

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo do sistema de reparo do DNA tipo “*Mismatch Repair*” em *Plasmodium* spp.

por

Sarah Stela Resende

Belo Horizonte
Fevereiro/2013

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo do sistema de reparo do DNA tipo “*Mismatch Repair*” em *Plasmodium* spp.

por

Sarah Stela Resende

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do
Título de Mestre em Ciências da Saúde na área de
concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr^a Cristiana Ferreira Alves de Brito

Belo Horizonte,
Fevereiro/2013

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R433e Resende, Sarah Stela.
2013

Estudo do sistema de reparo do DNA tipo
“*Mismatch Repair*” em *Plasmodium* spp. / Sara
Stela Resende. – Belo Horizonte, 2013.

xv, 95 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 102 - 110

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para
obtenção do título de Mestre em Ciências pelo
Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde
do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de
concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Malária *Falciparum*/genética 2. *Plasmodium*
falciparum/enzimologia 3. Resistência
a Medicamentos/efeitos de drogas I. Título. II. Brito,
Cristiana Ferreira Alves (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo do sistema de reparo do DNA tipo “Mismatch Repair” em *Plasmodium* spp.

por

Sarah Stela Resende

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr^a. Cristiana Ferreira Alves de Brito (Presidente)
Dr. Mariano Gustavo Zalis
Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares
Suplente: Dr^a. Silvane Maria Fonseca Murta

Dissertação defendida e aprovada em: 22/02/2013

A todos que de alguma forma deixaram sua marca em meu caminho: aos meus amigos e familiares, que souberam compreender meus momentos de ausência. Ao meu noivo, por seu amor, companheirismo e compreensão. A minha irmã, que tanto se orgulha das minhas conquistas. Aos meus pais, que carinhosamente me apoiaram em cada decisão. A vocês, que estão sempre torcendo por mim e são o motivo pelo qual eu tenho vontade de seguir em frente, superar as dificuldades e ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. Cristiana Brito, pela amizade, oportunidade, paciência e confiança. Por sua contribuição para o meu crescimento científico.

Às doutoras Luzia Carvalho e Taís Nóbrega, pelo apoio técnico, científico e profissional.

Ao Filipe e ao Gabriel, pela parceria e contribuição na execução dos experimentos.

À Aracele, Denise e Marina, pela amizade, companheirismo e compreensão nos momentos de dificuldade.

Ao Armando, pelas contribuições no meu projeto, mas principalmente por me apresentar o LAMAL.

A todos os colegas do laboratório de Malária, pelo apoio e companheirismo.

À Alice, pela boa vontade em organizar os pedidos, cuidar do laboratório e resolver todos os meus problemas.

Ao Geraldo, pela preparação dos materiais.

Às “Antonietes”, pelas amostras e ajuda nas dificuldades do cultivo.

À Renata e à Maria Fernanda, também pela ajuda com os parasitos.

Aos colegas do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo ótimo convívio e por oferecerem a estrutura necessária para realização deste projeto.

À plataforma de PCR em Tempo Real, pelo fornecimento da infraestrutura necessária a realização dos meus experimentos. Em especial à Fernanda, pelo seu trabalho na plataforma e por esclarecer todas as minhas dúvidas.

À plataforma de sequenciamento, em especial à Mariana e à Elisângela pela ajuda com a realização das genotipagens.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo oferecimento deste curso de mestrado com ênfase em Biologia Celular e Molecular.

À Biblioteca do CPqRR, por prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde, custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

A todas as agências de fomento, pelo apoio financeiro: FAPEMIG, CAPES, CNPq e CPqRR/FIOCRUZ.

A Deus, principalmente, já que sem Sua bênção, certamente não chegaria até aqui.

"A maior recompensa para o trabalho do
homem não é o que ele ganha com isso,
mas o que ele se torna com isso"

John Ruskin

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Malária	16
1.2 Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i>	17
1.3. Ação dos antimaláricos e mecanismos de resistência	19
1.3.1 Cloroquina e seus análogos	19
1.3.2 Inibidores da via do folato	21
1.4 Sistemas de reparo do DNA	22
1.4.1 Reparo de bases mal pareadas (<i>mismatch repair</i>)	23
1.5 <i>Mismatch repair</i> , instabilidade de microssatélites e resistência às drogas	24
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3. 2 Objetivos Específicos	28
4 MÉTODOS	29
4.1 Amostras de <i>Plasmodium</i>	29
4.2 Análises <i>in silico</i>	29
4.3 Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	30
4.4 Sincronização dos parasitos	30
4.5 Confecção de esfregaços	31
4.6 Extração de DNA	31
4.7 Extração de RNA	32
4.8 Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação dos genes MMR	33
4.9 Sequenciamento de DNA	36
4.10 Avaliação da expressão gênica	37
4.10.1 Análise da expressão dos genes codificadores das proteínas do sistema MMR	37
4.10.2 Análise da expressão dos genes associados à resistência	38

4.11 Determinação do número de cópias gênicas	39
4.12 Amplificação e genotipagem dos microssatélites	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Identificação das enzimas do <i>mismatch repair</i>	41
5.2 Comparação entre as sequências das enzimas do MMR de <i>P. falciparum</i> e enzimas do MMR de diferentes organismos.	43
5.3 Similaridade entre as enzimas do MMR nas diferentes espécies de <i>Plasmodium</i>	49
5.4 Comparação entre as sequências de MSH2-1 e MSH2-2	51
5.5 Análise da proteína hipotética MutS*	53
5.6 Polimorfismos nas sequências codificadoras das proteínas do MMR	56
5.7 Sequenciamento dos domínios funcionais	59
5.8 Avaliação do desenvolvimento dos estágios eritrocíticos da cultura ao longo de 50 horas	62
5.9 Quantificação relativa da expressão dos genes de <i>mismatch repair</i>	62
5.10 Quantificação relativa da expressão dos genes de envolvidos na resistência	68
5.11 Avaliação no número de cópias gênicas	70
5.12 Genotipagem dos microssatélites	71
6 DISCUSSÃO	72
6.1 Características do MMR em <i>Plasmodium</i>	72
6.1.1 MutS*	73
6.2 Polimorfismos de base única nos genes codificadores das proteínas do MMR em <i>Plasmodium falciparum</i>	75
6.3 Cinética de expressão das proteínas do MMR	76
6.4 Genes envolvidos na resistência	79
6.4.1 Cinética de expressão ao longo da cultura	79
6.4.2 Expressão x número de cópias	80
6.5 Genotipagem dos Microssatélites em diferentes cepas de <i>P. falciparum</i>	81
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
8 ANEXOS	83
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp. em humanos.	18
Figura 2. Topologia e função do <i>Plasmodium</i> PfCRT.	20
Figura 3. Topologia e função do PfMDR1.	21
Figura 4. Via de biossíntese do folato em <i>P. falciparum</i> .	22
Figura 5. Sistema de reparo de mal pareamento do DNA e suas respectivas enzimas de reparo em procarioto e eucariotos.	24
Figura 6. Desenho esquemático dos domínios presentes em proteínas homólogas a MutS em diferentes organismos.	44
Figura 7. Desenho esquemático dos domínios presentes em proteínas homólogas a MutL em diferentes organismos.	45
Figura 8. Alinhamento dos domínios importantes das enzimas ortólogas de MutS e MutL.	46
Figura 9. Fenograma das proteínas ortólogas de MutS.	48
Figura 10. Alinhamento global entre MSH2-1 e MSH2-2 de <i>P. falciparum</i> .	51
Figura 11. Alinhamento global entre MutS* de diferentes espécies de <i>Plasmodium</i> .	55
Figura 12. Representação esquemática da localização dos SNPS encontrados em cepas e isolados ao redor do mundo.	58
Figura 13. Alinhamento das sequências MSH2-1 obtidas por meio de sequenciamento, em comparação à sequência da cepa 3D7 do GenBank (NCBI).	59
Figura 14. Alinhamento das sequências MSH2-2 obtidas por meio de sequenciamento, em comparação à sequência da cepa 3D7 do GenBank (NCBI).	60
Figura 15. Alinhamento das sequências MSH6 obtidas por meio de sequenciamento, em comparação à sequência da cepa 3D7 do GenBank (NCBI).	60
Figura 16. Alinhamento das sequências MLH1 obtidas por meio de sequenciamento, em comparação à sequência da cepa 3D7 do GenBank (NCBI).	61
Figura 17. Alinhamento das sequências PMS1 obtidas por meio de sequenciamento, em comparação à sequência da cepa 3D7 do GenBank (NCBI).	61
Figura 18. Formas presentes em cada tempo da cultura após sincronização.	62
Figura 19. Cinética da expressão do gene <i>msh2-1</i> normalizado pelo T0 de cada cepa.	63
Figura 20. Cinética da expressão do gene <i>msh2-2</i> normalizado pelo T0 de cada cepa.	64

Figura 21. Comparação da expressão do gene <i>msh2-2</i> em diferentes tempos em relação à expressão de 3D7 em cada tempo.	64
Figura 22. Cinética da expressão do gene <i>msh6</i> normalizado pelo T0 de cada cepa.	65
Figura 23. Cinética da expressão do gene <i>mlh1</i> normalizado pelo T0 de cada cepa.	65
Figura 24. Comparação da expressão do gene <i>mlh1</i> em diferentes tempos em relação à expressão de 3D7 em cada tempo.	66
Figura 25. Cinética da expressão do gene <i>pms1</i> normalizado pelo T0 de cada cepa.	66
Figura 26. Comparação da expressão do gene <i>pms1</i> em diferentes tempos em relação à expressão de 3D7 em cada tempo.	67
Figura 27. Cinética da expressão do gene <i>mutS*</i> normalizado pelo T0 de cada cepa.	67
Figura 28. Cinética da expressão do gene <i>gch-1</i> normalizado pelo T0 de cada cepa.	68
Figura 29. Cinética da expressão do gene <i>mdr1</i> normalizado pelo T0 de cada cepa.	69
Figura 30. Comparação da expressão do gene <i>mdr1</i> em diferentes tempos em relação à expressão de 3D7 em cada tempo.	69
Figura 31. Número de cópias do gene <i>gch-1</i> .	70
Figura 32. Número de cópias do gene <i>mdr1</i> .	70
Figura 33. Filogenia de Apicomplexa.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores e sondas utilizados neste estudo.	34
Tabela 2. Número de espécies de organismos eucariotos em relação ao número de cópias dos genes codificadores de cada proteína do MMR.	41
Tabela 3. Número de genes codificadores de proteínas do MMR em diferentes espécies do filo Apicomplexa.	42
Tabela 4 . Domínios essenciais em cada classe de proteína do <i>mismatch repair</i> .	43
Tabela 5. Escores do alinhamento local entre proteínas do MMR do <i>Plasmodium falciparum</i> e de outros organismos.	47
Tabela 6. Escores do alinhamento local entre proteínas do MMR do <i>Plasmodium falciparum</i> e de diferentes espécies de <i>Plasmodium</i> .	50
Tabela 7. Alinhamento entre os domínios correspondentes de MSH2-1 e MSH2-2.	52
Tabela 8. Resultado do alinhamento entre a proteína homóloga a MutS de <i>P. falciparum</i> e proteínas MSH2 e MSH6 em diferentes organismos.	53
Tabela 9. Resultado da busca por famílias de proteínas no Pfam utilizando a sequência MutS* de <i>P. falciparum</i> .	53
Tabela 10. Resultado do alinhamento local entre o domínio V de MutS* e o domínio V de MSH2 e MSH6 em <i>P. falciparum</i> .	54
Tabela 11. SNPs Encontrados nos genes do <i>Mismatch Repair</i> .	56
Tabela 12. Eficiência dos pares de iniciadores utilizados na avaliação da expressão gênica.	63
Tabela 13. Genotipagem dos microssatélites em diferentes cepas de <i>P. falciparum</i> .	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT – Terapia combinada baseada em artemisina

ATP – *Adenosine Triphosphate* (Trifosfato de Adenosina)

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

cDNAs – *complementar DNA* (Sequência complementar de DNA)

CNP – *copy number polymorphisms* (polimorfismo do número de cópias)

CQ – cloroquina

Ct – *Threshold cycle*

DHFR – Dihidrofolato redutase

DHPS – Dihidropteroato Sintetase

DNA – *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

Pb – pares de bases

MMR – *Mismatch Repair*

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms* (polimorfismos de nucleotídeo único)

VP – vacúolo parasitóforo

Resumo

Cepas de *Plasmodium* resistentes a diferentes drogas têm sido descritas ao redor do mundo. Embora os mecanismos de desenvolvimento de resistência não sejam bem conhecidos, sabe-se que defeitos nos sistemas de reparo do DNA podem estar envolvidos. Esses defeitos estão relacionados principalmente a mutações nas enzimas do sistema de reparo de mal pareamento do DNA ou *mismatch repair* (MMR) e já foram descritos em populações naturais de diversos organismos. Devido ao conhecimento limitado sobre o sistema MMR de *Plasmodium*, faz-se necessário um amplo estudo sobre os genes que codificam as proteínas envolvidas nesse sistema. Neste trabalho, foi realizado um estudo sobre as enzimas envolvidas no sistema de reparo do mal pareamento do DNA em *Plasmodium*: variabilidade intra e interespecífica em *Plasmodium*, principalmente nos domínios funcionais, e comparação entre níveis de expressão entre cepas/isolados de *P. falciparum*. Os parasitos foram também avaliados quanto ao número de cópias e expressão dos genes *gch-1* e *mdr1*. Foram identificadas proteínas pertencentes às classes MSH2, MSH6, MLH1 e PMS1. As sequências de proteínas mostraram-se muito conservadas, tanto entre o gênero *Plasmodium*, quanto em relação a outros organismos distantes evolutivamente. Foi encontrada uma proteína homóloga a MutS que possui os domínios I e V, mas ainda não identificada quanto à sua classificação. O gene codificador desta proteína teve sua expressão confirmada neste e em outros trabalhos. Alguns SNPs foram encontrados em cepas/isolados depositados no PlasmoDB, no entanto, o sequenciamento da região que compreende os principais domínios funcionais apontou apenas 1 SNP na proteína PMS1. Os genes estudados, em sua maioria, apresentaram-se mais expressos entre 10 e 30 horas após a sincronização. W2 e 3D7 apresentam 2 cópias dos genes *gch-1* e *mdr1*. BHZ apresentou apenas 1 cópia do *mdr1*. Os resultados da análise de expressão desses genes ligados à resistência concordam com os resultados encontrados para o número de cópias gênicas. Este estudo fornece uma análise ampla das principais enzimas do MMR e será importante para estudos futuros do papel funcional destas enzimas e seu envolvimento no desenvolvimento de resistência às drogas.

ABSTRACT

Drug-resistant *Plasmodium* strains have been reported world wide. The mechanisms underlying resistance development are not well understood, but failure in DNA repair could be involved in this process. This failure is mainly related to mutations in the enzymes of the DNA mismatch repair (MMR). Because of the limited knowledge about the *Plasmodium* MMR system, it is necessary a comprehensive study about the genes encoding proteins involved in this system. In this work, we studied the enzymes involved in the *Plasmodium* MMR, considering the intraspecific and interspecific variability in *Plasmodium*, especially within the functional domains and comparing the expression levels between strains/isolates of *P. falciparum*. Parasites were also assessed for copy number and expression of the genes *pfgch-1* and *pfmdr1*. We identified proteins related to MSH2, MSH6, MLH1 and PMS1. The protein sequences were very conserved among the genus *Plasmodium*, as well in relation to other evolutionarily unrelated organisms. We found a putative protein homologous to MutS showing the domains I and V, but not classified yet. The gene encoding this protein has its expression confirmed here and in other previous studies. SNPs were found in some strains/isolates deposited in PlasmoDB, however, the sequencing of the region comprising the main functional domains showed only one SNP in PMS1. The genes studied, mostly, were more expressed between 10 and 30 hours after synchronization. W2 and 3D7 showed 2 copies of the gene *gch-1* and *mdr1*. In BHZ, only one copy of the *mdr1* were founded. The results of expression of these genes related to the resistance agree with the findings for the gene copy number. This study provides a comprehensive analysis of the major enzymes of the MMR and will be important to further functional studies of this enzymes and their role in drug resistance development.

INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença causada por protozoários do filo Apicomplexa, gênero *Plasmodium*. As principais espécies causadoras da doença no homem são: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale*. No entanto, recentemente foram relatados casos de *Plasmodium knowlesi* infectando humanos (CDC, 2009), embora ainda sejam necessárias evidências de que a infecção causada por *P. knowlesi* represente uma zoonose (Barber *et al.* 2012). Estes parasitos são organismos heteroxenos, que têm como hospedeiro vertebrado o homem e como hospedeiros invertebrados, mosquitos do gênero *Anopheles*, vetores da doença.

Cerca 3 bilhões de pessoas estão sob risco de infecção pelo *Plasmodium* spp, sendo que as principais populações afetadas são as de regiões com poucos recursos, a maioria na África sub-Sahara, Sudeste da Ásia e Oeste do Pacífico (CDC, 2009). Em 2010, ocorreram cerca de 216 milhões de casos da doença no mundo (WHO, 2011). O número de casos fatais foi estimado em 1,2 milhões (Murray *et al.* 2012). No Brasil, cerca de 10 milhões de pessoas estão sob risco de infecção. Em 2010 ocorreram cerca 300.000 casos da infecção, dos quais 85% foram causados pelo *P. vivax* (MS/SVS, 2011).

Tanto *P. falciparum* quanto *P. vivax* podem causar anemia grave, mas apenas *P. falciparum* foi descrito causando complicações como malária cerebral, hipoglicemia e acidose metabólica. A biologia destes parasitos explica, pelo menos em parte, as diferenças nos padrões clínicos da doença: *P. falciparum* pode invadir uma grande parte dos eritrócitos, mas *P. vivax* é capaz de invadir apenas eritrócitos jovens (reticulócitos). Além disso, *P. falciparum* possui um número muito maior de vias de invasão em relação ao *P. vivax*, que invade as células vermelhas por meio da interação com receptores do grupo sanguíneo Duffy, presente na superfície das hemácias (Miller *et al.* 2002).

1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium* spp.

No hospedeiro humano, a infecção pelo *Plasmodium* inicia-se com a picada de mosquitos infectados do gênero *Anopheles*, que inoculam os parasitos na forma de esporozoítos (Greenwood, *et al.* 2008). Depois de inoculados, cerca de 30% dos esporozoítos invadem vasos linfáticos e se movimentam ao longo dos mesmos. Estes provavelmente não serão capazes de avançar no ciclo. Os esporozoítos restantes invadem os vasos sanguíneos e por meio da corrente sanguínea, chegam aos capilares sinusóides do fígado, atravessam o endotélio e vários hepatócitos antes de chegarem a um hepatócito final (Chen e Wang, 2008). Dentro do hepatócito, o esporozoíto diferencia-se em esquizonte multinucleado, o qual gera vários merozoítos, as formas invasivas de eritrócitos. O merozoíto alcança o lúmen dos capilares sinusóides no fígado, atravessa a membrana do hepatócito, o espaço de Disse, a camada de matriz extracelular e o endotélio do sinusóide. Para evitar sua remoção por células fagocitárias que patrulham os vasos sinusóides hepáticos, o parasito dispõe de diversos mecanismos para alcançar com segurança a corrente sanguínea (Sturm *et al.* 2006). Assim, o parasito faz com que os hepatócitos formem os merossomas, grandes vesículas que possuem de poucos a milhares de merozoítos. O parasito é ainda capaz de induzir a expressão de marcadores de células viáveis nas células infectadas e nos merossomas, de modo a adiar a morte celular. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, se ligam aos receptores na membrana dos eritrócitos e sofrem reorientação apical, com formação de uma junção irreversível. Os parasitos induzem a formação de um vacúolo parasitóforo derivado da membrana do eritrócito e entram nele movendo a junção. Dentro do eritrócito, o merozoíto inicia a fase eritrocítica do ciclo, transformando-se em trofozoíto jovem, seguido de trofozoíto maduro, sofre esquizogonia e produz novos merozoítos, capazes de invadir novas hemácias (Vlachou *et al.* 2006). *P. falciparum* e *P. vivax* levam cerca 48 horas para completarem o seu desenvolvimento intraeritrocítico (Weatherall *et al.* 2002). Alguns desses parasitos assexuados transformam-se em gametócitos, que quando ingeridos pelo mosquito vetor, recebem o estímulo para sair da hemácia. Cada microgametócito se diferencia em oito microgametas móveis e sofre exflagelação. Já o macrogameta sai do eritrócito

com uma forma arredondada. Após a fertilização, forma-se o zigoto (Vlachou *et al.* 2004; Alano, 2007). O zigoto se transforma em oocineto e atravessa a parede do intestino. Os oocinetos transformam-se em oocistos e, a partir de cada um deles, são produzidos milhares de esporozoítos, que migram para diversas partes mosquito por meio da hemolinfa. Estas formas se acumulam na glândula salivar do mosquito e poderão infectar um novo hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo do vetor (Vlachou *et al.* 2004). A figura 1 ilustra o ciclo de vida do parasito causador da malária.

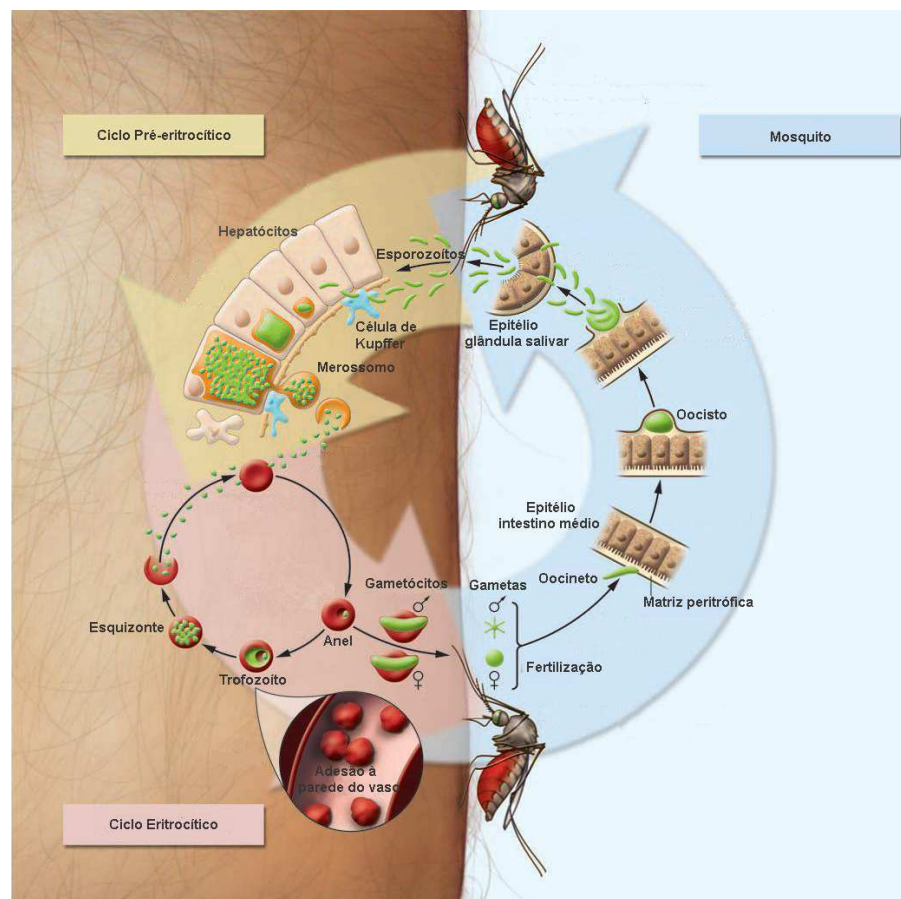


Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. em humanos. Fonte: Greenwood *et al.* (2008).

1.3. Ação dos antimaláricos e mecanismos de resistência

1.3.1 Cloroquina e seus análogos

Por ser um parasito intracelular obrigatório, o *Plasmodium* obtém do hospedeiro os nutrientes necessários ao seu metabolismo. Um destes mecanismos se dá por meio da digestão da hemoglobina, quando ocorre a liberação de uma fração do grupo heme geradora de radicais livres tóxicos para o parasito (Sullivan, 2002). Dessa forma, o parasito promove a detoxificação do grupo heme, gerando um cristal de hemozoína (Ginsburg *et al.* 1999).

A cloroquina (CQ) é um antimalárico padrão, ainda utilizado no tratamento de infecções por *Plasmodium* em locais onde não ocorre resistência a este antimalárico. Apesar de seu longo tempo de uso, os mecanismos de ação e resistência ainda estão longe de serem completamente esclarecidos. A CQ é acumulada no vacúolo parasitóforo (VP). Em pH fisiológico a CQ encontra-se desprotonada, mas no VP, onde o pH é ácido, torna-se protonada, perdendo a capacidade de atravessar a membrana plasmática (Bray *et al.* 2005). O mecanismo de ação mais aceito para a CQ é a formação de uma ligação covalente com o grupo heme, inibindo a formação dos cristais de hemozoína (Sullivan, 2002; Fitch, 2004) e gerando uma alta produção de radicais livres. Esses radicais causam danos oxidativos às biomoléculas, tais como proteínas, DNA e lipídeos. A CQ parece atuar também na inibição da enzima heme polimerase (Orjih, 1997; Agrawal *et al.* 2002).

Muitas teorias já foram formuladas a respeito dos mecanismos que levam à aquisição de resistência à CQ e dentre as mais aceitas está a alteração nos mecanismos de acumulação ou extrusão do fármaco, o que leva a uma redução de sua concentração no vacúolo parasitóforo e também o transporte alterado no citoplasma ou membrana do vacúolo parasitóforo (Olliaro, 2001).

Polimorfismos no gene *pfcr* (*chloroquine resistance transporter*) já foram relacionados à resistência à cloroquina. Neste gene, alelos polimórficos podem conferir diferentes graus de resistência à CQ. Parasitos resistentes à cloroquina que apresentam mutações no *pfcr* acumulam menores taxas desse antimalárico no

vacúolo parasitóforo (Fitch, 2004). Possivelmente, a proteína codificada pelo *pfcr* controla o acesso da cloroquina e diversos outros antimaláricos aos seus alvos, como esquematizado na figura 2.

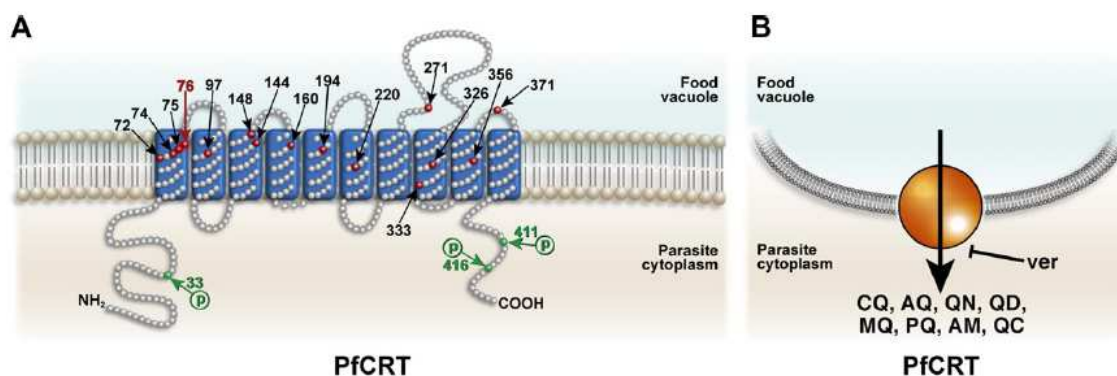


Figura 2. Topologia e função de PfCRT. (A) Um modelo topológico de PfCRT. Setas pretas destacam os aminoácidos polimórficos (círculos vermelhos). Uma substituição conservada em parasitos CQ resistentes, de treonina para lisina na posição 76 está indicada pela seta em vermelho. Os resíduos que podem ser fosforilados são indicados em verde. (B) Substratos propostos para PfCRT, que parece transportar drogas para fora do vacúolo parasitóforo, onde essas drogas são acumuladas. CQ, cloroquina; AQ, amodiaquina; QN, quinina, QD, quinidina; MQ, mefloquina; PQ, primaquina, AM, amantadina; QC, quinacrina. Verapamil (Ver) bloqueia o transporte de drogas mediado por PfCRT. Fonte: Sanchez *et al.* (2010).

Em células cancerosas, o transporte alterado dos fármacos está relacionado a alterações na proteína Pgh, pertencente à classe dos transportadores ABC e codificada pelo gene *mdr1* (*multi drug resistance*) (Higgins, 2007). A proteína Pgh ou MDR1 está presente na membrana do vacúolo parasitóforo de *P. falciparum*. Polimorfismos no gene *mdr1* deste parasito já foram relacionados a alterações na susceptibilidade *in vitro* à cloroquina, quinina, halofantrina, mefloquina e artemisinina (Duraisingh *et al.* 2000; Reed *et al.* 2000; Ngo *et al.* 2003; Pickard *et al.* 2007; Sidhu *et al.* 2005; Sanchez *et al.* 2008).

A perda da capacidade de importar uma droga em particular pode ser vantajosa se seus alvos encontram-se no vacúolo parasitóforo, como CQ e quinina (Fitch, 2004). Por outro lado, se a droga interfere em funções ausentes no vacúolo parasitóforo, a sua importação sequestra os compostos para um compartimento onde eles não são prejudiciais ao parasito (Sanchez *et al.* 2010). A figura 3 mostra as mutações já identificadas na proteína MDR1 e a sua interação com diversos compostos.

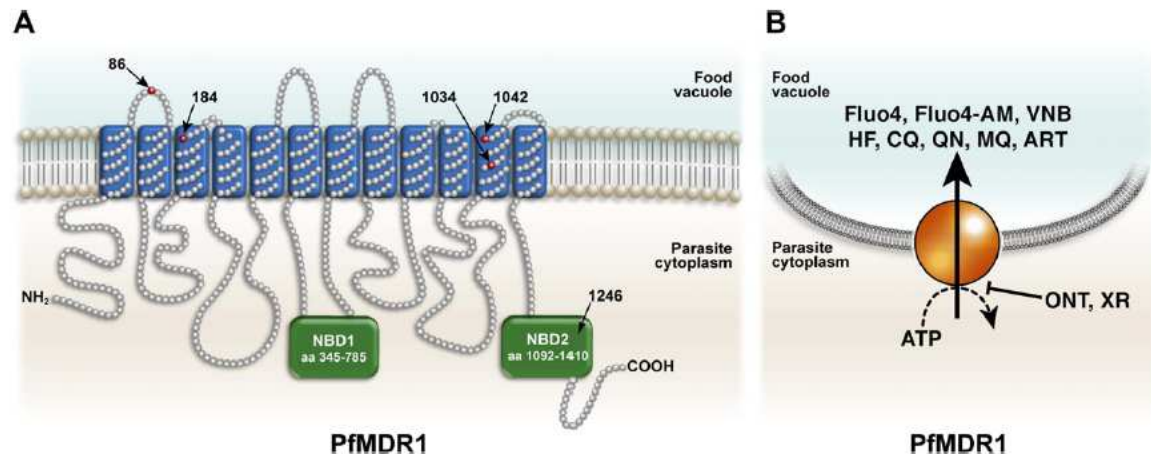


Figura 3. Topologia e função de PfMDR1. (A) Um modelo topológico de PfMDR1. Setas pretas indicam aminoácidos polimórficos (círculos vermelhos) associados com a capacidade de resposta alterada à droga em *P. falciparum*. NBD, domínio de ligação a nucleotídeos. (B) PfMDR1 parece atuar bombeando compostos como fluorocromos (Fluo-4, Fluo-4 AM), para dentro do vacúolo digestivo. HF halofantrina; CQ, cloroquina; QN, quinina; MQ, mefloquina; ART, artemisinina. ONT-093 e XR-9576 bloqueiam o transporte mediado por PfMDR1. Fonte: Sanchez *et al.* (2010).

1.3.2 Inibidores da via do folato

Alguns dos antimaláricos mais comumente utilizados pertencem à classe de antagonistas do folato. No entanto, seu papel no controle da malária é prejudicado pelo rápido aparecimento de resistência sob pressão seletiva do fármaco (Plowe *et al.* 1998).

A inibição de enzimas da via do folato resulta na diminuição da síntese de pirimidina, acarretando na redução da formação de DNA e também prejudica a formação de serina e metionina. Tais atividades são essenciais em todos os estágios do ciclo eritrocítico e em gametócitos jovens. Os antifolatos atuam na inibição das enzimas dihidropteroato sintase (DHPS) ou dihidrofolato redutase (DHFR), prevenindo a formação de intermediários desta via. Os mecanismos de resistência desenvolvidos envolvem mutações nas enzimas alvo, impedindo a sua interação com o fármaco (Olliaro, 2001), conforme mostrado na figura 4.

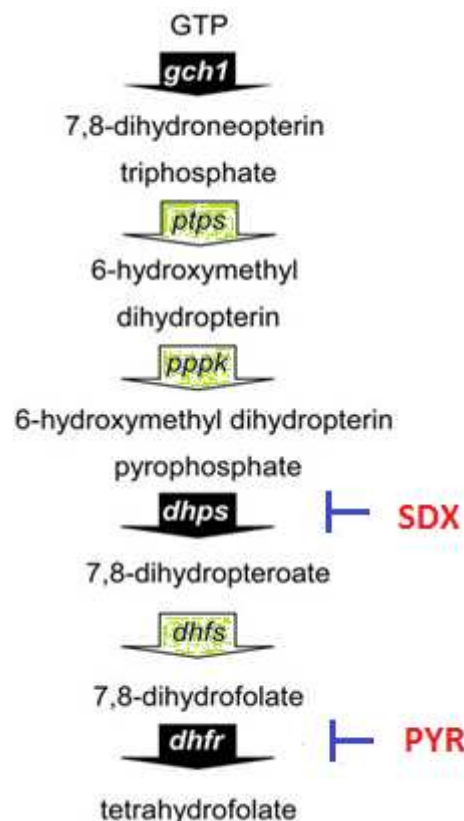


Figura 4. Via de biossíntese do folato em *P. falciparum*. As etapas catalisadas por GCH-1, DHPS e DHFR estão realçadas em preto. As posições da via onde atuam os antifolatos pirimetamina (PIR) e sulfadoxina (SDX) estão indicadas em azul. Fonte: Nair *et al.* (2008), com modificações.

1.4 Sistemas de reparo do DNA

A molécula de DNA está sujeita a alterações induzidas por interações químicas dos nucleotídeos com compostos químicos, como espécies reativas de oxigênio, metais, agentes alquilantes e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ela pode ser alterada também por agentes físicos, como a temperatura e as radiações ultravioleta (UV) e ionizante (Sancar e Sancar, 1988). Também podem ocorrer alterações espontâneas, devido à instabilidade de ligações químicas dos próprios nucleotídeos.

As consequências biológicas dos danos geralmente dependem da natureza química da lesão, que na maioria das vezes afeta a fidelidade da replicação do DNA, causando mutações. Para lidar com tais danos, todos os organismos desenvolveram uma complexa rede de mecanismos de reparo de DNA. Uma grande variedade de vias já foi descrita: reversão direta, reparo por excisão de bases, reparo por excisão

de nucleotídeos, reparo de bases mal pareadas e reparo por recombinação (Morita *et al.* 2010).

1.4.1 Reparo de bases mal pareadas (*mismatch repair*)

O sistema de reparo de bases mal pareadas ou *mismatch repair* (MMR) reconhece e corrige principalmente, os erros da DNA polimerase durante o processo de replicação do DNA, aumentando significativamente a exatidão deste processo (Schaaper, 1993).

Em *Escherichia coli*, o sistema MMR utiliza a ausência de metilação no sítio de restrição para dirigir o reparo à fita de DNA recentemente sintetizada (Modrich, 1989). O sistema MutLHS é formado por três proteínas: MutS - reconhece e ataca a base mal pareada do DNA dupla fita (Lamers *et al.* 2000; Obmolova *et al.* 2000; Takamatsu, Kato, Kuramitsu, 1996); MutL - que interage com o complexo MutS-DNA e ativa a nuclease de restrição MutH (Ban e Yang, 1998). A região contendo o erro é então excisada pela DNA helicase (Mechanic, Frankel e Matson, 2000) e uma exonuclease específica de DNA fita simples (Burdett *et al.* 2001; Yamagata *et al.* 2002; Yamagata *et al.* 2001), como mostrado na figura 5. O fragmento de DNA excisado é então substituído pela síntese de um novo fragmento, por meio da DNA polimerase III e da ligase (Modrich, 1989). Muitos ortólogos de MutL e MutS de *E. coli* são encontrados na maioria dos organismos, entretanto, nenhum ortólogo de MutH foi encontrado nos eucariotos e em bactérias gram-positivas.

Em eucariotos, foi demonstrado que a descontinuidade da fita funciona como um sinal para direcionar o MMR a uma fita particular da dupla fita mal pareada. Nesses organismos, fitas recentemente sintetizadas possuem descontinuidades, como terminações 3' ou fragmentos de Okazaki (Fang e Modrich, 1993; Dzantiev *et al.* 2004; Constantin *et al.* 2005; Modrich, 2006).

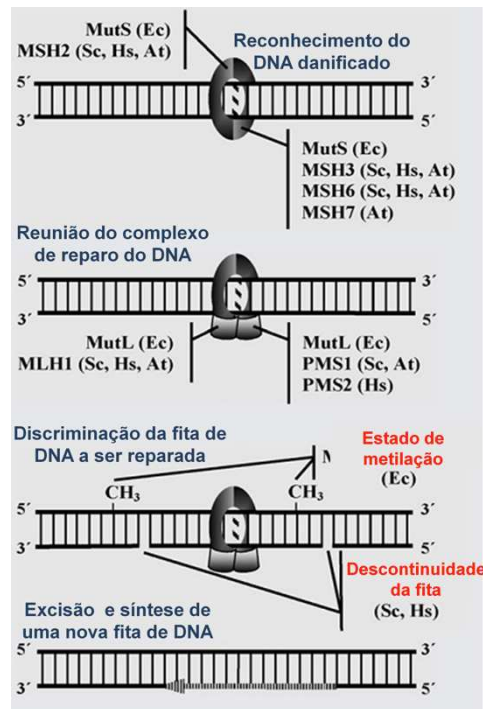


Figura 5. Sistema de reparo de mal pareamento do DNA (MMR) e suas principais enzimas de reparo em procarioto e eucariotos. *Escherichia coli* (Ec) e eucariotos: *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Homo sapiens* (Hs), *Arabidopsis thaliana* (At). As proteínas do MMR atuam na forma de homodímeros em procariotos e heterodímeros em eucariotos. Fonte: Spampinato *et al.* 2009.

1.5 Mismatch repair, instabilidade de microssatélites e resistência às drogas

Os sistemas de reparo do tipo *MMR* estão envolvidos no reparo de mutações pontuais garantindo a fidelidade da replicação e também na regulação da recombinação homóloga, conversão gênica, apoptose e no pareamento e segregação de cromossomos meióticos e mitóticos (Harfe *et al.* 2000; Jiricny, 1998; Kunkel e Erie, 2005; Marti e Fleck, 2002; Schofield e Hsieh, 2003). Todos estes processos estão profundamente relacionados à geração e manutenção da diversidade genética. Defeitos neste sistema de reparo podem estar ligados às formas graves de câncer, hipermutabilidade, tolerância a danos no DNA, resistência quimioterápica e instabilidade de microssatélites (Casorelli *et al.* 2008, Russo *et al.* 2009, Strand *et al.* 1993; Gibson *et al.* 2006; Pepponi *et al.* 2001). A instabilidade de microssatélites refere-se à expansão ou contração de repetições curtas de nucleotídeos. A instabilidade ao longo destas repetições é gerada devido à

derrapagem da polimerase durante a replicação do DNA (*DNA polymerase Slippage*), um erro geralmente reparado pelo sistema MMR. Em tumores, quando há falhas neste sistema de reparo, os erros não são corrigidos, resultando na instabilidade de microssatélites (Samowitz, 2008). Algumas proteínas envolvidas no reparo do DNA já foram identificadas no *P. falciparum* (Haltiwanger *et al.* 2000, Trotta *et al.* 2004, Bethke *et al.* 2007), mas nenhuma em *P. vivax*.

Cepas de *Plasmodium* resistentes às diferentes drogas têm sido descritas ao redor do mundo (Parija Praharaji, 2011). Apesar desta resistência não estar clara para os derivados da artemisinina, já foram relatados casos de baixa susceptibilidade ao Artemether *in vitro* (Talisuna *et al.* 2004; White, 2009). Casos de resistência associados à *P. falciparum*, são muito mais frequentes, uma vez que casos de resistência em *P. vivax* surgiram posteriormente e estão localizados principalmente no Sudeste da Ásia.

Apesar dos mecanismos de desenvolvimento de resistência não serem bem conhecidos, dois processos parecem estar envolvidos: a presença de mutações pontuais em genes específicos, tais como *crt* e *mdr*, como descrito acima, ou a alteração nos níveis de expressão destes genes. Ambos os processos poderiam envolver o sistema MMR, seja pelo acúmulo de mutações, ou pelo aumento no número de cópias gênicas. Mutações pontuais já foram demonstradas para o *P. falciparum* resistente à pirimetamina, sulfadoxina e atovaquona (Brooks *et al.* 1994, Cowman *et al.* 1988, Korsinczky *et al.* 2000). Existem alguns mecanismos descritos pelos quais o parasito é capaz de aumentar a sua taxa de mutações em resposta ao estresse ambiental, por exemplo, causado pela pressão de drogas. Por outro lado, defeitos nos sistemas de reparo também já foram descritos ocorrendo em populações naturais em outros organismos, particularmente em bactérias. Estes defeitos ocorrem principalmente no sistema de reparo de pareamento do DNA ou *mismatch repair* (MMR), em enzimas envolvidas neste processo (Chopra *et al.* 2003).

Pouco se sabe a respeito da atuação do MMR em *Plasmodium*. Em *P. berghei*, embora a introdução uma mutação que leva à produção de uma proteína homóloga a PfMSH2-2 truncada, não tenha levado à um aumento significativo nas taxas de resistência, ocorreu uma alteração nos microssatélites (Bethke *et al.* 2007). No

entanto, cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina apresentaram uma taxa de reparo menor em relação às cepas sensíveis, bem como menor expressão da proteína PfMLH1 (Castellini *et al.* 2011).

Tendo em vista o rápido desenvolvimento de resistência às drogas pelo *P. falciparum*, é possível que parasitos resistentes possuam um sistema de reparo pós-replicação menos eficiente. As consequências deste reparo ineficiente seriam parasitos com diversas mutações, incluindo alterações em genes-chave para a aquisição de resistência às drogas (Rathod, McErlean e Lee, 1997).

Também já foi demonstrado em *Escherichia coli*, levedura e humanos, que mutantes com *MMR* deficiente possuem um aumento nas taxas de rearranjos cromossômicos, como duplicações, deleções e translocações (Petit, *et al.* 1991; Chen *et al.* 2001; Myung *et al.* 2001). Estas duplicações e deleções podem acarretar polimorfismos no número de cópias gênicas (*copy number polymorphism* - CNP). Sabe-se que o aumento do número de cópias de um gene pode incrementar sua expressão sem que seja necessária uma mudança em sua sequência (Anderson *et al.* 2009). Estudos mostram que grande parte da variação genômica e da expressão gênica entre indivíduos pode ser explicada pelos CNPs (Cooper *et al.* 2007; Estivill e Armengo, 2007; Freeman *et al.* 2006; McCarroll e Altshuler, 2007).

Em *Plasmodium*, o estudo dos CNPs ganhou importância quando foi demonstrado que o aumento do número de cópias do gene de resistência *pfmdr1* de *P. falciparum* estava relacionado à resistência a vários antimaláricos no sudeste asiático (Wilson *et al.* 1989). Outros estudos também já relacionaram o número de cópias do *pfmdr1* e resistência à mefloquina, quinina, artemisinina e cloroquina (Price, *et al.* 2004; Wilson *et al.* 1993, Barnes *et al.* 1992).

Outro CNP incriminado no contexto da resistência às drogas envolve o gene *gch-1*, codificante da enzima GTP ciclohidrolase 1, que atua no início da via de biossíntese do folato (Kidgell *et al.* 2006). Enzimas que atuam mais no final desta via são alvos dos compostos sulfadoxina e pirimetamina, de modo que tratamento com antifolatos poderia direta ou indiretamente influenciar no aumento do número de cópias do gene *gch-1* (Nair *et al.* 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a terapia combinada baseada em artemisinina (ACT) é o tratamento preconizado para o tratamento da infecção pelo *P. falciparum* pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), que dentre outras finalidades, reduz as chances de desenvolvimento de resistência e prolonga a eficácia dos quimioterápicos. Embora a resistência à artemisinina ainda não tenha sido descrita *in vivo*, casos de susceptibilidade reduzida a este antimalárico, com atraso no *clearance* dos parasitos já foram identificados (Dondorp *et al.* 2009). Além disso, recentemente parasitos resistentes a dihidroartemisinina foram selecionados *in vitro* (Cui *et al.* 2012). Embora haja controvérsias, especialistas acreditam que em poucos anos o tratamento baseado em ACT deixará de ser efetivo (Eisenstein, 2012). Considerando a velocidade com que os parasitos da malária adquirem resistência a algumas drogas e que muitos aspectos relacionados a tal aquisição permanecem desconhecidos, torna-se essencial o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo.

Um dos mecanismos envolvidos na aquisição de resistência às drogas é a deficiência no sistema de reparo tipo *MMR*, que permite o acúmulo de mutações em diferentes genes. Alguns estudos demonstraram em diferentes modelos, desde bactérias, neoplasias humanas, bem como em *P. falciparum*, uma associação da deficiência nesse tipo de sistema de reparo e resistência às drogas (Chopra *et al.* 2003; Diouf *et al.* 2011; Bethke *et al.* 2007; Castellini *et al.* 2011). Além disso, os achados de que mutantes com *MMR* deficiente possuem um aumento nas taxas de rearranjos cromossômicos (Petit, *et al.* 1991; Chen *et al.* 2001; Myung *et al.* 2001) contribuem para a hipótese do envolvimento do *MMR* em um outro mecanismo já relacionado com a aquisição de resistência em *Plasmodium*, o polimorfismo no número de cópias gênicas (CNP). Devido ao conhecimento limitado sobre o sistema *MMR* de *P. falciparum* faz-se necessário um estudo amplo sobre os genes que codificam as proteínas envolvidas nesse sistema, tais como a identificação de polimorfismos e determinação dos níveis de expressão.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo sobre as enzimas envolvidas no sistema de reparo do mal pareamento do DNA em *Plasmodium*, com ênfase no estudo da sua variabilidade intra e interespecífica em *Plasmodium*, e comparação entre seus níveis de expressão em diferentes cepas.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a conservação das sequências codificadoras das enzimas do *mismatch repair* em 7 espécies de *Plasmodium*, em relação a organismos modelo, por meio de análises *in silico*.
- Analisar cepas de *P. falciparum* resistentes e sensíveis às drogas, quanto à preservação dos domínios responsáveis pela manutenção funcional das enzimas MMR pelo sequenciamento de DNA.
- Avaliar o nível de expressão gênica das enzimas de reparo de *P. falciparum* para as diferentes cepas.
- Avaliar o nível de expressão dos genes *pfmdr1* e *pfgch-1* em diferentes cepas do *P. falciparum*.
- Avaliar os polimorfismos do número de cópias dos genes *pfmdr1* e *pfgch-1* em *P. falciparum* das diferentes cepas.
- Avaliar a variabilidade genética nas cepas 3D7, W2, BHZ e NF54, por meio da genotipagem de microssatélites.

4 MÉTODOS

4.1 Amostras de *Plasmodium*

Foram estudadas neste trabalho 4 cepas de *Plasmodium falciparum*: 3D7 e NF54, que são sensíveis à cloroquina, W2 que é resistente e BHZ, um isolado de Rondônia parcialmente resistente. As amostras utilizadas foram obtidas do estoque do laboratório de malária. Para as análises *in silico*, foram utilizados dados de cepas e isolados cujos SNPs foram depositados no PlasmoDB (<http://plasmodb.org>).

4.2 Análises *in silico*

As sequências codificadoras das principais enzimas do MMR de *P. falciparum*, juntamente com suas ortólogas nas diferentes espécies de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. yoelli*, *P. chabaudi* e *P. berghei*) foram obtidas do PlasmoDB (<http://plasmodb.org>).

A análise da presença e conservação dos domínios funcionais foi feita por meio da recuperação de informações disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e OrthoMCL (<http://orthomcl.org>).

Foram realizados alinhamentos entre as sequências de proteínas ortólogas das diferentes espécies de *Plasmodium*, bem como entre *P. falciparum* e as ortólogas em diferentes organismos modelo (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* e *Homo sapiens*). Os alinhamentos globais foram realizados no programa *ClustalW* (Thompson *et al.* 1994), implementado no pacote de programas do *BioEdit Sequence Alignment Editor* v.7.0.9 (Hall, 1999). Por meio da análise dos alinhamentos pelo *ClustalW*, foi estudada também a conservação dos domínios de cada enzima nas diferentes cepas/isolados. Os alinhamentos locais foram realizados no programa *Blast* (<http://Blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

O fenograma das sequências homólogas a MutS de *E. coli* foi reconstruído pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), utilizando o modelo de substituição nucleotídica (Nei & Kumar, 2000) implementado no programa *MEGA v4.0* (Tamura *et al.* 2007). A consistência dos padrões de agrupamento no fenograma foi avaliado pelo método de *bootstrap* com 1000 repetições.

4.3 Cultivo de *Plasmodium falciparum*

As amostras de sangue parasitado mantidas em nitrogênio líquido foram transferidas para tubos de centrífuga, onde foram gotejados 0,4mL de NaCl 12%, para cada mL de sangue parasitado. Em seguida, foram adicionados 10mL de NaCl 1,6%, gota a gota. Os parasitos foram centrifugados por 5min a 2500rpm, a 20°C e o sobrenadante descartado. O parasitos foram ressuspensos em 5mL de Meio RPMI completo, gota a gota, sob agitação e centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos 20 °C. Depois disso o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi mantido em placas de cultivo com meio RPMI completo. O volume de hemácias foi ajustado para um hematócrito de 6% em um volume final de 10 mL. As placas foram armazenadas em vasilhas plásticas e incubadas a 37°C por 48 h. Após esse período, o meio de cultura foi trocado diariamente, com o adequado ajuste do hematócrito e da parasitemia final. Para a verificação da parasitemia, foram realizados esfregaços diários da cultura, onde a porcentagem de hemácias infectadas foi calculada de acordo com a razão entre hemácias infectadas sobre o total de hemácias.

4.4 Sincronização dos parasitos

Culturas até 12 horas após a invasão dos eritrócitos foram sincronizadas com sorbitol 5% e glicose 0,5%. Cada cultura foi centrifugada por 5min, 2000rpm, na temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 10 volumes da solução de sorbitol e glicose ao sedimento. Posteriormente foi feita a

incubação por 10 minutos a 37°C. Os parasitos em solução foram centrifugados por 5 minutos a 2000rpm e ressuspensos em 5 volumes de meio RPMI completo pré-aquecido a 37°C. Depois disso, os parasitos foram novamente centrifugados e ressuspensos em meio RPMI completo até o volume original. Finalmente, foram transferidos para placas de cultivo e incubados a 37°C.

4.5 Confecção de esfregaços

Os esfregaços sanguíneos feitos a partir do cultivo de *P. falciparum* foram secos ao ar livre e fixados com álcool metílico por 2 minutos. A solução estoque de Giemsa foi diluída na proporção de 1 gota para cada mL de água tamponada e colocada sob cada lâmina. Após 10 minutos, as lâminas eram lavadas, secas ao ar e examinadas em microscópio óptico com a objetiva de imersão.

4.6 Extração de DNA

Trezentos microlitros de sangue parasitado com *P. falciparum* em cultura, com uma parasitemia mínima de 10%, foram utilizados para a extração de DNA, por meio do *Gentra Puregene Blood kit (QIAGEN)*. Foram dispensados 900 µL da solução de Lise RBC (*RBC Lysis Solution*) em um tubo de 1,5 ml e misturados a 300 µL de hemácias. Após 3 minutos de incubação à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada durante 20 segundos a 13200 rpm. O sobrenadante foi desprezado por pipetagem, deixando cerca de 10 µL do líquido residual e o sedimento. Cada tubo foi agitado no vórtex, para ressuspender o sedimento no líquido residual. Em seguida, foram adicionados 300 µL da solução de lise celular (*Cell Lysis Solution*) e o conteúdo agitado no vórtex por 10 segundos. Foram adicionados 100 µL de solução de precipitação de proteínas (*Protein Precipitation Solution*) e o conteúdo do tubo foi agitado no vórtex por 20 segundos e posteriormente centrifugado durante 1 minuto a 13200 rpm. Ao sobrenadante recuperado foram acrescentados 300 µL de

isopropanol. Após homogeneização, foi necessário centrifugar cada tubo durante 1 minuto a 13200 rpm. O sedimento foi seco sobre um papel absorvente e depois 300µL de etanol 70% foram adicionados para lavar o sedimento de DNA. Depois de uma nova centrifugação e da secagem do tubo, ocorreu a adição de 100 µL da solução de hidratação de DNA (*DNA Hydration solution*), com posterior agitação no vórtex por 5 segundos. Para dissolver o DNA, o tubo foi incubado a 65 °C por 5 minutos e à temperatura ambiente por 12 a 16h. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

4.7 Extração de RNA

As amostras para análise da expressão gênica foram obtidas pela sincronização dos parasitos 3D7, W2 e BHZ por sorbitol. Foram coletadas amostras após a sincronização e a cada 10 horas cultura, até a coleta da última amostra no tempo 50 horas, para a realização de uma cinética da expressão gênica.

O RNA dos parasitos foi extraído utilizando-se o *Trizol Reagent (Invitrogen)*, segundo o protocolo do fabricante. Resumidamente, para cada amostra 200µL de eritrócitos parasitados com *P. falciparum* foram homogenizados em 1mL de Trizol, imediatamente depois de retirados da cultura. As amostras foram armazenadas até o momento do uso a -70°C. Para a extração, as amostras foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente e após este intervalo foram adicionados 200µL de clorofórmio. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugada a 12 000 x g por 15 minutos, à 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500µL de isopropanol e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos, seguindo-se de uma centrifugação a 12 000 x g a 4°C, por 10 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1 mL etanol 75%. A amostra foi então agitada e centrifugada a 7 500 x g por 5 minutos à 4°C. O tubo contendo cada amostra foi deixado sob um papel absorvente por no máximo 10 min e o RNA foi então redissolvido em 50 µL de água por incubação a 55°C, durante 10 minutos. As amostras foram imediatamente armazenadas a -70°C.

4.8 Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação dos genes MMR

As reações em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação dos genes MMR foram realizadas para amplificar fragmentos entre 700 e 1172pb, contendo as regiões correspondentes aos domínios essenciais à funcionalidade de cada proteína de reparo nas espécies de *Plasmodium* estudadas. Os iniciadores utilizados foram desenhados no programa *Primer Blast*, disponível via web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-Blast/>) (tabela 1), utilizando a sequência da cepa de referência 3D7.

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 50 µL, utilizando 100-200ng da amostra de DNA, 0,5µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM de MgCl₂, 0,05U da enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen, California, USA*) e o tampão 1X fornecido com a enzima. As amplificações foram realizadas em termociclador *Applied Biosystems (ABI), Veriti 96-wells Thermal Cycler*. As condições da PCR foram um ciclo de 5 minutos a 94°C, seguido por trinta e cinco ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 1,5 minutos a 72°C cada, e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Tabela 1. Iniciadores e sondas utilizados neste estudo

Iniciadores		Locus (sequência 5' 3')
<i>pms1</i>		
<i>pms1ATS</i>	F	CGATTCATAATATATGCAGCAGTCAGG
	R	GACAAGAGCTGTTTTTCATGTGTTCA
<i>pms1ENC</i>	F	TGAAGGACATGAATCAGAATGCTACA
	R	AGGTCTACCATGAGGACAATTCCAT
<i>pms1TR</i>	F	TTGCATCATCTAACAGAGCATCCAGTAGCA
	R	CTTGGATGCTAGAATACGCCACACCTT
<i>msh2-2</i>		
<i>msh2-2ATS</i>	F	AAGTAGCATGTTCATATTGGGAACC
	R	TGGCTCCTACATGATTATTGATTACTCCTT
<i>msh2-2TR</i>	F	GCTGGTCCGTTGCACATTATATCCT
	R	TGGCTCCTACATGATTATTGATTACTCCTT
<i>mlh1</i>		
<i>mlh1ATS</i>	F	ATTAATCGTATAGCTGCTGGTGAGG
	R	ATCACAGGGTAAATTCCTATCGGTAG
<i>mlh1TR</i>	F	AAAGGTTGGTAAGGGCATAGGAGGT
	R	ATCACAGGGTAAATTCCTATCGGTAG
<i>msh2-1</i>		
<i>msh2-1ATS</i>	F	TGTGCTGTTTCTACATATACACCAGT
	R	GGCAATTCAGCAACATTAACCTCCA
<i>msh2-1TR</i>	F	AGTTACCGGACCTAATATGGGAGGG
	R	CGGAAGCTCCAACCTCTGCACATAA
<i>msh6</i>		
<i>msh6MMB</i>	F	ACTCATCAACTATATGGACCCCTCC
	R	AGCACATATGACACTGGTTTGTCT
<i>msh6TR</i>	F	ACGCGTCCTATTCTACATCCTATGGATTCT
	R	GCAACCACAGGATGGATGTTGTCTTC
<i>mutS*</i>		
<i>mutSTR</i>	F	ACCATGTATAGCAACCACACCTGTTGA
	R	ACGATGTTTTTCGCTCTGGCATATTTTGT
<i>seril tRNA sintetase</i>		
<i>serilTR</i>	F	AAGTAGCAGGTCATCGTGGTT
	R	TTCGGCACATTCTTCCATAA
<i>pfmdr1</i>		
<i>mdr1TR(1)</i>	F	TGCATCTATAAAACGATCAGACAAA
	R	TCGTGTGTTCCATGTGACTGT
	S	TTTAATAACCCTGATCGAAATGGAACCTTTG
<i>Pftubulin</i>		
<i>tubulinaTR(1)</i>	F	TGATGTGCGCAAGTGATCC
	R	TCCTTTGTGGACATTCTTCCTC
	S	TAGCACATGCCGTTAAATATCTTCCATGTCT
<i>GTP- ciclohidrolase I-F</i>		
<i>gch-1TR(2)</i>	F	CCTTTTGAAGGTACATGTGATATTGAGT
	R	GCGTTACAAATATCGTTAGTTAAATCTTCT
	P	CTTGAAAATTTAGATAACCCGA

Tabela 1. Iniciadores e sondas utilizados neste estudo. (Continuação)

Iniciadores		Locus (sequência 5' 3')
Microssatélites		
TA1		
(3)	F CCGTCATAAGTGCAGAGC R TTTTATCTTCATCCCCACA	
POLYα		
(3)	F AAAATATAGACGAACAGA R ATCAGATAATTGTTGGTA	
TA60		
(3)	F CTCAAAGAGAAATAATTCA R AAAAAGGAGGATAAATACAT	
ARA2		
(3)	F GAATAAACAAAGTATTGCT R GCTTTGAGTATTATTAATA	
Pfg377		
(3)	F GATCTCAACGGAAATTAT R TTATCCCTACGATTAACA	
PfPK2		
(3)	F CTTTCATCGATACTACGA R AAAGAAGGAACAAGCAGA	
TA87		
(3)	F AATGGCAACACCATTCAAC R ACATGTTCATATTACTCAC	
TA109		
(3)	F GGTAAATCAGGACAACAT R CCTATACCAAACATGCTAAA	
TA81		
(3)	F TGGACAAATGGGAAAGGAT R TTTCACACAACACAGGATT	
TA42		
(3)	F TAGAAACAGGAATGATACG R GTATTATTACTACTACTAAAG	
2490		
(3)	F TTCTAAATAGATCCAAAG R TAGAATTATTGAATGCAC	

Iniciadores F(senso, ou *forward*) e R (antisenso, ou *reverse*), P (sonda, ou *probe*). 1 - Price *et al.* 2004; 2 - Nair *et al.* 2008; 3 - Su e Wellems, 1996. ATS: iniciadores amplificam domínio de ATPase, TR: iniciadores para PCR em tempo real, ENC: iniciadores amplificam domínio de endonuclease; MMB: iniciadores amplificam domínio de ligação da base não pareada.

4.9 Sequenciamento de DNA

A purificação do produto de PCR amplificado foi realizada utilizando-se o *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN). Para cada volume de amostra foram adicionados 5 volumes de tampão PB e 1 volume da amostra de PCR. A mistura foi transferida para uma coluna de purificação, onde foi centrifugada por 60 segundos a 12 000 rpm. Após descartar todo o líquido resultante desta etapa, foram adicionados à coluna 0,75 mL de tampão PE e então se procedeu uma nova centrifugação de 60 segundos. O líquido resultante foi novamente descartado e a coluna centrifugada por 1 minuto adicional. Finalmente, a coluna foi transferida para um novo tubo de centrífuga e o DNA foi eluído adicionando-se 50 µL de água ao centro da coluna, que foi então centrifugada durante 1 minuto.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit *BigDye Terminator v3.1* (Life Technologies), que se baseia no método de terminação de cadeia com ddNTPs, descrito por Sanger *et al.* (1977). Cada reação de 9 µL continha 1 µL dos iniciadores a 3,2 pmoles/µL dos oligonucleotídeos, senso ou antisenso; 1 µL do tampão; 1 µL do *Big dye* e até 6 µL do fragmento amplificado e purificado, nas concentrações entre 20 e 100 ng.

As condições da reação foram 94 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 60 °C por 30 segundos.

O produto obtido da reação foi posteriormente precipitado com isopropanol 65% e etanol 60% e ressuspenso em formamida. As sequências foram analisadas pelo programa *Sequencing Analysis 3.7*, no sequenciador automático *ABIPRISM® 3130*.

Os polimorfismos nas sequências de DNA foram identificados a partir do alinhamento das sequências de cada domínio com o programa *ClustalW* (Thompson *et al.* 1994) dentro do pacote de programas *BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9* (Hall, 1999). No *BioEdit*, quando necessário, foi realizada a edição manual do alinhamento.

4.10 Avaliação da expressão gênica

Para a degradação do DNA antes da transcrição reversa, a amostra foi submetida à ação da *RQ1 RNase-Free DNase (Promega)*. Um micrograma de RNA total foi incubado durante 40 minutos a 37°C, juntamente com 1 µL do tampão RQ1 DNase, 1 µL da DNase RQ1 e água em quantidade suficiente para 10 µL. A reação foi interrompida adicionando-se 1 µL da RQ1 DNase Stop, com incubação de 10 minutos a 65°C. Para a reação de transcrição reversa, foram acrescentados 5 µL de água 1 µL de iniciadores aleatórios (*Promega*). A reação foi Incubada a 70°C por 10 minutos e depois foi acrescentado o mix da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)*: 5 µL do tampão MLV, 2 µL de dNTPs e 1 µL da enzima. A reação de transcrição reversa foi 25°C por 10 min, 37°C por 60 min e 70°C por 15 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C.

A amplificação do cDNA e a detecção de fluorescência foram feitas no *ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems)* e a análise da expressão dos genes foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.10.1 Análise da expressão dos genes codificadores das proteínas do sistema MMR

Para quantificar os níveis de expressão dos genes codificadores das enzimas de reparo do DNA em *P. falciparum*, amostras de cDNA foram processadas por PCR em tempo real, realizada em placas ópticas de 96 poços vedadas com selos ópticos (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Cada reação de volume igual a 20 µl continha 2 µl do cDNA, 10 µl de *SYBR® Green PCR master mix 2x (Applied Biosystems)* e 10 µM de cada iniciador (*BioSynthesis*). Os iniciadores (tabela 1) foram desenhados utilizando o software *Primer express® version 2.0 (Applied Biosystems)* e o *Primer Blast (NCBI)*, de modo a gerar amplicons entre 90 e 150 pb. A qualidade dos primers foi verificada no *PrimerBlast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-Blast>),

utilizando-se os seguintes parâmetros: percentual de G-C entre 30 e 80%; temperatura de anelamento próxima a 60°C; ausência de repetições de 4 ou mais nucleotídeos e também de G/C na extremidade 3'. Também evitou-se a presença de mais de 2 bases G ou C entre os 5 últimos nucleotídeos (Applied Biosystems, 2003). Desta forma, foi desenhado 1 par de iniciadores para cada gene. O controle endógeno selecionado foi o gene *seril tRNA sintetase*.

Para a reação de PCR, os ciclos foram de 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A eficiência de cada reação foi estimada pelo método da curva-padrão, baseada na diluição serial da respectiva amostra de cDNA. Os valores de CT dos padrões diluídos foram plotados versus o logaritmo do fator de diluição de cada amostra [$CT = K \times \log(N_0) + CT(1)$] e a eficiência calculada com a fórmula [$E = 10^{-1/K} - 1$].

4.10.2 Análise da expressão dos genes de resistência

A expressão gênica de *pfmdr1* e *gch-1* foi avaliada por PCR em Tempo Real, utilizando o sistema *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems). O gene que codifica a proteína β -tubulina foi utilizado como controle interno para normalização da quantidade de DNA adicionado às reações. Os iniciadores e sondas específicos para cada um dos genes estão descritos na tabela 1. As sondas foram marcadas com os fluoróforos FAM, VIC, TAMRA e/ou MGB. Para cada reação de 20 μ L foram utilizados 2 μ L do DNA, o tampão 2x, 900 nM de cada iniciador e 200nM da sonda, exceto para *tubulina*, onde foram adicionados 300 nM do iniciador antisense e 250 nM da sonda. Para a reação de PCR os ciclos foram de 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

4.11 Determinação do número de cópias gênicas

O número de cópias dos genes *pfmdr1* e *gch-1* foi determinado em relação ao gene de cópia única *β-tubulina*, por PCR em Tempo Real utilizando o sistema *TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. O número de cópias foi determinado em relação ao um calibrador de cópia única (Pvh79, para o *mdr1* e pvh74 para *gch-1*, isolados de campo obtidos pelo Laboratório de Malária). O número de cópias foi calculado utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para o *mdr1*, e o método da curva padrão relativa para o *gch-1*. Os iniciadores e sondas específicos para cada um dos genes estão descritos na tabela 1. As sondas foram marcadas com os fluoróforos FAM ou VIC na extremidade 5' e TAMRA ou MGB na extremidade 3'. A amplificação e a detecção de fluorescência foram feitas no *ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems)*. As condições da reação foram as mesmas descritas para a análise da expressão gênica.

4.12 Amplificação e genotipagem dos microssatélites

Foram utilizados 11 microssatélites de *Plasmodium falciparum*, descritos por Su e Wellems (1996). Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1. Todas as reações em cadeia da polimerase foram padronizadas utilizando o termociclador *Veriti 96-wells Thermal Cycler (Applied Biosystems)*.

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 15 µL, utilizando 1 a 10 ng da amostra de DNA, 0,5 µM de cada iniciador; 1,25 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM de MgCl₂, 0,1U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, California, USA) e o tampão 1X fornecido com a enzima. As condições da PCR foram: um ciclo de 2 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos, cada um com 20 segundos a 94°C, 10 segundos a 45°C; 10 segundos a 40°C e 30 segundos a 60°C.

Para a realização da genotipagem dos microssatélites no sequenciador automático, foram utilizados na amplificação dos produtos de PCR, iniciadores senso marcados

com fluoresceína. A genotipagem foi realizada em placa de 96 poços do modelo “*Ultraamp™ Skirted 96 PCR Plate*” (Sorenson BioScience TNC). Em cada poço da placa foram colocados 7,75 µL de Tween-20 a 0,1%, 0,25 µL do padrão de peso molecular mencionado acima e 2 µL do produto amplificado. As amostras foram homogeneizadas na placa, em seguida a placa foi rapidamente centrifugada. A placa foi armazenada a 4°C até que fosse analisada no sequenciador automático. Antes das amostras serem lidas no aparelho, elas foram desnaturadas a 94°C por 1 minuto.

Após a separação das amostras por eletroforese capilar, os produtos foram analisados utilizando o programa *MegaBACE Fragment Profiler versão 1.2*, o qual possibilita a determinação do tamanho exato dos fragmentos previamente amplificados.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação das enzimas do *mismatch repair*

As enzimas do sistema MMR em *P. falciparum* tiveram suas sequências recuperadas do PlasmoDB, juntamente com as ortólogas em outras espécies de *Plasmodium*. As enzimas ortólogas de *E. coli*, *H. sapiens*, *S. cerevisiae* e *A. thaliana* foram também recuperadas de bancos de dados (Genbank). Todas as proteínas foram alinhadas utilizando o *ClustalW* e o *Blast*. Os domínios importantes para manutenção da função de cada enzima foram analisados quanto à sua conservação. Foram localizadas as enzimas MMR de *P. falciparum* (PF14_0254; MAL7P1.206; PFE0270c; PF11_0184; MAL7P1.145) e suas ortólogas em outras espécies de *Plasmodium*. As enzimas encontradas pertencem aos grupos MSH2, MSH6, MLH1 e PMS1.

Uma busca por proteínas no PlasmoDB utilizando como entrada as palavras *mismatch repair* retornou, além das proteínas já identificadas anteriormente, uma proteína hipotética homóloga a MutS presente apenas em alguns Apicomplexa, mas nenhuma proteína MSH3. Neste trabalho, a busca por homologia por meio de *Blast* entre sequências MSH3 de outros organismos e o genoma de *P. falciparum* também não obteve resultados satisfatórios. A proteína MSH3 não foi descrita em 43 das 96 espécies (45%) de organismos eucariotos com sequências depositadas no OrthoMCL (Tabela 2) e que possuem pelo menos uma proteína do MMR conhecida.

Tabela 2. Número de espécies de organismos eucariotos em relação ao número de cópias dos genes codificadores de cada proteína do MMR.

Número de cópias de cada gene	MLH1	PMS1	MSH2	MSH3	MSH6	MutS*
0	2	2	1	43	3	87
1	88	88	78	50	59	9
2	5	5	15	3	29	0
3	1	1	2	0	4	0
4	0	0	0	0	1	0
Total de species	96	96	96	96	96	96

*Grupo de proteínas ortólogas classificadas como homólogas de MutS, mas que não foram classificadas como MSH2, 3, 6, etc.

Dentre as espécies de Apicomplexa presentes no banco de dados OrthoMCL, apenas uma espécie possui MSH3 e esta mesma espécie possui 3 cópias do MSH6 (tabela 3).

Plasmodium possui duas homólogas a MSH2 (tabela 3), denominadas MSH2-1 e MSH2-2. Nota-se que a frequência das espécies que possuem MSH2 duplicada é baixa (15/96), (tabela 2). Destas 15 espécies com duplicação em MSH2, 8 não apresentam MSH3, sendo elas: as seis espécies de *Plasmodium*, *Entamoeba histolytica* e *Chlamydomonas reinhardtii*. Nota-se a presença de MSH2, MSH6, MLH1 e PMS1 em praticamente todas as espécies eucariotas depositadas no OrthoMCL.

A MutS* encontrada em *Plasmodium* possui ortólogos também em *Theileria parva*, *Theileria annulata* e *Babesia bovis* (tabela 3), com a diferença de que *Plasmodium* possui os domínios I e V de MutS e as restantes, apenas o domínio V (dados não mostrados).

Tabela 3. Número de genes codificadores de proteínas do MMR em diferentes espécies do filo Apicomplexa.

Espécie	MLH1	PMS1	MSH2	MSH3	MSH6	MutS*
<i>Tetrahymena thermophila</i>	1	1	1	1	3	0
<i>Plasmodium vivax</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Plasmodium falciparum</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Plasmodium berghei</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Plasmodium yoelii</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Plasmodium knowlesi</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Plasmodium chabaudi</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Theileria parva</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Theileria annulata</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Babesia bovis</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Cryptosporidium muris</i> RN66	1	1	1	0	1	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	1	1	1	0	1	0
<i>Neospora caninum</i>	1	1	1	0	1	0
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1	1	1	0	1	0
<i>Cryptosporidium hominis</i>	1	1	1	0	1	0

5.2 Comparação entre as sequências das enzimas do MMR de *P. falciparum* e enzimas do MMR de diferentes organismos

Para a manutenção funcional das proteínas do *mismatch repair*, é necessário que a proteína apresente alguns domínios funcionais, listados na tabela 4. As figuras 6 e 7 mostram os domínios de proteínas presentes em proteínas do *mismatch repair* em diferentes organismos.

Dentro destes domínios funcionais, a presença de alguns resíduos conservados é necessária. As sequências de aminoácidos foram comparadas com as ortólogas de procarioto (*E. coli*) e de eucariotos, tanto com o objetivo de verificar se os domínios importantes para a função das enzimas estão conservados nesses diferentes organismos, quanto para avaliar a presença desses domínios nas enzimas de *P. falciparum*. As figuras 8A e 8B mostram, respectivamente, os alinhamentos dos domínios para as enzimas ortólogas à MutS e MutL.

Tabela 4 . Domínios essenciais em cada classe de proteína do *mismatch repair*.

Classe MRR	Domínios (Pfam)
MSH2	MutS V e MutS III;
MSH3	MutS V e MutS III;
MSH6	MutS I e MutS V;
MLH1	Histidina kinase, DNA gyrase B e ATPase HSP90-like (HATPaseC); Domínio C-terminal de proteína do MMR (DNA_MMR)
PMS1	Histidina kinase, DNA gyrase B e ATPase HSP90-like (HATPaseC); Domínio C-terminal de proteína do MMR (DNA_MMR) Domínio de dimerização C-terminal (MutL C)

Foi feito um alinhamento local entre as diferentes classes de proteínas do MMR utilizando o *Blast*. Considerando os altos valores de *escore* e os pequenos valores do *e-value*, os resultados demonstram que tais proteínas são bastante conservadas nestas diferentes espécies (tabela 5). Por meio alinhamento global realizado no *ClustalW*, percebe-se uma maior conservação destas proteínas dentro dos domínios funcionais (dados não mostrados). O fenograma construído para as ortólogas de MutS de *E. coli* mostrou que MSH2 e MSH6 formam dois clados distintos e muito consistentes, com altos valores de *bootstrap* (figura 9).

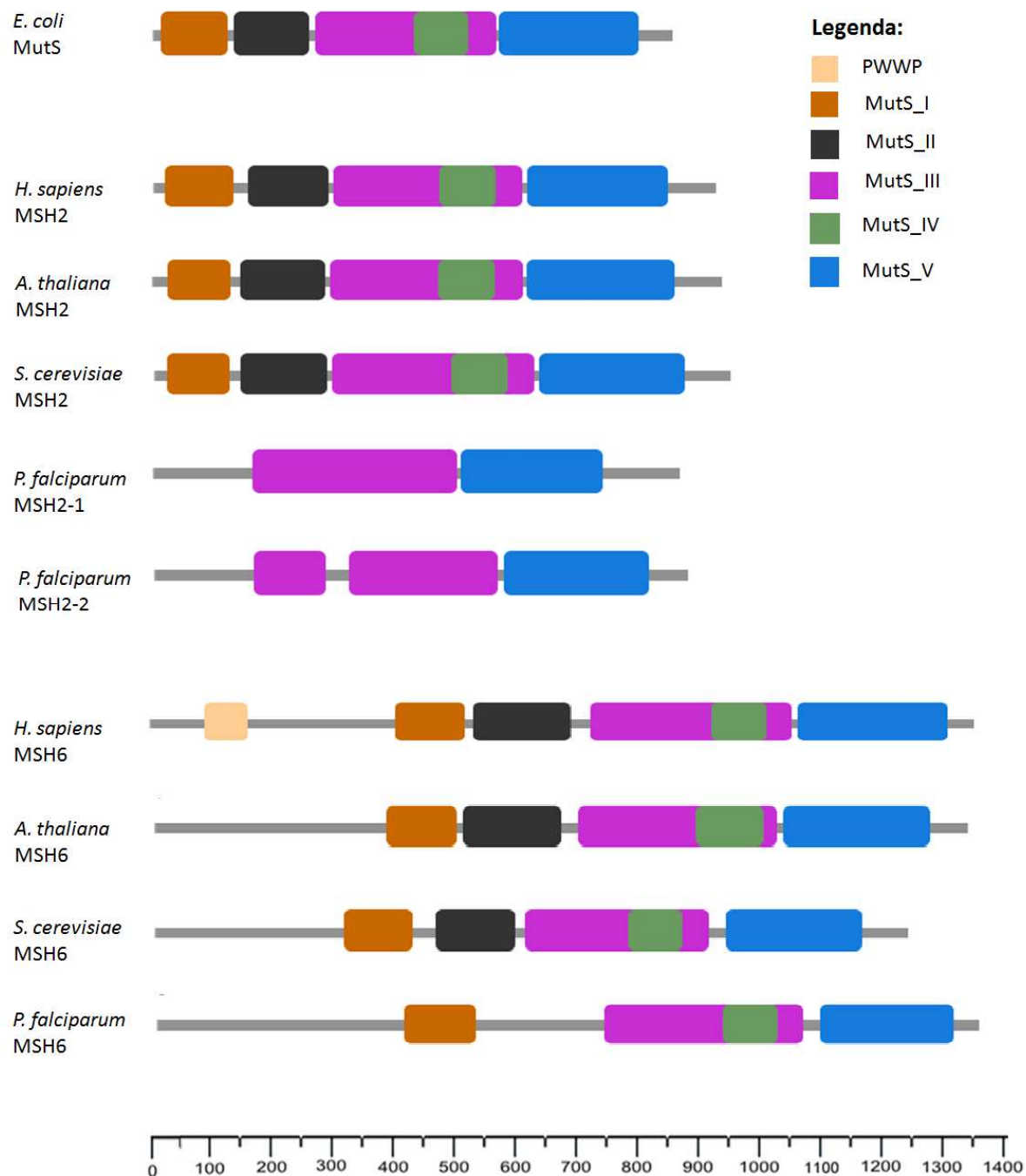
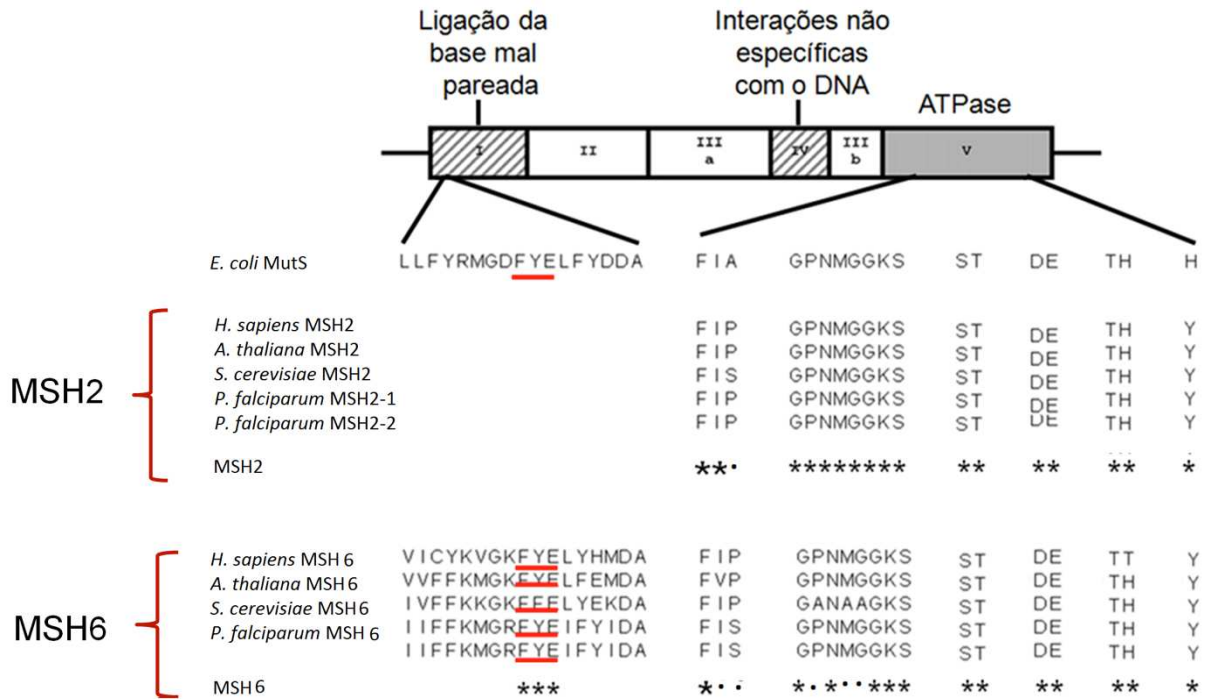


Figura 6. Desenho esquemático dos domínios presentes em proteínas homólogas a MutS em diferentes organismos.



Figura 7. Desenho esquemático dos domínios presentes em proteínas homólogas a MutL em diferentes organismos.

A)



B)

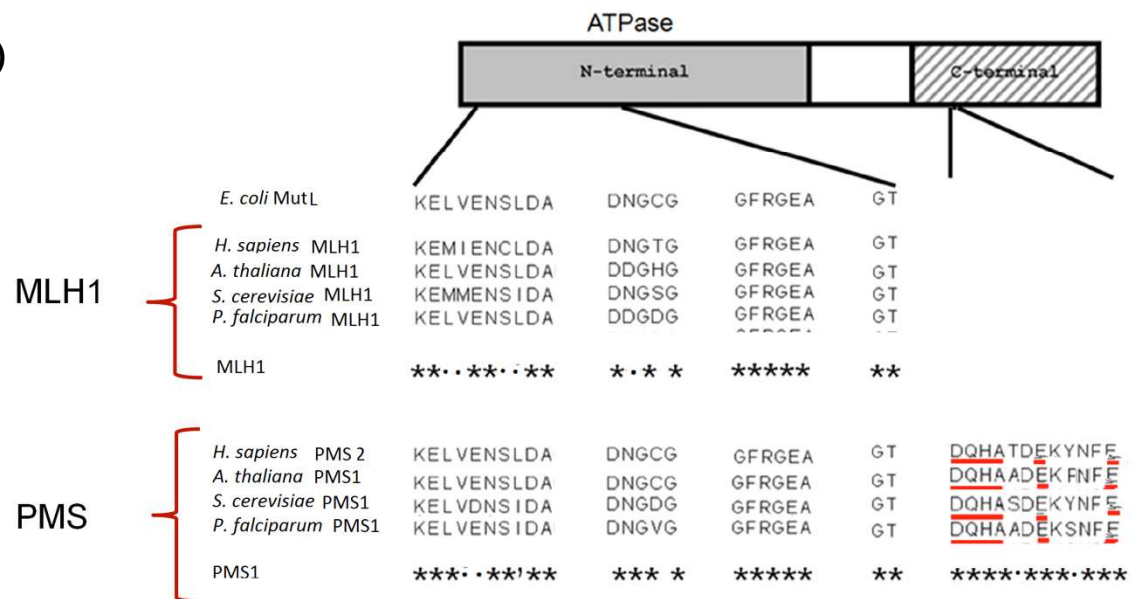


Figura 8. Alinhamento dos domínios importantes das enzimas ortólogas de MutS (A) e MutL (B). (_) Resíduos necessariamente conservados dentro dos domínios, sendo FXE para MutS e MSH6 e DQHAX₂EX₄E para PMS; (*) aminoácidos conservados em todas as espécies estudadas e (.) Aminoácidos semiconservados. (Ec) *E. coli*; (Sc) *S. cerevisiae*; (Hs) *H. sapiens*; (At) *A. thaliana*; (Pf) *P. falciparum*.

Tabela 5. Escores do alinhamento local entre proteínas do MMR do *Plasmodium falciparum* e de outros organismos.

	PfMLH1				PfMSH2-1				PfMSH2-2				PfPMS1				PfMSH6			
	Escore	Cob.	E-value	Ident.	Escore	Cob.	E-value	Ident.	Escore	Cob.	E-value	Ident.	Escore	Cob.	E-value	Ident*.	Escore	Cob.	E-value	Ident.
<i>H. sapiens</i>	415	65%	2,00E-59	52%	428	88%	2,00E-137	34%	426	91%	1,00E-135	33%	364	47%	1E-76	39%	487	82%	2E-145	42%
<i>A. thaliana</i>	450	68%	4,00E-56	55%	441	88%	3,00E-128	50%	387	91%	2,00E-114	50%	368	49%	2E-69	40%	505	71%	7E-144	32%
<i>S. cerevisiae</i>	383	71%	2,00E-57	62%	412	88%	9,00E-133	33%	378	94%	8,00E-111	36%	352	50%	1E-61	34%	411	72%	8E-112	89%
<i>E. coli</i>	226	34%	2,00E-33	44%	222	76%	4,00E-63	28%	279	40%	4,00E-57	45%	157	24%	6E-38	78%	316	65%	2E-64	33%

Cob. – cobertura, Ident. – identidade máxima encontrada no alinhamento. Espécies: *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*.

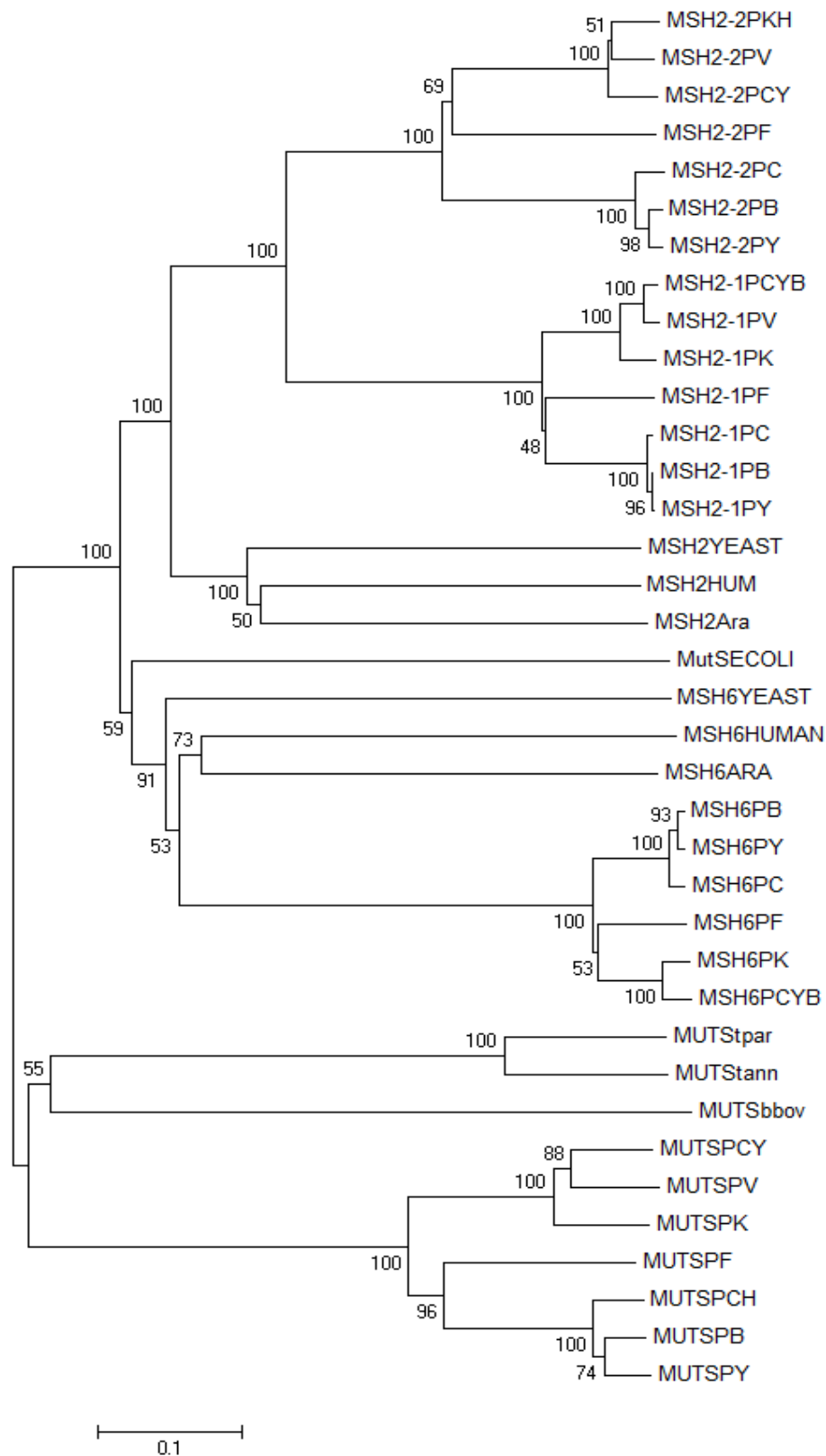


Figura 9. Fenograma das proteínas ortólogas de MutS. Yeast – *S. cerevisiae*; HUM – *H. sapiens*; ARA – *A. thaliana*; PB – *P. berghei*; PY – *P. yoelii*; PKH/PK – *P. knowlesi*; PF – *P. falciparum*; PV – *P. vivax*; PCH – *P. chabaudi*; PCYB – *P. cynomolgi*; bbov – *B. bovis*; tpar – *T. parva*; tann – *T. annulata*.

5.3 Similaridade entre as enzimas do MMR nas diferentes espécies de *Plasmodium*

As sequências de *P. falciparum* apresentaram as menores identidades com as de outras espécies do gênero, no entanto, a conservação ainda é muito grande, conforme indicado pelos altos valores de *score* e *e-value* (tabela 6). As proteínas apresentaram entre 59 e 96% de identidade entre as espécies, de modo que uma maior semelhança foi encontrada entre parasitos com uma relação evolutiva mais próxima, como foi o caso da maior semelhança entre os parasitos de murinos, bem como entre os parasitos de primatas. Além disso, as proteínas MSH2-1 e MLH1 apresentaram as maiores similaridades dentro do grupo e as proteínas MSH2-2 e MutS* se mostraram com menores similaridades. Os resultados do alinhamento local cruzando duas a duas, todas as espécies de *Plasmodium* estão no anexo II.

O alinhamento entre estas diferentes sequências demonstrou a conservação de todos os resíduos essenciais nos domínios funcionais destas proteínas, conforme mostrado no anexo I.

Tabela 6. Escores do alinhamento local entre proteínas do MMR do *Plasmodium falciparum* e de diferentes espécies de *Plasmodium*.

	PfMSH2-1			PfMSH2-2			PfMSH6			PfMutS*			PfMLH1			PfPMS1		
	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.*	Escore	Cob.	Ident.*	Escore	Cob.	Ident.
<i>P. berghei</i>	1384	100%	83%	970	98%	59%	1758	84%	76%	499	32%	60%	1227	87%	80%	1185	64%	80%
<i>P. chabaudi</i>	1384	100%	83%	966	98%	59%	1742	83%	77%	1496	99%	58%	1216	88%	80%	1247	67%	75%
<i>P. yoelii</i>	1383	100%	83%	968	98%	59%	504	23%	79%	498	32%	61%	1154	84%	81%	1132	65%	71%
<i>P. knowlesi</i>	1392	100%	83%	1053	98%	62%	1758	99%	65%	1541	99%	57%	1279	91%	100%	1273	73%	81%
<i>P. cynomolgi</i>	1362	100%	82%	1025	98%	60%	1817	92%	74%	1393	92%	53%	1227	89%	83%	1291	78%	79%
<i>P. vivax</i>	1405	100%	84%	1047	98%	59%	1815	88%	74%	1533	98%	52%	1224	85%	100%	1277	76%	80%

Cob. – cobertura, Ident. – identidade máxima encontrada no alinhamento. Valores de e-value iguais ou próximos a zero.

5.4 Comparação entre as sequências de MSH2-1 e MSH2-2

Foi possível perceber que estes domínios funcionais encontram-se relativamente conservados nas duas proteínas, no entanto, o domínio V possui maior nível de conservação, tanto no alinhamento global (figura 10) quanto no alinhamento local entre os domínios funcionais de MSH2-1 e MSH2-2 (tabela 7), que retornou valores mais significativos no alinhamento.

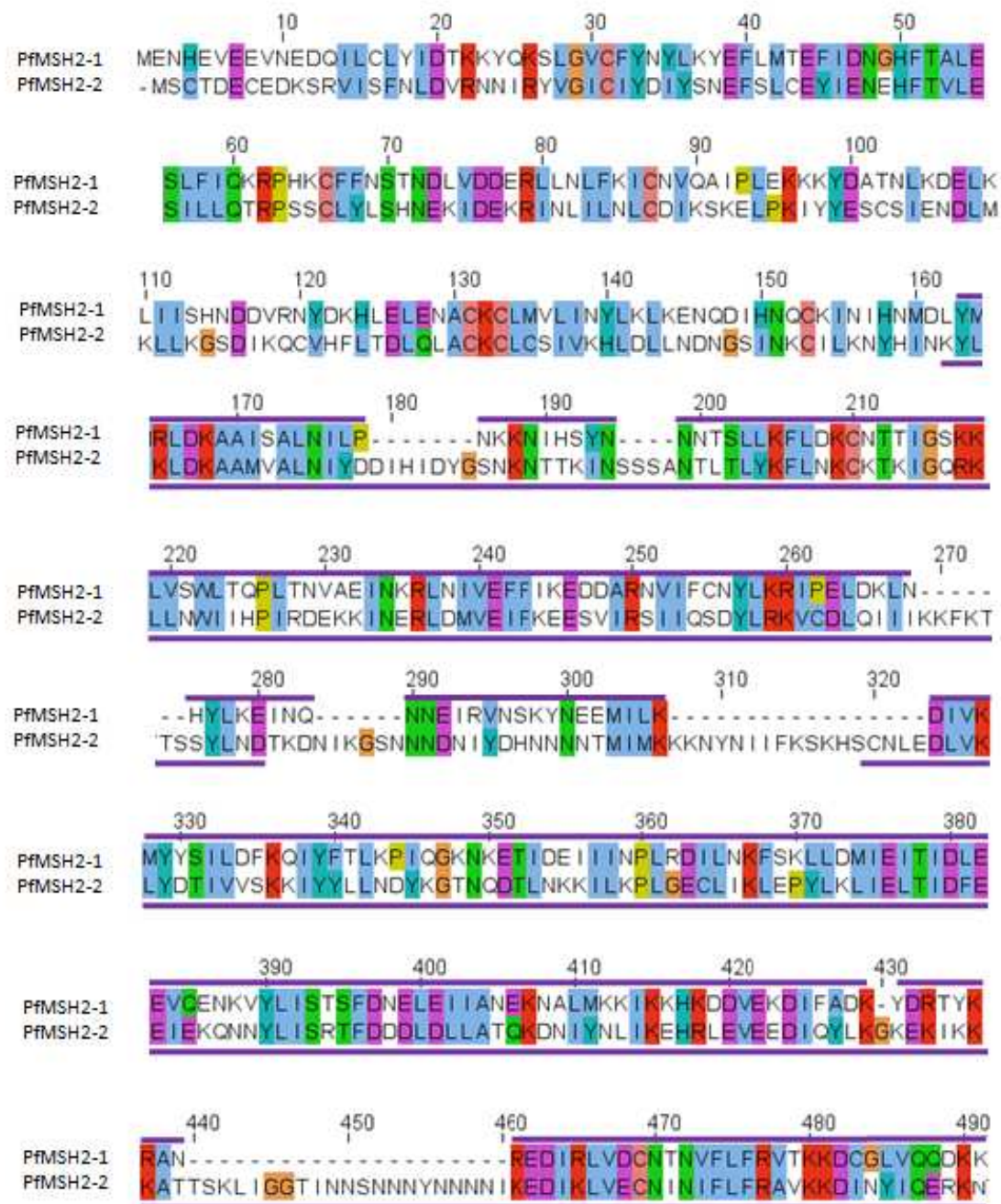


Figura 10. Alinhamento global entre MSH2-1 e MSH2-2 de *P. falciparum*. Domínio III destacado em roxo e domínio V em azul.

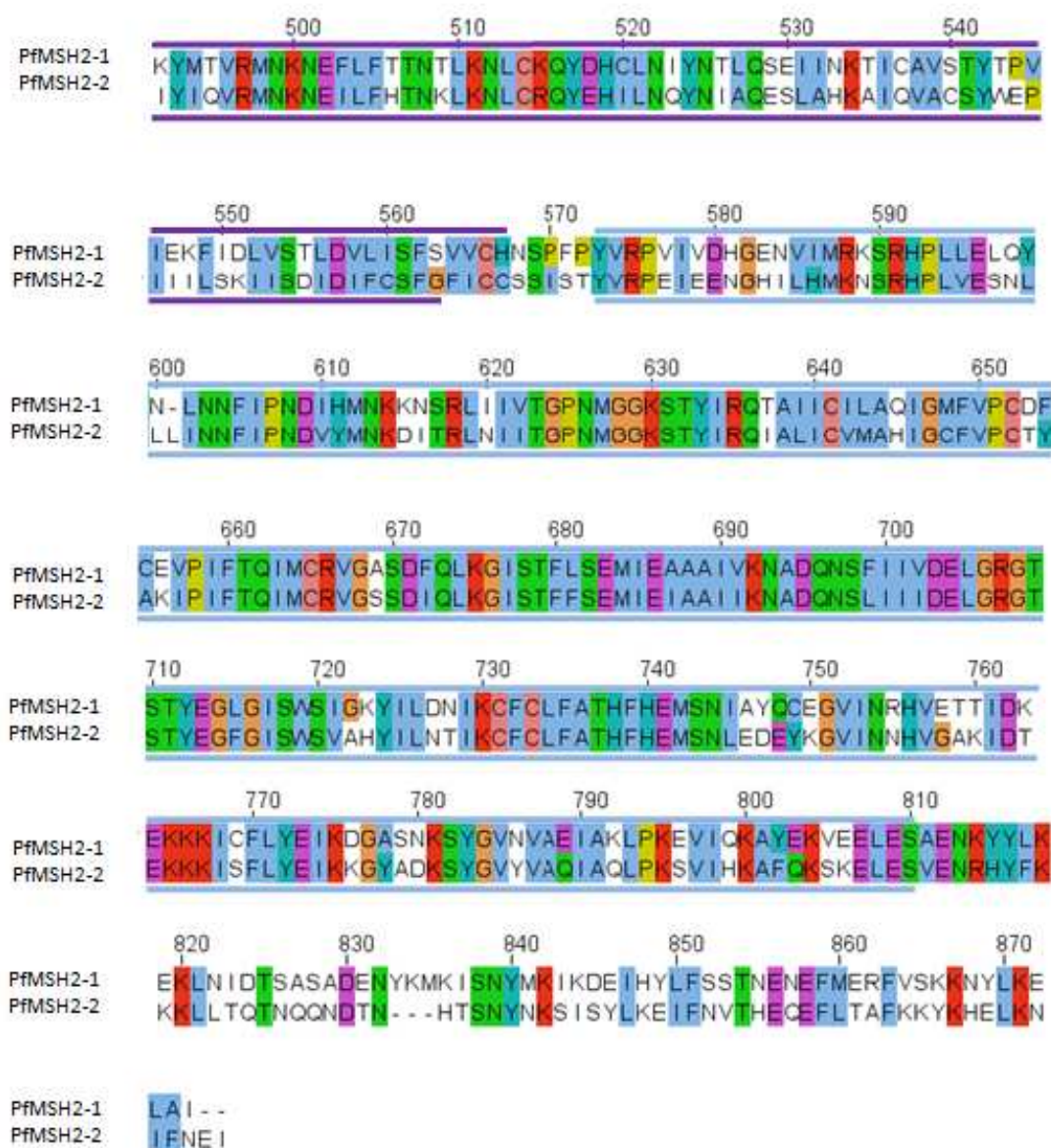


Figura 10. Alinhamento global entre MSH2-1 e MSH2-2 de *P. falciparum*. Domínio III destacado em roxo e domínio V em azul. (continuação)

Tabela 7. Alinhamento global entre os domínios correspondentes de MSH2-1 e MSH2-2

MSH2-1 Versus MSH2-2				
	Escore	Cobertura	E-value	Identidade máxima
Domínio IIIA	107	35%	5,00E-21	52%
Domínio IIIB	176	66%	1,00E-51	56%
Domínio V	343	95%	8,00E-124	70%

5.5 Análise da proteína hipotética MutS*

A busca por proteínas de *mismatch repair* em *Plasmodium* no banco de dados do PlasmDB retornou, além das proteínas já identificadas por Bethke *et al* 2007, uma outra proteína homóloga de MutS, mas que não está classificada como MSH2, MSH3 ou MSH6.

Foram realizados alinhamentos globais entre a sequência em questão do *P. falciparum* e o proteoma predito de diferentes organismos (*H. sapiens*, *A. thaliana*, *S. cerevisiae* e *P. falciparum*). Os resultados do *Blast* retornaram sequências de proteínas MSH2 e MSH6 em todas as espécies (tabela 8).

Tabela 8. Resultado do alinhamento entre a proteína homóloga a MutS de *P. falciparum* e proteínas MSH2 e MSH6 em diferentes organismos.

Espécie	MSH2				MSH6			
	Escore	Cob.	E-value	Max. Ident.	Escore	Cob.	E-value	Max. Ident.
<i>H. sapiens</i>	101	13%	3,00E-08	69%	78.2	11%	0,0002	35%
<i>A. thaliana</i>	121	21%	7,00E-09	38%	86.2	20%	9,00E-07	54%
<i>S. cerevisiae</i>	143	22%	8,00E-09	50%	95.9	5%	0,0001	40%
<i>P. falciparum</i>	122 ⁽¹⁾	23%	1,00E-09	50%	113	29%	6,00E-09	50%
<i>P. falciparum</i>	171 ⁽²⁾	20%	0,00001	67%				

(1)MSH2-1; (2)MSH2-2. MutS de *E. coli*, Escore 117, cobertura 17%, e-value 0,0008, identidade 39%.

Uma busca realizada no Pfam utilizando como entrada para o *Blast*, a proteína hipotética de *P. falciparum* retornou dois domínios da família MutS (MutSI e MutSV) (tabela 9). Estes domínios são essenciais à proteína MSH6.

Tabela 9. Resultado da busca por famílias de proteínas no Pfam utilizando a sequência MutS* de *P. falciparum*.

Família	Descrição	Alinhamento		Bit escore	E-value
		Início	Fim		
MutSI	Domínio I de MutS	219	312	41,6	9,10E-11
MutSV	Domínio V de MutS	1037	1242	34,9	8.8E-9

Foi realizado também um alinhamento entre os domínios encontrados em MutS* e os domínios correspondentes nas sequências de MSH2 e MSH6 do próprio *P. falciparum*. A tabela 10 mostra os resultados do alinhamento local para o domínio V, onde percebe-se que em MutS* este domínio encontra-se muito pouco conservado, mas *e-value* e a cobertura em relação ao domínio V da MSH6 foram mais significativos.

O domínio I de MutS* não apresentou *hits* significativos em relação a MSH6 e por isso os resultados não foram mostrados.

Tabela 10. Resultado do alinhamento local entre o domínio V de MutS* e o domínio V de MSH2 e MSH6 em *P. falciparum*.

Proteína	PfMutS*			
	<i>Escore</i>	Cob.	<i>E-value</i>	Max. Ident.
PfMSH2-1	67.7	70%	0.011	47%
PfMHS2-2	23.9	43%	0.003	67%
PfMSH6	25.0	96%	2,00E-04	57%

Para avaliar a possibilidade de MutS* ser uma proteína da família MSH6, os resíduos conservados necessários à manutenção da função da MSH6 foram analisados quanto à sua presença e conservação, por meio do alinhamento dessa proteína no grupo *Plasmodium*. Conforme já mostrado nos resultados do alinhamento local (tabela 6), esta sequência se encontra bem conservada dentro deste grupo e a figura 11 mostra que muitos resíduos essenciais encontram-se conservados.

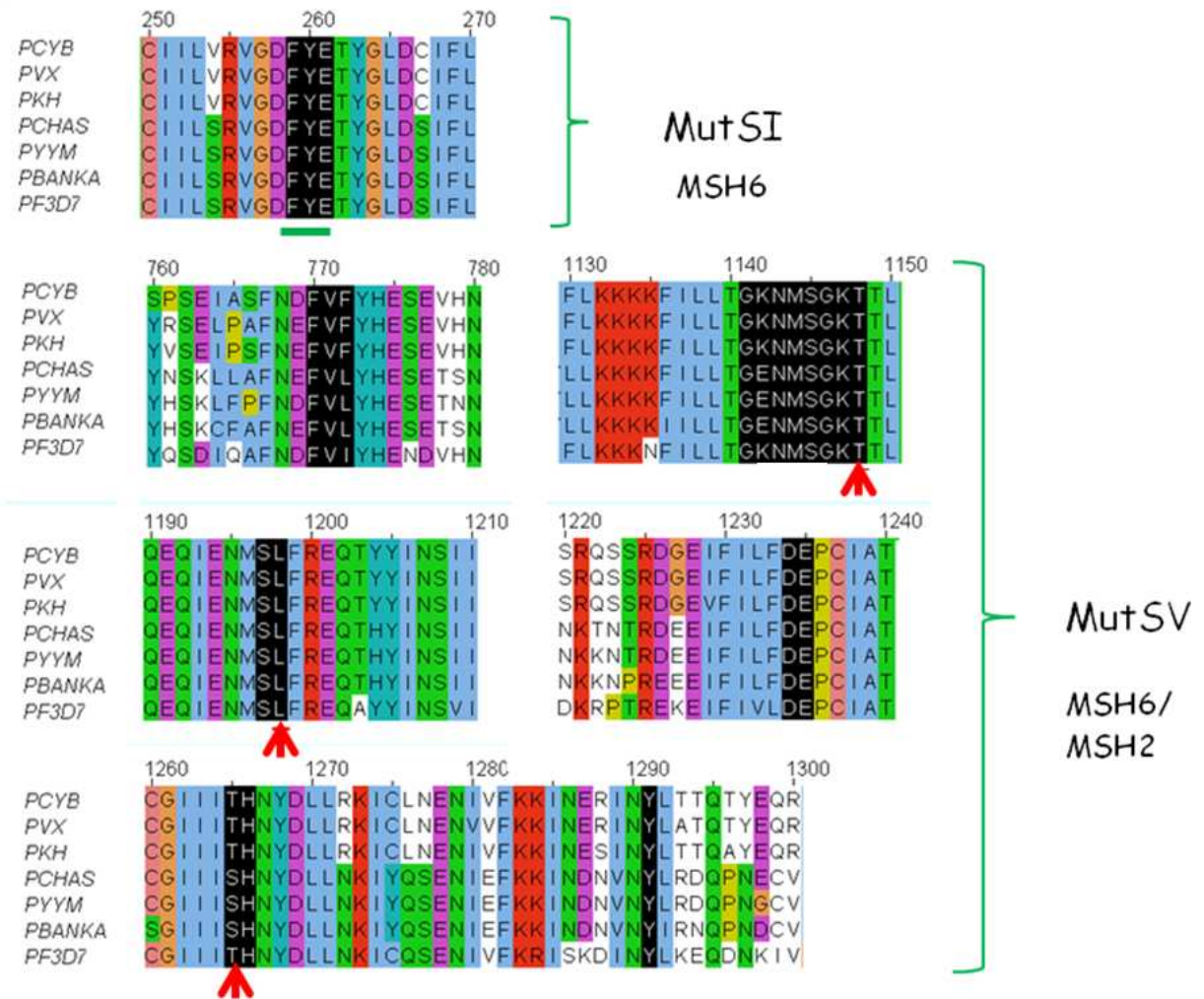


Figura 11. Alinhamento global entre MutS* de diferentes espécies de *Plasmodium*. PCYB – *P. cynomolgi*; PVX – *P. vivax*; PKH – *P. knowlesi*; PCHAS – *P. chabaudi*; PYYM – *P. yoelii*; PBANKA – *P. berghei* e PF3D7 – *P. falciparum*. As posições dos resíduos obrigatórios dentro dos domínios funcionais de MSH6 e que não foram conservados nas espécies de *Plasmodium* estão indicadas pelas setas em vermelho.

Outro dado interessante envolve o fato de que dentre as classes de proteínas de reparo estudadas neste trabalho, MSH6 apresenta a maior taxa de proteínas duplicadas numa mesma espécie eucariótica (29/96) mostrado na tabela 2. Apesar disso, o fenograma mostrou que MutS* forma um clado distinto de MSH2 e MSH6 (figura 9).

5.6 Polimorfismos nas sequências codificadoras das proteínas do MMR

Todos os SNPs envolvendo os genes de *mismatch repair* foram recuperados do banco de dados PlasmDB. A tabela 11 mostra a quantidade de SNPs já encontrados nestes genes. Dos 33 SNPs encontrados, 26 estão em regiões codificadoras, sendo que 16 destes representam substituições não-sinônimas.

Tabela 11. SNPs Encontrados nos genes do *Mismatch Repair*

Gene	NC	C		Total
		Sin	Nsin	
MSH2-1	-	-	-	0
MSH2-2	-	1	-	1
MSH6	4	2 [1]	7 [3]	13
MutS	3	2 [1]	1	6
MLH1	-	4 [1]	3 [1]	7
PMS1	-	1	5	6
Total	7	10 [3]	16 [4]	33

Substituição de nucleotídeo em região não codificadora (NC) ou codificadora (C) do gene. Mutação sinônima (Sin) ou não sinônima (Nsin). Os números entre chaves indicam as mutações dentro dos domínios funcionais

A figura 12 ilustra a localização dos SNPs presentes nas sequências codificadoras das proteínas do MMR. Nenhum SNP foi descrito na proteína MSH2-1. A proteína MSH-2-2 também mostrou-se bastante conservada, apresentando uma única mutação sinônima na sua sequência codificadora, em uma região fora dos domínios funcionais de MutS.

Já na proteína MSH6, dentre os 9 SNPs encontrados na região codificadora, 2 representam mutações sinônimas. As 7 substituições restantes são não-sinônimas, cinco delas também são não conservativas, ou seja com substituição entre aminoácidos que possuem diferentes características físico-químicas. Na sequência codificadora de MutS* foram encontradas 3 mutações, mas apenas uma resultou em substituição não conservativa.

Na proteína MLH1, 3 das 7 mutações encontradas nas regiões codificadoras estão dentro de domínios funcionais, no entanto, apenas uma destas mutações é não conservativa.

Todas as 6 mutações encontradas na sequência codificadora de PMS1 estão em regiões fora de domínios funcionais, destas, uma foi sinônima e duas foram não conservativas.

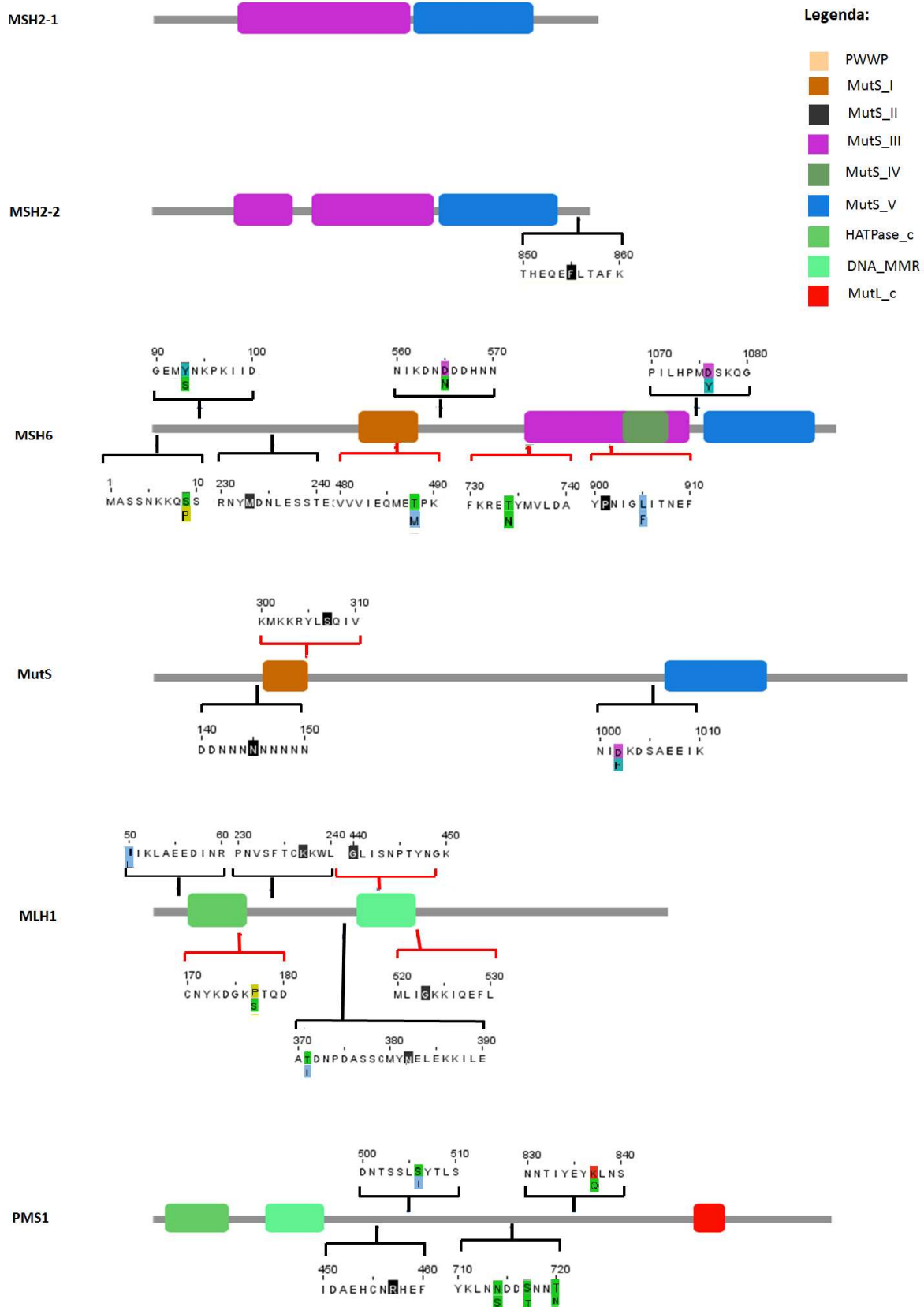


Figura 12. Representação esquemática da localização dos SNPS encontrados em cepas e isolados ao redor do mundo. As chaves em preto mostram mutações fora de domínios funcionais e em vermelho, mutações dentro dos domínios funcionais. A alteração da cor no realce dos aminoácidos indica que a mutação foi não conservativa. Os aminoácidos realçados em preto são produtos de mutação sinônima.

5.7 Sequenciamento dos domínios funcionais

Sequências parciais dos genes codificadores das enzimas pertencentes ao *mismatch repair* foram obtidas por sequenciamento, utilizando-se amostras de DNA das cepas 3D7, NF54, W2 e BHZ. As sequências obtidas foram comparadas às de 3D7 do *GenBank* (NCBI). Verificou-se, que todas as sequências apresentaram 100% de identidade e similaridade, com exceção do aminoácido 1063 da proteína PMS1, onde em comparação à cepa 3D7 do *GenBank* ocorreu uma substituição Y/N nas sequências de W2 e NF54, mantidas em laboratório (figura 17). As figuras 13 a 17 mostram o alinhamento global destas sequências, realizado no programa *ClustalW*.

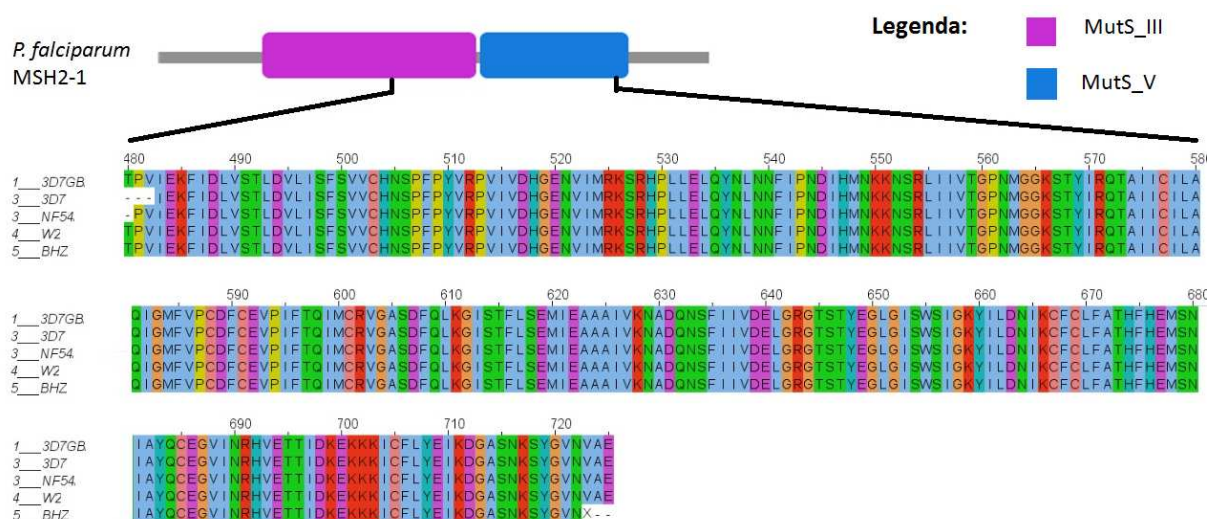


Figura 13. Alinhamento das sequências MSH2-1 obtidas por meio de sequenciamento, em comparação à sequência da cepa 3D7 do *GenBank* (NCBI).

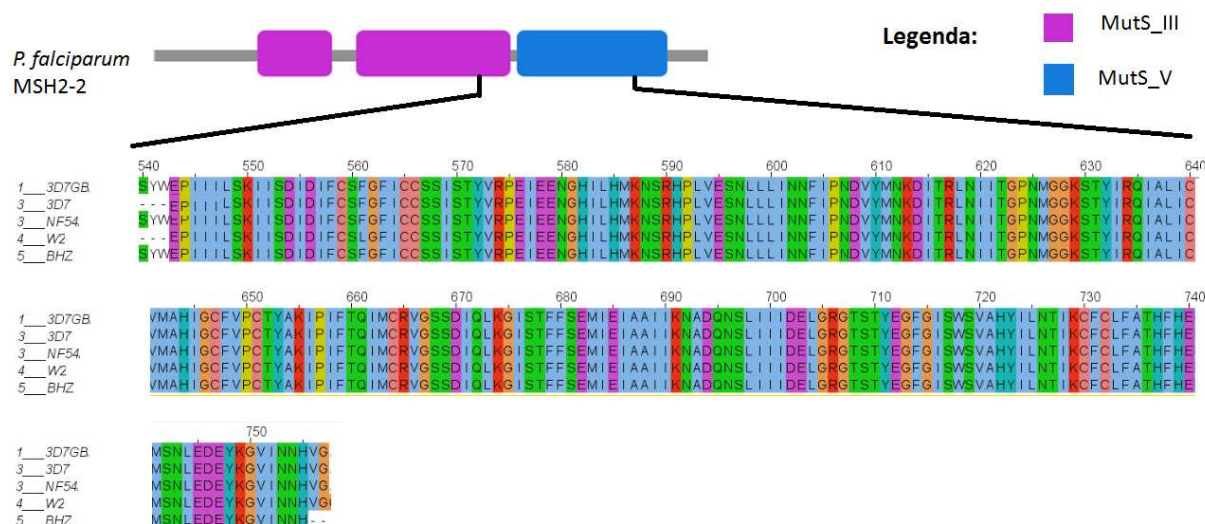


Figura 14. Alinhamento das sequências MSH2-2 obtidas por meio de sequenciamento, em comparação à sequência da cepa 3D7 do GenBank (NCBI).

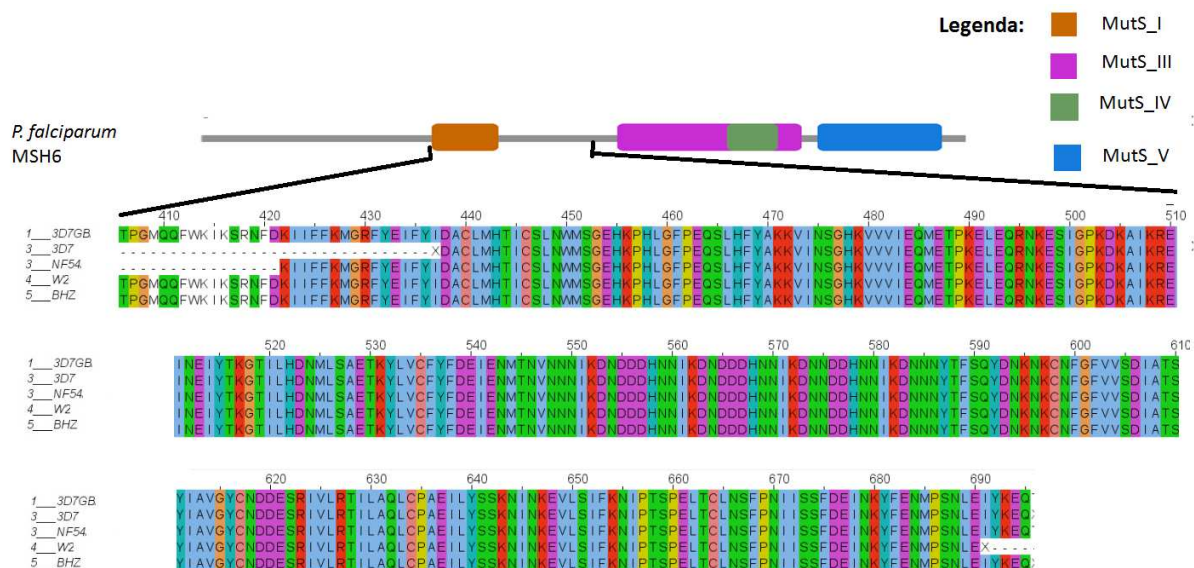


Figura 15. Alinhamento das sequências MSH6 obtidas por meio de sequenciamento, em comparação à sequência da cepa 3D7 do GenBank (NCBI).

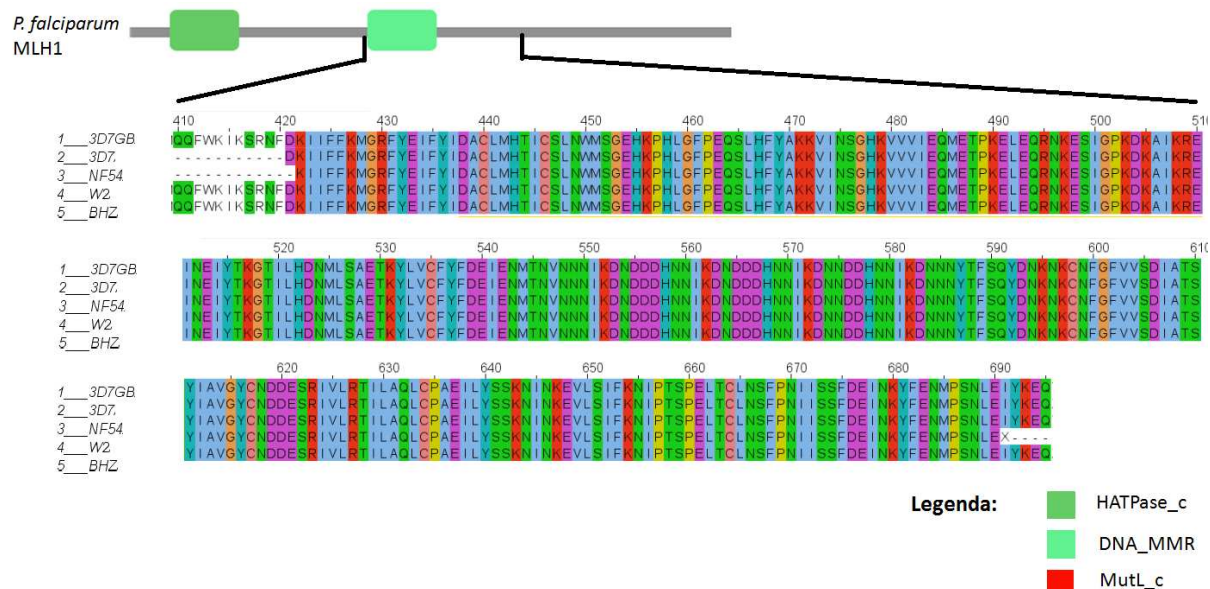


Figura 16. Alinhamento das seqüências MLH1 obtidas por meio de sequenciamento, em comparação à seqüência da cepa 3D7 do GenBank (NCBI).

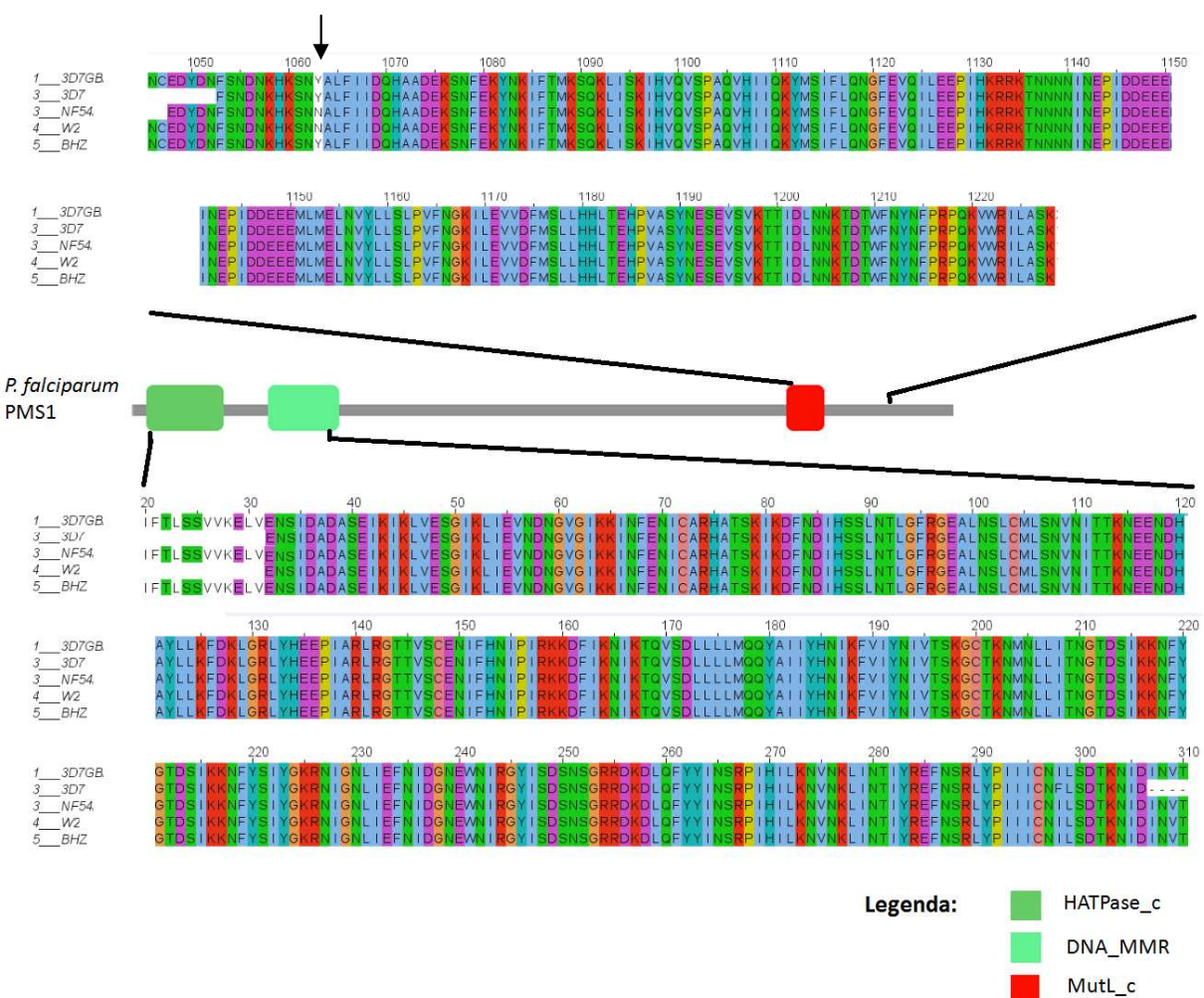


Figura 17. Alinhamento das seqüências PMS1 obtidas por meio de sequenciamento, em comparação à seqüência da cepa 3D7 do GenBank (NCBI). A seta indica a posição onde ocorreu a substituição.

5.8 Avaliação do desenvolvimento dos estágios eritrocíticos da cultura ao longo de 50 horas

Juntamente com a coleta das amostras para extração de RNA, foram feitos esfregaços sanguíneos de todos os pontos da cultura nas diferentes cepas. A figura 18 apresenta a cinética das formas sanguíneas em cada ponto analisado. Não foram percebidas alterações significativas ao se comparar a porcentagem de cada forma sanguínea entre as amostras de 3D7, W2 e BHZ, por isso, os dados não foram mostrados separadamente.

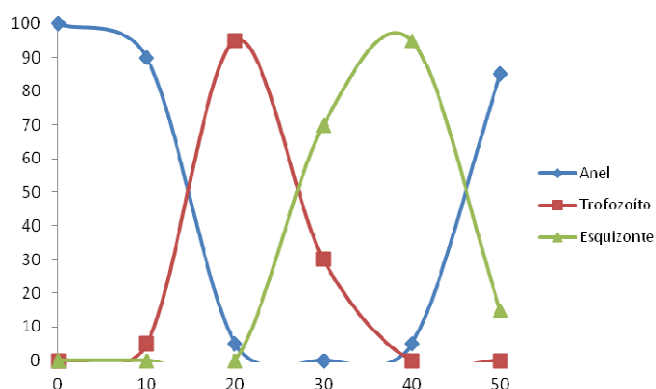


Figura 18. Formas presentes em cada tempo da cultura após sincronização.

5.9 Quantificação relativa da expressão dos genes de *mismatch repair*

Foi utilizado o método de quantificação relativa pelo $2^{-\Delta\Delta CT}$, para isso, cada gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *seril tRNA sintetase* e as amostras foram normalizadas utilizando-se a amostra 3D7 de cada tempo, para a avaliação da diferença na expressão entre as diferentes cepas em cada ponto da cultura sincronizada. Para a avaliação da cinética de expressão dentro das cepas, as amostras de cada cepa foram normalizadas utilizando-se o seu respectivo tempo 0h, ou seja, a amostra do primeiro ponto, coletada logo após a sincronização dos parasitos. A utilização deste método foi possível devido as eficiências dos iniciadores, que se apresentaram superiores a 90% (tabela 12).

Tabela 12. Eficiência dos pares de iniciadores utilizados na avaliação da expressão gênica.

Iniciadores	Slope	Eficiência (%)	R ²
MSH2-1	-3,287	101,479	0,9991
MSH2-2	-3,515	92,521	0,998
MSH6	-3552	91,223	0,997
MutS	-3,303	100,813	0,994
MLH1	-3,478	93,868	0,999
PMS1	-3,45	94,923	0,997
Seril tRNA sint.	-3,399	96,865	0,994

A figura 19 mostra a cinética da expressão do gene *msh2-1*, onde é possível perceber que a cepa BHZ, além de apresentar um atraso de 10h no pico da expressão do mRNA em relação às outras cepas, também apresenta um aumento menor, relativo à expressão do normalizador no tempo zero.

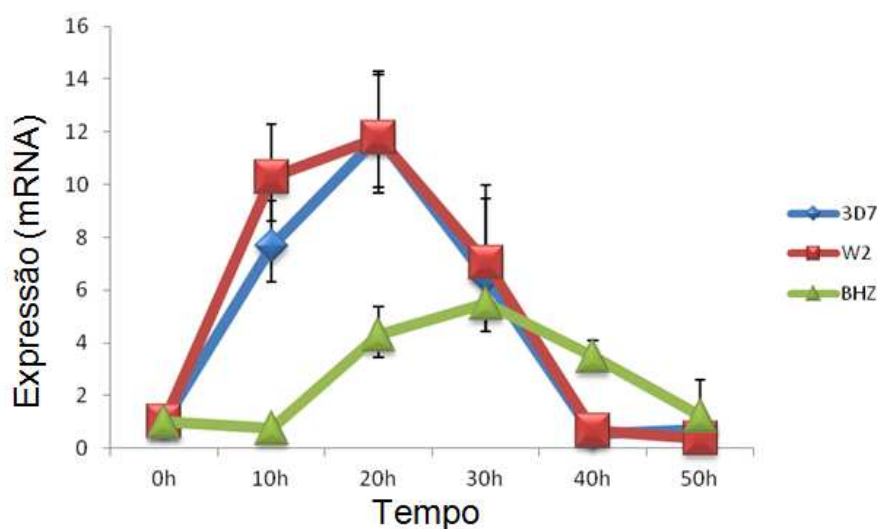


Figura 19. Cinética da expressão do gene *msh2-1* normalizado pelo T0 de cada cepa. Os valores apresentados representam proporções em relação ao tempo inicial de cada cultura.

Para o gene *msh2-2*, mostrado na figura 20, observa-se um aumento de expressão na cepa W2 entre os pontos 30 e 50h, chegando a aumentar mais de 6 vezes o seu nível de expressão em relação ao tempo inicial. Já 3D7 apresenta um pequeno aumento de expressão em 30h e BHZ somente demonstra um aumento de cerca de 2,5 vezes na expressssão a partir de 40h.

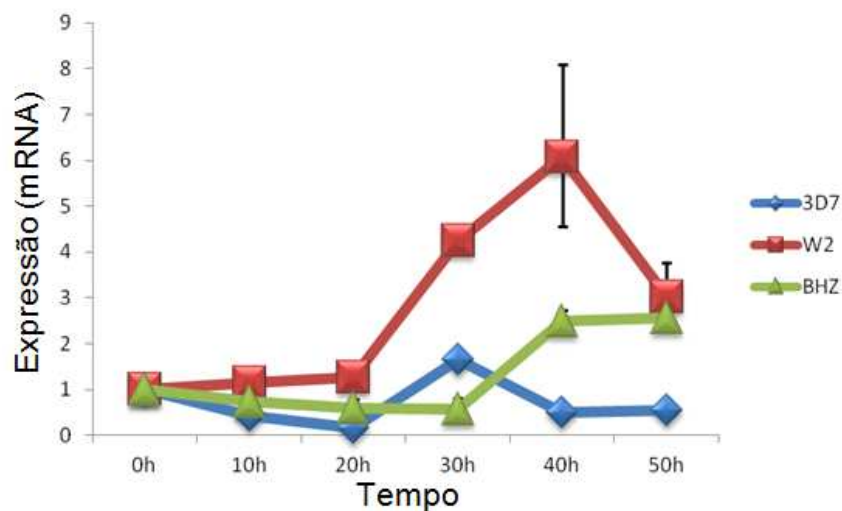


Figura 20. Cinética da expressão do gene *msh2-2* normalizado pelo T0 de cada cepa. Os valores apresentados representam proporções em relação ao tempo inicial de cada cultura.

No entanto, quando a comparação é feita entre as cepas, utilizando a 3D7 para normalizar, BHZ e W2 encontram-se com expressão bem aumentada no ponto 40h e no caso de BHZ, continua aumentada em 50h (figura 21).

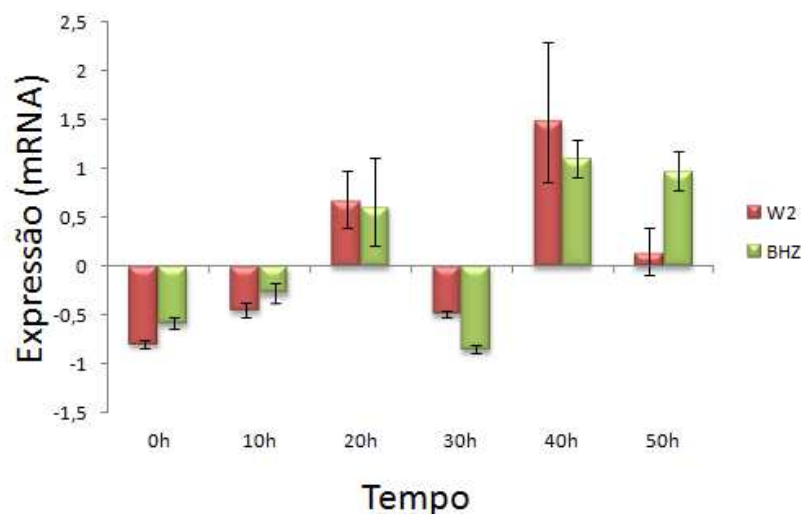


Figura 21. Comparação da expressão do gene *msh2-2* em diferentes tempos em relação à expressão de 3D7 em cada tempo.

Para o gene *msh6* (figura 22) não foi possível detectar um perfil semelhante nas diferentes amostras, mas é possível perceber que na cepa 3D7 ocorre um aumento seguido por ligeira diminuição e posterior aumento novamente. Em W2, os níveis de expressão começam a aumentar gradualmente em 10h e permanecem aumentados

até 40h. Em BHZ, o aumento na expressão se dá nos pontos 20 e 30. Os pontos 40 e 50 de BHZ não foram analisados, pois apresentaram um desvio padrão elevado.

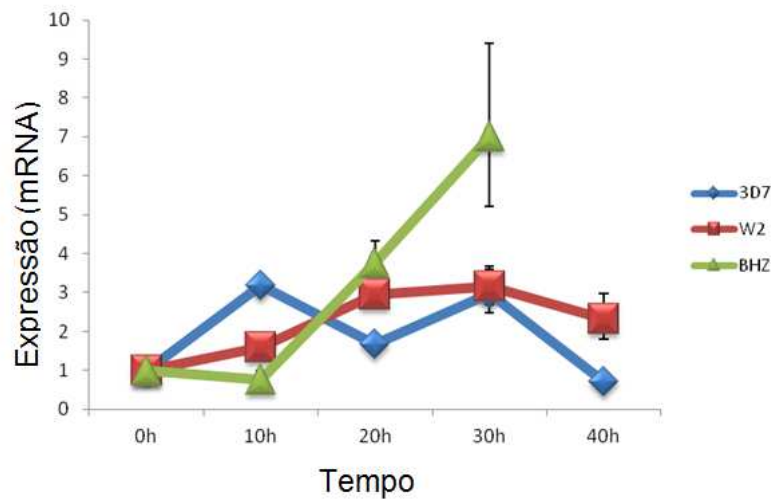


Figura 22. Cinética da expressão do gene *msh6* normalizado pelo T0 de cada cepa. Os valores apresentados representam proporções em relação ao tempo inicial de cada cultura.

O gene *mlh1* apresenta um perfil de expressão inicial parecido em todas as cepas, que diminui a partir de 10h e que começa a aumentar em 30h. No caso da BHZ, o valor de expressão do *mlh1* em 40 h é aproximadamente 4 vezes maior do que no tempo 0h da mesma cepa (figura 23).

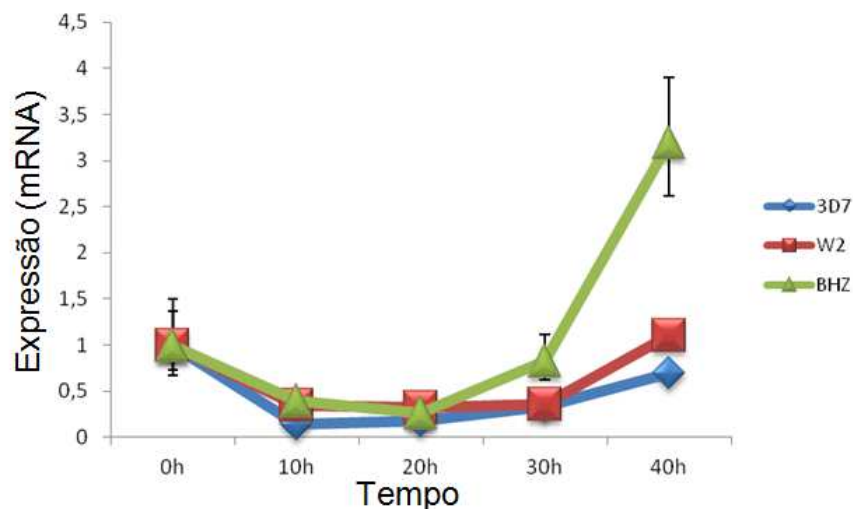


Figura 23. Cinética da expressão do gene *mlh1* normalizado pelo T0 de cada cepa. Os valores apresentados representam proporções em relação ao tempo inicial de cada cultura.

Quando os valores de expressão do gene *mlh1* são normalizados pela 3D7 nos distintos tempos, é possível perceber um aumento em W2 10h, 20 e 40h e também em BHZ 40h (figura 24).

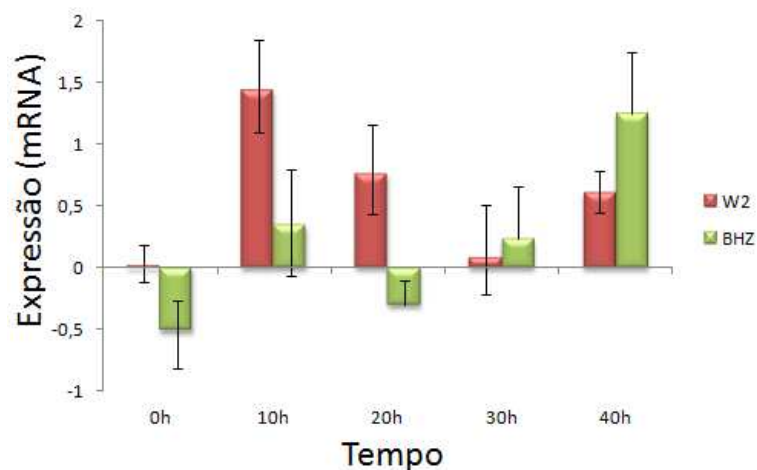


Figura 24. Comparação da expressão do gene *mlh1* em diferentes tempos em relação à expressão de 3D7 em cada tempo.

A cinética da expressão de *pms1* em cada cepa também é muito parecida entre as cepas, de modo que após uma pequena redução em comparação ao ponto inicial, ocorre um aumento a partir de 40h, que é bastante expressivo na W2 em relação ao seu ponto inicial na cultura (figura 25).

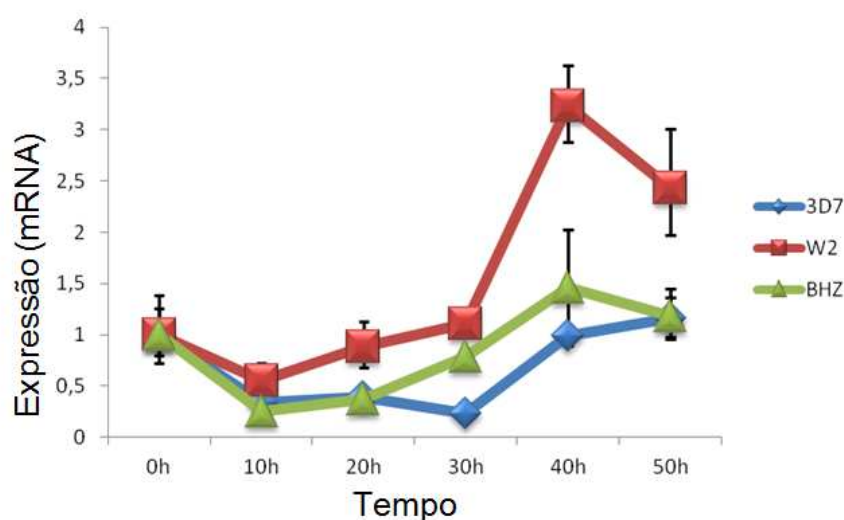


Figura 25. Cinética da expressão do gene *pms1* normalizado pelo T0 de cada cepa. Os valores apresentados representam proporções em relação ao tempo inicial de cada cultura.

O gene *pms1* mostrou-se mais expresso em BHZ e W2 no ponto 30h, quando comparadas a 3D7 (figura 26).

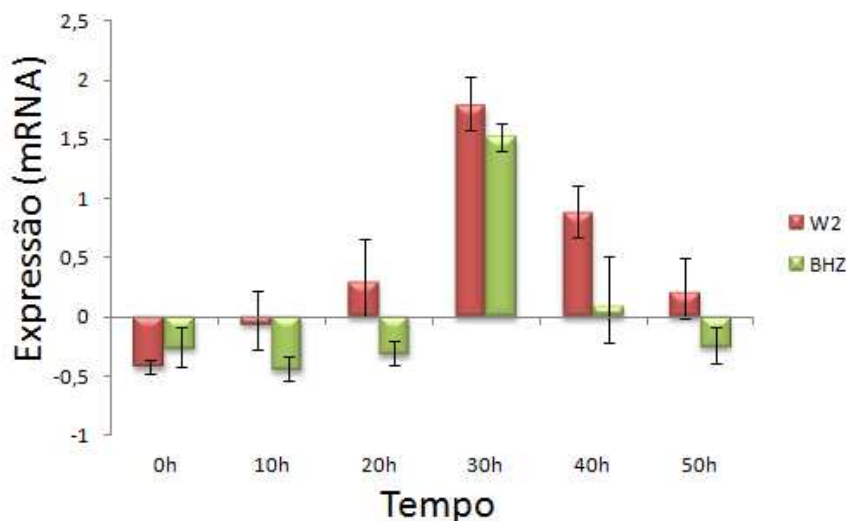


Figura 26. Comparação da expressão do gene *pms1* em diferentes tempos em relação à expressão de 3D7 em cada tempo.

Para *mutS**, de acordo com os dados obtidos por normalização das amostras em relação ao seu T0, não foi possível perceber um perfil de expressão conservado entre as três linhagens de parasitos, de modo que BHZ e 3D7 apresentaram 3 picos de expressão e a W2 apenas 2. Além disso, a maior expressão em 3D7 se dá em 10 e 50h da cultura (cerca de 4x), em W2 50h (cerca de 3 vezes), e em BHZ 40h (2,5 vezes), (figura 27).

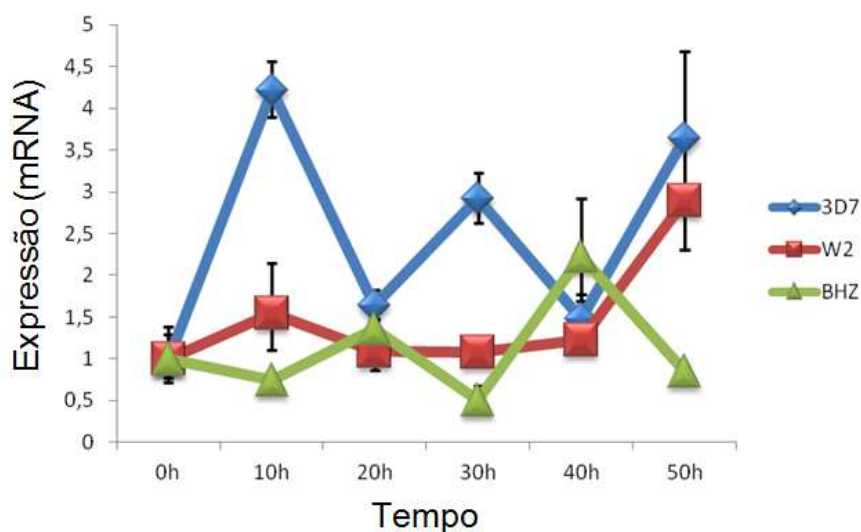


Figura 27. Cinética da expressão do gene *mutS** normalizado pelo T0 de cada cepa. Os valores apresentados representam proporções em relação ao tempo inicial de cada cultura.

5.10 Quantificação relativa da expressão dos genes de envolvidos na resistência

Não foram realizadas curvas-padrão para avaliação da eficiência dos iniciadores utilizados para a avaliação da expressão dos genes *mdr1* e *gch-1*, uma vez que 100% de eficiência dos iniciadores é garantida pelo fabricante, no caso de utilização de todos os reagentes recomendados. A normalização da expressão dos genes envolvidos na resistência foi realizada de modo semelhante à anterior, exceto pela utilização da β -tubulina como gene normalizador.

Pela análise da expressão normalizada utilizando a amostra T0, nota-se que o gene *gch-1* possui uma diminuição nos níveis de expressão nos tempos iniciais da cultura, decrescendo a partir de 10h para 3D7 e 20h para W2 e BHZ. No caso da cepa 3D7, um aumento na expressão ocorre em 50h (figura 28).

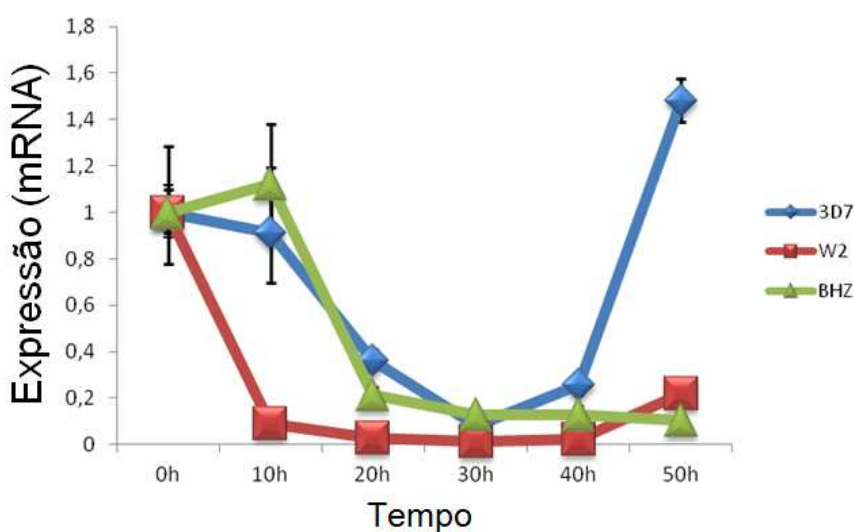


Figura 28. Cinética da expressão do gene *gch-1* normalizado pelo T0 de cada cepa. Os valores apresentados representam proporções em relação ao tempo inicial de cada cultura.

De modo semelhante, a cinética da expressão do gene *mdr1* normalizada por T0, mostra uma diminuição na expressão em 10h para 3D7 e W2 e em 20h para BHZ. A partir de 40h, ocorre novamente um discreto aumento na sua expressão, em BHZ este aumento é ainda menos perceptível (figura 29).

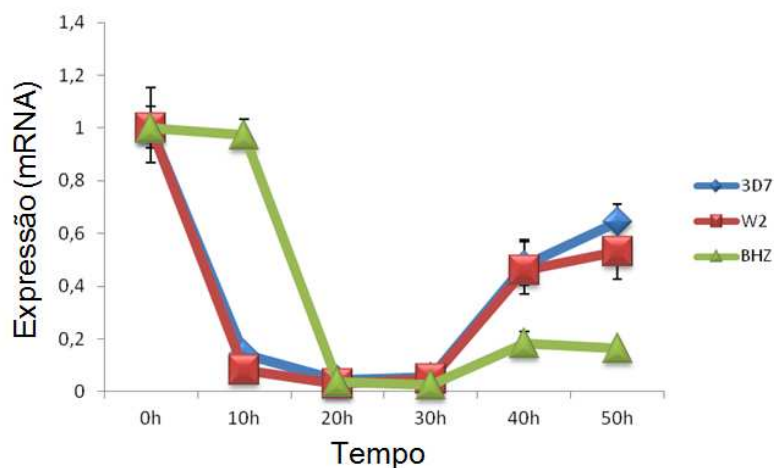


Figura 29. Cinética da expressão do gene *mdr1* normalizado pelo T0 de cada cepa. Os valores apresentados representam proporções em relação ao tempo inicial de cada cultura.

Ainda para *mdr1*, quando a expressão é normalizada pela cepa 3D7 nos diferentes tempos, percebe-se que a expressão da cepa BHZ em 10h é maior do que em 3D7 e W2, mas é menor nos pontos restantes. De modo geral, a expressão do *mdr1* se mostrou maior em W2, nos tempos 0h, 30h, 40 e 50 h (figura 30).

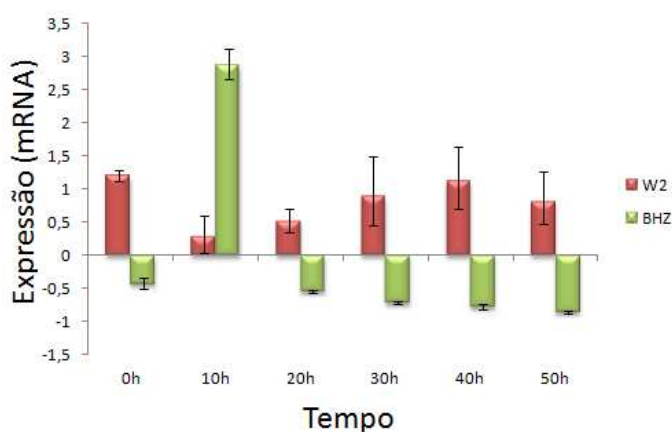


Figura 30. Comparação da expressão do gene *mdr1* em diferentes tempos em relação à expressão de 3D7 em cada tempo.

5.11 Avaliação no número de cópias gênicas

A avaliação do número de cópias do gene *gch-1* foi feita pelo método da curva padrão relativa. Foi possível verificar que W2 e 3D7 possuem o mesmo número de cópias do gene *gch-1* (2 cópias) já para BHZ, embora a estimativa no número de cópias seja maior, quando comparado às duas cepas, devido ao alto valor do desvio padrão, não é possível afirmar que esta diferença seja real (figura 31).

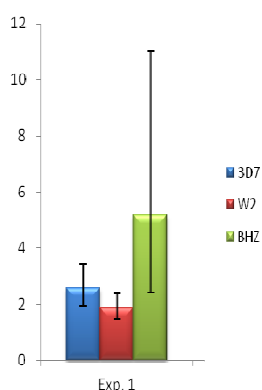


Figura 31. Número de cópias do gene *gch-1*

A avaliação do número de cópias do gene *mdr1* mostrou que tanto 3D7 quanto W2 possuem o mesmo número de cópias (2). Já o isolado BHZ apresentou apenas 1 cópia, embora o valor do desvio esteja um pouco alterado. No entanto, mais experimentos são necessários para confirmar o resultado para BHZ, pois o valor de desvio padrão mostrou-se indesejável (figura 32).

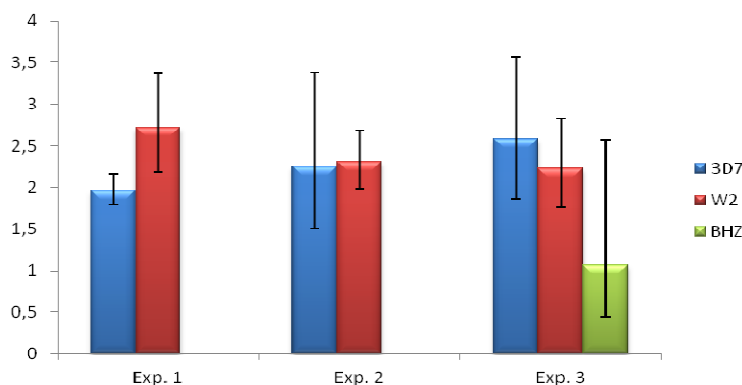


Figura 32. Número de cópias do gene *mdr1*. Para 3D7 e W2, foram feitos 3 experimentos e para BHZ, apenas 1.

5.12 Genotipagem dos Microssatélites em diferentes cepas de *P. falciparum*

Foi realizada a genotipagem de microssatélites de *P. falciparum*. Dentre os 11 marcadores estudados, 7 apresentaram o mesmo alelo em mais de uma amostra. Pela genotipagem, foi possível demonstrar que estas amostras são geneticamente diferentes umas das outras. Foram também encontrados alelos não descritos nas amostras de campo já descritos na literatura (tabela 13).

Tabela 13. Genotipagem dos microssatélites em diferentes cepas de *P. falciparum*.

Microssatélite	3D7	NF54	W2	BHZ
TA1	169	172	169	187
Polyα*	244	232	232	202
TA60*	204	198	195	204
ARA2	72	72/57	51	69
Pfg377	101	74/62	104	95
PfPK2	169	145	175	178
TA87	109	100/103	112	97
TA109	163	166	166	175
TA81	125	98	122	122
TA42	188	188	188	203
2490*	63	60	84	81

Novos alelos estão destacados em vermelho. Em negrito estão os alelos iguais em diferentes cepas/isolados. Apenas o alelo predominante de cada amostra foi representado, exceto nos casos em que a diferença entre dois picos foi menor do que 60%.

6 DISCUSSÃO

6.1 Características do MMR em *Plasmodium*

Poucos estudos têm sido realizados no sentido de compreender os diversos aspectos relacionados às proteínas do MMR. Em *Plasmodium*, já foram encontradas proteínas do MMR pertencentes às classes MSH2, MSH6, MLH1 e PMS1, mas nenhuma MSH3 (Bethke *et al.* 2007). Este trabalho também não obteve sucesso na busca de um ortólogo de MSH3 por similaridade em *Plasmodium*. Possivelmente, a proteína MSH3 não desempenha um papel essencial nestes organismos, de modo que algumas de suas funções podem ser desempenhadas por outras proteínas ou mesmo pela MSH6, que associada à MSH2, constitui o heterodímero denominado MutS α . Este heterodímero é eficiente em reparar 1 a 2 *loops* de inserção ou deleção (IDLs) e possui afinidade reduzida por IDLs maiores (Spampinato *et al.* 2009). Esta e outras funções exercidas por MSH3 devem ser compensadas por outras proteínas. Além disso, a frequência em que MSH3 está ausente (45% das espécies do OrthoMCL) é muito alta, o que confirma a não essencialidade desta proteína para a sobrevivência dos diferentes organismos eucariotos. *Plasmodium* não possui o domínio IV da MutS em MSH6. Nota-se para MSH2, a ocorrência de redução do número de domínios funcionais, restringindo-se apenas aos domínios estritamente necessários a esta classe de proteína do MMR.

A importância destas proteínas pode ser demonstrada pelo seu significativo nível de conservação nas diferentes espécies, principalmente em relação aos domínios funcionais e ao se comparar as espécies com relação evolutiva mais recente, como é o caso do gênero *Plasmodium*. Bethke *et al.* (2007) realizou em *P. berghei* tentativas de interrupção das sequências codificadoras das proteínas MSH2-1, MSH6, PMS1 e MLH1. Todavia, nenhuma tentativa foi bem sucedida. Neste mesmo trabalho, a única alteração obtida foi a introdução de uma mutação no gene *msh2-2*, que levou a expressão de uma proteína truncada. Esta proteína não se mostrou essencial, tanto nos estágios sexuais, quanto nos assexuais do parasito. Este trabalho sugere que as funções exercidas pela MSH2-2 podem ser compensadas

por outras proteínas, como a MSH2-1 ou que MSH2-2 pode estar envolvida em outras funções não vitais para o parasito, como a recombinação homóloga.

O fato de MSH2-2 ter se mostrado não essencial, aliado às informações de que ela é menos conservada entre as diferentes espécies de *Plasmodium*, pode indicar uma maior plasticidade desta proteína para a diferenciação e aquisição de novas funções. Isso pode ser explicado pela redundância funcional entre proteínas parálogas, em conformidade com a teoria da conjectura de ortólogos (Koonin, 2005; Theissen, 2002). Apesar disso, é importante lembrar a conservação de MSH2-1 e MSH2-2 de *P. falciparum*, quando comparadas com outros organismos mais distantes evolutivamente.

6.1.1 MutS*

A MutS* encontrada em *Plasmodium* é uma proteína ainda considerada hipotética. Neste trabalho, foram apresentadas evidências da expressão do seu mRNA em três diferentes cepas/isolados de *P. falciparum*. Outros trabalhos científicos, a nível de transcriptoma também já haviam detectado a expressão deste gene (Llinás *et al.* 2006, Bozdec *et al.* 2003, López-Barragán *et al.* 2011). Esta proteína hipotética possui ortólogos também em *Theileria parva*, *Theileria annulata* e *Babesia bovis*, três dentre as quatro espécies evolutivamente mais relacionadas à *Plasmodium* (Figura 33). Embora não esteja presente em todos os Apicomplexa, a MutS* pode ter se diferenciado apenas uma vez no ancestral comum deste grupo. No entanto, o alinhamento entre as proteínas deste grupo de ortólogas foi bastante divergente quando se adicionou estas três espécies, isso pode ser observado tanto no alinhamento local (anexo III), quanto no global (anexo IV). Neste caso, estas proteínas talvez desempenhem funções diferentes nestes organismos Apicomplexa, ou que se sobrepõem a outras proteínas, permitindo assim uma alta plasticidade durante seu processo de evolução.

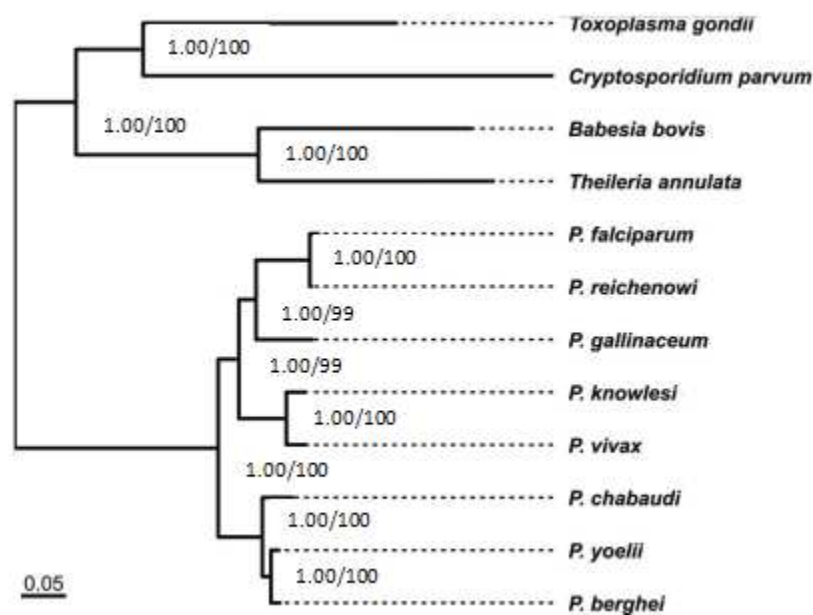


Figura 33. Filogenia de Apicomplexa. Fonte: Pick *et al.* (2011).

O resultado do alinhamento de MutS* considerando apenas *Plasmodium* foi muito significativo, mostrando alta conservação entre elas e principalmente dos resíduos importantes, mesmo aqueles que foram substituídos na MutS*.

Os domínios funcionais I e V encontrados em MutS*, quando comparados aos domínios funcionais correspondentes de outros organismos e não apenas de *Plasmodium*, apresentaram muitos resíduos necessários à função das proteínas (Spampinato *et al.* 2009), no entanto, alguns destes resíduos necessários foram substituídos. Estes domínios são correspondentes aos domínios necessários para a função da MSH6. Apesar de apresentar o resíduo conservado FYE, o alinhamento entre o domínio I da MSH6 e o domínio I de MutS* não apresentou valores significativos. Entretanto, ao se comparar o domínio V da MutS* e os domínios V da MSH6, MSH2-1 e MSH2-2, o alinhamento mais significativo foi em relação ao domínio da MSH6. Os resultados obtidos não são suficientes para confirmar a hipótese de que MutS seja uma proteína da classe MSH6, mas são indicativos desta possibilidade. A ocorrência desta duplicação não seria uma exclusividade de *Plasmodium*, uma vez que dentre as espécies eucariotas que possuem pelo menos uma proteína do MMR depositada no PlasmDB, aproximadamente 35% possuem uma ou mais duplicações do MSH6. Mas é importante ressaltar que o fenograma aqui construído mostrou que MutS forma um clado separado, tanto de MSH2, quanto

de MSH6, o que indica uma relação evolutiva muito distante e dificulta a sua correta classificação.

A importância desta proteína pode ser especulada devido ao seu nível de conservação entre as diferentes espécies de *Plasmodium* e também pelo baixo registro de SNPs nesta sequência, com apenas uma substituição não conservativa. Isto pode indicar a ocorrência de pressão seletiva negativa. Entretanto, estudos funcionais são necessários para avaliar a importância e a função de MutS* em *Plasmodium*.

6.2 Polimorfismos de base única nos genes codificadores das proteínas do MMR em *Plasmodium falciparum*

O sequenciamento de domínios funcionais das proteínas do MMR de 4 diferentes isolados/cepas mostrou-se completamente conservado. Exceto pela substituição do aminoácido 1063 na PMS1. As cepas W2 e NF54 mantidas no laboratório foram diferentes da cepa de referência 3D7 do Genbank. A detecção deste polimorfismo de base única na sequência de PMS1 é inédita, mas serão necessários outros estudos avaliando a atividade do MMR nestas cepas para fazer inferências funcionais.

A análise dos SNPs depositados no PlasmoDB mostrou que estas proteínas são bastante conservadas. Apenas nas proteínas MSH6 e MLH1 foram encontradas substituições não conservativas dentro dos domínios funcionais. Mu *et al.* (2010) mostrou que o SNP que causa a substituição do aminoácido da posição 177 em MLH1 está sob pressão seletiva positiva.

6.3 Cinética de expressão das proteínas do MMR

A expressão destes genes já foi estudada em trabalhos de transcriptoma do *P. falciparum*, dentre eles Le Roch *et al.* (2003), que avaliou a expressão gênica nas diferentes formas do ciclo eritrocítico. Infelizmente, no caso do estudo de Le Roch *et al.* (2003), devido à metodologia de coleta de amostras de acordo com as formas sanguíneas e não com o tempo de cultura, a comparação torna-se incoerente. Mas é possível comparar nossos resultados com os dados de Bozdech *et al.* (2003) que acompanhou a expressão gênica ao longo das 48 horas do ciclo eritrocítico em cultura. No entanto, algumas variações são observadas nos resultados em comparação a este trabalho. Ao considerarmos apenas os tempos em comum entre este trabalho e os analisados por Bozdech *et al.* (2003), o seu trabalho mostra a presença de um pico único de expressão para *msh2-1*, *msh6* e *muts** em 30 h de cultura. Já para *pms1* e *mlh1* foram observados dois picos de expressão, sendo o primeiro em 10h e o segundo em 30h. Neste trabalho, o pico de expressão para *msh2-1* se deu em 20h para W2 e 3D7 e em 30 h apenas para BHZ. O gene *msh6* também mostrou maior expressão em 30h, mas este não foi o único ponto onde a expressão ocorreu. Já *pms1* mostrou seu pico de expressão em 40h. O gene *mlh1*, depois de uma redução em relação ao tempo inicial, retorna a expressão aos níveis próximos ao inicial no ponto 40h, nos casos de W2 e 3D7. Na BHZ, em 40h os níveis de expressão estão mais elevados em relação ao tempo inicial. O gene *muts**, neste trabalho mostrou um perfil de expressão muito variável, com vários picos e em diferentes tempos. Muitos argumentos podem explicar tais variações, como variações no número de sincronizações e condições gerais da cultura, além da variação inerente a cada amostra utilizada.

Os sistemas de reparo do tipo *MMR* estão envolvidos no reparo de mutações pontuais, garantindo a fidelidade da replicação e também na regulação da recombinação homóloga, conversão gênica, pareamento e segregação de cromossomos meióticos e apoptose (Harfe *et al.* 2000; Jiricny, 1998; Kunkel e Erie, 2005; Marti e Fleck, 2002; Schofield e Hsieh, 2003). Quase todos estes processos estão profundamente envolvidos com a aquisição e manutenção da diversidade genética e ocorrem durante a replicação ou pós-replicação do DNA. Neste momento,

as proteínas do MMR devem estar prontas para atuar nas diversas atividades que lhes competem. Em eucariotos, a síntese do mRNA não é concomitante à síntese da proteína, portanto, o mRNA deve ser produzido em tempo hábil para que sua tradução culmine na expressão da proteína no momento em que ela é requisitada pelo organismo.

Embora estudos em outros organismos mostrem que mais do que 50% da variação na abundância das proteínas pode ser atribuída aos níveis de mRNA correspondente, em *Plasmodium* isto é um pouco mais complexo, devido à dinâmica natural da cascata cíclica de expressão gênica. Já foi demonstrado que a maior parte das proteínas do parasito tem o seu pico de expressão cerca de 11 horas depois do pico de expressão do seu mRNA correspondente. Além disso, análises computacionais indicaram que a discrepância entre os níveis do transcrito e da sua respectiva proteína pode ser causada pela dinâmica de tradução e degradação das proteínas (Foth *et al.* 2011).

Em alguns casos, o isolado BHZ apresentou um atraso no pico de expressão dos genes, que pode ser explicado por variações no tempo de progressão do ciclo celular. Já foi demonstrado que estas diferenças podem ocorrer devido a variações, entre as cepas/isolados e também devido às variações das condições da cultura (Janse *et al.* 2003; Hayward *et al.* 2005; Reilly *et al.* 2007; Arnot *et al.* 2011). No entanto, neste trabalho, variações nas porcentagens entre as formas sanguíneas nas diferentes amostras não foram morfologicamente perceptíveis. Possivelmente, o atraso observado na expressão gênica está relacionado à progressão do ciclo celular nos diferentes parasitos, mas não foi suficiente para afetar bruscamente as taxas de conversão das formas sanguíneas ou a janela de 10 horas para observação foi muito grande para se perceber estas diferenças.

A primeira fase S do ciclo celular de *Plasmodium* ocorre cerca de 24 horas após a invasão dos eritrócitos e a primeira divisão mitótica se completa entre 27 e 29 horas e as divisões mitóticas de esquizogonia, merogonia e a lise dos eritrócitos ocorrem entre 34 a 44 horas após a invasão (Arnot *et al.* 2011). Levando em consideração a complexidade deste processo de divisão celular e o fato da peculiaridade na expressão gênica em *Plasmodium*, a associação entre os níveis de expressão dos genes do MMR e a presença da proteína fica impossibilitada. Além disso, a

disponibilidade de mRNA pode não refletir no nível de expressão da proteína, pois podem ocorrer regulações pós-transcricionais. Portanto, as diferenças entre a expressão gênica demonstradas em alguns momentos da cultura podem ou não refletir alterações funcionais do MMR nas diferentes amostras, tornando necessário avaliar quantitativamente a presença destas proteínas nas diferentes cepas/isolados, bem como um estudo funcional do MMR, que possa correlacioná-lo às características de cada amostra (resistência, variabilidade genética, expressão gênica).

Castellini *et al.* (2011) demonstrou que parasitos resistentes expressam em menores taxas o mRNA codificador e a proteína MLH1 e que essa alteração diminui a eficiência do reparo do DNA. Ao tentar avaliar as sequências codificadoras e a região reguladora do gene, não foram detectadas alterações. Nenhuma alteração na expressão de outros genes do MMR foi detectada neste estudo.

Embora a cinética de expressão entre 3D7 (CQ sensível) e W2 (CQ resistente) tenha sido muito semelhante para a maioria dos genes, em alguns pontos da cultura, W2 apresentou um aumento da expressão em relação à 3D7. Isto ocorreu também quando foram comparadas a expressão entre 3D7 e BHZ (parcialmente resistente à CQ). No entanto, a expressão de BHZ também se mostrou menor em relação à 3D7 em alguns casos. Não apenas a redução da expressão de algum componente do MMR, mas também o seu aumento, pode levar à desregulação desta via. Gibson *et al.* (2006) demonstrou que a expressão aumentada de um ortólogo de MutL leva à hipermutabilidade e tolerância a danos no DNA em fibroBlastos de camundongo. Segundo os autores, o desequilíbrio na estequiometria dos componentes do MMR também pode afetar as vias que dependem do MMR, devido a interações não produtivas entre as moléculas ou pela formação de homodímeros.

É importante que sejam realizados mais estudos na quantificação das proteínas e avaliação da atividade do MMR em *Plasmodium*, pois tal abordagem pode fornecer novos *insights* a respeito da aquisição de variabilidade genética por alguns parasitos, principalmente aquela relacionada ao desenvolvimento de resistência. Com base nos conhecimentos existentes (Trotta *et al.* 2004; Ichikawa *et al.* 2000), nossa hipótese para uma perspectiva de investigação é de que as falhas no *mismatch repair* podem influenciar na aquisição de resistência dos parasitos de duas

formas: negligenciando um maior número de erros durante a replicação, que podem resultar na aquisição de mutações em genes chave para o desenvolvimento de resistência ou evitando a morte do parasito, ao não ativar a cascata de morte celular, que deveria ser ativada em casos onde os danos no DNA são considerados como irreparáveis pelo MMR, dando assim mais tempo à célula para que ela se recupere dos danos sofridos.

6.4 Genes envolvidos na resistência

6.4.1 Cinética de expressão ao longo da cultura

O gene *gch-1* possui uma diminuição nos níveis de expressão nos tempos iniciais da cultura, decrescendo a partir de 10h para 3D7 e 20h para W2 e BHZ. No caso da cepa 3D7, um pequeno aumento na expressão ocorre novamente em 50h. No entanto, Bozdec *et al.* (2003) (apenas nos pontos 1h, 10h, 20h, 30h, 40h e 48h) encontrou o *gch-1* expresso apenas em 30h. O gene *gch-1* codifica uma enzima essencial à via de síntese do folato, um composto indispensável a síntese de pirimidinas e que por isso influencia a síntese de DNA, serina e metionina (Olliaro, 2001). Daí a importância de que a expressão gênica ocorra nos tempos iniciais, para que ela possa trabalhar antes da etapa de síntese do DNA.

De modo semelhante, a cinética da expressão do gene *mdr1* mostrou uma diminuição em 10h na 3D7 e W2 e em 20h para BHZ. A partir de 40h, ocorre novamente um discreto aumento na sua expressão. No entanto, em seu trabalho, Bozdec *et al.* (2003) mostrou a expressão do *mdr1* em 10 e 20 h. O *mdr1* codifica uma proteína transportadora de membrana, que embora pareça ser essencial ao parasito, por não ser possível construir um *knockout*, não tem um papel biológico elucidado até o momento (Sanchez *et al.* 2010), por isso, é impossível atribuir relações entre sua expressão e o suprimento das necessidades do parasito.

6.4.2 Expressão x número de cópias

Para o *mdr1*, quando a expressão normalizada pela cepa 3D7 nos diferentes tempos, percebe-se que a expressão da cepa BHZ em 10h é maior do que em 3D7 e W2, mas é menor nos pontos restantes. De modo geral, a expressão do *mdr1* se mostrou maior em W2, nos tempos 0h, 30h, 40 e 50 h. A menor expressão em BHZ pode ser atribuída ao menor número de cópias do gene *mdr1* em relação a 3D7 e W2. De modo interessante, a expressão da W2, uma cepa CQ resistente, se mostrou maior do que a expressão da 3D7. A maior expressão apresentada em 10h por BHZ é coerente com a queda da expressão de W2 e 3D7 e a manutenção dos níveis do mRNA pela BHZ na avaliação da cinética da expressão. Poderia ser esperado que o número de cópias em parasitos resistentes fossem diferentes em relação à 3D7. No entanto, como já foi discutido, a alteração do número de cópias do *mdr1* pode alterar o *fitness* do parasito. Discordante deste trabalho, Mu *et al.* 2010 mostrou que 3D7 e W2 possuíam apenas uma cópia do *mdr1*. Esta alteração na estimativa do número de cópias pode ser devido ao tempo de cultivo em laboratório e quantidade numerosa de passagens já sofrida pelos parasitos.

Além disso, os experimentos foram realizados na ausência de pressão seletiva. Bohórquez *et al.* (2012) mostrou que na ausência de pressão seletiva clones com um maior número de cópias do gene *mdr1* exibem maiores níveis de expressão deste gene. Já foi demonstrado anteriormente, que na ausência de pressão seletiva, clones com elevado número de cópias do *mdr1* apresentaram menores taxas de multiplicação em relação aos clones sensíveis dos quais eles se derivaram (Preechapornkul *et al.* 2009). O número de cópias do *mdr1* influencia de modos diferentes na resistência aos antimaláricos. Por exemplo, a diminuição do número de cópias leva à diminuição da susceptibilidade à CQ, mas aumenta a susceptibilidade à mefloquina, artemisinina e halonfantrina (Sidhu *et al.* 2005, Sidhu *et al.* 2006).

Em relação ao gene *gch-1*, foi possível verificar que W2 e 3D7 possuem o mesmo número de cópias do gene *gch-1* (2 cópias). Já para BHZ, embora a estimativa no número de cópias seja maior, quando comparado às duas cepas, devido ao alto valor do desvio padrão, não é possível afirmar que esta diferença seja real. Além disso os dados da expressão do *gch-1*, que se manteve em níveis semelhantes

entre as cepas/isolados contribuem para a suposição de que o número de cópias gênicas entre as três amostras é semelhante. Ao contrário do CNP no *mdr1*, a ocorrência de cnp no gene *gch-1* poderia ser apenas um efeito indireto da resistência. A relação entre CNP no *gch1* e resistência a antifolatos ainda não foi completamente elucidada. Uma das hipóteses levantada seria de que mutações no gene *dhfr* impediriam a atuação dos fármacos, mas também alterariam a ligação da proteína por ele codificada e o seu substrato, desequilibrando a via em que participa a enzima GTP ciclodiolase 1. Portanto, o aumento nas dosagens de *gch-1* poderia ser apenas um mecanismo compensatório para melhorar o fitness do parasito (Nair *et al.* 2008). No entanto, recentemente, Heinberg *et al.* (2013) foi capaz de manipular o número de cópias do *gch1* em várias cepas de *P. falciparum* e demonstrou que o aumento do número de cópias deste gene é capaz de influenciar diretamente na resistência à pirimetamina.

Mu *et al.* (2010) também mostrou um resultado diferente para a estimativa de cópias do *gch-1* em 3D7, apenas uma cópia, mas também mostrou 2 cópias do gene em W2. Para BHZ no entanto, não havia sido realizado um estudo sobre CNP.

6.5 Genotipagem dos Microssatélites em diferentes cepas de *P. falciparum*

Dos 11 marcadores estudados, 7 apresentaram o mesmo alelo em mais de uma amostra. As amostras utilizadas neste estudo são geneticamente diferentes umas das outras. Foram também encontrados alelos não descritos nas amostras de campo estudadas por Conway *et al.* (2001). Estes dados sugerem uma alta variabilidade nas cepas estudadas, entretanto esta alta variabilidade não é observada nos genes do MMR, indicando restrições ao aparecimento de mutações nestes genes, principalmente nos seus domínios funcionais.

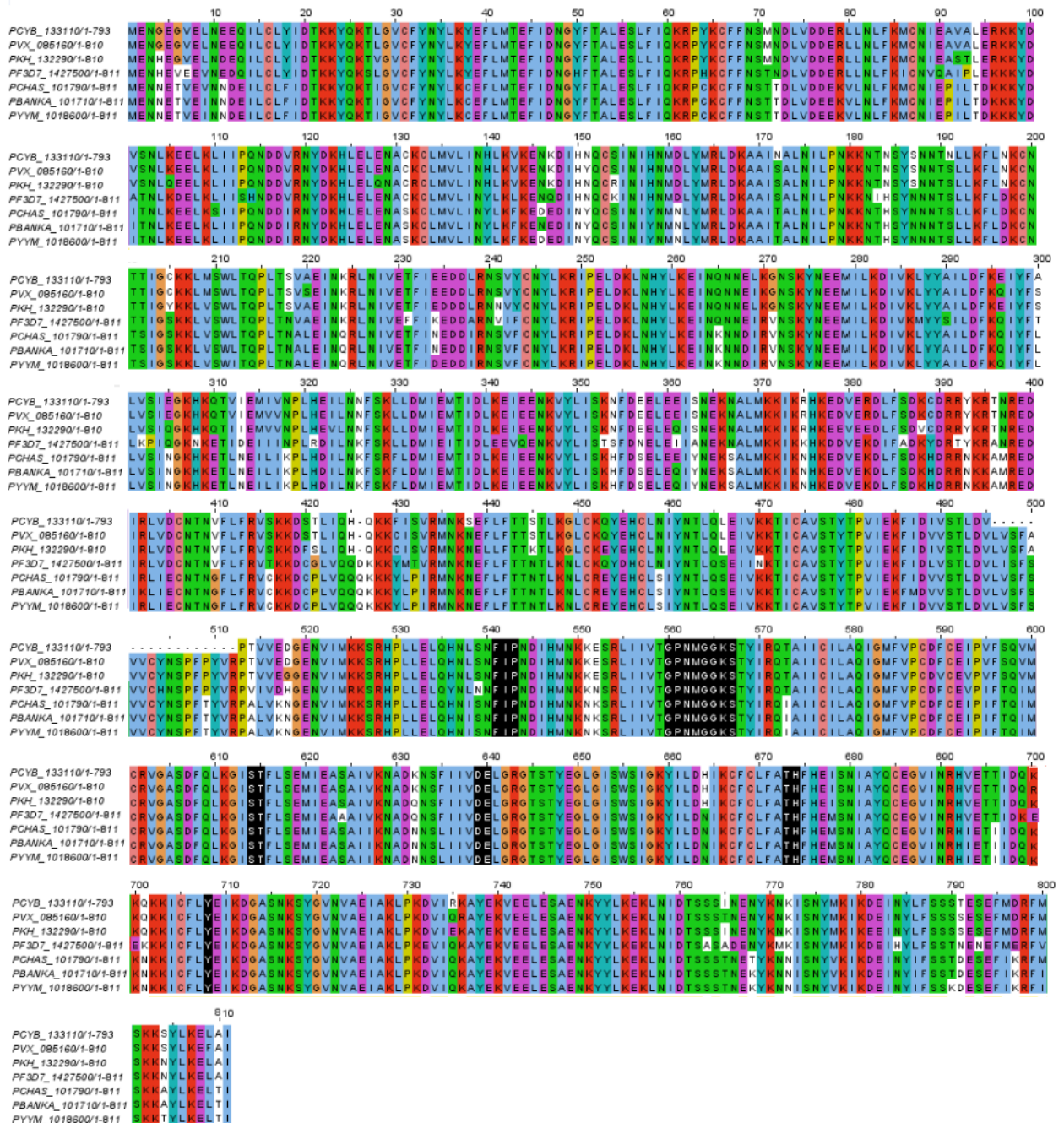
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram identificadas proteínas pertencentes às classes MSH2, MSH6, MLH1 e PMS1 e todas as sequências de proteínas mostraram-se muito conservadas, tanto entre o gênero *Plasmodium*, quanto em relação a outros organismos distantes evolutivamente.
- A proteína homóloga a MutS, aqui denominada MutS*, possui os domínios I e V, mas ainda não foi identificada quanto à sua classificação. O gene codificante desta proteína teve sua expressão confirmada neste e em trabalhos anteriores. Neste trabalho, sugere-se que esta proteína seja uma MSH6 bastante modificada, mas ainda são necessários estudos que comprovem se ela é funcional.
- Alguns SNPs foram encontrados em cepas/isolados depositados no PlasmoDB, no entanto, o sequenciamento da região que compreende os domínios funcionais apontou apenas 1 SNP na proteína PMS1.
- Os genes estudados, em sua maioria, apresentaram-se mais expressos entre 10 e 30 horas após a sincronização. Além disso, a cepa W2, que é CQ resistente, apresentou maiores níveis de expressão destes genes em relação à 3D7.
- W2 e 3D7 apresentam 2 cópias do genes *gch-1* e *mdr1*. BHZ apresenta apenas 1 cópia do *mdr1*. Os resultados da análise de expressão desses genes ligados à resistência concordam com os resultados encontrados para o número de cópias gênicas.
- Mais estudos são necessários para avaliar a significância entre diferenças nos níveis de expressão gênica e a atividade funcional do MMR nestes organismos, bem como a expressão dos genes envolvidos na resistência e a avaliação dos CNPs.

8 ANEXOS

Anexo I – Alinhamento global entre as espécies de *Plasmodium* disponíveis no PlasmoDB

Alinhamento entre proteínas MSH2-1 em *Plasmodium*.

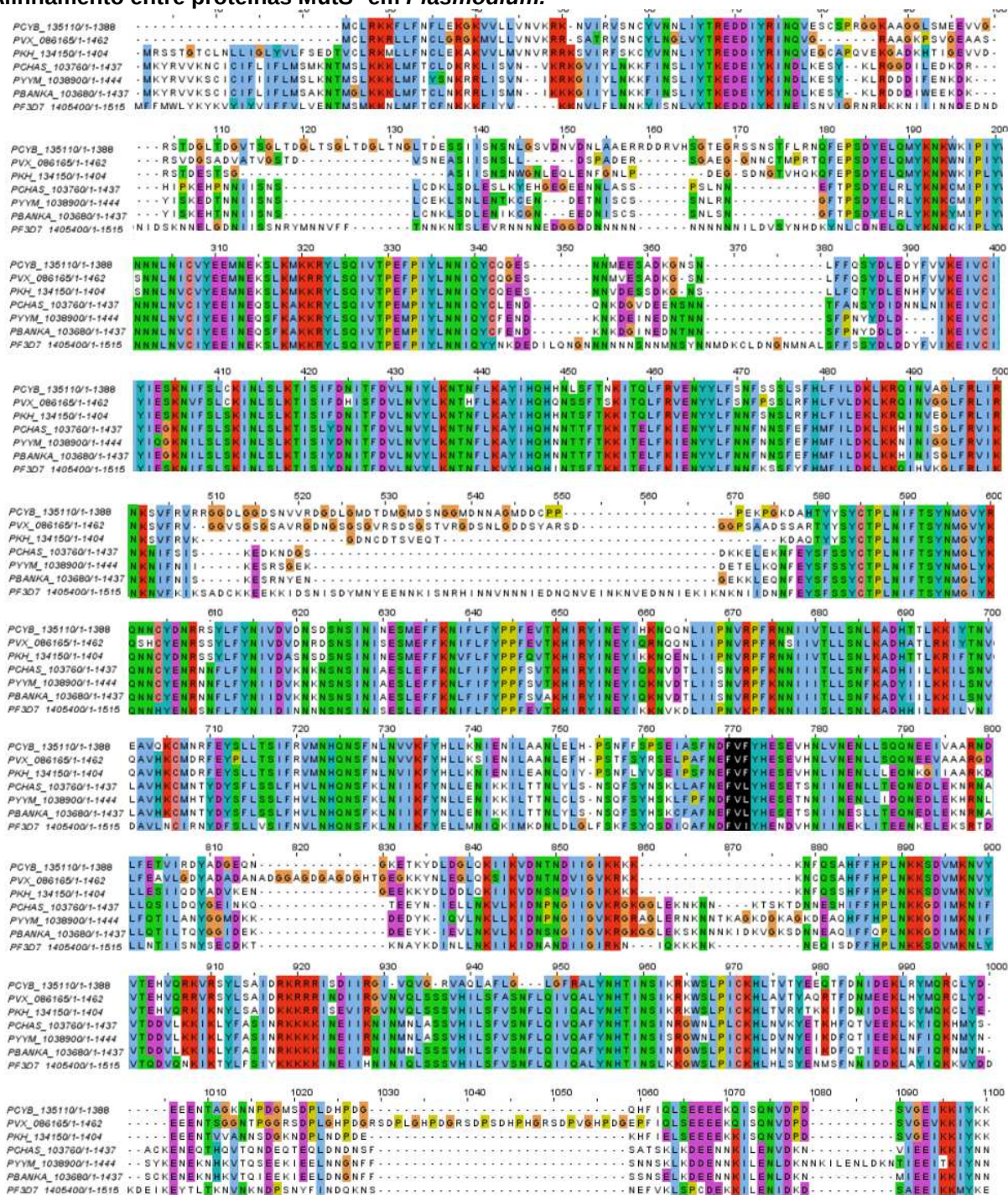


As regiões que compreendem os resíduos necessariamente conservados estão destacadas em preto. PCYB – *P. cynomolgi*; PVX – *P. vivax*; PKH – *P. knowlesi*; PCHAS – *P. chabaudi*; PYYM – *P. yoelii*; PBANKA – *P. berghei* e PF3D7 – *P. falciparum*.

[illegible]

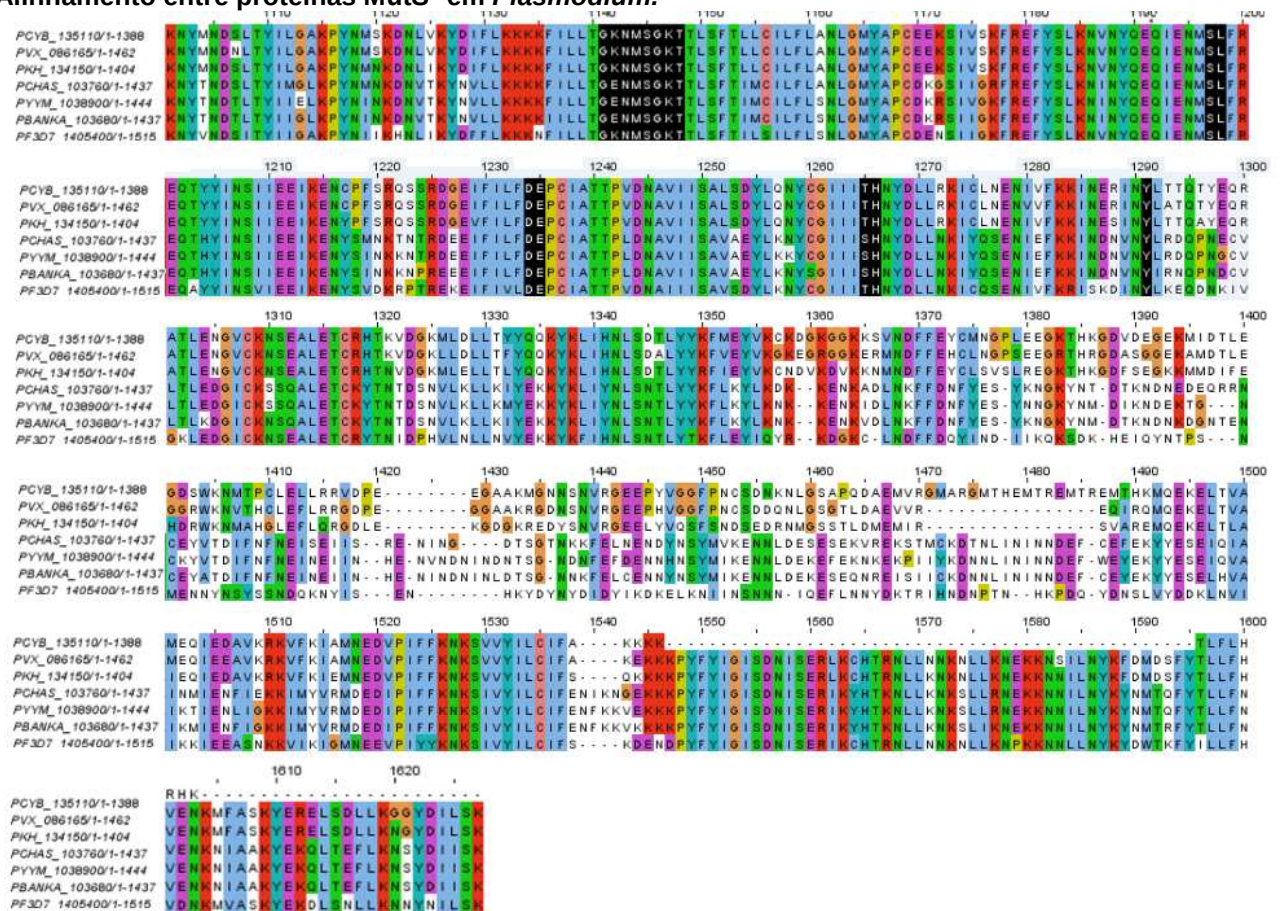
84

Alinhamento entre proteínas MutS* em *Plasmodium*.



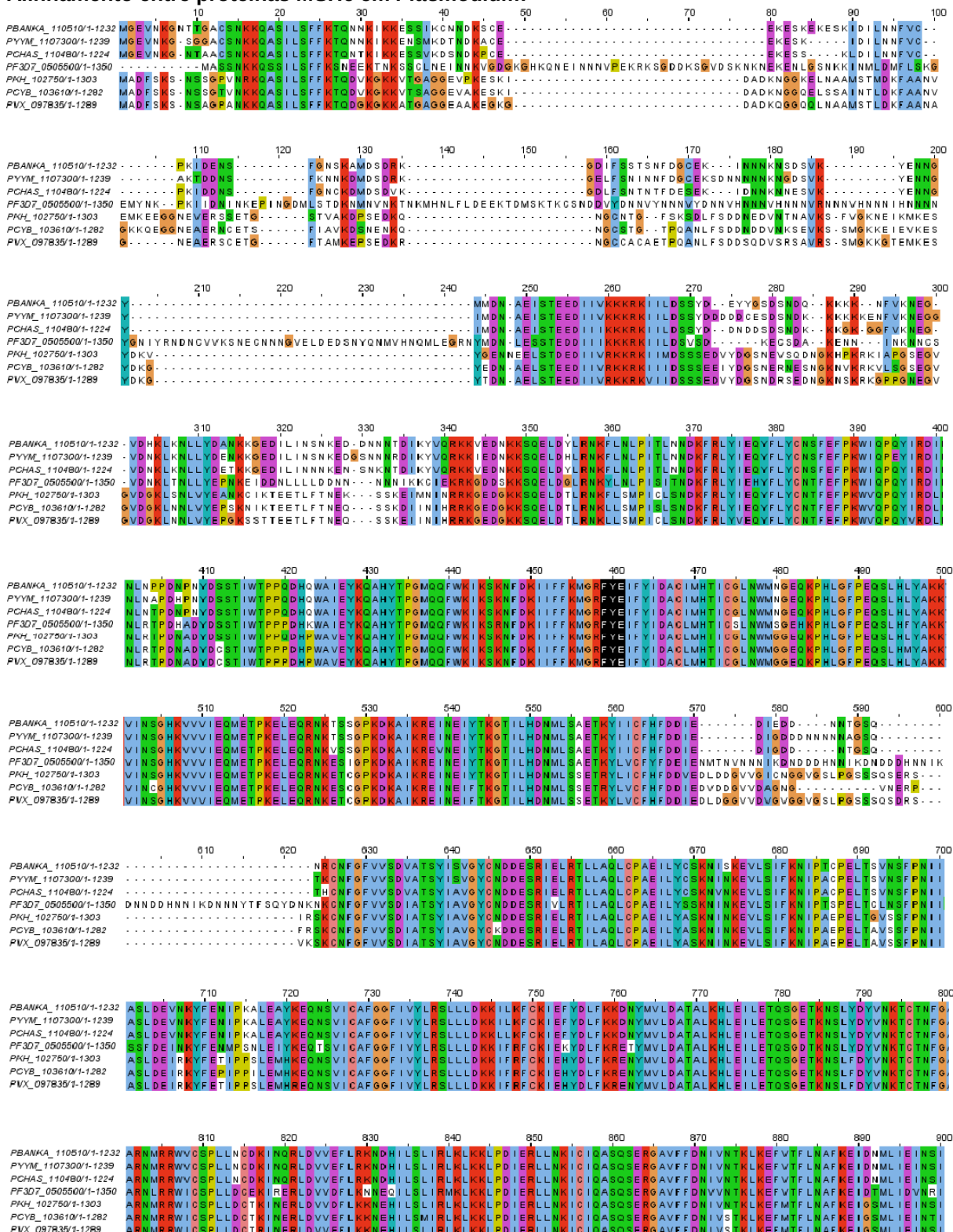
As regiões que compreendem os resíduos necessariamente conservados estão destacadas em preto. PCYB – *P. cynomolgi*; PVX – *P. vivax*; PKH – *P. knowlesi*; PCHAS – *P. chabaudi*; PYYM – *P. yoelii*; PBANKA – *P. berghei* e PF3D7 – *P. falciparum*.

Alinhamento entre proteínas MutS* em *Plasmodium*.



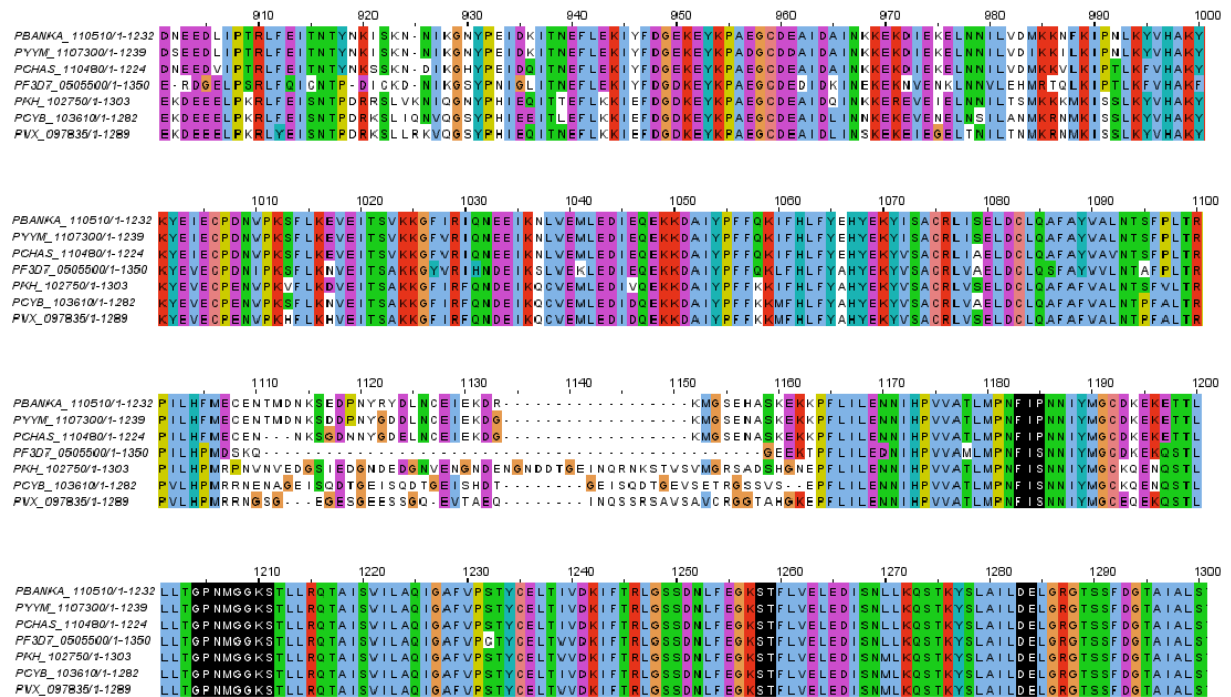
As regiões que compreendem os resíduos necessariamente conservados estão destacadas em preto. PCYB – *P. cynomolgi*; PVX – *P. vivax*; PKH – *P. knowlesi*; PCHAS – *P. chabaudi*; PYYM – *P. yoelii*; PBANKA – *P. berghei* e PF3D7 – *P. falciparum*.

Alinhamento entre proteínas MSH6 em *Plasmodium*.



As regiões que compreendem os resíduos necessariamente conservados estão destacadas em preto. PCYB – *P. cynomolgi*; PVX – *P. vivax*; PKH – *P. knowlesi*; PCHAS – *P. chabaudi*; PYYM – *P. yoelii*; PBANKA – *P. berghei* e PF3D7 – *P. falciparum*.

Alinhamento entre proteínas MSH6 em *Plasmodium* (continuação).



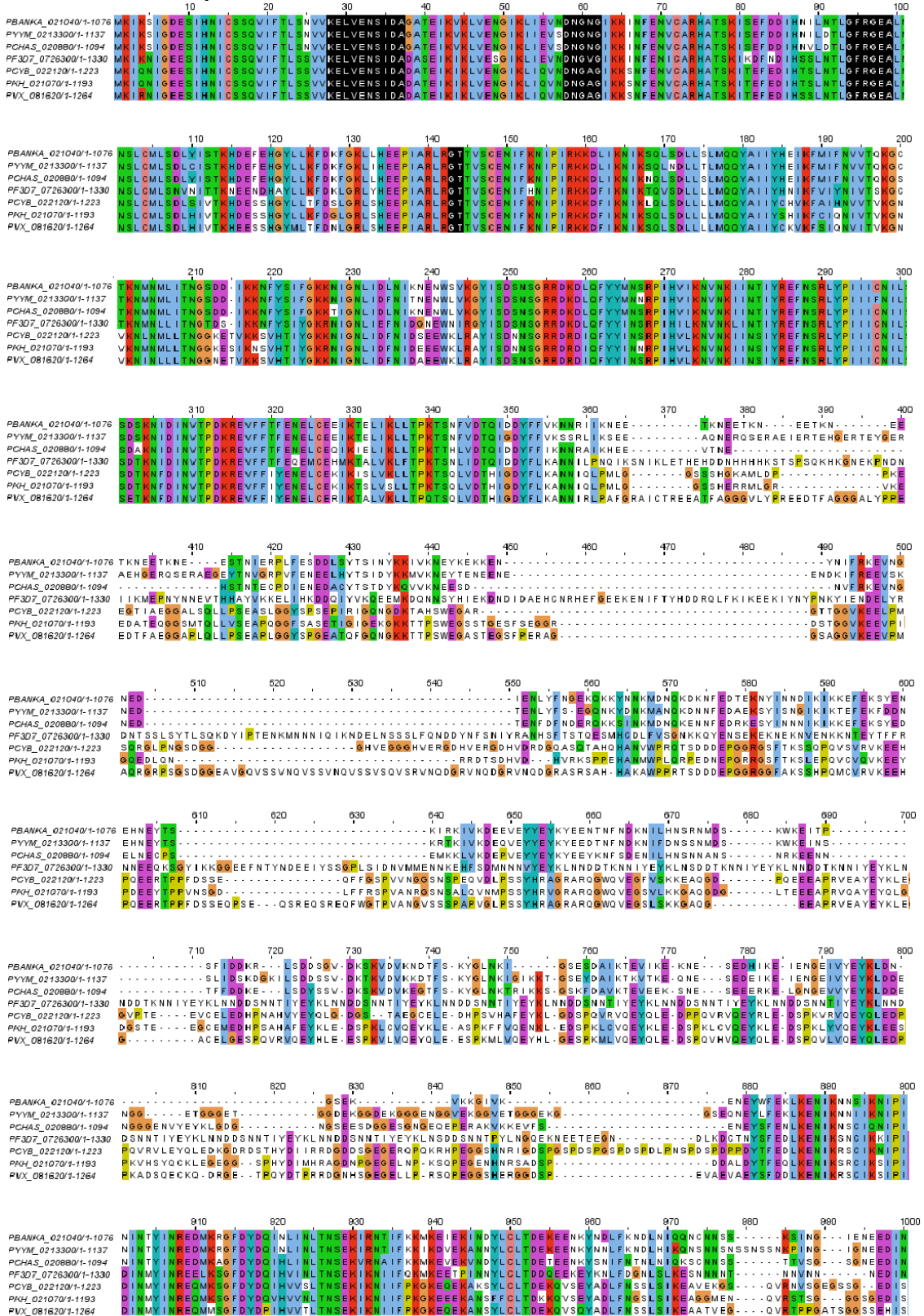
As regiões que compreendem os resíduos necessariamente conservados estão destacadas em preto. PCYB – *P. cynomolgi*; PVX – *P. vivax*; PKH – *P. knowlesi*; PCHAS – *P. chabaudi*; PYYM – *P. yoelii*; PBANKA – *P. berghei* e PF3D7 – *P. falciparum*.

Alinhamento entre proteínas MLH1 em *Plasmodium*.



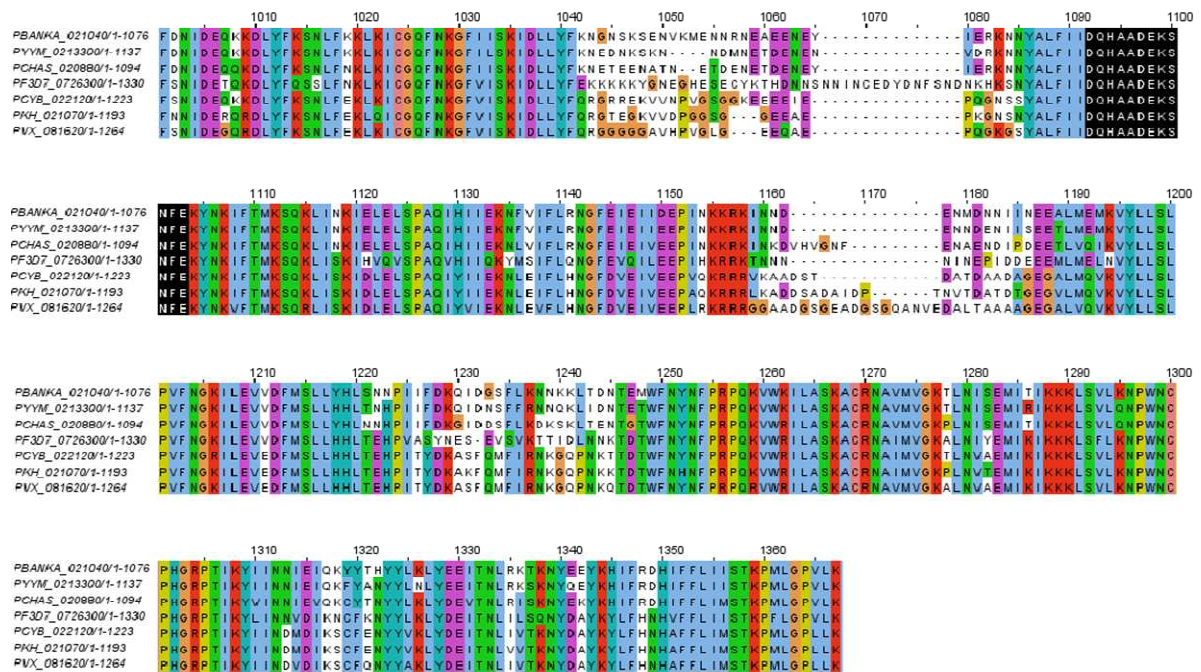
As regiões que compreendem os resíduos necessariamente conservados estão destacadas em preto. PCYB – *P. cynomolgi*; PVX – *P. vivax*; PKH – *P. knowlesi*; PCHAS – *P. chabaudi*; PYYM – *P. yoelii*; PBANKA – *P. berghei* e PF3D7 – *P. falciparum*.

Alinhamento entre proteínas PMS1 em *Plasmodium*.



As regiões que compreendem os resíduos necessariamente conservados estão destacadas em preto. PCYB – *P. cynomolgi*; PVX – *P. vivax*; PKH – *P. knowlesi*; PCHAS – *P. chabaudi*; PYYM – *P. yoelii*; PBANKA – *P. berghei* e PF3D7 – *P. falciparum*.

Alinhamento entre proteínas PMS1 em *Plasmodium* (continuação).



As regiões que compreendem os resíduos necessariamente conservados estão destacadas em preto. PCYB – *P. cynomolgi*; PVX – *P. vivax*; PKH – *P. knowlesi*; PCHAS – *P. chabaudi*; PYYM – *P. yoelii*; PBANKA – *P. berghei* e PF3D7 – *P. falciparum*.

Anexo II Escores dos alinhamentos entre proteínas do MMR de espécies de *Plasmodium*, comparadas duas a duas.

Escore do alinhamento local entre MSH2-1 de diferentes espécies de *Plasmodium*.

	<i>P. falciparum</i>			<i>P.berghei</i>			<i>P. chabaudi</i>			<i>P. yoelii</i>			<i>P. knowlesi</i>			<i>P. cynomolgi</i>		
	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.
<i>P. berghei</i>	1384	100%	83%															
<i>P. chabaudi</i>	1384	100%	83%	1621	100%	99%												
<i>P. yoelii</i>	1383	100%	83%	1624	100%	99%	1618	100%	99%									
<i>P. knowlesi</i>	1392	100%	83%	1356	100%	82%	1356	100%	82%	1358	100%	82%						
<i>P. cynomolgi</i>	1362	100%	82%	1334	100%	82%	1335	100%	82%	1335	100%	82%	1504	100%	93%			
<i>P. vivax</i>	1405	100%	84%	1387	100%	84%	1390	100%	84%	1387	100%	84%	1555	100%	95%	1555	100%	96%

Escore do alinhamento local entre MSH2- de diferentes espécies de *Plasmodium*.

	<i>P. falciparum</i>			<i>P.berghei</i>			<i>P. chabaudi</i>			<i>P. yoelii</i>			<i>P. knowlesi</i>			<i>P. cynomolgi</i>		
	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.
<i>P. berghei</i>	970	98%	59%															
<i>P. chabaudi</i>	966	98%	59%	1589	100%	94%												
<i>P. yoelii</i>	968	98%	59%	1637	100%	96%	1596	100%	94%									
<i>P. knowlesi</i>	1053	98%	62%	1036	98%	61%	1039	98%	62%	1013	95%	60%						
<i>P. cynomolgi</i>	1025	98%	60%	1043	98%	60%	1045	98%	60%	1037	98%	59%	1541	99%	87%			
<i>P. vivax</i>	1047	98%	59%	1016	98%	58%	1032	98%	59%	1019	98%	58%	1536	100%	83%	1530	100%	84%

Escore do alinhamento local entre MSH6 de diferentes espécies de *Plasmodium*.

	<i>P. falciparum</i>			<i>P.berghei</i>			<i>P. chabaudi</i>			<i>P. yoelii</i>			<i>P. knowlesi</i>			<i>P. cynomolgi</i>		
	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.
<i>P. berghei</i>	1758	84%	76%	2245	100%	94%	2240	100%	93%	1838	100%	72%	2309	100%	87%	2326	99%	88%
<i>P. chabaudi</i>	1742	83%	77%															
<i>P. yoelii</i>	504	23%	79%	2261	100%	93%												
<i>P. knowlesi</i>	1758	99%	65%	1833	100%	71%	1831	100%	71%									
<i>P. cynomolgi</i>	1817	92%	74%	1821	100%	71%	1826	100%	71%	1827	100%	71%						
<i>P. vivax</i>	1815	88%	74%	1814	100%	70%	1823	100%	71%	1820	100%	70%	2304	99%	87%			

Escore do alinhamento local entre MutS* de diferentes espécies de *Plasmodium*.

	<i>P. falciparum</i>			<i>P.berghei</i>			<i>P. chabaudi</i>			<i>P. yoelii</i>			<i>P. knowlesi</i>			<i>P. cynomolgi</i>		
	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.
<i>P. berghei</i>	499	32%	60%	2370	100%	88%	2285	100%	85%	1489	99%	56%	2051	92%	76%	2167	99%	76%
<i>P. chabaudi</i>	1496	99%	58%															
<i>P. yoelii</i>	498	32%	61%															
<i>P. knowlesi</i>	1541	99%	57%	1508	99%	57%	1561	99%	59%									
<i>P. cynomolgi</i>	1393	92%	53%	1337	96%	51%	1402	98%	53%	1403	88%	58%						
<i>P. vivax</i>	1533	98%	52%	1461	98%	52%	1530	99%	53%	1472	99%	52%	2187	98%	75%			

Escores do alinhamento local entre MLH1 de diferentes espécies de *Plasmodium*.

	<i>P. falciparum</i>			<i>P.berghei</i>			<i>P. chabaudi</i>			<i>P. yoelii</i>			<i>P. knowlesi</i>			<i>P. cynomolgi</i>		
	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.
<i>P. berghei</i>	1227	87%	80%															
<i>P. chabaudi</i>	1216	88%	80%	1511	100%	90%												
<i>P. yoelii</i>	1154	84%	81%	1499	100%	89%	1460	100%	86%									
<i>P. knowlesi</i>	1279	91%	100%	1224	99%	71%	1219	98%	72%	1218	98%	70%						
<i>P. cynomolgi</i>	1227	89%	83%	1190	98%	70%	1194	98%	71%	1198	98%	69%	1524	99%	88%			
<i>P. vivax</i>	1224	85%	100%	1199	98%	71%	1196	98%	72%	1200	98%	69%	1492	100%	87%	1565	100%	89%

Escores do alinhamento local entre PMS1 de diferentes espécies de *Plasmodium*.

	<i>P. falciparum</i>			<i>P.berghei</i>			<i>P. chabaudi</i>			<i>P. yoelii</i>			<i>P. knowlesi</i>			<i>P. cynomolgi</i>		
	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.	Escore	Cob.	Ident.
<i>P. berghei</i>	1185	64%	80%															
<i>P. chabaudi</i>	1247	67%	75%	1661	100%	78%												
<i>P. yoelii</i>	1132	65%	71%	1646	100%	81%	1520	100%	74%									
<i>P. knowlesi</i>	1273	73%	81%	1256	85%	80%	1300	97%	71%	1236	79%	79%						
<i>P. cynomolgi</i>	1291	78%	79%	1265	80%	79%	1263	82%	78%	1259	81%	79%	1860	100%	77%			
<i>P. vivax</i>	1277	76%	80%	1218	81%	78%	1242	79%	77%	1260	75%	78%	1819	100%	72%	1887	100%	75%

Anexo III

Escores do alinhamento local entre MutS* de *P. falciparum* e suas ortólogas, segundo PlasmoDB (REFdisc).

	MutS* <i>P. falciparum</i>			
	Escore	Cob.	Ident.*	E-value
<i>T. parva</i>	288	29%	70%	9,00E-11
<i>T. annulata</i>	179	23%	57%	8,00E-09
<i>B. bovis</i>	138	16%	50%	7,00E-05

Anexo IV

Alinhamento global entre MutS* de *P. falciparum* e suas ortólogas, segundo PlasmoDB (REFdisc).

```
tpar|XP_766245/1-898      1 -----MFCRI I I K G-----TPGHPLKCKLLFK-----22
tann|TA06710/1-887      1 -----MFLRI IYKR-----AFSHALKCKLLFK-----22
bbov|XP_001610980.1/1-766
pfa|PF14_0051/1-1515    1 MFFMMLYKYKYVYIYVIFVVLVENIMSKNLMFTCFNKKFFIYV-----KKNVLFNNKYISNLVYTKEDDIYIIEISNVTGRNRKKKNI I 87
pber|PBANKA_103680/1-1420
pyoe|PY03673/1-1427    1 -----MSAKNIMGLKKKLMFTCLNRRRLISMN--IKKKG I IYLNKKFINSLIYTKEDIYKINDLKESY--KLRDDDIW 70
pcha|PCHAS_103760/1-1420
pkno|PKH_134150/1-1419 1 -----MSLKNIMSLKKKLMFIYSNRRRLISVN--IKKKG I IYLNKKFINSLIYTKEDIYKINDLKESY--KLRDDDIW 70
pviv|PVX_086165/1-1462 1 -----MRSSTGTCLNLLIGLYVLFSEDIYCLRMMLFNCLCAKAYVLMVNVRRKSVIRFSKCYVNNLIYTREDDIYIINOVEGCA--POVEKGA 89
1 -----MCLRRLLFNCLGRGMYLLVNVKRS-SATRVSNCLYGLVYITREDDIYIINOVRAGAKPSVGEAAS 67

tpar|XP_766245/1-898      23 -----YLHISVGLCNQ I LD 37
tann|TA06710/1-887      23 -----YLHISVGLSNEK I LE 37
bbov|XP_001610980.1/1-766
pfa|PF14_0051/1-1515    1 -----MNVSCEMNPLK I 14
pber|PBANKA_103680/1-1420
pyoe|PY03673/1-1427    88 INNEDNDNIIDSKNNLEGD--NITSSNRYMNNVFFTNKNKNTSEYRNNNNEDGGDNNNNNNNNNNN I LDVSYNHDKYNLCDELQLYKNC 177
pcha|PCHAS_103760/1-1420
pkno|PKH_134150/1-1419 71 ENKDK-----YISKEHTN--N I I SNS-----LCKNLSLEN I KCGN--EEDN I SCSSNLSN-----GFTPSDYELRLYKNCY 133
pviv|PVX_086165/1-1462 71 ENKDK-----YISKEHTN--N I I SNS-----LCKNLSLEN I KCGN--EEDN I SCSSNLSN-----GFTPSDYELRLYKNCY 133
71 EDKDR-----H I I K E H P N--N I I SNS-----LCKNLSLEN I KCGN--EEDN I SCSSNLSN-----GFTPSDYELRLYKNCY 136
90 KHTIG--EVVDRSTDETSAS I I SNS-----LCKNLSLEN I KCGN--EEDN I SCSSNLSN-----GFTPSDYELRLYKNCY 157
68 RSVGSAADVATVSTGVNEAS I I SNS-----LCKNLSLEN I KCGN--EEDN I SCSSNLSN-----GFTPSDYELRLYKNCY 133

tpar|XP_766245/1-898      38 KOALLNENVL I KKK IARKMLEVLSLRN--PYLGNNVNFLSQFIKSEKKNVYFNNVILLNNGQKYESFDTDSVLLVEHCGLEFGGTAAQVF 128
tann|TA06710/1-887      38 NQGLLLNDSYL I KKK IAKKMLEVLSLRN--PYGVNNVNFLSQFIKSEKKNVYFNNVILLNNGQKYESFDTDSVLLVEHCGLEFGGTAAQVF 128
bbov|XP_001610980.1/1-766
pfa|PF14_0051/1-1515    15 TALALGLDGRDCSESPKGLDRYMLPDSNQRIMKTMLMYLMSHLDN-----IAANVKYVVEKLAATQVILYEAP I I PPK I KQ I V 96
pber|PBANKA_103680/1-1420
pyoe|PY03673/1-1427    178 K I P L W I K K L D N L K N M A I N C I E Y L K G D N L L Y F D H Y K N G L L K F L N D E K K K Y S N C I I L S R V G D F Y E T Y G L D S I F L I E F L N I K K M N N K L S C G F 269
pcha|PCHAS_103760/1-1420
pkno|PKH_134150/1-1419 134 M I P I W I K K L E K L N I A I N C I E Y L K G D N L L Y F D H Y K N G L L K F L N D E K K K Y S N C I I L S R V G D F Y E T Y G L D S I F L I E F L N I K K M N N K L S C G F 225
pviv|PVX_086165/1-1462 134 M I P I W I K K L E K L N I A I N C I E Y L K G D N L L Y F D H Y K N G L L K F L N D E K K K Y S N C I I L S R V G D F Y E T Y G L D S I F L I E F L N I K K M N N K L S C G F 225
137 M I P I W I K K L E K L N I A I N C I E Y L K G D N L L Y F D H Y K N G L L K F L N D E K K K Y S N C I I L S R V G D F Y E T Y G L D S I F L I E F L N I K K M N N K L S C G F 228
158 K I P L W I K K L E K L N M A I N C V E H L D D N L L Y F D H Y K N G L L K F L N E E K K K Y S N C I I L S R V G D F Y E T Y G L D S I F L I E F L N I K K M N N K L S C G F 249
134 N I P I W I K K L E K L N I A I N C V E H L D D N L L Y F D H Y K N G L L K F L N E E K K K Y S N C I I L S R V G D F Y E T Y G L D S I F L I E F L N I K K M N N K L S C G F 225

tpar|XP_766245/1-898      129 F V T E L E E V V N K L L A G I D N V Y E E L V N G-----S I F T E N K S F Y L S I Y Y K N K L N-----H D R D E T I T C I S G-----190
tann|TA06710/1-887      129 F V T E L E E I V N K L D A G I D N V Y E E L V N G-----S I F T E N K S L Y L R I F Y S K L M-----D N E V E K I K N F G-----190
bbov|XP_001610980.1/1-766
pfa|PF14_0051/1-1515    97 S Y K I D T V I M E L C H T L D A Y L Y S R S L-----S I F T E N K S L Y L R I F Y S K L M-----D N E V E K I K N F G-----190
pber|PBANKA_103680/1-1420
pyoe|PY03673/1-1427    270 I K S S I N K A L S I L T N N N L N V C I Y E E I N E Q S F A K K R Y L S Q I V T P E P P I Y L N N I Q Y C F E N D I L Q N G N N N N S N N M S Y N N M D K C L D N G M N N A 361
pcha|PCHAS_103760/1-1420
pkno|PKH_134150/1-1419 226 I K S S I N K A L S I L T N N N L N V C I Y E E I N E Q S F A K K R Y L S Q I V T P E P P I Y L N N I Q Y C F E N D I L Q N G N N N S N N M S Y N N M D K C L D N G M N N A 297
pviv|PVX_086165/1-1462 226 I K S S I N K A L S I L T N N N L N V C I Y E E I N E Q S F A K K R Y L S Q I V T P E P P I Y L N N I Q Y C F E N D I L Q N G N N N S N N M S Y N N M D K C L D N G M N N A 297
229 I K S S I N K A L S I L T N N N L N V C I Y E E I N E Q S F A K K R Y L S Q I V T P E P P I Y L N N I Q Y C F E N D I L Q N G N N N S N N M S Y N N M D K C L D N G M N N A 300
250 I K T S I N K A L H I L S S N L N V C Y Y E E M E K S L M K K R Y L S Q I V T P E P P I Y L N N I Q Y C O E S-----N N V D E S S D K G S-----320
226 I K T S I N K A L H I L S S N L N I C Y Y E E M E K S L M K K R Y L S Q I V T P E P P I Y L N N I Q Y C O E S-----N N V D E S S D K G S-----296

tpar|XP_766245/1-898      191 -----D I K P T I S N D K L E G F I I T D S V K S D N K-----V V G L G F D E N G Y S L S V I D L K G D V S Y N N L N E I C V E D Y L N K L N-----260
tann|TA06710/1-887      191 -----E I E S I N S-----E G L E I T E A T S K S D N K-----I V G L G Y D E D G S I S V V D L K G E V S Y N N L N E I C V E D Y L N K L N-----256
bbov|XP_001610980.1/1-766
pfa|PF14_0051/1-1515    125 -----N T I K K K I H V I A A S D L N L A S N I D K L T D E V E I C Q Q V I R N M H N N R I I P S T G I H A L D E L F Q-----182
pber|PBANKA_103680/1-1420
pyoe|PY03673/1-1427    362 L S F S S Y D L D D Y V I K E I V C I Y I E S K N I F S L K I N L S L K T I S I D N I T F D V L N V Y L K N T F L K A Y I H O H N T T F T K K I T E L F K I E N Y Y L F N N-----453
pcha|PCHAS_103760/1-1420
pkno|PKH_134150/1-1419 298 -S F P N Y D L D-----I K E I V C I Y I E G K N I L S L S K I N L S L K T I S I D N I T F D V L N V Y L K N T F L K A Y I H O H N T T F T K K I T E L F K I E N Y Y L F N N-----384
pviv|PVX_086165/1-1462 298 -S F P N Y D L D-----I K E I V C I Y I E G K N I L S L S K I N L S L K T I S I D N I T F D V L N V Y L K N T F L K A Y I H O H N T T F T K K I T E L F K I E N Y Y L F N N-----384
301 -T F A N S Y D I D N N L N I K E I V C I Y I E G K N I F S L K I N L S L K T I S I D N I T F D V L N V Y L K N T F L K A Y I H O H N T T F T K K I T E L F K I E N Y Y L F N N-----391
321 L F L Q T Y D L E N H F V K E I V C I Y I E S K N I F S L K I N L S L K T I S I D N I T F D V L N V Y L K N T F L K A Y I H O H N T T F T K K I T E L F K I E N Y Y L F N N-----411
297 -L F F Q S Y D L E D H F V K E I V C I Y I E S K A V S L C I N L S L K T I S I D H I S F D V L N V Y L K N T F L K A Y I H O Q N S S F T S-----I T O L F R V E N Y Y L F S-----387

tpar|XP_766245/1-898      261 R-----I I I L D G S A R I K S V F N L P N V L Y H I M Q G-----290
tann|TA06710/1-887      257 R-----I I I L D G S A K I K S V F N L P N V L Y H I M Q G-----286
bbov|XP_001610980.1/1-766
pfa|PF14_0051/1-1515    183 -----K E E T F N G M H P S I V I K E L Y O V D-----204
pber|PBANKA_103680/1-1420
pyoe|PY03673/1-1427    454 F K S S Y F H M F I D K L K K I H V K G L F R L I K N N V F K I S A D-----CKKEEKK I D S N I S D Y M N Y E E N K I I S N R H I N N V N N N I E D N Q N V E I N K N V-----541
pcha|PCHAS_103760/1-1420
pkno|PKH_134150/1-1419 385 F N N S F E H M F I D K L K K N I N I S G L F R V I K N N I F N I S-----K E S R N Y E N-----429
pviv|PVX_086165/1-1462 385 F N N S F E H M F I D K L K K N I N I S G L F R V I K N N I F N I S-----K E S R S G E K-----429
392 F N N S F E H M F I D K L K K H I N I S G L F R V I K N N I F N I S-----K E D K N D S-----436
412 F N S L R F H L F I L E K L R Q I N Y E G L F R L I R N S V F R Y K-----G D N C D T S-----455
398 F S S L R F H L F V L D L K R Q I N Y G G L F R L I R N S V F R Y G G V S G S A V R G D N G S S G S V R S-----D S G S T V R G S N L-----457

tpar|XP_766245/1-898      291 -----G C I G D S F M S V L G E I T I R L N I I N F K V K R I D S G L E T G F I Y L D N R V I N Q L G D F H E Q V S S S F Y V K Y F K R-----L L Y R Y P K-----371
tann|TA06710/1-887      287 -----G C V G D A F T S V L G E I T I R I N K I I N F K V I N L R S L E T G F I Y L D N R V I N K L G N F H E Q I V P N S F S Y V K Y F K R-----L L Y R Y P E-----367
bbov|XP_001610980.1/1-766
pfa|PF14_0051/1-1515    205 -----I A A C Q L I Q A V A T Y I T P E M A A I D I T O P S K W S Y I A T E L O H I A N T E S N I V I N D N-----Y Y I F K K I N V E H H N-----275
pber|PBANKA_103680/1-1420
pyoe|PY03673/1-1427    542 E D N N I E K I K N K N I I D N N F E Y S F S S Y C T P L N I F T S Y N M G L Y K N N C Y E R N N F L Y N I I D V K N K N S N S I N I A E S L E F F K N L I F Y P P S V A K H-----633
pcha|PCHAS_103760/1-1420
pkno|PKH_134150/1-1419 430 -----G E K K L Q N F E Y S F S S Y C T P L N I F T S Y N M G L Y K N N C Y E R N N F L Y N I I D V K N K N S N S I N I A E S L E F F K N L I F Y P P S V A K H-----512
pviv|PVX_086165/1-1462 430 -----D E T E L Q N F E Y S F S S Y C T P L N I F T S Y N M G L Y K N N C Y E R N N F L Y N I I D V K N K N S N S I N I A E S L E F F K N L I F Y P P S V A K H-----512
437 -----D K K E L I K N F E Y S F S S Y C T P L N I F T S Y N M G L Y K N N C Y E R N N F L Y N I I D V K N K N S N S I N I A E S L E F F K N L I F Y P P S V A K H-----519
456 -----V E O T K D A Q T Y S Y C T P L N I F T S Y N M G V Y Q N N C Y E R S S Y L F Y N I V D A S S D S N S I N I N E S M E F F K N I F L F Y P P F V T K H-----535
458 G D S Y A R S D G G P S A A D S A R T Y S Y C T P L N I F T S Y N M G V Y K S H O Y E R S S Y L F Y N I V D V D R D S N S I N I S E S M E F F K N I F L F Y P P F E V T K H-----549

tpar|XP_766245/1-898      372 L S G T I E I N K I L S L L T V S-----M V O K N V N L D E L S L E N L I S L I O V Y E Y S E N L P N K L I P L L F D V L D N L N V S V K E N F K K I F A K N N-----454
tann|TA06710/1-887      368 F S G T I R E I N K I L S N L T V S-----I I Q K N V N L D E L S L E N L V S L I N V Y K Y S E N L P K K L V Q L L F D L V V K D N L N V G V K H E N L N K I F R K M T-----450
bbov|XP_001610980.1/1-766
pfa|PF14_0051/1-1515    276 L R S T E A V I D N Q L I T G Y I N-----N E V T O A M L N Y R N R C I A K I K A Q A L S Q R A R I L A K Y A Q N L V L A S H C V Y V Q T L A A H V S M A T-----353
pber|PBANKA_103680/1-1420
pyoe|PY03673/1-1427    634 I R Y I N E Y I K K I V K D L I P N V R P F K N N I I T L L S N L K A D H I L K K I L Y N I O A V L N C I R N Y D F S L L V I F N V L N H Q N S F K L N I I K F Y E L L M N I Q-----604
pcha|PCHAS_103760/1-1420
pkno|PKH_134150/1-1419 513 I R Y I N E Y I K K I V D T L I S N V R P F K N N I I T L L S N F K A D Y I L K K I L S N V L A V H K C M N T Y D Y S F L S S F H V L N H Q N S F K L N I I K F Y N L L E N I K-----604
pviv|PVX_086165/1-1462 520 I R Y I N E Y I K K I V D T L I S N V R P F K N N I I T L L S N F K A D Y I L K K I L S N V L A V H K C M N T Y D Y S F L S S F H V L N H Q N S F K L N I I K F Y N L L E N I K-----611
536 I R Y I N E Y I K K I Q E N L I P N V R P F R N N I I V T L L S N L K A D H T L K R I F T N V O A V H K C M D R F E Y S L L T S I F R V M N H Q N S F N L N V I K F Y H L L K I E-----627
550 I R Y I N E Y I K K I Q Q N L I P N V R P F R N N I I V T L L S N L K A D H A T L R K I Y T N V O A V H K C M D R F E Y P L L T S I F R V M N H Q N S F N L N V V K F Y H L L K I E-----641

tpar|XP_766245/1-898      455 K V N S Y V S E N-----W D K K H K P Q N N L T R Q I Q K M N K S E M I R R O L L V N L N R V E S F E R L L N E I Y T K F V D S D P G-----N-----525
tann|TA06710/1-887      451 K V D S Y V S K D-----W N N -C P K Q N F L R Q I Q K K S K E M I R R L L E N L N R V E S F E R L L S E I Y T K F V D S Q S A-----N-----520
bbov|XP_001610980.1/1-766
pfa|PF14_0051/1-1515    354 A K A S A P N I S-----P D R T I I Y K N L P H M D D O E A I P L T V S L S V N I I R G S N N S K S I L S A I L A A T V A-----417
pber|PBANKA_103680/1-1420
pyoe|PY03673/1-1427    726 K I M D L D L G L F K F S Y Q S D I O A F N D F V I Y H D N V N I I N K L I T E E N K E L E S T O L L N I I S N S E C K T-----K N A-----901
pcha|PCHAS_103760/1-1420
pkno|PKH_134150/1-1419 605 K I L T N L Y L S -N S O F S Y H S K O F A F N E F V L Y H E S E T N I I N E S L L T E Q E D L E N R N A L L O T I L T Q G G D E K-----D E E-----679
pviv|PVX_086165/1-1462 605 K I L T N L Y L S -N S O F S Y H S K L F F N D F V L Y H E S E T N I I N E N L L I Q E D L E N H R N L F O T I L A N G M G K K-----D E E-----679
612 K I L T N L Y L S -N S O F S Y N K L L A F N E F V L Y H E S E T N I I N E N L L T E Q E D L E N R N A L L O S I D Q Y G E I N K Q-----D E E-----686
628 N I L E A N L O I Y -P S N F L V S E I P S N E F F V Y H E S E V H L N E N L L L Q N K G I I A A R K D L L E I I O D A V D K E N-----G E E K K-----704
642 N I L A A L E F H -P T F S Y R E L P A F N E F V F Y H E S E V H L N E N L L S Q N E E A A A A G D L F E A V L G D A D A N A D G A G A G A D H T B E K K-----732
```

pber – *P. berghei*; pyoe – *P. yoelii*; pkno – *P. knowlesi*; pfa – *P. falciparum*; pviv – *P. vivax*; pcha – *P. chabaudi*; bbov – *B. bovis*; tpar – *T. parva*; tann – *T. annulata*.

pber – *P. berghei*; pyoe – *P. yoelii*; pkno – *P. knowlesi*; pfal – *P. falciparum*; pviv – *P. vivax*; pcha – *P. chabaudi*; bbov – *B. bovis*; tpar – *T. parva*; tann – *T. annulata*.

Anexo V

Relação de espécies estudadas neste trabalho e suas respectivas proteínas MMR (OrthoMCL).

Espécie	MSH2	MSH3	MSH6	MutS*	MLH1	PMS1
<i>Leishmania braziliensis</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Trypanosoma brucei</i>	2	2	2	0	2	2
<i>Leishmania mexicana</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Trypanosoma vivax</i>	1	1	1	0	0	0
<i>Trypanosoma congolense</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Leishmania major</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Leishmania infantum</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	2	2	1	0	2	2
<i>Entamoeba invadens</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Entamoeba dispar</i>	3	0	1	0	1	1
<i>Dictyostelium discoideum</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Entamoeba histolytica</i>	2	0	1	0	1	1
<i>Ricinus communis</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Oryza sativa</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Micromonas sp.</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Physcomitrella patens</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Ostreococcus tauri</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	0	1	0	1	1
<i>Volvox carteri</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	1	0	3	0	2	2
<i>Tetrahymena thermophila</i>	1	1	3	0	1	1
<i>Plasmodium vivax</i>	2	0	1	1	1	1
<i>Plasmodium falciparum</i>	2	0	1	1	1	1
<i>Plasmodium berghei</i>	2	0	1	1	1	1
<i>Plasmodium yoelii</i>	2	0	1	1	1	1
<i>Plasmodium knowlesi</i>	2	0	1	1	1	1
<i>Plasmodium chabaudi</i>	2	0	1	1	1	1
<i>Theileria parva</i>	1	0	1	1	1	1
<i>Theileria annulata</i>	1	0	1	1	1	1
<i>Babesia bovis</i>	1	0	1	1	1	1

**Relação de espécies estudadas neste trabalho e suas respectivas proteínas MMR (OrthoMCL).
(Continuação).**

Espécie	MSH2	MSH3	MSH6	MutS*	MLH1	PMS1
<i>Cryptosporidium muris</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Toxoplasma gondii</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Neospora caninum</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Cryptosporidium hominis</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Aspergillus oryzae</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Neurospora crassa</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Eremothecium gossypii</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Coccidioides immitis</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Coccidioides posadasii</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Candida albicans</i>	2	2	4	0	2	2
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	2	1	2	0	1	1
<i>Emericella nidulans</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Gibberella zeae</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Candida glabrata</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Laccaria bicolor</i>	1	0	2	0	1	1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Cryptococcus bacillisporus</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Ixodes scapularis</i>	2	1	1	0	1	1
<i>Drosophila melanogaster</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Aedes aegypti</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Bombyx mori</i>	1	0	1	0	0	0

**Relação de espécies estudadas neste trabalho e suas respectivas proteínas MMR (OrthoMCL).
(Continuação).**

Espécie	MSH2	MSH3	MSH6	MutS*	MLH1	PMS1
<i>Apis mellifera</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Culex pipiens</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Pediculus humanus</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Anopheles gambiae</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Nematostella vectensis</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Trichoplax adhaerens</i>	1	0	3	0	1	1
<i>Danio rerio</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Takifugu rubripes</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Ciona intestinalis</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	2	1	1	0	1	1
<i>Rattus norvegicus</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Homo sapiens</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Mus musculus</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Monodelphis domestica</i>	2	1	1	0	1	1
<i>Macaca mulatta</i>	0	1	2	0	2	2
<i>Canis lupus familiaris</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Pan troglodytes</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Equus caballus</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Gallus gallus</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Brugia malayi</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Schistosoma mansoni</i>	3	0	2	0	1	1
<i>Monosiga brevicollis</i>	1	1	2	0	1	1
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1	0	1	0	3	3
<i>Giardia lamblia</i>	1	0	0	0	1	1
<i>Giardia intestinalis 1</i>	1	0	0	0	1	1
<i>Phytophthora ramorum</i>	1	0	3	0	1	1
<i>Giardia lamblia</i>	1	0	0	0	1	1

Anexo VI

Sequências utilizadas no estudo (OrthoMCL).

Espécie	MSH2		MSH6	MLH1	PMS	MutS*
<i>P. berghei</i>	>PBANKA_101710	>PBANKA_080430	>PBANKA_110510	>PBANKA_093020	>PBANKA_021040	>PBANKA_103680
<i>P. chabaudi</i>	>PCHAS_101790	>PCHAS_080460	>PCHAS_110480	>PCHAS_091410	>PCHAS_020880	>PCHAS_103760
<i>P. cynomolgi</i>	>PCYB_133110	>PCYB_011410	>PYYM_1107300	>PYYM_0931600	>PKH_021070	>PCYB_135110
<i>P. falciparum</i>	>PF3D7_1427500	>PF3D7_0706700	>PKH_102750	>PF3D7_1117800	>PVX_081620	>PF3D7_1405400
<i>P. knowlesi</i>	>PKH_132290	>PKH_010510	>PCYB_103610	>PKH_091520	>PYYM_0213300	>PKH_134150
<i>P. vivax</i>	>PVX_085160	>PVX_087875	>PF3D7_0505500	>PCYB_092390	>PF3D7_0726300	>PVX_086165
<i>P. yoelli</i>	>PYYM_1018600	>PYYM_0806900	>PVX_097835	>PVX_091525	>PCYB_022120	>PYYM_1038900
<i>A. thaliana</i>	>sp O24617 MSH2_ARATH		>sp P52701 MSH6_HUMAN	>tr Q9ZRV4 Q9ZRV4_ARATH	>tr Q941I6 Q941I6_ARATH	
<i>H. sapiens</i>	>sp P43246 MSH2_HUMAN		>tr F4JH76 F4JH76_ARATH	>sp P40692 MLH1_HUMA	>sp P54278 PMS2_HUMAN	
<i>S. cerevisiae</i>	>sp P25847 MSH2_YEAST		>sp Q03834 MSH6_YEAST	>sp P38920 MLH1_YEAST	>sp P14242 PMS1_YEAST	
<i>B. bovis</i>	>bbov XP_001610980.1					
<i>T. parva</i>	>tpar XP_766245					
<i>T. annulata</i>	>tann TA06710					
<i>E. coli</i>	MutS	>sp P23909 MUTS_ECOLI		MutL	>sp P23367 MUTL_ECOLI	

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI PRISM 7000 sequence detection System – User guide. Applied Biosystems, 2003.

Agrawal R, Tripathi R, Tekwani BL, Jain SK, Dutta GP, Shukla OP. Haem polymerase as a novel target of antimalarial action of cyproheptadine. *Biochem Pharmacol*. 2002 Nov 1;64(9):1399-406.

Alano P. *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Molecular Microbiology*. 2007 Oct;66(2):291-302.

Anderson TJ, Patel J, Ferdig MT. Gene copy number and malaria biology. *Trends Parasitol*. 2009 Jul;25(7):336-43.

Arnot DE, Ronander E, Bengtsson DC. The progression of the intra-erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum* and the role of the centriolar plaques in asynchronous mitotic division during schizogony. *Int J Parasitol*. 2011 Jan;41(1):71-80.

Ban C, Yang W. Structural basis for MutH activation in E.coli mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. *EMBO J*. 1998 Mar 2;17(5):1526-34.

Barber BE, William T, Grigg MJ, Menon J, Auburn S, Marfurt J, Anstey NM, Yeo TW. A prospective comparative study of knowlesi, falciparum, and vivax malaria in sabah, malaysia: high proportion with severe disease from *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium vivax* but no mortality with early referral and artesunate therapy. *Clin Infect Dis*. 2013 Feb;56(3):383-97.

Barnes DA, Foote SJ, Galatis D, Kemp DJ, Cowman AF. Selection for high-level chloroquine resistance results in deamplification of the *pfmdr1* gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J*. 1992 Aug;11(8):3067-75.

Bethke L, Thomas S, Walker K, Lakhia R, Rangarajan R, Wirth D. The role of DNA mismatch repair in generating genetic diversity and drug resistance in malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*. 2007 Sep;155(1):18-25.

Bohórquez EB, Juliano JJ, Kim HS, Meshnick SR. Mefloquine Exposure Induces Cell Cycle Delay and Reveals Stage-Specific Expression of the *pfmdr1* Gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Feb;57(2):833-9.

Bozdech Z, Llinás M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*. 2003 Oct;1(1):E5. Epub 2003 Aug 18.

Bray P. G., Ward S. A., O'Neill P. M. Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;295:3-38.

Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem*. 1994 Sep 1;224(2):397-405.

Burdett V, Baitinger C, Viswanathan M, Lovett ST, Modrich P. In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6765-70.

Casorelli I, Russo MT, Bignami M. Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008 May;8(4):368-80.

Castellini MA, Buguliskis JS, Casta LJ, Butz CE, Clark AB, Kunkel TA, Tarasch TF. Malaria drug resistance is associated with defective DNA mismatch repair. *Mol Biochem Parasitol*. 2011 Jun;177(2):143-7.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Simian malaria in a U.S. traveler—New York, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009, 58:229-232.

Chen Q, Wang H. Implications of imaging malaria sporozoites. *Trends in Parasitology*. 2008;24(3):106-9.

Chen S, Bigner SH, Modrich P. High rate of CAD gene amplification in human cells deficient in MLH1 or MSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13802-7.

Chopra I, O'Neill AJ, Miller K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updat*. 2003 Jun;6(3):137-45.

Constantin N, Dzantiev L, Kadyrov FA, Modrich P. Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction. *J Biol Chem*. 2005 Dec 2;280(48):39752-61.

Conway DJ, Machado RL, Singh B, Dessert P, Mikes ZS, Pova MM, Oduola AM, Roper C. Extreme geographical fixation of variation in the *Plasmodium falciparum* gamete surface protein gene Pfs48/45 compared with microsatellite loci. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 Jul;115(2):145-56.

Cooper GM, Nickerson DA, Eichler EE. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7 Suppl):S22-9.

Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(23):9109-13.

Cui L, Wang Z, Miao J, Miao M, Chandra R, Jiang H, Su XZ, Cui L. Mechanisms of *in vitro* resistance to dihydroartemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2012 Oct;86(1):111-28.

Diouf B, Cheng Q, Krynetskaia NF, Yang W, Cheok M, Pei D, Fan Y, Cheng C, Krynetskiy EY, Geng H, Chen S, Thierfelder WE, Mullighan CG, Downing JR, Hsieh P, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Somatic deletions of genes regulating MSH2

protein stability cause DNA mismatch repair deficiency and drug resistance in human leukemia cells. *Nat Med*. 2011 Sep 25;17(10):1298-303.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):455-67. Erratum in: *N Engl J Med*. 2009 Oct 22;361(17):1714.

Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the *pfm-dr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Apr 30;108(1):13-23.

Dzantiev L, Constantin N, Genschel J, Iyer RR, Burgers PM, Modrich P. A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Mol Cell*. 2004 Jul 2;15(1):31-41.

Eisenstein, M. Drug development: Holding out for reinforcements. *Nature*. 2012 April; 484, S16–S18.

Estivill X, Armengol L. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS Genet*. 2007 Oct;3(10):1787-99.

Fang WH, Modrich P. Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. *J Biol Chem*. 1993 Jun 5;268(16):11838-44.

Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci*. 2004 Mar 5;74(16):1957-72.

Foth BJ, Zhang N, Chahal BK, Sze SK, Preiser PR, Bozdech Z. Quantitative time-course profiling of parasite and host cell proteins in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Aug;10(8):M110.006411.

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res*. 2006 Aug;16(8):949-61.

Gibson SL, Narayanan L, Hegan DC, Buermeyer AB, Liskay RM, Glazer PM. Overexpression of the DNA mismatch repair factor, PMS2, confers hypermutability and DNA damage tolerance. *Cancer Lett*. 2006 Dec 8;244(2):195-202.

Ginsburg H, Ward SA, Bray PG. An integrated model of chloroquine action. *Parasitol Today*. 1999 Sep;15(9):357-60.

Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, *et al*. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(4):1266-76.

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser.. 1999 41, 95-98.

Haltiwanger BM, Matsumoto Y, Nicolas E, Dianov GL, Bohr VA, Taraschi TF. DNA base excision repair in human malaria parasites is predominantly by a long-patch pathway. Biochemistry. 2000 Feb 1;39(4):763-72.

Harfe BD, Jinks-Robertson S. DNA mismatch repair and genetic instability. Annu Rev Genet 2000;34:359–99.

Hayward R, Saliba KJ, Kirk K. *pfm*dr1 mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 2005 Feb;55(4):1285-95.

Heinberg A, Siu E, Stern C, Lawrence EA, Ferdig MT, Deitsch KW, Kirkman LA. Direct evidence for the adaptive role of copy number variation on antifolate susceptibility in *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 2013 Jan 25.

Higgins, C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature. 2007 April; 446(1): 749–757.

Ichikawa M, Nakane H, Marra G, Corti C, Jiricny J, Fitch M, Ford JM, Ikejima M, Shimada T, Yoshino M, Takeuchi S, Nakatsu Y, Tanaka K. Decreased UV sensitivity, mismatch repair activity and abnormal cell cycle checkpoints in skin cancer cell lines derived from UVB-irradiated XPA-deficient mice. Mutat Res. 2000 May 31;459(4):285-98. Jan;57(1):151-60.

Janse CJ, Haghighparast A, Sperança MA, Ramesar J, Kroeze H, del Portillo HA, Waters AP. Malaria parasites lacking *eef1a* have a normal S/M phase yet grow more slowly due to a longer G1 phase. Mol Microbiol. 2003 Dec;50(5):1539-51.

Jiricny J. Eukaryotic mismatch repair: an update. Mutat Res 1998;409(3):107–21.

Kidgell C, Volkman SK, Daily J, Borevitz JO, Plouffe D, Zhou Y, Johnson JR, Le Roch K, Sarr O, Ndir O, Mboup S, Batalov S, Wirth DF, Winzeler EA. A systematic map of genetic variation in *Plasmodium falciparum*. PLoS Pathog. 2006 Jun;2(6):e57.

Koonin, E. V. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. Annual review of genetics. 2005 Jan; 39(1): 309-38.

Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Aug;44(8):2100-8.

Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. Annu Rev Biochem 2005;74:681–710.

Lamers MH, Perrakis A, Enzlin JH, Winterwerp HH, de Wind N, Sixma TK. The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. Nature. 2000 Oct 12;407(6805):711-7.

Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, Grainger M, Moch JK, Haynes JD, De La Vega P, Holder AA, Batalov S, Carucci DJ, Winzeler EA. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*. 2003 Sep 12;301(5639):1503-8.

Llinás M, Bozdech Z, Wong ED, Adai AT, DeRisi JL. Comparative whole genome transcriptome analysis of three *Plasmodium falciparum* strains. *Nucleic Acids Res*. 2006 Feb 21;34(4):1166-73.

López-Barragán MJ, Lemieux J, Quiñones M, Williamson KC, Molina-Cruz A, Cui K, Barillas-Mury C, Zhao K, Su XZ. Directional gene expression and antisense transcripts in sexual and asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*. 2011 Nov 30;12:587.

Marti TM, Kunz C, Fleck O. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol* 2002;191(1):28–41.

McCarroll SA, Altshuler DM. Copy-number variation and association studies of human disease. *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7 Suppl):S37-42.

Mechanic LE, Frankel BA, Matson SW. Escherichia coli MutL loads DNA helicase II onto DNA. *J Biol Chem*. 2000 Dec 8;275(49):38337-46.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002;415(6872):673-9.

Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem*. 2006 Oct 13;281(41):30305-9.

Modrich P. Methyl-directed DNA mismatch correction. *J Biol Chem*. 1989 Apr 25;264(12):6597-600.

Morita R, Nakane S, Shimada A, Inoue M, Iino H, Wakamatsu T, Fukui K, Nakagawa N, Masui R, Kuramitsu S. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *J Nucleic Acids*. 2010 Oct 14;2010:179594.

MS/SVS. Situação epidemiológica da malária na Amazônia. Ministério da Saúde; 2011.

Mu J, Myers RA, Jiang H, Liu S, Ricklefs S, Waisberg M, Chotivanich K, Wilairatana P, Krudsood S, White NJ, Udomsangpetch R, Cui L, Ho M, Ou F, Li H, Song J, Li G, Wang X, Seila S, Sokunthea S, Socheat D, Sturdevant DE, Porcella SF, Fairhurst RM, Wellems TE, Awadalla P, Su XZ. *Plasmodium falciparum* genome-wide scans for positive selection, recombination hot spots and resistance to antimalarial drugs. *Nat Genet*. 2010 Mar;42(3):268-71.

Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2012 Feb 4;379(9814):413-31.

Myung K, Datta A, Chen C, Kolodner RD. SGS1, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):113-6.

Nair S, Miller B, Barends M, Jaidee A, Patel J, Mayxay M, Newton P, Nosten F, Ferdig MT, Anderson TJ. Adaptive copy number evolution in malaria parasites. *PLoS Genet.* 2008 Oct;4(10):e1000243.

Ngo T, Duraisingh M, Reed M, Hipgrave D, Biggs B, Cowman AF. Analysis of *pfcr*, *pfmdr1*, *dhfr*, and *dhps* mutations and drug sensitivities in *Plasmodium falciparum* isolates from patients in Vietnam before and after treatment with artemisinin. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Mar;68(3):350-6.

Obmolova G, Ban C, Hsieh P, Yang W. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):703-10.

Olliaro P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol Ther.* 2001 Feb;89(2):207-19.

Orjih AU. Heme polymerase activity and the stage specificity of antimalarial action of chloroquine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Jul;282(1):108-12.

Parija SC, Praharaj I. Drug resistance in malaria. *Indian J Med Microbiol.* 2011 Jul-Sep;29(3):243-8.

Pepponi R, Graziani G, Falcinelli S, Vernole P, Levati L, Lacal PM, Pagani E, Bonmassar E, Jiricny J, D'Atri S. hMSH3 overexpression and cellular response to cytotoxic anticancer agents. *Carcinogenesis.* 2001 Aug;22(8):1131-7.

Petit MA, Dimpfl J, Radman M, Echols H. Control of large chromosomal duplications in *Escherichia coli* by the mismatch repair system. *Genetics.* 1991 Oct;129(2):327-32.

Pick C, Ebersberger I, Spielmann T, Bruchhaus I, Burmester T. Phylogenomic analyses of malaria parasites and evolution of their exported proteins. *BMC Evol Biol.* 2011 Jun 15;11:167.

Pickard, A.L., Wongsrichanalai, C., Purfield, A., Kamwendo, D., Emery, K., Zalewski, C., Kawamoto, F., Miller, R.S., Meshnick, S.R. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007 Aug; 47(1): 2418–2423.

Plowe CV, Kublin JG, Doumbo OK. *P. falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations: epidemiology and role in clinical resistance to antifolates. *Drug Resist Updat.* 1998;1(6):389-96.

Preechapornkul P, Imwong M, Chotivanich K, Pongtavornpinyo W, Dondorp AM, Day NP, White NJ, Pukrittayakamee S. *Plasmodium falciparum* *pfmdr1* amplification, mefloquine resistance, and parasite fitness. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Apr;53(4):1509-15.

Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, Krishna S. Mefloquine resistance in

Plasmodium falciparum and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*. 2004 Jul 31-Aug 6;364(9432):438-47.

Rathod PK, McErlean T, Lee PC. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):9389-93.

Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):906-9.

Reilly HB, Wang H, Steuter JA, Marx AM, Ferdig MT. Quantitative dissection of clone-specific growth rates in cultured malaria parasites. *Int J Parasitol*. 2007 Dec;37(14):1599-607. Epub 2007 May 18.

Russo MT, De Luca G, Casorelli I, Degan P, Molatore S, Barone F, Mazzei F, Pannellini T, Musiani P, Bignami M. Role of MUTYH and MSH2 in the control of oxidative DNA damage, genetic instability, and tumorigenesis. *Cancer Res*. 2009 May 15;69(10):4372-9.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987 Jul;4(4):406-25.

Samowitz WS. Genetic and epigenetic changes in colon cancer. *Exp Mol Pathol*. 2008 Aug;85(1):64-7.

Sancar A, Sancar GB. DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:29-67.

Sanchez CP, Dave A, Stein WD, Lanzer M. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*. 2010 Aug 15;40(10):1109-18.

Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M. Dissecting the components of quinine accumulation in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2008 Mar;67(5):1081-93.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.

Schaaper RM. Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1993 Nov 15;268(32):23762-5.

Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:579–608.

Sidhu AB, Valderramos SG, Fidock DA. *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2005 Aug;57(4):913-26.

Sidhu, A.B., Uhlemann, A.C., Valderramos, S.G., Valderramos, J.C., Krishna, S., Fidock, D.A., 2006. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J. Infect. Dis.* 194, 528–535.

- Spampinato CP, Gomez RL, Galles C, Lario LD. From bacteria to plants: a compendium of mismatch repair assays. *Mutat Res*. 2009 Sep-Dec;682(2-3):110-28.
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*. 1993 Sep 16;365(6443):274-6. Erratum in: *Nature* 1994 Apr 7;368(6471);569.
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.
- Su X, Wellems TE. Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics*. 1996 May 1;33(3):430-44.
- Sullivan DJ. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol*. 2002 Dec 4;32(13):1645-53.
- Takamatsu S, Kato R, Kuramitsu S. Mismatch DNA recognition protein from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. *Nucleic Acids Res*. 1996 Feb 15;24(4):640-7.
- Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, Dynamics and Public Health. Importance of Malaria Parasite Resistance. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:235-54.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007 Aug;24(8):1596-9.
- Theissen G. Secret life of genes. *Nature*. 2002 Feb 14;415(6873):741.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.
- Trotta RF, Brown ML, Terrell JC, Geyer JA. Defective DNA repair as a potential mechanism for the rapid development of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry*. 2004 May 4;43(17):4885-91.
- Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A, Kafatos FC. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2006;16(4):384-91.
- Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC. Realtime, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cellular microbiology*. 2004;6(7):671-85.
- Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, *et al*. Malaria and the Red Cell. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:35-57.
- White NJ. Malaria. In: Cook GC, Zumla AI, editors. *Manson's Tropical Diseases*. 22nd ed. Netherlands: Elsevier; 2009. p. 1201-300.

Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, Bogenschutz MP, Shankar AH, Wirth DF. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1989 Jun 9;244(4909):1184-6.

Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK, Wirth DF. Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol*. 1993

World Health Organization World Malaria Report. 2011. (ed. Who Press, W. H. O.), Geneva.

World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 2nd edition. 2010. (ed. Who Press, W. H. O.), Geneva.

Yamagata A, Kakuta Y, Masui R, Fukuyama K. The crystal structure of exonuclease RecJ bound to Mn²⁺ ion suggests how its characteristic motifs are involved in exonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 30;99(9):5908-12.

Yamagata A, Masui R, Kakuta Y, Kuramitsu S, Fukuyama K. Overexpression, purification and characterization of RecJ protein from *Thermus thermophilus* HB8 and its core domain. *Nucleic Acids Res*. 2001 Nov 15;29(22):4617-24.