AND WARD, S. A. **Current drug development portfolio for antimalarial therapies**. *Current Opinion in Pharmacology* 5: 473-478 (2005).

BIRNBOIM, H. C & DOLY, J. **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA**. *Nucleic Acids Res*. Nov 24: 7(6) 1513–1523 (1979).

BOULOS, M.; DUTRA, A. P.; DISANTI, M. S.; SHIROMA, M.; NETO, A. V. **Avaliação Clínica do Quinino para o Tratamento de Malária por *Plasmodium Falciparum***. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.30 n.3 Uberaba (1997).

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde (2003)**.

BUTLER, W. T.; JOHN, B. B. **Proteins of the periodontium. Biochemical studies on the collagen and noncollagenous proteins of human gingivae.** Received 14 May, accepted for publication 28 May (1974).

CALDERON, L. A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J. P.; ALMEIDA E SILVA, A.; CIANCAGLINI, P.; PEREIRA DA SILVA, L. H. AND STÁBELI, R. G. **Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria.** Sociedade Brasileira de Química J. Braz. Chem. Soc. Vol. 20, No. 6, 1011-1023 (2009).

CAMARGO, L. M. A.; NORONHA, E. AND SALCEDO, J. M. V. **Epidemiology of malaria in Rondônia (western Amazonia region Brasil):** study of a ribeirine population. *Acta Tropica*, 72:1-11 (1999).

CANDEIAS, J. A. N. **A Engenharia Genética.** Novos Aspectos da saúde pública. Ver. Saúde Públ. São Paulo, 25 (1) 3-10 (1991).

CARSTEN-PETER, C.; BONNARDEL, J.; WAESCHE, A.; STRATAGEN, R. A. **Condon bias - High-level expression of heterologous proteins.** New BL21-CodonPlus™ Cells Correct Codon Bias in GC-Rich Genomes (2000).

CARTER, R. AND MENDIS, K. N. **Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria.** Clinical Micrinantes obiology Reviews. Doi: 10.1128/CMR. Geneva, Switzerland 15.4.564–594 (2002).

CARUSO, C. S. **Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de *Xilella fastidiosa*.** Tese apresentada ao Instituto de química de São Carlos da Universidade de São Paulo (2007).

CHEDGZOY, P.; WINCKLE, G.; HEARD, C. M. **Triclosan: release from transdermal adhesive formulations and in vitro permeation across human epidermal membranes.** *Int. J. Pharm.* Amsterdam (2002).

CINQUIN, O.; RICHARD, I.; CHRISTOPHERSON, R. AND MENZ, I. **A hybrid plasmid for expression of toxic malarial proteins in *Escherichia coli*.** Molecular & Biochemical Parasitology. Department of Biochemistry. the University of Sydney. Sydney, Australia. 117 (2001) 245–247 (2001).

COGGINS, J. R.; BOOCOOCK, M. R.; CHAUDHURI, S.; LAMBERT, J. M.; LUMSDEN, J.; NIMMO, G. A. AND SMITH, D. D. **The arom multifunctional enzyme from *Neurospora crassa*.** Methods Enzymol.142:325–341 (1987).

COGGINS, J. R.; ABELL, C.; EVANS, L. B.; FREDERICKSON, M.; ROBINSON, D. A.; ROSZAK, A. W. AND LAPTHORN, A. P. **Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design.** Biochem Soc. Trans. 31: 548-51 (2003).

CORDEIRO, M. C. R. **Engenharia genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações**. Embrapa Cerrados. Planaltina, DF (2003).

COURA, J. R.; SUÁREZ-MUTIS, M. AND LADEIA-ANDRADE, S. **A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection – A review**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101: 229-237 (2006).

CRAVO, P. AND ROSÁRIO, V. E. **Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos**. Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais/UNL. Rua da Junqueira 96, 1349-008 Lisboa (2003).

DE AZEVEDO, J. R. W. F.; CANDURI, F.; DA SILVEIRA, N. J. F. **Structural basis for inhibition of cyclin-dependent kinase 9 by flavopiridol**. Biochemical and biophysical research communications. 293 p. 566–571 (2002).

DEANE, L. M. **Malaria studies and control in Brazil**. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38 (2): 223-230 (2000).

DIECKMAN, A. & JUNG, A. **Mechanisms of sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum***. *Mol Biochem Parasitol* 19: 143-7 (1986).

DUNCAN, k.; EDWARDS, R. M. AND COGGINS, J. R. **The pentafunctional arom enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is a mosaic of monofunctional domains**. *Biochem J*. September 1; 246 (2): 375–386 (1987).

FITZPATRICK, T.; RICKEN, S.; LANZER, M.; AMRHEIN, N.; MACHEROUX, P.; KAPPES, B. **Subcellular localization and characterization of chorismate synthase in the apicomplexan *Plasmodium falciparum***. *Mol Microbiol*; 4: 65-75 (2001).

FRÉDÉRICH, M.; DOGNE, J. M.; ANGENOT, L.; MOL, P. **New trends in anti-malarial agents**. *Current Medicinal Chemistry* (2002).

FREITAS, L. F.; CHAVES, G. C.; WANNMACHER, L. AND OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S. **Malária não complicada por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* no Brasil: evidências sobre fármacos isolados e associações medicamentosas empregados em esquemas terapêuticos recomendados pelo protocolo terapêutico oficial**. *Saúde Pública*, Rio de Janeiro, out (2007).

FUNASA/MS. **Evolução das endemias parasitárias**. Malária. *Informe Epidemiológico do SUS*, 8 (3): 26-29, jul/set (1999a). Disponível em [www.funasa.gov.br](http://www.funasa.gov.br), acesso em 20/11/2009.

FUNASA/MS. **Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998**. *Boletim Epidemiológico*, edição especial: 17-18 (1999b). Disponível em [www.funasa.gov.br](http://www.funasa.gov.br), acesso em 20/11/2009.

FUNASA: FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de terapêutica da malária**. Brasília: Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde (2001). Disponível em [www.funasa.gov.br](http://www.funasa.gov.br), acesso em 20/11/2009.

GARDNER, M. J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; HYMANR, 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.; PERTEA, M.; ALLEN, J.; SELENGUT, J.; HAFT, D.; MATHER, M. W.; VAIDYA, A. B.; MARTIN, D. M. A.; 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. AND BARRELL, B. **Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum***. *Nature* 419: 498–511 (2002).

GARFINKEL, M. S.; ENDY, D.; EPSTEIN, G. L.; FRIEDMANN, R. M. **Synthetic genomics: options for governance**. Disponível em <http://www.jcvi.org>, acesso em 20/11/2009.

GLENN, A. E.; RICHARDSON, E. A. AND BACON, C. W. **Genetic and morphological characterization of a *Fusarium verticillioides* conidiation mutant**. *Mycologia*, 96 (5) p. 968–980 (2004).

GORNICK, P. **Apicoplast fatty acid biosynthesis as a target for medical intervention in apicomplexan parasites**. *Int. J. Parasitol.* 33:885-96 (2003).

GOUY, M. & GAUTIER, C. **Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity**. *Nucleic Acids Res.* 10. 7055–7074 (1982).

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S. AND MINSHUL, J. **Codon bias and heterologous protein expression**. DNA 2.0,1455 Adams Drive, Menlo Park, CA 94025, USA (2004).

HERRMANN, K. M. AND WEAVER, L. M. **The shikimate pathway**. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol.* 50: 473-503 (1999).

JORGENSEN, F. G.; SCHIERUP, M. H.; CLARK, A. G. **Heterogeneidade regional em GC conteúdo e diferenciada usa de códons e aminoácidos em GC-GC- Pobres e regiões ricas do genoma de *Apis mellifera***. *Biologia Molecular e Evolução* (2006).

KANE, J. F. **Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli***. SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, USA (1995).

KAPOOR, M. C.; CHANDRAMOULI, R.; KRISHNASASTRY, M. V.; SUROLIA, N. AND SUROLIA, A. **Slow-tight-binding inhibition of enoyl-acyl carrier protein**

**reductase from *Plasmodium falciparum* by triclosan.** Biochem. J381: 719 - 24 (2004).

KETOLA, I. R.; NAFIS, J. T.; BIELINSKA, O. M.; PORTER-TINGE, S. B.; TAPANAINEN, J. S.; HUHTANIEMI, I. T.; WILSON, D. B. AND HEIKINHEIMO, M. **Expression and Regulation of Transcription Factors GATA-4 and GATA-6 in Developing Mouse Testis.** The Endocrine Society. Vol. 140, No. 3 1470-1480 (1999).

KICSKA, G. A.; TYLER, P. C.; EVANS, G. B.; FURNEAUX, R. H.; SCHRAMM, V. L.; KIM, K. **Purine-less death in *Plasmodium falciparum* induced by immucillin-H, a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase.** J Biol Chem. 277: 3226-31(2002a).

KICSKA, G. A.; TYLER, P. C.; EVANS, G. B.; FURNEAUX, R. H.; KIM, K.; SCHRAMM, V. L. **Transition state analogue inhibitors of purine nucleoside phosphorylase from *Plasmodium falciparum*.** J Biol Chem. 277: 3219-25 (2002b).

KINK, J. A.; MARGOT, M.; KIT-YIN, L.; KANABROCKI, J. AND KUNG, A. C. **Efficient expression of the *Paramecium* calmodulin gene in *Escherichia coli* after four TAA-to-CAA changes through a series of polymerase chain reactions.** J. Protozool. 38: 441–447 (1991).

MACHEROUX, K. B. **Annotating the *Plasmodium* genome and the enigma of the shikimate pathway.** Trends Parasitol. 20: 60-5 (2003).

MACLEAN, J. AND SOHAIL, A. **The Structure of Chorismate Synthase Reveals Novel Flavin Binding Site Fundamental to a Unique Chemical Reaction.** Elsevier Science Ltda. All rights reserved. DOI 10.1016 Vol. 11: 1499–1511 (2003).

MARQUES, A. C. & GUTIERREZ, H. C. **Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 91-108 (1994).

MARQUES, C. H. **Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica.** Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Rio de Janeiro (2005).

MATTIOLI, M. A. P. **Analysis of codon usage patterns of eucalyptus genomes for DNA optimization and enhanced protein expression.** *Genética Vegetal e Melhoramento. Código:* Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia 000448268 (2008).

MCCONKEY, G. A.; PINNEY, J. W.; WESTHEAD, D. R.; PLUECKHAHN, K.; FITZPATRICK, T. B. AND MACHEROUX, K. B. **Annotating the Plasmodium genome and the enigma of the shikimate pathway.** 10.1016.11.001 (2004).

McCONKEY, G. A. **Targeting the shikimate pathway in the malaria parasite Plasmodium falciparum.** Antimicrob Agents Chemother 43: 175-7 (1999).

MCGREEVY, P. B.; DIETZE, R.; PRATA, A. AND HEMBREE, S. C. **Effects of immigration on the prevalence of malaria in rural areas of the Amazon basin of Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 84 (4) : 485-491 (1989).

McLEOD, R.; STEPHEN, P.; MUENCH, J. B.; RAFFERTY, D. E.; KYLE, E. J.; MUI, M. J.; KIRISITS, D. G.; MACK, C. W.; ROBERTS, B. U.; RUSSELL, S.; LYONS, E.; DORRIS, M.; WILBUR, K. M. AND RICE, D. W. **Triclosan inhibits the growth of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii by inhibition of Apicomplexan Fab I.** Int J Parasitol 31: 109-113 (2001).

McROBERT, L. AND MCCONKEY, G. A. **RNA interference (RNAi) inhibits growth of Plasmodium falciparum.** Mol Biochem Parasitol. 119: 273-8 (2002)

McROBERT, L.; SHENDE, J. B.; STEAD, C. A.; MCCONKEY, G. A. **Plasmodium falciparum: Interaction of shikimate analogues with antimalarial drugs.** Institute of Pharmacy and Chemistry, School of Sciences, University of Sunderland, SR1 3SD, UK. Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin, PR China, 300072 (2005).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE PREVENÇÃO E CONTROLE DA MALÁRIA – PNCM. Série C. **Projetos, Programas e Relatórios, Secretaria de Vigilância em Saúde,** Ministério da Saúde, Brasília-DF (2003). Disponível em <http://www.saude.gov.br/svs>. Acesso em 10/06/2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica da malária no Brasil.** Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília-DF (2005). Disponível em <http://www.saude.gov.br/svs>. Acesso em 15/06/2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Programa nacional de prevenção e controle da malária.** Brasília: Ministério da Saúde. (2008). Disponível em [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs), acesso em 25/06/2008.

MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; CHRISTOPHER, J. A. AND HERNANDEZ, C. J. **Application of multiplex PCR and fluorescence-based semiautomated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources.** Editeur / Publisher. Crop Science Society of America, Madison, WI, ETATS-UNIS (1961) vol. 37, nº2, p. 617-624 (1997).

MOUSDALE, T. L.; HAWKES, T. R.; LEWIS, T.; COGGINS, J. R.; MOUSDALE, D. M.; LOWES, D. J. AND THORNELEY, R. N. F. **Chorismate synthase.** Pre-



steady-state kinetics of phosphate release from 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate. *Biochem J.* February 1: 265 (3): 899–902 (1990).

MUSTO, H.; ROMERO, R.; ZAVALA, A.; JABBARI, K. AND BERNARDI, G. **Synonymous Codon Choices in the Extremely GC-Poor Genome of *Plasmodium falciparum***: Compositional Constraints and Translational Selection. Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma, Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay, UY (1999).

NAMBIAR, K. P.; STACKHOUSE, J.; PRESNELL, S. R. AND BENNER, S. A. **Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein.** *Science.* 223 1299–130 (1984).

NOVY, R.; DROTT, D.; YAEGER, K. AND MIERENDORF, R. **Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression.** Novagen. *An Affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany* (2001).

OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. World Health Organization 1997. **World malaria situation in 1994.** Disponível em [www.who.int/](http://www.who.int/). Acesso em 12/06/2008.

OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. World Health Organization 2005. **World malaria situation in 2005.** Disponível em [www.who.int/](http://www.who.int/). Acesso em 15/06/2008.

OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. World Health Organization 2006. **World malaria situation in 2006.** Disponível em [www.who.int/](http://www.who.int/). Acesso em 20/06/2008.

OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. World Health Organization 2006. **World malaria situation in 2008.** Disponível em [www.who.int/](http://www.who.int/). Acesso em 20/06/2008.

OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. World Health Organization 2009. **World malaria situation in 2009.** Disponível em [www.who.int/](http://www.who.int/). Acesso em 22/02/2010.

OMS/OPAS **A malária e as metas de desenvolvimento Internacionalmente acordadas, inclusive as constantes da Declaração do Milênio.** 46º Conselho Diretor - 57ª Sessão do Comitê Regional *Washington*, Organização Pan-americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (2005). Disponível em [www.who.int/](http://www.who.int/). Acesso em 21/06/2008.

PANKE, S. AND HEINEMANN, M. **Synthetic biology putting engineering into biology.** Bioprocess Laboratory, Institute of Process Engineering. Universita tsstrasse Zurich, Switzerland (2006).

PEREIRA, J. H.; DE OLIVEIRA, J. S. F.; CANDURI, M. V. B.; DIAS, M. S.; PALMA, L. A.; BASSO, D. S. S. AND DE AZEVEDO, W. F. JR. **Structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the binding of shikimic acid.** *Acta Cryst. V.D60*, p. 2310–2319 (2005).

PEROZZO, R.; KUO, M.; SIDHU, A. B. S.; VALIYAVEETIL, J.T.; BITTMAN, R.; JACOBS, W. R. J. R.; FIDOCK, D. A. AND SACCHETTINI, J. C. **Structural elucidation of the specificity of the antibacterial agent triclosan for malarial enoyl acyl carrier protein reductase.** *J Biol Chem* 277. 13106-14 (2002).

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. **farmacêutica aplicada ao tratamento da malária Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. Vol. 43, n. 4, out./dez. (2007).

PITHAN, O. A. **Malária em populações indígenas de Roraima.** XXX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Resumo de Temas Livres*, p. 568 n.º 284 (1994).

PÓVOA, M. M.; VINEIS, J. H.; BOLLBACK, J. P.; ONYABE, D. Y.; WILKERSON, R. C. AND CONN, J. E. **Population Structure of the Malaria Vector *Anopheles darlingi* in a Malaria-Endemic Region of Eastern Amazonian Brazil.** The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74 (5) p. 798–806 (2006).

RAMOS, C. P. S. **Análise dos padrões de utilização de códons sinônimos no genoma da bactéria *Chromobacterium violaceum*.** Dissertação – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas Genética. 70 folhas. (2006).

RANG, H. P.; DALE, M. M. AND RITTER, J. M. **Farmacologia.** Guanabara Koogan, 3.<sup>a</sup> edição (1997).

REBÊLO, M. M. J.; DA SILVA, A. R.; FERREIRA, L. A. E VIEIRA, J. A. ***Anopheles* (culicidae, anophelinae) e a Malária em Buriticupu-Santa Luzia, Pré-Amazônia Maranhense.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 30 (2):107-111, mar-abr ( 1997).

REYES, P.; RATHOD, P. K.; SANCHEZ, D. J.; MREMA, J. E.; RIECKMANN, K. H. AND RIDLEY, R. G. **Medical need scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs.** *Nature* 415: 686-93 (2002).

RIDLEY, R. G. AND HUDSON, A. T. **Exp. Opin. Ther. Patents** 8-121 (1998).

RIDLEY, R. G. **Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs.** *Medicines for Malaria Venture, Box 1826, CH-1215 NATURE.* VOL 415, 7 february,15 Geneva, Switzerland (2002).

ROBERTS, F.; ROBERTS, C. W.; JOHNSON, J. J.; KYLE, D. E.; KRELL, T.; COGGINS J. R., COOMBS G. H., MILHOUS W. K., TZIPORI S., FERGUNSON D. CHAKREBARTI, D. AND MCLEOD, R. **Evidence for shikimate pathway in apicomplexan parasites.** Nature 393: 801-5 (1999).

RODRIGUES, A. F.; ESCOBAR, A. L. AND SOUZA-SANTOS, R. **Spatial analysis and determination of malaria control areas in the State of Rondônia-Brasil.** Dissertação – Universidade Federal de Rondônia-BR (2008).

SAMBROOK, R. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual** 3ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).

SANTOS, R. L. C. S.; CARVALHO, I. M.; LACERDA, R. N. L.; FAYAL, A. S.; PÓVOA, M. M. **Inquérito entomológico e efetividade durante epidemia de malária no município de Anajás, Estado do Pará.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38(2): 202-204 (2005).

SCHWANKE, R. C. **Expressão da Proteína GM-CSF em Corpos de Inclusão e suas Vantagens.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências na Pontifícia Universidade Católica do Rio do Sul, Porto Alegre-RS (2008).

SEEBER, F. **Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa.** (Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 3: 99-109 (2003).

SHI, W.; TING, L. M.; KICKSKA, G. A.; LEWANDOWICZ, A.; TYLER, P. C.; EVANS, G. B.; FURNEAUX, R. H.; KIM, K.; ALMO, S. C. AND SCHRAMM, V. L. **Plasmodium falciparum purine nucleoside phosphorylase.** Crystal structures, immucillin inhibitors and dual catalytic function. J Biol Chem. 279: 18103-6 (2004).

SILVEIRA, A. C. & REZENDE, D. F. **Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil.** Organização Pan-Americana da Saúde, Brasília-DF. (2001). Disponível em [www.opas.org.br/](http://www.opas.org.br/). Acesso em 10/07/2008.

SILVEIRA, N. J. F. **Bioinformática estrutural aplicada ao estudo de proteínas alvo do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*.** Tese apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP. 117 f.[s.n.], São José do Rio Preto (2005)

SNOUNOU, G. **Detection and Identification of the Four Malaria Parasite Species Infecting Humans by PCR Amplification.** Methods in molecular Biology. Vol. 50: species Diagnostics: PCR and Other Nucleic Acid Methods. p. 263-291(1996).

SNOUNOU, G.; SNOW, R. W.; GUERRA, C. A.; NOOR, A. M.; MYINT, H. Y. AND HAY, S. I. **The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria.** *Nature* 434: 214-7 (2005).

SUÁREZ-MUTIS, M. C. AND COURA, J. R. **Malária. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** Rio de Janeiro. Editora Guanabara - Koogan (2007).

SUROLIA, N. AND SUROLIA, A. **Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*.** *Nature Medicine* 7, 167-173: doi 10.1038/84612 (2001).

TAYLOR, W. R. J. & WHITE, N. J. **Combination of Isosorbide Dinitrate and Hydralazine in Blacks.** Vol 351 nº. 20 (2004).

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I. AND ARAKAWA, T. **Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies.** *Protein Expr Purif* Mar 28 (1): 1-8 (2003).

VALE, N.; MOREIRA, R. E GOMES, P. **quimioterapia da malária.** Departamento de Química da Universidade do Porto. Centro de Estudos de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (2005)

VANZ, A. L. S. **Clonagem, Superexpressão Purificação e Caracterização da Proteína Recombinante Humana Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos.** Dissertação de mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio grande do Sul - Faculdade de Biociências (2008).

WELLEMS, T. AND PLOWE, C. **Chloroquine-resistant malaria.** *J Infect Dis.* 184: 770-6 (2001).

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A. L.; WERNSDORFER, W. H. AND MESHNICK, S. R. **Epidemiology of drug-resistant malaria.** *Lancet Infect. Dis.* 2 (4) 209-218 (2002).

WU, X.; KNAPP, S.; STAMP, A.; STAMMERS, D. K.; JÖRNVALL, H.; DELLAPORTA, S. L. AND OPPERMAN, U. **Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*.** RNA stability and secondary structure but not tRNA. Karolinska Institutet SE-141 57 Huddinge, Sweden (2003).

YADAVA, A. AND OCKENHOUSE, C. F. **Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems.** *Infect. Immun.* 71 4961–4969 (2003).