ROGÉRIO LAURIA DA SILVA

**Dimorfismo alélico na proteína de
superfície MSP-6 de merozoítos de
*Plasmodium falciparum***

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas.**

**São Paulo
2008**

ROGÉRIO LAURIA DA SILVA

**Dimorfismo alélico na proteína de
superfície MSP-6 de merozoítos de
*Plasmodium falciparum***

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas.**

Área de Concentração: Parasitologia

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano
Ferreira**

**São Paulo
2008**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Silva, Rogério Lauria da.

Dimorfismo alélico na proteína de superfície MSP-6 de merozoítos de *Plasmodium falciparum* / Rogério Lauria da Silva. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Marcelo Urbano Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Epidemiologia molecular da malária.

Versão do título para o inglês: Allelic dimorphism in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-6 (MSP-6).

Descritores: 1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. Proteínas da membrana 4. Dimorfismo alélico 5. MSP-6 I. Ferreira, Marcelo Urbano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB114/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rogério Lauria da Silva.

Título da Dissertação: Dimorfismo alélico na proteína de superfície MSP-6 de merozoítos de *Plasmodium falciparum*.

Orientador(a): Marcelo Urbano Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Alberto Lauria da Silva e Maria Edina da Rocha, por estarem sempre presentes, mesmo à distância, e por terem sempre me apoiado quando tomei as decisões mais difíceis.

Ao meu irmão Reinaldo, meu mais antigo amigo.

Ao meu irmão Renan, inspiração constante para que eu tente sempre ser alguém melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Marcelo Urbano Ferreira, por ter me aceitado como aluno de mestrado, por ter me apresentado a coisas tão novas e distintas, e pelas constantes demonstrações de conhecimento que o tornam um exemplo a ser seguido. Muito obrigado.

Aos meus amigos de laboratório:

Mari (Mariana Tenedini), minha querida aluna de Iniciação Científica, por ter ficado ao meu lado esse tempo todo, sem nunca desistir. Muito obrigado por sua amizade, paciência e companhia.

Zeze (Maria José Menezes), fonte inesgotável de sabedoria (sei que ela vai achar isso irônico, mas não é). Teoricamente a técnica do laboratório, na prática minha grande amiga, incentivadora e conselheira.

Pam (Pâmela Orjuela), nossa flor da Colômbia, por sua amizade, seu bom humor e seu sorriso, sempre presentes, seja pipetando um sequenciamento, seja sob ataque dos borrachudos.

Simonete (Simone Ladeia), Princesa do Jaú, cujo sorriso afasta tudo de ruim, de mau-humor a mau-olhado. Saudosos tempos em que eu ia te dar boa noite no laboratório e você pulava de susto.

Scott W. Roy, por todas as conversas filosóficas sobre a vida e dimorfismo alélico, por todas as perguntas e e-mails respondidos, pelas noites na Casa do Norte, pela cafeteira, pelo violão e pela amizade.

Tatiana Havryliuk, pela alegria e energia incomparáveis, inimitáveis e inesgotáveis.

Mônica da Silva Nunes, por fazer minha “entrevista” de admissão no laboratório, e ser minha primeira colega de trabalho.

Natal, caboclo acreano, pelas dicas dadas nos momentos críticos.

... e Kézia Scopel, por muitas coisas, mas principalmente por ter tentado.

Aos meus companheiros de lar:

Cristiane Gonçalves (Cris) e Alan Rosendo (Normal), irmãos que a vida me deu.

Clodoaldo Teixeira (Bode), pela paciência e amizade inabaláveis, e pela presença constante nos momentos mais críticos da minha vida.

Mauricio Esteves, Carol Sanchez, Bruno Canettieri, Luciana Sanchez, Álvaro, Aninha (a tartaruga), Henrique (Peba), Christopher Pereira e Cláudia Nóbrega, pelas cervejas, almoços, risadas, amizade, passeios de bicicleta, companhia, enfim, por terem tornado tão agradável, para um jovem interiorano recém-chegado, a vida na cidade grande.

Aos meus amigos da faculdade:

Mauro e Zé, por todas as viagens, especialmente pra Pedra, especialmente “aquela”...

Alex Hubble, por jamais ter desistido de me chamar pra bandejar.

Bininha, Marília, Liló, Carol do Zé, Lelê, Japonês, Carol do Japonês, Joana (a essas duas últimas, obrigado por EmbrioMol), Vitão, Ninja, Renato Recoder, Thiago Rasta, Solange, e todos os que acidentalmente não estejam nessa lista, por todos os bons (e maus) momentos vividos durante a graduação.

Aos meus companheiros de laboratório durante minha Iniciação Científica: Cleber, Foca (Arthur Neri), Kátia Yuahasi, Kátia Neves, Henrique, Janaína, Karla, Rodrigo Resende, Paromita Majunder e, especial e carinhosamente, Henning Ulrich, meu primeiro orientador.

À Professora Terezinha Schumaker e seus alunos (Guilherme, Flávia, Eliana, Elinor, Gazeta, Gustavo, Thaís e Antônio), pelo agradável convívio ao longo desses dois anos.

Ao Professor Gerhard Wunderlich e seus alunos por toda a ajuda gentilmente cedida em vários momentos.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia: Márcio Yamamoto, José Mário, Valnice Peres, Manoel Peres e Wolfgang Fischer, por todo o auxílio prestado em vários momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento concedido ao longo desse projeto.

***“Toda a sua vida estudara o universo,
mas passara-lhe despercebida a sua
mensagem mais clara: para pequenas
criaturas como nós, a imensidão só é
suportável através do amor”.***

Carl Sagan

RESUMO

Silva RL. Dimorfismo alélico na proteína de superfície MSP-6 de merozoítos de *Plasmodium falciparum* [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O desenvolvimento de uma vacina contra a malária causada por *P. falciparum* é prejudicado pelo extenso polimorfismo apresentado pelos antígenos desse parasito. O dimorfismo alélico é um tipo particular de polimorfismo no qual os todos os alelos observados de um gene se encontram claramente divididos em duas famílias. A proteína dimórfica MSP-6 se associa à proteína MSP-1 (também dimórfica) na superfície do merozoíto, participando da formação de um complexo que, acredita-se, esteja envolvido no processo de invasão de hemácias. Genes de *msh-6* de 21 isolados obtidos de pacientes do Brasil, mais 2 isolados da Tanzânia, África, foram seqüenciados para estudo da diversidade nucleotídica e distribuição geográfica dos alelos. As duas famílias alélicas possuem distribuição global. Não foi verificada associação entre o dimorfismo de MSP-1 e MSP-6 na montagem do complexo proteico. O gene ortólogo de *msh-6* em *P. reichenowi*, grupo irmão de *P. falciparum*, foi seqüenciado para estudos evolutivos. Os alelos dimórficos de MSP-6 aparentam ter surgido de uma população ancestral polimórfica, tendo sido mantidos no presente por seleção balanceada. O alto grau de conservação encontrado dentro de cada família alélica torna MSP-6 um potencial alvo de uma vacina contra a malária.

Palavras-chave: Malária; *Plasmodium falciparum*; Proteína de superfície do merozoíto-6 (MSP-6); Dimorfismo alélico.

ABSTRACT

Silva RL. Allelic dimorphism in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-6 (MSP-6) [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

The development of a vaccine against malaria caused by *Plasmodium falciparum* has been hampered by the high level of antigen polymorphism exhibited by this parasite. Allelic dimorphism is a pattern in which every observed allele of a gene is clearly grouped into one of two families. The dimorphic protein MSP-6 forms a complex with MSP-1 (also dimorphic) on merozoite surface, and this complex is believed to be involved in erythrocyte invasion. The *msh-6* genes were sequenced in isolates obtained from 21 patients from Brazil, plus 2 isolates from Tanzania, Africa, to study nucleotide diversity and geographic distribution of alleles. Both families are globally distributed. Moreover, no association was observed between the MSP-1 and MSP-6 allelic types. Orthologous gene of *msh-6* in *P. reichenowi*, chimpanzee parasite and sister group of *P. falciparum*, was sequenced for evolutionary studies. Dimorphic alleles of MSP-6 seem to have originated from an ancestral polymorphic population and are maintained by balancing selection. The high degree of conservation observed within each allelic family makes MSP-6 an promising target for vaccine development.

Key words: Malaria; *Plasmodium falciparum*; Merozoite surface protein-6 (MSP-6); Allelic dimorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões do globo endêmicas para <i>Plasmodium falciparum</i>	22
Figura 2. Áreas de risco de malária no território brasileiro.....	23
Figura 3. Evolução dos casos de malária causada por <i>P. falciparum</i> na Amazônia Legal.....	24
Figura 4. Representação esquemática das fases sangüíneas do ciclo de <i>P. falciparum</i>	25
Figura 5. Representação esquemática do principal complexo protéico presente na superfície de merozoítos de <i>P. falciparum</i>	29
Figura 6. Genealogia de alelos de acordo com os modelos de evolução neutra, seleção balanceada e dimorfismo alélico.....	30
Figura 7. Representação esquemática de genes de proteínas de superfície de <i>P. falciparum</i> para os quais é sugerida a ocorrência de dimorfismo alélico..	32
Figura 8. Região de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados para amplificação das duas formas alélicas de <i>msp-6</i>	39
Figura 9. Visualização dos produtos da amplificação de <i>msp-6</i> por PCR.....	44
Figura 10. Diversidade nucleotídica entre seqüências de <i>msp-6</i>	49
Figura 11. Alinhamento entre as seqüências de <i>msp-6</i> dos isolados K1, 3D7 e Dd2.....	50
Figura 12. Genealogia das amostras de <i>msp-6</i>	51

Figura 13. Amplificação do gene ortólogo de <i>m</i> sp-6 em <i>P. reichenowi</i>	54
Figura 14. Alinhamento da região dimórfica de <i>m</i> sp-6 tipo K1 e 3D7 de <i>P. falciparum</i> e do gene ortólogo de <i>P. reichenowi</i>	55
Figura 15. Uma hipótese para a história da região dimórfica de <i>m</i> sp-6 de <i>P. falciparum</i>	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Local e data de coleta dos isolados de <i>Plasmodium falciparum</i>	36
Quadro 2. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de <i>nested</i> PCR, PCR e sequenciamento do gene <i>msh-6</i> de <i>P. falciparum</i> e do gene ortólogo em <i>P. reichenowi</i>	39
Quadro 3. Outras seqüências de <i>msh-6</i> utilizadas para cálculo de diversidade nucleotídica e associação entre alelos.....	40
Quadro 4. Identificação dos tipos alélicos de <i>msh-6</i> e da região composta pelos blocos 6-16 de <i>msh-1</i> de <i>P. falciparum</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos tipos alélicos presentes nas amostras colhidas em estados da Amazônia Legal.....	43
Tabela 2. Distribuição das amostras estudadas conforme o tipo alélico de <i>msh-1</i> e <i>msh-6</i>	46
Tabela 3. Diversidade nucleotídica intra e entre famílias alélicas de <i>msh-6</i>	48
Tabela 4. Valores de substituições sinônimas por sítio sinônimo (dS) e substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimo (dN) para os alelos de <i>msh-6</i>	53
Tabela 5. Número médio de substituições por sítio na comparação entre seqüências de <i>msh-6</i> de <i>P. reichenowi</i> e dos alelos de <i>P. falciparum</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRA	- <i>acidic basic repeat antigen</i>
CDC	- <i>Center for Disease Control</i>
CSP	- proteína circunsporozoíto
C-terminal	- região carboxila terminal
dN	- número médio de substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimo
DNA	- ácido dextrirribonucléico
dS	- número médio de substituições sinônimas por sítio sinônimo
EBA	- <i>erythrocyte binding antigen</i>
EDTA	- ácido etileno diamino tetracético
EGF	- fator de crescimento epidérmico
GPI	- glicosil-fosfatidil inositol
H ₀	- hipótese nula
HCl	- ácido clorídrico
Indel	- inserção-deleção
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
MSA	- antígeno de superfície do merozoíto
MSP	- proteína de superfície do merozoíto
N-terminal	- região amino terminal
NaCl	- cloreto de sódio
PBS	- phosphate buffered saline
PCR	- reação em cadeia da polimerase
RNA	- ácido ribonucléico
SDS	- sódio duodecil sulfato
SSU rRNA	- subunidade pequena do RNA ribossomal
TEN	- tampão Tris-EDTA-NaCl
T _{LCA}	- tempo até o último ancestral comum

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 O agente causador da malária.....	19
1.2 Origem de <i>Plasmodium falciparum</i> como parasito de humanos.....	20
1.3 Situação atual da malária, no mundo e no Brasil.....	21
1.4 Ciclo de vida dos plasmódios no homem e sintomas clínicos da doença	24
1.5 Imunidade adquirida no hospedeiro humano e mecanismos de evasão do parasito.....	26
1.6 O complexo de proteínas de superfície do merozoito.....	27
1.7 O dimorfismo alélico em proteínas de superfície de membrana do merozoíto	29
1.8 Tempos de divergência entre alelos de genes dimórficos.....	32
1.9 Importância do dimorfismo alélico para estratégias de imunização.....	33
2 OBJETIVOS.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Amostras de DNA de <i>P. falciparum</i> e <i>P. reichenowi</i>.....	36
3.1.1 Amostras de DNA de <i>P. falciparum</i>.....	36
3.1.2 Amostras de DNA de <i>P. reichenowi</i>.....	37
3.2 Extração de DNA a partir de amostras de sangue.....	37
3.3 Reação de PCR para amplificação do gene <i>msp-6</i>.....	37
3.4 Sequenciamento do gene de <i>msp-6</i>.....	38
3.5 Montagem das seqüências de <i>msp-6</i> de <i>P. falciparum</i> e <i>P. reichenowi</i>..	39
3.6 Outras seqüências de <i>msp-6</i>.....	40

3.7 Teste de Fisher para verificar a associação entre alelos de <i>msh-1</i> e <i>msh-6</i>	40
3.8 Análise da diversidade entre as seqüências.....	41
3.9 Cálculo de mutações sinônimas e não-sinônimas e identificação de regiões selecionadas positivamente.....	41
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Amplificação e sequenciamento do gene de <i>msh-6</i> em amostras de sangue de pacientes de malária em estados da Amazônia Legal.....	43
4.2 Ausência de associação entre as formas alélicas de <i>msh-1</i> e <i>msh-6</i>	44
4.3 Diversidade intra- e entre-famílias alélicas de <i>msh-6</i> em amostras do Brasil.....	46
4.4 Diversidade intra- e entre-famílias alélicas de <i>msh-6</i> utilizando o conjunto ampliado de seqüências.....	47
4.4.1 Diversidade nas regiões N- e C-terminal.....	47
4.4.2 Diversidade na região dimórfica.....	48
4.4.3 Deleção secundária na amostra Dd2.....	50
4.4.4 Regra do um quarto aplicada aos alelos de <i>msh-6</i>	50
4.5 Seleção positiva em <i>msh-6</i>	52
4.6 Amplificação e sequenciamento do gene ortólogo de <i>msh-6</i> em <i>P. reichenowi</i>	53
5 DISCUSSÃO.....	57
5.1 Antígenos de superfície como alvos para uma vacina contra malária.....	57
5.2 Distribuição dos alelos de <i>msh-6</i>	57
5.3 Diversidade nucleotídica em <i>msh-6</i>	58
5.4 Ausência de associação entre alelos de <i>msh-1</i> e <i>msh-6</i>	59

5.5 Seleção positiva em <i>msh-6</i>.....	59
5.6 MSP-6 como possível alvo de uma vacina contra malária.....	60
5.7 Evolução do dimorfismo alélico em MSP-6.....	61
6 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO A – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE <i>msh-6</i>.....	73
ANEXO B – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS REPRESENTATIVAS DOS ALELOS DE <i>msh-6</i> DE <i>P. falciparum</i> COM O GENE ORTÓLOGO EM <i>P.</i> <i>reichenowi</i>	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 O agente causador da malária

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, pertencentes ao Filo Apicomplexa (caracterizado pela presença, em seus integrantes, de uma estrutura na região anterior, o complexo apical, relacionado com a invasão das células do hospedeiro), Classe Aconoidasida, Ordem Haemosporida, Família Plasmodidae.

O Filo Apicomplexa Levine, 1970, possui cerca de 5000 espécies conhecidas, todas parasitas. A origem desse filo é objeto de discussão e especulação. Acredita-se que tenham surgido como parasitos de ostras ou poliquetas, tendo depois passado a parasitar outros invertebrados marinhos, até atingirem finalmente os artrópodes e, através destes, os vertebrados (Levine, 1988).

A ordem Haemosporida Danilewsky, 1885, é composta por parasitos sanguíneos, e abrange dez gêneros que contêm cerca de 450 espécies. Alguns de seus caracteres diagnósticos são familiares para quem conhece o ciclo de vida de *Plasmodium*: heteroxenia, com merogonia no hospedeiro vertebrado e esporogonia no hospedeiro invertebrado; presença de pigmento (hemozoína) nas células infectadas; desenvolvimento independente de macro e microgametócitos; zigoto móvel (oocineto); transmissão por insetos sugadores. Outras características não tão evidentes são a ausência de conóide (estrutura presente nos anéis polares do complexo apical de outras classes de apicomplexos), esporozoítos com parede formada por três membranas; microgamontes produzindo cerca de oito microgametas flagelados, e ausência de sigízia (fusão permanente das membranas do micro e macrogametócito) (Levine, 1988). Os principais gêneros dentro de Haemosporida são *Plasmodium*, *Hepatocystis* e *Leucocytozoon*. Espécies pertencentes a esses dois últimos gêneros antigamente eram usadas como grupo externo para estudos filogenéticos do gênero *Plasmodium*.

Há cerca de 200 espécies de plasmódios conhecidas, que parasitam répteis, aves e mamíferos (Garnham, 1966). Dentre essas, quatro infectam humanos: *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*. Esta última é responsável pela maioria

absoluta da mortalidade causada pela doença. A transmissão da malária se dá através de picadas de mosquito do gênero *Anopheles* spp.

1.2 Origem de *Plasmodium falciparum* como parasito de humanos

Estudos clássicos que visavam elucidar as relações filogenéticas dentro do gênero *Plasmodium*, e desse gênero com outros integrantes da Ordem Haemosporida, baseavam-se em caracteres morfológicos e características do ciclo de vida dos parasitos, incluindo a espécie de hospedeiro, vertebrado e invertebrado, e a periodicidade dos paroxismos (febre em intervalos regulares) (Garnham, 1966). Caracteres presentes nos microgametócitos (número formado durante o ciclo sanguíneo, quantidade de flagelos, tamanho), oocistos (tamanho, ocorrência de esporocisto, número de esporozoítos formados) e durante a esquizogonia (número de merozoítos formados) formavam a base de dados disponível para se classificar as diferentes espécies de plasmódios. A partir desses critérios, os plasmódios parasitos de mamíferos foram divididos em três sub-gêneros: *P. (Vinckeia)*, contendo os parasitos de mamíferos não-símios; *P. (Plasmodium)*, parasitos de macacos, e que contém 3 espécies infectantes de *Homo sapiens*, nominalmente *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*; e *P. (Laverania)*, que contém 2 espécies, *P. falciparum* e *P. reichenowi*, parasito de *Pan troglodites* (chimpanzés) (Garnham, 1966).

O advento das técnicas moleculares forneceu ferramentas para que sistematistas de Apicomplexa compensassem a ausência de fósseis desse grupo para estudo (Rich e Ayala, 2003). Em especial, a questão sobre como se deu a evolução de parasitos de humanos (por co-especiação com hospedeiros ou por transferência lateral) pôde ser melhor examinada.

O primeiro estudo molecular visando elucidar as relações filogenéticas dentro do gênero *Plasmodium* se baseou em seqüências da subunidade pequena de RNA ribossomal (SSU rRNA) de seis espécies, incluindo *P. falciparum*, expressas durante o estágio assexual do parasito (Waters et al., 1991). A partir da análise filogenética desse conjunto de dados foi concluído que *P. falciparum* formaria um grupo monofilético com *P. gallinaceum* e *P. lophurae*, parasitos de aves, reforçando a hipótese de que *P. falciparum* teria se tornado um parasito de humanos a partir de uma troca horizontal de hospedeiro.

Um estudo posterior, que utilizou também seqüências de SSU rRNA de um número maior de espécies (11) estabeleceu *P. reichenowi* como grupo irmão de *P. falciparum*, formando um grupo monofilético (Escalante e Ayala, 1994). No entanto, a relação desse grupo com os demais variava conforme o grupo externo selecionado. A hipótese de surgimento de *P. falciparum* como parasito de humanos através de co-evolução a partir do ancestral comum de homens e chimpanzés foi reforçada a partir desse estudo. Ficou também reforçada a idéia de que as demais espécies de *Plasmodium* que parasitam o homem pertencem a um grupo claramente distinto do formado por *P. falciparum* - *P.reichenowi*.

A obtenção de filogenias do gênero *Plasmodium* a partir do gene de SSU rRNA foi questionada devido à ocorrência de cópias distintas e não agrupadas desse gene, cópias essas cuja regulação da expressão ocorre de forma diferenciada, conforme o momento do ciclo de vida no qual o parasito se encontra (McCutcham et al., 1995). Da mesma forma, um estudo posterior que usou seqüências da proteína circunsporozoito (*circunsporozoite protein* – *csp*) (Escalante et al., 1995) para obtenção de filogenias foi questionado, visto que essa proteína de membrana está sob forte pressão evolutiva exercida pelo sistema imune do hospedeiro.

Um estudo abrangente feito por Perkins e Schall (2002), utilizando seqüências de citocromo b de 37 espécies de plasmódios infectantes de diversos grupos, e 16 espécies de outros parasitos apicomplexos, estabeleceu que todas as espécies estudadas de *Plasmodium* infectantes de mamíferos se agrupavam em um único clado, que no entanto é parafilético devido à presença de espécies de *Hepatocystis*, fato que já havia sido notado por Escalante et al. (1998). O grupo formado por *P. falciparum* - *P. reichenowi* continuou claramente separado dos demais grupos de parasitos de mamíferos, confirmando que *P. falciparum* tem uma origem distinta da de outras espécies de plasmódios como parasitos de humanos.

1.3 Situação atual da malária, no mundo e no Brasil

Estimativas indicam que em 2007 cerca de 2 bilhões de pessoas estiveram expostas ao risco de infecção por malária, com a ocorrência de 300-600 milhões de casos clínicos resultando em 1-3 milhões de mortes (Snow et al., 2005; Guerra et al., 2008 – Figura 1). A maior parte das mortes ocorre na África sub-saariana, em

crianças com até 5 anos de idade. A doença é endêmica em boa parte dos países da África, Ásia e das Américas Central e do Sul (Organização Mundial de Saúde, 2005).

Figura 1. Regiões do globo endêmicas para *Plasmodium falciparum*. As áreas do globo foram classificadas como de transmissão estável (vermelho), instável (rosa) e sem risco de transmissão (cinza) (Guerra et al., 2008).

No Brasil, ampla maioria dos casos da doença (99,5%) ocorre nos Estados da Amazônia Legal (Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) (Figura 2). Nessa região, foram notificados 466.199 casos em 2007, com maior número nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia (mais de 100.000 casos em cada estado; Ministério da Saúde, 2008). O principal vetor da doença no Brasil é *A. darlingi*, que possui vasta distribuição no território nacional, é altamente antropofílico sendo capaz de transmitir as três espécies de plasmódios humanos que ocorrem no país: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (Ministério da Saúde, 2005).

Historicamente, a malária sempre foi um grave problema de saúde pública no Brasil, estando presente em praticamente todo o território brasileiro até fins do século XIX (Camargo, 2003). Na primeira metade do século XX, grandes surtos da doença assolaram as regiões Norte e Nordeste do país. A partir da década de 1940, a estratégia mundial de combate à doença, focado principalmente no controle dos vetores, foi iniciada no Brasil. Associado a outras medidas essa estratégia possibilitou a redução do número de casos, os quais permaneceram estáveis até meados da década de 70, quando teve início a ocupação desordenada da região amazônica (Ministério da Saúde, 2005). A partir de então, foram notados aumentos sucessivos no número de casos da doença: em 1983, foram registrados 300.000

casos; entre 1984 e 1986, a média anual foi de cerca de 400.000 casos; entre 1987 e 1995, foram registrados cerca de 500.000 casos de malária anualmente. Após uma redução significativa nos anos de 1996 e 1997, ocorreu um aumento preocupante no número de casos, que chegou ao seu ápice no ano de 1999, com 637.472 casos registrados.

Figura 2. Áreas de risco de malária no território brasileiro (Ministério da Saúde, 2006).

A implementação, a partir de 2000, de uma série de medidas para reduzir a incidência de malária – tais como a redução no tempo de diagnóstico e tratamento da doença, o monitoramento da resistência do parasito às drogas e do vetor aos inseticidas, e a capacitação dos profissionais de saúde – resultou numa diminuição no número de casos no período de 2000 até 2002. Contudo, a partir de 2003 um aumento significativo no número de casos voltou a ser observado especialmente nos estados de Rondônia e do Acre. Dentre as causas possíveis para esse fato, citam-se a disseminação de parasitos resistentes às drogas antimaláricas, fragilidade das campanhas de combate ao vetor e, supostamente, a ocorrência de pacientes assintomáticos, que podem servir como reservatórios da doença (Coura et al., 2006). Até a década de 1980, havia equivalência entre os casos de malária causados por *P. falciparum* e *P. vivax*. A partir de então, houve aumento progressivo na proporção de

casos devidos a infecções por *P. vivax*, que causa uma forma mais branda da doença, embora tenha sido notado um aumento preocupante na proporção de casos de *P. falciparum* entre 1999 a 2005, de 18,6% para quase 26% do total (Figura 3). Em 2007, essa proporção se reduziu para cerca de 20% do total de casos registrados.

Figura 3. Evolução dos casos de malária causada por *P. falciparum* na Amazônia Legal (Ministério da Saúde, 2006).

1.4 Ciclo de vida dos plasmódios no homem e sintomas clínicos da doença

A forma infectante do parasito para os hospedeiros vertebrados são os esporozoítos, que se alojam nas glândulas salivares de anofelinos, e são depositados na pele, quando estes realizam repasto sanguíneo (Figura 4). Os parasitos atingem a corrente sangüínea em alguns minutos, e rapidamente são transportados para o fígado (Frevert, 2004). No hepatócito ocorre a primeira fase de reprodução assexuada (esquizogonia). Ao final de cinco a sete dias, os merozoítos formados (entre 30.000 e 50.000) são liberados na corrente sanguínea, possivelmente após o rompimento do hepatócito infectado (Sinden e Gilles, 2002), embora em *P. berghei* (parasito de roedores) tenha sido descrito um processo no qual os merozoitos são liberados envolvidos em uma estrutura chamada merossomo (Sturm et al., 2006). Esta fase da infecção é assintomática. Uma vez liberados no sangue, os merozoítos invadem eritrócitos. Esse processo ocorre através dos seguintes passos: (a) ligação do merozoíto ao eritrócito, (b) reorientação apical (que coloca as organelas secretoras do merozoíto, as roptrias e os micronemas, em

contato com a membrana plasmática do eritrócito), (c) formação de um vacúolo parasitóforo, e (d) entrada do parasito no vacúolo (Gaur et al., 2004). No interior dos eritrócitos, o parasito se diferencia na forma intra-eritrocitária conhecida como trofozoíto, que se alimenta das substâncias contidas no citoplasma, principalmente de hemoglobina. Segue-se uma nova esquizogonia, denominada eritrocitária. Ao final deste processo o eritrócito rompe-se, liberando 8-32 novos merozoítos na corrente sangüínea, que invadem novas hemácias (Sinden e Gilles, 2002). Ao final de alguns ciclos sangüíneos, formam-se gametócitos masculinos e femininos que, ao serem ingeridos por mosquitos, dão início ao ciclo sexuado que ocorre no vetor (Barillas-Mury e Kumar, 2005).

Figura 4. Representação esquemática das fases sangüíneas do ciclo de *P. falciparum* (adaptado de Ferreira et al., 2004).

A gravidade da malária está associada à espécie de plasmódio infectante, ao estado geral de saúde da pessoa infectada e à ocorrência ou não de contato anterior com a doença. Em casos de infecção por *P. falciparum*, após o período assintomático de invasão do fígado, uma série de sintomas clínicos gerais se manifestam, dentre os quais se podem citar: dores de cabeça (às vezes intensa),

anorexia e náusea, entre outros (Warrel, 2002). Em caso de não tratamento, surgem os paroxismos, ou febres regulares, que valeram à doença o nome popular de febre terçã, ou sub-terçã, maligna.

Além da anemia severa causada pela destruição dos eritrócitos, outras complicações da malária causada por *P. falciparum* advém da propriedade que as hemácias infectadas têm de aderirem às paredes de pequenos vasos sanguíneos (seqüestro), e também de formarem rosetas (estruturas que surgem quando um eritrócito infectado se liga a dois ou mais eritrócitos não infectados) (Wahlgreen et al., 1998). A obstrução de pequenos vasos devido ao acúmulo de eritrócitos no cérebro pode levar ao quadro conhecido como malária cerebral, cuja evolução acaba resultando em coma e morte (Mackintosh et al., 2004). Outras complicações possíveis são a ocorrência de malária placentária, comum em mulheres primigrávidas de regiões endêmicas, e o comprometimento de órgãos diversos (Warrel, 2002).

1.5 Imunidade adquirida no hospedeiro humano e mecanismos de evasão do parasito

Crianças recém-nascidas, provenientes de áreas endêmicas para malária, possuem uma imunidade passiva contra a doença, adquirida pela transferência de anticorpos maternos. Após cerca de seis meses, essa imunidade cessa, e a criança entra na fase em que está mais susceptível à doença. A maior taxa de mortalidade causada por malária se concentra em crianças com até cinco anos de idade, decorrente dos efeitos da anemia grave, malária cerebral ou acidose metabólica (Schofield e Grau, 2005). Após essa fase, a imunidade à malária se desenvolve em 3 fases seqüenciais: imunidade ao desenvolvimento letal da doença, à infecção sintomática e, finalmente, imunização parcial à parasitose (capacidade de manter um baixo nível de parasitemia no sangue, sem desenvolver os sintomas clínicos da doença) (Troye-Blomberg et al., 1999; Schofield e Grau, 2005). O mecanismo pelo qual residentes de regiões endêmicas adquirem imunidade à malária não está esclarecido. No entanto, sabe-se que essa imunidade não é estável, estando vinculada à continuidade do indivíduo na região. Após um período ausente, uma pessoa anteriormente imune se torna novamente susceptível à malária (Marsh, 2002).

Diversas características da biologia de *Plasmodium falciparum* tornam difícil tanto seu reconhecimento por células do sistema imune quanto o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o parasito. Dentre essas características, podemos citar: o seu complexo ciclo de vida, com expressão estágio-específica de antígenos (Figura 4); as diferentes respostas imunológicas desenvolvidas pelo hospedeiro; a variação temporal na expressão de antígenos (variação clonal), e o polimorfismo antigênico que ocorre nas proteínas de membrana dos plasmódios (Tsuji et al., 2001; Sinden e Gilles, 2002; Dzikowski et al., 2006). Essa última característica faz com que o parasito não seja reconhecido pelas células de memória geradas por uma exposição anterior ao mesmo patógeno.

O polimorfismo é gerado tanto por substituições em um único nucleotídeo (evento raro, porém constante, que ocorre ao longo de todo o genoma), quanto por eventos de recombinação gênica. Alguns genes de proteínas de membrana (por exemplo, *csp*, *msh-1* e *msh-2*) possuem regiões com motivos repetidos, onde a ocorrência de inserções e deleções (*indels*) é mais acentuada (Ferreira et al., 2004). Essas regiões constituem importantes mecanismos de evasão imune, pois tanto geram novas conformações estruturais nos antígenos expostos na superfície do parasito, como também estimulam uma resposta de células B não mediada por células T, não gerando, portanto, células de memória.

1.6 O complexo de proteínas de superfície do merozoíto

A busca de antígenos que fossem potenciais candidatos para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária levou à descoberta da proteína mais abundante na superfície do merozoíto, MSP-1 (*Merozoite Surface Protein-1*). Essa proteína é sintetizada nos estágios finais do desenvolvimento intracelular do parasito como uma molécula precursora de alto peso molecular (180-225 kDa), que sofre uma posterior clivagem proteolítica, resultando em um fragmentos de 83 kDa (p43 ou MSP-1₄₃), 28-30 kDa (p30 ou MSP-1₃₀), 38 kDa (p38 ou MSP-1₃₈) e 42 kDa (p42 ou MSP-1₄₂)(Holder et al., 1992). Esse fragmento de 42 kDa também será clivado, resultando em fragmentos com os tamanhos de 33 kDa (p33) e 19 kDa (p19 ou MSP-1₁₉); somente este último (MSP-1₁₉) mantém-se ancorado à membrana do parasito, por meio de uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Gaur et al., 2004). A presença, em MSP-1₁₉, de dois domínios semelhantes ao fator de

crescimento epidérmico (*epidermal growth factor* - EGF), que em outras moléculas exerce funções de adesão (O'Donnell et al., 2000), aliada à redução no número de eritrócitos infectados em ensaios com anticorpos que afetam a clivagem de MSP-1₄₂ (Blackman et al., 1994), são indicadores da importância de MSP-1 no processo de invasão das hemácias.

Devido à sua abundância na superfície do merozoíto e capacidade de causar uma forte resposta imune, a proteína MSP-1 logo se tornou alvo de vários estudos, sendo até o momento a proteína de superfície de merozoitos melhor caracterizada. Esses estudos demonstraram a presença de duas outras proteínas associadas com os fragmentos processados de MSP-1 na superfície do merozoíto (McBride e Heidrich, 1987), que foram posteriormente identificadas como MSP-6 e MSP-7.

MSP-6 é uma proteína codificada por um gene de um único éxon (Trucco et al., 2001). O polipeptídeo correspondente tem 371 aminoácidos, com peso molecular de 42 kDa, no clone 3D7 de *P. falciparum*. Essa molécula é posteriormente clivada, e o produto resultante, com 211 aminoácidos e peso molecular de 36 kDa (denominada MSP-6₃₆), é uma proteína encontrada na membrana de merozoítos, na forma de um tetrâmero, que se associa não-covalentemente com MSP-1₃₈ através de sua região C-terminal conservada (Figura 5) (Kauth et al., 2006). Já MSP-7 é sintetizada como um precursor de 48kDa, que sofre uma série de clivagens proteolíticas até ser exposto na membrana como um fragmento de 22kDa (MSP-7₂₂) (Pachebat et al., 2007), associado com os fragmentos MSP-1₃₈, MSP-1₃₀ e MSP-1₈₃ (Kauth et al., 2006).

MSP-9, antigamente denominada p101 ou ABRA (*acidic basic repeat antigen*), é outra proteína que se associa com esse complexo, através do fragmento MSP-1₄₂ ou MSP-1₁₉ (Kariuki et al., 2005). A região de interação entre essas duas proteínas seria responsável pelo reconhecimento de um ligante (Banda 3, uma proteína trocadora de íons) presente na membrana de eritrócitos (Goel et al., 2003) (Figura 5).

Acredita-se que o complexo constituído pelos fragmentos processados das proteínas MSP-1, MSP-6, MSP-7 e MSP-9 esteja envolvido em uma via alternativa de invasão de eritrócitos, independente da via do ácido siálico, que ocorre por meio dos antígenos ligantes do eritrócito (*erythrocyte binding antigen* – EBA) EBA-175 e parálogos (Gaur et al., 2004). Embora seja reconhecida a importância de MSP-1 e MSP-9 nesse processo, o papel das proteínas MSP-6 e MSP-7 ainda não está esclarecido.

Figura 5. Representação esquemática do principal complexo proteico presente na superfície de merozoítos de *P. falciparum*. Os fragmentos resultantes do processamento proteolítico da proteína MSP-1 permanecem não-covalentemente ligados entre si, e se associam com os fragmentos de MSP-6, MSP-7 e MSP-9. Durante o momento da invasão, esse complexo é clivado, e somente MSP-1₁₉ permanece na superfície do merozoíto. O complexo reconhece o transportador de íons Banda 3, presente na superfície das hemácias.

1.7 O dimorfismo alélico em proteínas de superfície de membrana de merozoítos

Uma característica importante de alguns antígenos de superfície de merozoítos é a presença de *dimorfismo alélico*. Nesse tipo particular de polimorfismo, as diversas variantes de um determinado antígeno agrupam-se claramente em duas famílias.

A partir de uma amostra de alelos, pode-se, com base em modelos de coalescência, estimar o tempo esperado até o último ancestral comum dessa amostra (T_{LCA}), sob evolução neutra. Esse tempo é estimado a partir da análise do grau de divergência entre as seqüências. No caso do dimorfismo alélico, os níveis de divergência entre alelos de diferentes famílias, quando comparada à divergência encontrada no interior da mesma família, excedem de modo significativo as expectativas de modelos clássicos de evolução neutra ou seleção balanceada (Figura 6).

Se dividirmos a amostra de alelos em duas classes, pode-se estimar o tempo médio esperado de coalescência de cada par de alelos em cada classe, que corresponde ao conjunto de tempos de coalescência até o penúltimo evento de coalescência na amostra. Deste modo, pode-se mostrar que T_{LCA} , sob evolução neutra, é cerca de quatro vezes o tempo médio de coalescência entre pares de alelos cujo último ancestral comum é posterior ao último ancestral da amostra (Figura 6A). No modelo de seleção balanceada (Figura 6B), T_{LCA} é muito maior do que em (6A), pois a pressão seletiva tende a manter o tempo de persistência de diversos alelos na população que seriam eliminados por deriva gênica na ausência de seleção, mas o tempo médio de coalescência dos demais alelos também é prolongado, mantendo-se a proporção entre ramos basais e distais (Richman, 2000).

Figura 6. Genealogia de alelos de acordo com os modelos de evolução neutra, seleção balanceada e dimorfismo alélico. Nos modelos de evolução neutra (A) e seleção balanceada (B), o tempo médio de coalescência entre os alelos de cada ramo é cerca de um quarto do tempo da coalescência até o mais antigo ancestral comum de toda a amostra. No caso do dimorfismo alélico (C), o tempo médio de coalescência entre os alelos de ramos diferentes é muito menor que um quarto de T_{LCA} . Reproduzido de Roy et al. (2008).

O modelo de dimorfismo alélico (Figura 6C) caracteriza-se por um alongamento desproporcional dos ramos basais da genealogia; deste modo, T_{LCA} é muito superior ao tempo médio de coalescência do mais antigo ancestral de cada um dos ramos dimórficos. Com base nessas relações, pode-se propor um teste estatístico simples para definir dimorfismo alélico como um padrão que se desvia do

esperado sob evolução neutra: confirma-se sua ocorrência em genealogias em que a divergência entre alelos de classes opostas é quatro vezes maior do que a divergência média entre alelos da mesma classe (Roy et al., 2008). Esse teste será referido, daqui em diante, como “regra de um quarto”.

Este padrão dimórfico foi inicialmente descrito em MSP-1 de *P. falciparum* (Tanabe et al., 1987). O estudo de diferentes seqüências do gene dessa proteína levou à identificação de regiões com alta diversidade flanqueadas por regiões muito conservadas. O gene *msp-1* foi dividido em blocos (17 ao todo) que podem ser classificados como conservados, semi-conservados ou altamente divergentes (Figura 7). O dimorfismo foi observado nos blocos com alta divergência, e as duas famílias alélicas originadas pela combinação desses blocos são conhecidas como MAD20 e K1 (Tanabe et al., 1987).

Em 1991, foi observada a ocorrência de dimorfismo alélico na proteína MSP-2 (então chamada *merozoite surface antigen 2* - MSA2) (Smythe et al., 1991; Snewin et al., 1991). Assim como MSP-1, essa proteína, com peso molecular de cerca de 45-50 kDa, liga-se à superfície do merozoíto por meio de uma âncora de GPI (Gaur et al., 2004). A análise de seqüências diversas de *msp-2* também permitiu sua divisão em 2 famílias alélicas, 3D7 e FC27. A proteína pode ser dividida em blocos (5 no total) conforme o grau de divergência encontrado entre as seqüências (Figura 7). Classificam-se como conservadas as regiões N- e C-terminal (correspondentes aos blocos 1 e 5), que limitam regiões dimórficas (blocos 2 e 4) e uma região central, flanqueada pelas dimórficas, composta por motivos repetitivos (bloco 3). A estrutura desses motivos repetitivos também é característica de cada família (Felger et al., 1997).

Finalmente, em 2004 foi verificada a existência de duas famílias alélicas para a proteína MSP-6, que foram denominadas K1 e 3D7 (Pearce et al., 2004). Assim como MSP-1 e MSP-2, as regiões N- e C-terminal dessa proteína são altamente conservadas, e flanqueiam a região central dimórfica (Figura 7). Os sítios dimórficos são conservados dentro de cada família, mas K1 se distingue por possuir 3 blocos de seqüências (com 15, 24 e 129 bp de extensão) ausentes em 3D7, o que permite rápida identificação dos tipos alélicos por meio de visualização em gel de agarose. Alelos de tipo 3D7 foram encontrados em parasitos distribuídos em várias regiões do mundo, enquanto os alelos K1 parecem geograficamente restritos a países do Sudeste Asiático (Pearce et al., 2004).

Figura 7. Representação esquemática de genes de proteínas de superfície de *P. falciparum* para os quais é sugerida a ocorrência de dimorfismo alélico. Os genes são divididos em blocos, de acordo com a variabilidade encontrada nessas regiões. As regiões correspondentes às extremidades amina e carboxila de cada proteína são conservadas (adaptado de Roy et al., 2008).

1.8 Tempos de divergência entre alelos de genes dimórficos

A ocorrência de dimorfismo alélico resulta em suposições importantes para o estudo das genealogias em que a sua ocorrência é sugerida. Uma delas é a de que não ocorra recombinação, na região dimórfica, entre os genes de famílias alélicas diferentes, visto que isso levaria a uma redução no número de diferenças observadas, por meio de um efeito homogenizador. De fato, um estudo feito com 34 seqüências de *msp-1* de *P. falciparum* não encontrou evidências da ocorrência, entre as famílias alélicas MAD20 e K1, de recombinação na região compreendida entre os blocos 4 e 16 (Tanabe et al., 2007a). Dessa forma, o dimorfismo deve ter surgido como um evento basal na genealogia, tendo sido mantido, por razões desconhecidas, até o presente (Roy et al., 2008).

A data de divergência entre os alelos de genes dimórficos de *P. falciparum* foi estimada pela comparação com os genes ortólogos de outras espécies de *Plasmodium*. Hughes (1992) estimou que os grupos alélicos de MSP-1 teriam divergido há cerca de 35 milhões de anos, comparando duas porções similares nesse gene e nos genes ortólogos de *P. yoelli* e *P. chabaudi*, parasitos de roedores. Estimativas realizadas posteriormente, em que a comparação foi feita com o gene

ortólogo de *msp-1* em *P. reichenowi*, forneceram um valor aproximado para divergência dos alelos de MSP-1 entre cerca de 28-40 milhões de anos (Polley et al., 2005; Roy et al., 2008). Esses valores colocam o dimorfismo de MSP-1 como um dos mais antigos polimorfismos já descritos, pré-datando a especiação de *P. falciparum* – *P. reichenowi*, que, estima-se, tenha ocorrido entre 5 a 7 milhões de anos (Escalante et al., 1998).

De forma contrastante, o dimorfismo alélico de MSP-2 de *P. falciparum* parece ter origem bem mais recente. O alinhamento de 32 seqüências dos blocos 1 e 5 (conservados) desse gene e do gene ortólogo de *P. reichenowi* forneceu um valor estimado entre cerca de 450.000 e 640.000 anos para a divergência entre os alelos (Ferreira e Hartl, 2007).

Uma comparação prévia, feita com as seqüências disponíveis de *msp-6* de *P. falciparum* e uma seqüência montada a partir do seqüenciamento do genoma de *P. reichenowi* realizado pelo *Sanger Institute*, estimou a data de divergência dos alelos desse gene como concomitante à especiação de *P. falciparum* – *P. reichenowi* (Roy et al., 2008).

O dimorfismo alélico se apresenta dessa forma como um fenômeno que surgiu em diferentes épocas da evolução de *Plasmodium falciparum*, seja nesse parasito em si ou em seus ancestrais. A manutenção dos alelos por um período de tempo tão extenso, como o sugerido para MSP-1, reforça a hipótese de seleção balanceadora prolongando o tempo de permanência dos alelos, embora os fatores que exerçam essa seleção não estejam esclarecidos (Hughes, 1992).

1.9 Importância do dimorfismo alélico para estratégias de imunização

Os anticorpos produzidos como parte da resposta imune do hospedeiro são específicos para as formas variantes das proteínas de *Plasmodium* apresentadas na superfície do parasito. Estratégias de imunização baseadas em proteínas dimórficas apresentam a vantagem de lidarem com antígenos de superfície que apresentam regiões antigênicas de variabilidade reduzida, devido à ausência de variantes gerados por recombinação (Tanabe et al., 2007a). Dessa forma, sugere-se que vacinas que incorporassem regiões conservadas das duas formas alélicas de antígenos dimórficos teriam maior probabilidade de induzir uma resposta eficaz contra esses antígenos (Genton et al., 2002; Polley et al., 2007).

A proteína MSP-6, dimórfica, representa um potencial integrante de uma vacina contra malária. Tanto o fragmento processado MSP-6₃₆ quanto regiões presentes somente na molécula precursora MSP-6 são reconhecidos pelo sistema imune (Wang et al., 2003). Anticorpos que reconhecem a região C-terminal de MSP-6, produzidos naturalmente por indivíduos infectados por *P. falciparum*, são capazes de reduzir o crescimento de parasitos *in vitro*, por meio de resposta mediada por monócitos (Singh et al., 2005). Ensaio de inibição de invasão, realizados com IgG de coelhos imunizados com MSP-6 do tipo 3D7, resultaram em redução expressiva do número de eritrócitos infectados por parasitos com o mesmo tipo alélico. Quando o ensaio foi realizado com parasitos com MSP-6 do tipo K1, nenhuma redução foi notada (Pearce et al., 2004). Esses dados demonstram que o potencial efeito protetor desses anticorpos depende do reconhecimento de regiões alelo-específicas da proteína.

A diversidade dentro das famílias alélicas de *msh-6* ainda não foi explorada, tendo seu dimorfismo sido descrito a partir de somente 8 seqüências (Pearce et al., 2004). Essa informação, associada ao conhecimento das formas alélicas presentes em uma região endêmica para malária, são essenciais para o estudo da imunidade adquirida dos habitantes dessa região, e para o desenho de estudos que visem estudar a epidemiologia e estabelecer estratégias de imunização contra a doença.

2 OBJETIVOS

Caracterizar o dimorfismo alélico de MSP-6, uma proteína de superfície de merozoíto de *Plasmodium falciparum* dimórfica, presente em isolados coletados em Estados da Amazônia Legal Brasileira.

Estabelecer hipóteses para o surgimento do dimorfismo alélico nessa proteína, a partir do seqüenciamento do gene ortólogo de *msp-6* em *Plasmodium reichenowi*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de DNA de *P. falciparum* e *P. reichenowi*

3.1.1 Amostras de DNA de *P. falciparum*

As amostras de *P. falciparum* disponíveis para este projeto foram obtidas através da coleta de sangue de pessoas infectadas (Quadro 1). Os doadores forneceram consentimento informado e seu anonimato foi garantido. Todas as amostras selecionadas tiveram seu gene *msh-1* previamente tipado com base em uma estratégia que envolve amplificação, através de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) com oligonucleotídeos alelo-específicos, de três regiões dimórficas ou polimórficas do gene. Selecionaram-se para este projeto amostras brasileiras em que um único alelo de MSP-1 foi encontrado, para permitir o estudo de eventual associação entre famílias alélicas de MSP-1 e MSP-6 nos mesmos isolados (Quadro 1); os isolados da Tanzânia, entretanto, foram escolhidos independentemente desse critério, em função da alta proporção de infecções geneticamente mistas entre eles.

Quadro 1. Local e data de coleta dos isolados de *Plasmodium falciparum*.

País	Local	Região	Número de amostras	Data de coleta	Referência
Brasil	Pará	Amazônia Oriental	6	1985-1994	Silva et al., 2000
Brasil	Acre	Amazônia Ocidental	4	1999	Silva et al., 2000
Brasil	Rondônia	Amazônia Ocidental	16	1997	da Silveira et al., 1999
Tanzânia	Tanga	Norte da Tanzânia	2	1996	Ferreira et al., 1998a

3.1.2 Amostra de DNA de *P. reichenowi*

A amostra de DNA de *P. reichenowi* utilizada nesse projeto foi gentilmente cedida pelo Dr. John Barnwell, do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, Estados Unidos.

3.2 Extração do DNA a partir de amostras de sangue

Nas amostras de sangue em que ainda não havia sido realizada a extração de DNA, foi seguido o protocolo proposto por Ferreira et al. (1998b). Brevemente, 200 µL de sangue foram lisados com 0,15% de saponina diluída em tampão de fosfato (*phosphate buffered saline* – PBS – pH 7,4), e ressuspensos em 200 µL de tampão TEN (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM ácido etileno diamino tetra-acético – *Ethylene Diamine Tetracetic acid* EDTA – e 100 mM NaCl) com 0,5% de sódio-duodecil-sulfato (SDS) e 200 µg/mL de proteinase K. Após uma incubação noturna a 37°C, o DNA foi recuperado através de uma extração comum de fenol-clorofórmio, precipitado com etanol 100% na presença de 125 mM de acetato de sódio a -80°C, lavado em etanol 70% e ressuspensionado em 30 µL de água destilada autoclavada.

3.3 Reação de PCR para amplificação do gene *msp-6*

O gene *msp-6* completo foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos descritos por Pearce et al. (2004), denominados FWD1 e REV1 (Quadro 2).

As reações de PCR foram realizadas com as seguintes concentrações finais de reagentes em um volume de 20 µL: 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,25 µM de oligonucleotídeos (FWD1 e REV1), 250 µM de nucleotídeos trifosfatados (adenina, citosina, guanina e timina) e 2 unidades da enzima polimerizadora de DNA (taq). As condições de amplificação foram:

- 94°C por 4 minutos (denaturação inicial do DNA).
- 35 ciclos de:
 - 94°C por 1 minuto (denaturação do DNA)
 - 40°C por 1 minuto (anelamento dos oligonucleotídeos)
 - 72°C por 2 minutos (extensão do DNA).
- 72°C por 10 minutos (extensão final do DNA).

Nas amostras em que não foi possível amplificar o gene *msh-6* utilizando-se o protocolo acima, foi adotado um procedimento de *nested* PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos FWDEXT1 e REVEXT1 (Quadro 2). As concentrações de reagentes e as condições de amplificação foram mantidas, com exceção da temperatura de anelamento: na primeira reação (*nested*), foi utilizada uma temperatura de 44°C, e na reação de PCR seguinte essa temperatura foi aumentada para 55°C.

Parte do produto da reação foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, juntamente com um peso molecular de DNA de 100 bp (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus – Fermentas), para verificar a presença do fragmento desejado. Para alelos da família K1, o tamanho esperado do fragmento amplificado era de 1,3 Kbp, e para a família 3D7, 1,1 Kbp (Pearce et al., 2004). Em caso de resultado positivo, esse material era utilizado para reações de seqüenciamento.

3.4 Seqüenciamento do gene *msh-6*

As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando-se o kit comercial Big Dye Terminator v3.1 (Applied BioSystems), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Além dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene *msh-6* (FWD1 e REV1), foram utilizados os oligonucleotídeos denominados FWD2, FWD3, FWD4, REV2 e REV3. As seqüências podem ser vistas na Tabela 2, e sua localização dentro de cada variante do gene *msh-6* é mostrada na Figura 8. No caso do seqüenciamento do gene ortólogo de *msh-6* de *P. reichenowi*, o oligonucleotídeo FWD2alt foi utilizado no lugar de FWD2. As condições de amplificação foram:

- 96°C por 2 minutos (denaturação inicial do DNA).

- 35 ciclos de: 96°C por 45 segundos (denaturação do DNA)

 - 48°C por 30 segundos (anelamento dos oligonucleotídeos)

 - 60°C por 4 minutos (extensão do DNA).

O produto da reação foi seqüenciado em um Seqüenciador Automático ABI PRISM 3100 (Applied BioSystems).

Quadro 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de *nested* PCR, PCR e seqüenciamento do gene *msp-6* de *P. falciparum* e o gene ortólogo em *P. reichenowi*.

Oligonucleotídeo	Reação	Seqüência (5' => 3')
FWDEXT1	<i>Nested</i> PCR	GTTTCTTTTATAGATTATTTCAAATG
REVEXT1	<i>Nested</i> PCR	CCTATAGATAGGTTTAATTATTAC
FWD1	PCR e Seqüenciamento	ATGAATAAGATTTATAATATAC
REV1	PCR e Seqüenciamento	ATTATTACTAAATAGATGGATCAT
FWD2	Seqüenciamento	GGTTTAACTGGTGCAACAG
FWD2alt	Seqüenciamento (<i>P. reichenowi</i>)	CTCTGAATAATAATATACTTGG
FWD3	Seqüenciamento	GATTCAGAAATTCCTTTTTC
FWD4	Seqüenciamento	GATGACATAGATGAAGAAAG
REV2	Seqüenciamento	CTTTTATCTTCTGCAGCTC
REV3	Seqüenciamento	CAGATTCGTGAATACTATTTTC

Figura 8. Região de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados para amplificação das duas formas alélicas de *msp-6*. Números entre parênteses indicam o número da base em que se liga a extremidade 5' do respectivo primer. As áreas pretas no alelo do tipo K1 correspondem aos *indels* ausentes no alelo 3D7.

3.5 Montagem das seqüências de *msp-6* de *P. falciparum* e *P. reichenowi*

A seqüência completa de *msp-6* de cada isolado de *P. falciparum* foi montada a partir dos seqüenciamentos parciais em uma única seqüência (*contig*), através do programa SeqMan (DNASTar 5.00, Madison, WT). Quando ocorriam conflitos, correções manuais foram feitas, baseadas nos cromatogramas originais, de forma a eliminar falsos polimorfismos.

O Instituto Sanger realizou um seqüenciamento parcial de *P.reichenowi*, cujos resultados estão disponíveis *on-line* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_reichenowi). Após o seqüenciamento do gene ortólogo de *msp-6* em

P. reichenowi, foi feita uma busca por seqüências semelhantes, através do programa BLAST. Dentre as seqüências obtidas, foram selecionadas aquelas com os melhores índices (scores) de alinhamentos, e menores valores de *e* (probabilidade de se encontrar, ao acaso, uma seqüência semelhante à da nossa busca). A partir dessas seqüências, foi montado um *contig*, da maneira descrita no item anterior. Foi feita uma comparação entre o nosso seqüenciamento e o *contig* obtido, para se obter a seqüência final utilizada em nossa análise.

3.6 Outras seqüências de *msp-6*

Além das seqüências de *msp-6* obtidas conforme descrito nos itens 3.2 –3.5, foram utilizadas outras seqüências para os estudos com *msp-6*. A origem dessas amostras e outras informações são apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3 – Outras seqüências de *msp-6* utilizadas para cálculo de diversidade nucleotídica e associação entre alelos.

Amostra	Origem	Código de acesso <i>GenBank</i>	Referência
T9/96	Tailândia	AY007721	Trucco et al., 2001
3D7	Oeste africano	XM_001347594	Gardner et al., 2002
7G8	Brasil	AY518887	Pearce et al., 2004
D10	Papua Nova Guiné	AY518888	Pearce et al., 2004
HB3	Honduras	AY518889	Pearce et al., 2004
K1	Tailandia	AY518890	Pearce et al., 2004
Malay Camp	Malasia	AY518891	Pearce et al., 2004
NF7	Ghana	AY518892	Pearce et al., 2004
W2mef	Laos	AY518893	Pearce et al., 2004
Dd2	Laos	AASM01000000	Volkman et al., 2007
Isolado clínico	Gana		Jeffares et al., 2007
IT	Brasil		Jeffares et al., 2007

*- busca feita no site: http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_falciparum/

3.7 Teste de Fisher para verificar a associação entre alelos de *msp-1* e *msp-6*

A partir da identificação das formas alélicas de MSP-1 e MSP-6 presentes nas amostras estudadas, foi verificada a ocorrência de evidência de associação entre essas formas na montagem do complexo protéico presente na membrana do merozoíto de *P. falciparum*, montando-se uma tabela 2 X 2, a partir da qual foi realizado um teste exato de Fisher.

3.8 Análise da diversidade entre as seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas com o programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). A diversidade entre as seqüências foi analisada com o programa DnaSP 4.0 (Rozas et al., 2003), que utiliza o método proposto por Nei (1987). Basicamente, as n seqüências obtidas são comparadas duas a duas, após o alinhamento e excluindo as inserções e deleções (regiões não alinháveis), e um valor médio das diferenças encontradas (π) é definido, de acordo com a equação:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} x_i \cdot x_j \cdot \pi_{ij}$$

Nessa equação, x_i representa a freqüência com que uma das seqüências está presente na amostra, x_j é a freqüência da outra seqüência, e π_{ij} é o número de diferenças encontrado nessa comparação em particular. Esse cálculo foi realizado inicialmente apenas as seqüências de um determinado tipo alélico de *msh-6*, obtendo-se dessa forma o valor de π de cada ramo dimórfico (π_{K1} ou π_{3D7}). Em seguida foi calculado o valor médio de π nesses dois grupos ($\pi_{\text{médio}}$), e por fim, o valor entre grupos ($\pi_{\text{entre ramos}}$). O erro-padrão desses valores foi calculado pelo método de *bootstrap*, a partir de 1000 replicatas, com o programa MEGA 4.0. Gráficos de diversidade intra e entre famílias foram obtidos através do programa DnaSP 4.0, utilizando-se janelas de 100 bases com intervalos de 25 bases.

O dimorfismo alélico, segundo a regra de um quarto, foi testado comparando-se os valores de $\pi_{\text{médio}}$ e $\pi_{\text{entre ramos}}$. O valor obtido foi denominado $T_{1/4}$ (teste do um quarto), e definido como $T_{1/4} = \pi_{\text{médio}} / \pi_{\text{entre ramos}}$.

A genealogia das amostras foi obtida utilizando-se o método de *neighbour joining* (Saitou e Nei, 1987), através do programa MEGA 4.0.

3.9 Cálculo de mutações sinônimas e não-sinônimas e identificação de regiões selecionadas positivamente

O método utilizado será aquele proposto por Nei e Gojobori (1986). Resumidamente, para cada códon é calculado o valor de sítios sinônimos (s) e não-

sinônimos (n), ou seja, dentre todas as possíveis mutações que podem ocorrer em cada base (sítio) desse códon, quantas são sinônimas e quantas são não-sinônimas. Para uma sequência de DNA, o valor total de sítios sinônimos (S) é obtido somando-se os valores de s de todos os seus códons. O número de sítios não-sinônimos (N) é obtido de maneira análoga, somando-se os valores de n .

O valor estimado de diferenças sinônimas e não-sinônimas entre duas sequências é obtido alinhando-as e fazendo uma comparação códon a códon, desprezando-se as sequências não alinháveis. Soma-se o valor de diferenças sinônimas (s_d) encontradas entre os códons, obtendo-se o total de diferenças sinônimas entre as sequências (S_d). Procedimento análogo é feito para se obter o valor do total de diferenças não-sinônimas (N_d). Finalmente, a proporção de mutações sinônimas por sítio sinônimo (p_S) e de mutações não-sinônimas por sítio não-sinônimo (p_N) pode ser obtido calculando-se $p_S = S_d/S$ e $p_N = N_d/N$.

O valor de p_S pode ser interpretado da seguinte forma: de S possíveis substituições sinônimas que poderiam ocorrer, S_d ocorreram de fato. Semelhante interpretação pode ser dada para o valor de p_N . Para se levar em conta a possibilidade de que tenham ocorrido múltiplas substituições em um mesmo sítio, será aplicada a correção proposta por Jukes e Cantor (1969) (revisão em Graur e Li, 2000).

Para verificar se há excessos significantes de substituições não-sinônimas em segmentos de *msh-6*, foram empregados testes Z (Nei e Kumar, 2000) monocaudais, com 1.000 pseudo-replicatas, em janelas de 100 códons. O excesso de substituições não-sinônimas em um domínio em particular pode ser interpretado como evidência de seleção positiva (Hughes e Nei, 1988). Todos esses cálculos foram realizados com auxílio do programa MEGA 4.0.

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação e seqüenciamento do gene *msp-6* em amostras de sangue de pacientes de malária em estados da Amazônia Legal

Foi amplificado o gene *msp-6* de *P. falciparum* presente em 26 amostras provenientes de estados da Amazônia Legal, e 2 amostras provenientes da Tanzânia, África. A visualização em gel de agarose contendo brometo de etídeo permitiu a identificação do tipo alélico de *msp-6* (K1 ou 3D7) presente na amostra (Figura 9). Essa identificação visual foi posteriormente confirmada por seqüenciamento de DNA em 23 amostras (21 do Brasil e 2 da Tanzânia). Os dois tipos alélicos de *msp-6* estavam presentes nas amostras brasileiras, assim como nas amostras africanas (Tabela 1). Esses resultados demonstram que a variante do tipo K1 tem uma distribuição geográfica mais ampla que a anteriormente sugerida, visto que se acreditava que a ocorrência dessa família estivesse restrita ao sudeste asiático (Pearce et al., 2004). No geral, foi observado predomínio de alelos da família 3D7 em relação a K1 (16 contra 10, ou 0,62 contra 0,38, não significante considerando um intervalo de confiança de 95%).

Tabela 1. Identificação dos tipos alélicos presentes nas amostras colhidas em estados da Amazônia Legal.

Estado	Amostras Identificadas	Tipo K1	Tipo 3D7
Rondônia	16	7	9
Acre	4	0	4
Pará	6	3	3

Figura 9. Visualização dos produtos da amplificação de *msp-6* por PCR. As amostras B1e B3 são provenientes do estado do Pará, e as restantes do estado de Rondônia. M indica o marcador molecular de 100bp, com a seta indicando o fragmento referente ao tamanho de 1200 bp. As amostras 06 e 20 são do tipo alélico K1.

4.2 Ausência de associação entre formas alélicas de *msp-1* e *msp-6*

O Quadro 2 mostra o tipo alélico das amostras identificadas no Brasil. O material utilizado em nosso trabalho (23 amostras) já havia sido previamente identificado com relação ao gene da proteína MSP-1 (Ferreira et al., 1998a; Silva et al., 2000; da Silveira et al., 1999). Essa informação foi recuperada das outras amostras utilizadas (12 amostras, item 3.6). Dessa forma, o n total obtido para estudo de associação entre as formas alélicas de *msp-1* e *msp-6* foi de 35. É mostrada somente a tipagem da região compreendida entre os blocos 6-16 de *msp-1* porque é nessa região em que se acredita ocorrer a interação entre as duas proteínas (Kauth et al., 2006).

Os dados obtidos no Quadro 4 foram utilizados para compor a Tabela 2. Nessa tabela, as formas alélicas de *msp-1* e *msp-6* são dados qualitativos, e o número dentro de cada célula corresponde a quantidade de amostras que possuía os respectivos tipos alélicos dos genes. Um teste exato de Fisher foi realizado para verificar a hipótese nula (H_0) de que não existe associação entre as formas alélicas de *msp-1* e *msp-6*. Dado o valor de p encontrado em nossa análise ($p=0,875$), pode-se sugerir que não existe associação entre os diferentes tipos dimórficos de *msp-1* e *msp-6* na formação do complexo de proteínas de superfície do merozoíto.

Quadro 4. Identificação dos tipos alélicos de *msh-6* e da região composta pelos blocos 6-16 de *msh-1* de *P. falciparum*. Para *msh-6* há dois tipos alélicos possíveis: K1 e 3D7. Para *msh-1*, os tipos possíveis são MAD20 e K1. Foram acrescentados os resultados de amostras cujos seqüenciamentos estão disponíveis. As amostras identificadas nesse projeto estão marcadas com um asterisco(*).

Amostra	Origem	<i>msh-6</i>	<i>msh-1</i> bloco 6-16
04*	Rondônia	3D7	MAD20
06*	Rondônia	K1	MAD20
20*	Rondônia	K1	MAD20
27*	Rondônia	3D7	MAD20
32*	Rondônia	3D7	MAD20
34*	Rondônia	K1	MAD20
42*	Rondônia	3D7	MAD20
45*	Rondônia	3D7	MAD20
59*	Rondônia	3D7	MAD20
62*	Rondônia	K1	MAD20
BA24*	Acre	3D7	MAD20
DE28*	Acre	3D7	MAD20
PC11*	Acre	3D7	MAD20
PC17*	Acre	3D7	MAD20
B1*	Pará	3D7	MAD20
B2*	Pará	K1	MAD20
B3*	Pará	3D7	MAD20
B7*	Pará	K1	MAD20
P12*	Pará	3D7	MAD20
350/94*	Pará	K1	MAD20
D2*	noroeste da Tanzânia	K1	K1
NHC1*	Tanga - Tanzânia	3D7	MAD20
T9/96	Tailândia	3D7	MAD20
7G8	7G8 (Brasil)	3D7	MAD20
Dd2	Dd2 (Indochina)	K1	MAD20
Hb3	Hb3 (Honduras)	3D7	K1
<i>Ghanian isolate</i>	Gana	K1	MAD20
3D7	Oeste africano	3D7	MAD20
IT	Amazonas, Brasil	3D7	K1
NF7	Gana	3D7	MAD20
MC	Malásia	K1	MAD20
K1	Tailândia	K1	K1
D10	Papua Nova Guiné	3D7	MAD20

Tabela 2. Distribuição das amostras estudadas conforme o tipo alélico de *m*sp-1 e *m*sp-6. O teste exato de Fisher foi aplicado considerando os dados abaixo.

	<i>m</i> sp-1 tipo K1	<i>m</i> sp-1 tipo MAD20
<i>m</i> sp-6 tipo K1	2	10
<i>m</i> sp-6 tipo 3D7	2	19

4.3 Diversidade intra- e entre-famílias alélicas de *m*sp-6 em amostras do Brasil

A análise da diversidade nucleotídica em *m*sp-6 foi realizada a partir das 21 seqüências completas do Brasil obtidas para análise, sendo que 8 eram da família K1 e 13 pertenciam à família 3D7.

Essas amostras apresentaram baixo grau de diversidade nucleotídica. Foi encontrado apenas um haplótipo de alelo do tipo 3D7 ($\pi=0,0$), e dois haplótipos em alelos da família K1 ($\pi=0,00045$). Na comparação entre famílias, o valor de diversidade encontrado foi $\pi=0,01497$.

Os dois haplótipos de K1 se distinguem pela ocorrência de uma mutação na região N conservada do gene, presente em 4 amostras de Rondônia (06, 20, 134 e 608). Essa mutação (C=>T na base 100), não-sinônima, causa uma mudança no aminoácido codificado, de histidina para tirosina. Esses dois aminoácidos são polares, hidrofóbicos e aromáticos, o que caracteriza essa substituição como não-radical. Essa região da proteína é eliminada durante a clivagem que precede sua exposição na superfície do merozoíto.

Com exceção dessa mutação, não foram encontradas outras variações em amostras do Brasil, com exceção das já descritas como sítios dimórficos. Não foram encontradas diferenças entre os sítios dimórficos das amostras do Brasil com relação as amostras de outras localidades, de forma que essa região será analisada no item 4.4.2.

4.4 Diversidade intra- e entre-famílias alélicas de *msh-6* utilizando o conjunto ampliado de seqüências

4.4.1 Diversidade nas regiões N- e C-terminal

As regiões N- e C-terminal de *msh-6* são altamente conservadas em todas as amostras estudadas.

Na região N-terminal, foi encontrada uma única mutação em um conjunto de amostras do tipo K1 provenientes de Rondônia, conforme descrito no item 4.3.

Na região C-terminal conservada (bases 685-1281 em amostras do tipo K1, e 517- 1113 em amostras do tipo 3D7; Anexo A), foram observadas 2 mutações não-sinônimas e uma inserção. A primeira mutação (A=>T) está presente em 6 amostras do tipo 3D7 (base 680) coletadas no Brasil (amostra IT), África (3D7, NHC-1 e NF7), Papua Nova Guiné (D10) e Tailândia (T9/96), e faz com que seja codificado o aminoácido isoleucina no lugar de lisina (substituição radical). A segunda mutação não-sinônima foi observada em apenas uma amostra da Tanzânia, África (D2, tipo K1), e causa também uma mudança de histidina para tirosina (substituição de C por T na base 1264).

A amostra Malay Camp, proveniente da Malásia (Ásia) apresenta uma inserção de 6 bases (GAAGAA), que adicionam 2 resíduos de ácido glutâmico ao polipeptídeo, não alterando o código de leitura do gene (Pearce et al., 2004). Essa inserção é precedida pelos motivos repetitivos GAAGAT (3 vezes), de forma que um evento de pareamento incorreto durante a replicação do DNA pode ter sido a causa de sua origem (Rich e Ayala, 2000). A região em que essa repetição ocorre é rica em resíduos desse aminoácido.

No geral, as mutações presentes nas regiões conservadas de *msh-6* não devem afetar a conformação da proteína codificada, visto serem causadoras de substituições não radicais de aminoácidos (amostras de Rondônia e da Tanzânia) ou repetições de aminoácidos característicos de determinadas regiões do gene (amostra Malay Camp). A exceção a essa afirmação decorre da presença de uma mutação causadora de uma substituição radical de aminoácido na região C-terminal conservada de *msh-6*.

4.4.2 Diversidade na região dimórfica

A região dimórfica de *msp-6* de *P. falciparum* encontra-se delimitada entre as bases 241-684, na família alélica K1, e 241-516, na família 3D7. Nesse intervalo são encontrados 36 sítios dimórficos (incluindo-se as três regiões de *indels* presentes em alelos do tipo K1), que resultam em 29 mudanças no aminoácido codificado (há 3 códons com mudança dupla de base). Dentre as substituições de aminoácidos presentes na região dimórfica, 17 são radicais (Taylor, 1986). Os *indels* são perfeitamente conservados dentro da família K1, com exceção de uma deleção secundária encontrada na amostra Dd2 (item 4.4.3).

A análise da diversidade nucleotídica (π) ao longo dos genes *msp-6*, intra e entre famílias alélicas, mostra que os alelos são extremamente conservados dentro de cada família, sendo a maior parte da diversidade entre famílias concentrada na região dimórfica (Figura 10A). Os picos de diversidade encontrados dentro de cada família (Figuras 10B e 10C) são referentes ao número restrito de substituições encontradas. Os valores de π calculados para o gene completo e somente para a região dimórfica estão sumarizados na Tabela 3. Na comparação entre famílias, os valores encontrados são duas ordens de grandezas maiores que os valores intra família. Esses valores se encontram entre os menores descritos para proteínas de membrana, sendo inferiores inclusive aos apresentados por genes altamente conservados (*housekeeping genes*) de *P. falciparum* (Tanabe et al., 2004).

Tabela 3. Diversidade nucleotídica intra e entre famílias alélicas de *msp-6*.

Família alélica de <i>msp-6</i>	π gene completo	π região dimórfica
K1 (n=14)	0,00068 $\pm$ 0,00039	0,00033 $\pm$ 0,00033
3D7 (n=21)	0,00056 $\pm$ 0,00041	0,00069 $\pm$ 0,00046
geral (n=35)	0,01504 $\pm$ 0,00248	0,06450 $\pm$ 0,01146

Figura 10. Diversidade nucleotídica entre seqüências de *msp-6*. Na comparação entre famílias (A), a maior parte da diversidade encontra-se restrita à região dimórfica (linhas tracejadas). No interior das famílias alélicas, tanto K1 (B) quanto 3D7 (C) apresentam baixos níveis de diversidade.

4.4.3 Deleção secundária na amostra Dd2

O gene *msh-6* da amostra Dd2 representa uma exceção ao padrão dimórfico encontrado nas demais amostras. Embora, na comparação entre famílias, ele possua a mesma sequência de bases, nos sítios dimórficos, que caracteriza os alelos da família K1, há uma deleção de uma região de 123 bp, muito semelhante à região de 129 bp presente na família K1 e ausente em 3D7 (Figura 11). A presença da sequência de nucleotídeos GTG nas duas extremidades do *indel* em alelos do tipo K1, e também na região preservada da deleção em Dd2, não permite definir exatamente as coordenadas do evento. Uma explicação possível para essa combinação mista de características (deleção semelhante a da família 3D7 e regiões dimórficas semelhantes a da família K1) seria a ocorrência de uma deleção secundária nessa região, embora o mecanismo que a tenha ocasionado não esteja a princípio bem claro.

```
K1  401  CTCCTAGAAAGACTAAGTGGACTA...111 bases...TCAGGTGAAAGTGGAGAAAATCA 557
Dd2 401  CTCCTAGAAAGACTAAGTG-----...      ...-----AAAGTGGAGAAAATCA 434
3D7 362  TTCCTATAAAAC-----...      ...-----AAAGTGGAGAAAATCA 389
      ***** ** **                               *****
```

Figura 11. Alinhamento entre as seqüências de *msh-6* dos isolados K1, 3D7 e Dd2. É mostrada a deleção diferenciada de uma região de 123 bp, muito parecida com a deleção de 129 bp característica da família 3D7, embora a região dimórfica flanqueante seja característica da família K1 (hachuras em cinza). O trinucleotídeo GTG sublinhado não pode ser exatamente alinhado, podendo sua localização exata ser na outra extremidade da deleção.

4.4.4 Regra do um quarto aplicada aos alelos de *msh-6*

A genealogia obtida a partir da região dimórfica das seqüências de *msh-6*, utilizando-se o método de *neighbour-joining*, é mostrada na Figura 12. A estrutura geral é a esperada para genes que apresentam dimorfismo alélico, com ramos basais extremamente longos quando comparados aos distais, e com dois grupos claramente distintos (Figura 6C). Para verificar a ocorrência de dimorfismo alélico, segundo a regra do um quarto, foi feita comparação do valor médio de diversidade

Figura 12. Genealogia das amostras de *msp-6*. As amostras seqüenciadas nesse projeto estão marcadas por um asterisco (*). Todas as amostras se encontram claramente divididas em 2 grupos, ressaltando o dimorfismo alélico que ocorre nesse gene, com grande variação entre famílias e pequena variação dentro de cada família. Genealogia obtido pelo método de *neighbour-joining*, por comparação pareada (*pairwise comparison*) entre as seqüências, com o programa MEGA 4.0.

dentro de cada um dos ramos dimórficos ($\pi_{\text{médio}} = 0,00062$) com o valor de diversidade entre as populações ($\pi_{\text{entre ramos}} = 0,01504$). O valor encontrado para essa razão foi de $T_{1/4} = 0,041$. Quando direcionam-se os valores para diminuir a diferença entre numerador e denominador (subtraindo o desvio-padrão do valor médio da diversidade nos ramos no numerador e adicionando-se o desvio-padrão no valor de diversidade entre ramos no denominador, ou seja $T_{1/4} = [(\pi_{\text{médio}} + \text{desvio padrão}) / (\pi_{\text{entre ramos}} - \text{desvio padrão})]$, o valor encontrado foi $T_{1/4} = 0,072$. Dessa forma, a natureza dimórfica dos alelos de *msh-6* é confirmada através da regra do um quarto, pois os valores encontrados são bem menores do que o esperado para alelos evoluindo sob seleção neutra ou balanceada, que seria $T_{1/4} = 0,25$.

A estrutura dimórfica de antígenos se caracteriza pela manutenção desse padrão por longos períodos de tempo, o que implica na ausência de recombinação entre os integrantes das famílias dimórficas. Por esse motivo se espera que a diversidade entre alelos seja muito maior que a diversidade dentro de famílias de alelos dimórficos. A regra do um quarto permite distinguir genes que apresentam essa característica de outros em que variações locais possam ser interpretadas como dimorfismo. Os antígenos de superfície de merozoíto EBA-175 e MSP-3, descritos como apresentando dimorfismo, não apresentam a diversidade esperada de acordo com esse modelo (testada através da regra do um quarto), não podendo, portanto, serem considerados dimórficos (Roy et al., 2008).

4.5 Seleção positiva em *msh-6*

A região central do gene *msh-6* possui 33 sítios dimórficos (excluídos os *indels*), que codificam 31 mudanças de aminoácidos. Dentre eles, oito são sítios duas vezes degenerado, sendo que apenas um representa uma mutação não-sinônima. Cerca de metade (14, ou 42%) dos sítios dimórficos está situada na segunda base de seus respectivos códons, posição que não apresenta degeneração (ou seja, qualquer mutação na segunda base de um códon é obrigatoriamente não-silenciosa). Apenas um sítio dimórfico é 4 vezes degenerado (nenhuma mutação nessa posição altera o aminoácido codificado), mas outro dimorfismo no mesmo códon resulta em mudança de aminoácido.

Os valores de dS e dN encontrados no gene completo, nas regiões conservadas e na porção dimórfica de *msh-6* são apresentados na Tabela 4. Nas regiões N- e C-terminal conservadas, dN>dS é significativo ao nível de 5%, mas não ao nível de 1%. Já na região dimórfica, e considerando-se o gene completo, os valores são significantes, evidenciando a ocorrência de seleção positiva entre os alelos de *msh-6*, sendo essa seleção concentrada na região dimórfica do gene.

Tabela 4. Valores de substituições sinônimas por sítio sinônimo (dS) e substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimo (dN) para os alelos de *msh-6*. Um valor de dN significativamente maior que dS é considerada evidência de seleção positiva. A significância dos valores encontrados (p-valor) foi calculada por meio de um teste de *bootstrap* com 1000 replicatas. Valores de p menores que 0,01 são considerados significantes.

região de <i>msh-6</i>	dS	dN	p-valor
gene completo	0,00497 ± 0,00328	0,01822 ± 0,00335	0,00153
N- e C-terminal	0,00000 ± 0,00000	0,00089 ± 0,00053	0,03451
dimórfica	0,01639 ± 0,01094	0,08144 ± 0,01412	0,00005

4.6 Amplificação e seqüenciamento do gene ortólogo de *msh-6* em *P. reichenowi*

O protocolo utilizado foi basicamente o mesmo para amplificação de *msh-6* em *P. falciparum*. Com essas condições, foi possível amplificar o gene desejado (Figura 13). A visualização em gel de agarose 1,5% mostra a presença de um fragmento com tamanho aproximado um pouco maior que 1200 bases, semelhante ao tamanho do alelo do tipo K1 do gene *msh-6* de *P. falciparum*. O gene foi seqüenciado conforme descrito no item 3.4 de Material e Métodos, e a seqüência obtida foi utilizada para estudos comparativos com as seqüências de tipo K1 e 3D7 de *msh-6* de *P. falciparum*.

Figura 13. Amplificação do gene ortólogo de *msp-6* em *P. reichenowi*. PM= Peso molecular de 100bp Plus(Fermentas). Pr = *P. reichenowi*. A seta indica o fragmento com tamanho equivalente a 1200 bp.

No geral, o gene de *P. reichenowi* se assemelha ao alelo K1, não só devido a presença dos 3 *indels*, mas também na maioria dos sítios dimórficos. O número médio de substituições por sítio foi calculado entre as amostras de alelos do tipo K1 e 3D7 com a sequência de *P. reichenowi*, e entre si, para 3 regiões do gene: as extremidades N- e C-terminal conservadas e a região dimórfica (Tabela 5). Admitindo-se uma taxa de mutação constante ao longo do gene entre as espécies, os valores obtidos sugerem que diferentes regiões de *msp-6* apresentam histórias evolutivas particulares.

Nas regiões conservadas, *msp-6* de *P. reichenowi* tem distância semelhante dos dois alelos de *P. falciparum*, que por sua vez possuem uma distância muito menor entre si, sugerindo que os alelos de *msp-6* de *P.falciparum* teriam surgido após a divergência de *P. falciparum* e *P. reichenowi*. No entanto, a quantidade de diferenças acumuladas na região C-terminal faz crer que ela tenha divergido há mais tempo do gene de *P. reichenowi* do que a região N-terminal.

Tabela 5. Número médio de substituições por sítio na comparação entre sequências de *msp-6* de *P. reichenowi* e dos alelos de *P. falciparum*.

	valor médio de substituições por sítio		
	Pr x 3D7	Pr x K1	K1 x 3D7
N-term	0,01685	0,01808	0,00119
Dimórfico	0,14371	0,07898	0,13097
C-ter	0,07188	0,07267	0,00072

Na região dimórfica, a distância entre *P. reichenowi* e o alelo K1 é cerca da metade da distância entre *P. reichenowi* e o alelo 3D7, mas esses valores não se mantêm constantes ao longo dessa região. A semelhança entre o gene de *msp-6* de *P. reichenowi* e o alelo K1 de *P. falciparum* é mais acentuada na porção 5' da região dimórfica, no qual esses 2 genes apresentam bases iguais nos primeiros 13 sítios dimórficos (incluindo a presença dos *indels*, Figura 14). Já na porção 3' dessa região (resíduos 126-172), *P. reichenowi* mostra semelhanças tanto com os alelos do tipo K1 (12 sítios) quanto os do tipo 3D7 (10 sítios) nos sítios dimórficos.

Figura 14. Alinhamento da região dimórfica de *msp-6* tipo K1 e 3D7 de *P. falciparum* e do gene ortólogo de *P. reichenowi*. Regiões hachuradas em vermelho e verde mostram sítios dimórficos em que a seqüência de *P. reichenowi* é idêntica, respectivamente, à de *msp-6* do tipo K1 e 3D7 de *P. falciparum*. As 3 inserções presentes nos alelos do tipo K1 e em *msp-6* de *P. reichenowi* foram, cada um, consideradas como um único evento e, dessa forma, foram desconsideradas diferenças encontradas dentro dessas regiões.

Essa combinação de resultados sugere a ocorrência de 4 regiões com histórias evolutivas distintas em MSP-6. Nas regiões N- e C-terminal conservadas, os genes ortólogos de *msh-6* teriam divergido antes do surgimento das famílias alélicas em *P. falciparum*, porém na região C-terminal essa divergência seria mais ancestral. A porção 5' da região dimórfica de *msh-6* é praticamente idêntica entre os alelos do tipo K1 de *P. falciparum* e no gene ortólogo de *P. reichenowi*, indicando que os dois divergiram ancestralmente dos alelos do tipo 3D7 de *P.falciparum*. Finalmente, na porção 3' da região dimórfica, os 3 alelos teriam divergido em tempos muito próximos.

5 DISCUSSÃO

5.1 Antígenos de superfície como alvos para uma vacina contra malária

Proteínas de membrana de *P. falciparum* são candidatas a alvo de uma vacina contra a malária causada por esse parasito. No entanto, fatores como os polimorfismos apresentados por essas proteínas, dificultam sua utilização no desenvolvimento de uma estratégia de imunização.

Grande parte das vacinas atualmente em teste contra malária utiliza subunidades de antígenos variados de membrana, na tentativa de estimular uma resposta imune eficaz que mimetize os efeitos da imunidade adquirida contra a doença (Matuschewski e Mueller, 2007). Muitas delas utilizam fragmentos das mais abundantes proteínas encontradas na superfície de *P. falciparum*, nominalmente CSP, presente na membrana dos esporozoítos, e MSP-1, encontrada na membrana do merozoíto (Zavala et al., 1985; Patarroyo et al., 1988). Porém, alguns testes com essas vacinas se mostraram ineficazes, devido em parte à grande variabilidade apresentada por estes antígenos em populações naturais (D'Alessandro et al., 1995).

A proteína de superfície de merozoítos MSP-6 encontra-se presente no estágio sanguíneo do parasito. Assim como outras proteínas de superfície (MSP-1 e MSP-2), ela apresenta uma forma particular de polimorfismo, denominada dimorfismo alélico, no qual todas as suas variantes são agrupadas em duas famílias, sendo encontrada pouca variação dentro das famílias e grande variação entre famílias (Pearce et al., 2004). No entanto, enquanto que nas primeiras a diversidade dentro das formas alélicas já havia sido explorada (Ferreira et al., 2003; Ferreira e Hartl, 2007), poucos dados se encontram disponíveis para o estudo de *msp-6*.

5.2 Distribuição dos alelos de *msp-6*

Nesse trabalho, a diversidade e a distribuição dos diferentes alelos de *msp-6* de *P. falciparum* foi avaliada a partir da amplificação e seqüenciamento desse gene em 21 isolados de parasitos provenientes da região da Amazônia Legal brasileira, e mais dois isolados da Tanzânia, África. As duas formas alélicas foram encontradas

em amostras do Brasil, o que contrasta com a sugestão inicial de que variantes da família K1 estariam restritas ao sudeste asiático (Pearce et al., 2004). A variante K1 foi encontrada também em um isolado obtido de um paciente da Tanzânia, África. No geral, alelos do tipo 3D7 são predominantes, seja considerando somente as amostras do Brasil identificadas nesse projeto (16 contra 10, ou 0,62 contra 0,38, diferença não significativa), seja considerando também amostras obtidas em outros trabalhos (Pearce et al., 2004; Trucco et al., 2001), que expandem o total para 43 amostras identificadas (frequência de 0,67 para 3D7 contra 0,33 do tipo K1, não significativa). Também foi reportada a identificação de alelos do tipo K1 em uma população de Gâmbia, África (Weedall, 2008). De forma contrastante aos resultados acima apresentados, nessa população, de 54 amostras identificadas de *msh-6*, 47 eram do tipo 3D7 e 7 do tipo K1.

Lee et al. (2006) sugerem que em infecções maláricas causadas por parasitos expressando os dois tipos alélicos de *msh-1* ocorre falha na ativação de linfócitos T, prejudicando o combate à infecção e favorecendo a manutenção dos dois tipos alélicos na população local de parasitos. No entanto, o predomínio de alelos do tipo 3D7 de *msh-6* em uma população natural de Gâmbia não corrobora tal hipótese (Weedall, 2008). Dessa forma, estudos em outras regiões se fazem necessários para que se possa inferir um padrão para a distribuição dos diferentes alelos de *msh-6* em populações naturais de *P. falciparum*.

5.3 Diversidade nucleotídica em *msh-6*

Os valores de diversidade nucleotídica encontrados entre famílias alélicas são extremamente inferiores aos encontrados dentro de outros grupos de alelos dimórficos (Tabela 3). Além disso, a maior parte das diferenças entre famílias se encontra restrita a uma região central do gene, sendo essas diferenças essencialmente dimórficas. A diversidade nucleotídica dentro de cada família é duas ordens de grandeza menor que a encontrada entre famílias. Esse conjunto de dados levanta a hipótese de que, após o surgimento das famílias alélicas em *msh-6*, a pressão seletiva teve como efeito a estabilização dos alelos dentro de cada família.

Dentre as 21 seqüências de *msh-6* obtidas de amostras do Brasil, apenas 3 haplótipos foram encontrados (um da família alélica 3D7 e 2 da família K1). Um dos haplótipos de K1 foi encontrado somente em amostras provenientes de Porto Velho,

Rondônia. Essa baixa variabilidade pode ser reflexo do nível de transmissão reduzido e, por consequência, do pequeno número de infecções mistas encontradas em pacientes no Brasil (Machado et al., 2004). Em regiões de alta transmissão de malária, ocorre ampla oportunidade para ocorrência de recombinação no ciclo do parasito que ocorre no hospedeiro invertebrado, havendo inclusive evidência da ocorrência de eventos de recombinação entre amostras coletadas em Gâmbia (Weedal, 2008).

5.4 Ausência de associação entre alelos de *msp-1* e *msp-6*

Para testar a hipótese de que a baixa diversidade encontrada dentro das famílias alélicas de *msp-6* estaria relacionada a uma associação entre as formas dimórficas de *msp-1* e *msp-6* na formação do complexo protéico presente na superfície de merozoítos, foi feito um teste de associação de Fisher. O valor encontrado ($p = 0,875$) não indica evidência de associação. Uma possível explicação para essa falta de associação entre duas proteínas dimórficas que se associam na formação de um complexo seria a de que a ligação entre elas ocorre em regiões conservadas. De fato, a proteína clivada MSP-6₃₆ interage com o produto processado MSP-1₃₈ através de sua região C-terminal (Figura 5), que é altamente conservada (Kauth et al., 2006). Embora de MSP-1₃₈ seja codificado por uma região dimórfica do gene *msp-1*, essa mesma região contém um segmento (bloco 12) que é conservado entre as duas formas alélicas desse gene (Figura 7), o que leva a sugestão que esse bloco é um potencial alvo para o estudo de como ocorre a associação entre as proteínas MSP-6₃₆ e MSP-1₃₈.

5.5 Seleção positiva em *msp-6*

Antígenos de superfície de parasitos sofrem forte pressão seletiva exercida pelo sistema imune do hospedeiro. A manutenção de mutações não-sinônimas é favorecida, pois o polimorfismo nessas regiões representa um importante mecanismo de escape imune (Hughes e Hughes, 1995). Para verificar a hipótese de seleção positiva em *msp-6*, foi verificado se o número de substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimo (dN) era significativamente maior que o número de substituições sinônimas por sítio sinônimos (dS) encontrados ao longo do gene *msp-6* (Tabela 4).

A diferença mais significativa de dN em relação a dS foi encontrada na região dimórfica ($p=0,00005$), indicando que essa região é selecionada positivamente, com um acúmulo de mutações não-sinônimas maior que o esperado em um modelo de evolução neutra. As regiões conservadas desse gene também apresentaram um valor significativo de dN comparado a dS ($p=0,034$), mas isso provavelmente se deve à pequena quantidade de mutações presentes nessa região, que podem direcionar os valores para um falso resultado.

5.6 MSP-6 como possível alvo de uma vacina contra malária

A capacidade de gerar uma resposta imune protetora é uma das principais exigências para qualquer antígeno que venha a ser testado como constituinte de uma vacina. Também é necessário que esse antígeno não apresente grande variabilidade em populações naturais do patógeno, visto que a resposta imune gerada é específica. Existem evidências de que MSP-6 é capaz de induzir uma resposta imune alelo-específica (Pearce et al., 2004). O fato de existirem apenas duas famílias alélicas de MSP-6, e de que a diversidade encontrada dentro das famílias alélicas é extremamente reduzida, sugere o estudo do uso de segmentos da região dimórfica dos dois alelos de *msh-6* como eventuais integrantes de uma vacina baseada em subunidades de antígenos de *P. falciparum*.

A região dimórfica de MSP-6 do tipo 3D7 (com exceção de 4 sítios dimórficos) é eliminada da proteína após a clivagem que dá origem a MSP-6₃₆, fragmento que é efetivamente presente na membrana do merozoíto. O ponto de clivagem em MSP-6 do tipo K1 ainda não é conhecido (Pearce et al., 2004). Na comparação entre as duas famílias alélicas, os 4 sítios dimórficos remanescentes em MSP-6₃₆ dão origem a 3 substituições radicais de aminoácidos, que podem causar um reconhecimento diferencial das duas formas alélicas pelas células do sistema imune. Essas substituições se encontram afastadas da provável região em que MSP-6₃₆ interage com MSP-1₃₈ (Kauth et al., 2006), e constituem um objeto de estudo interessante na procura de peptídeos que desenvolvam uma resposta imune protetora

5.7 Evolução do dimorfismo alélico em MSP-6

O seqüenciamento do gene ortólogo de *msh-6* em *P. reichenowi* foi realizado para permitir o estudo da evolução do dimorfismo alélico nesse gene. Nas regiões amino e carboxila terminais, o gene de *P. reichenowi* demonstra ser igualmente distante dos alelos de *msh-6* em *P. falciparum*, embora a divergência da região C-terminal pareça ser mais antiga, dado o maior acúmulo de diferenças (Tabela 4).

O alinhamento da região dimórfica das amostras de *P. falciparum* mostra uma maior semelhança entre os alelos de tipo K1 com o gene de *P. reichenowi* na porção N-terminal, incluindo a presença dos três *indels* (Figura 12). No domínio C-terminal da região dimórfica, *msh-6* de *P. reichenowi* apresenta similaridades com os dois tipos alélicos de *msh-6* de *P. falciparum*. Isso sugere que diferentes regiões desse gene apresentam histórias evolutivas diferentes. Uma possível hipótese conciliadora desses dados seria que as duas formas alélicas hoje presentes teriam se originado de uma população ancestral polimórfica (Figura 15).

Os diferentes tempos de divergência podem refletir a criação do tipo alélico 3D7 a partir de dois alelos não mais existentes, que divergiram do tipo alélico K1 em tempos diferentes: um coincidentemente com o tempo de especiação e o outro significativamente antes (Figura 7). Nesse caso, o dimorfismo atual representaria uma diminuição na diversidade alélica de uma população ancestral. Essa é uma inferência interessante, considerando-se que as origens do dimorfismo alélico ainda são desconhecidas.

As razões pelas quais esses outros alelos teriam sido perdidos não são claras. Rich et al. (1998) sugeriram que as populações atuais de *P. falciparum* seriam provenientes de um único ancestral, sobrevivente de um severo gargalo populacional ocorrido em um período recente de tempo. Essa hipótese, que foi posteriormente questionada (Hughes e Verra, 1998), explicaria a ocorrência de um número limitado de alelos para determinados genes, mas não o porquê de somente duas famílias de alelos persistirem na população (Roy et al., 2008).

Figura 15. Uma hipótese para a história da região dimórfica de *msp-6* de *P. falciparum*. O atual tipo alélico 3D7 pode ter sido criado por um raro evento de recombinação entre dois alelos ancestrais (atualmente extintos) (Roy et al., a ser submetido).

A limitação de dados disponíveis, inclusive a falta de outras seqüências do gene ortólogo de *msp-6* de *P. reichenowi*, e a possibilidade de que as taxas de substituição de nucleotídeos ao longo do gene não sejam as mesmas, impedem que conclusões mais sólidas sejam obtidas a partir dos dados até o momento disponível. A disponibilização de outras seqüências de *P. reichenowi*, assim como a possibilidade da identificação de casos similares em outras espécies de *Plasmodium* pertencentes a clados proximamente relacionados com *P. falciparum* - *P. reichenowi*, podem auxiliar no esclarecimento da questão da evolução do dimorfismo alélico.

A ocorrência de dimorfismo alélico em proteínas de membrana de parasitos parece, até o momento, estar restrita a *P. falciparum*. Sua ocorrência já foi sugerida em proteínas de membrana de *P. vivax* (Han et al., 2004; Prajapati et al., 2006) e existe a possibilidade de que ocorra em MSP-1 de *P. cynomolgi* (Tanabe et al., 2007b), porém mais isolados de parasitos dessas espécies devem ser seqüenciados para que essa suspeita possa ser confirmada. Adicionalmente, seria recomendado uma análise mais ampla desses genes em outras espécies, visto que a maior parte dos estudos relacionados a polimorfismos em proteínas de membranas ocorre em parasitos de humanos, principalmente *P. falciparum* e *P. vivax*.

6 CONCLUSÕES

- 1- O dimorfismo alélico em *msh-6* foi confirmado a partir do seqüenciamento de isolados obtidos no Brasil e na Tanzânia.
- 2- As duas formas alélicas desse gene estão mundialmente distribuídas.
- 3- O gene *msh-6* apresenta níveis muito baixos de diversidade nucleotídica intra-famílias, o que o qualifica como potencial alvo em estudos de uma vacina contra malária.
- 4- O dimorfismo em *msh-6* pode ter se originado de uma população polimórfica ancestral, sendo que os demais alelos não se encontram mais presentes na população atual de parasitos.

REFERÊNCIAS*

Barillas-Mury C, Kumar S. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. Cell Microbiol. 2005;7(11):1539-45.

Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. J Exp Med. 1994; 180(1):389-93.

Camargo EP. Malaria, maleita, paludismo. Cienc. Cult. 2003;55(1):26-32.

Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 May;101(3):229-37.

Da Silveira LA, Dorta MI, Kimura EA, Katzin AM, Kawamoto F, Tanabe K, Ferreira MU. Allelic diversity and antibody recognition of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 during hypoendemic malaria transmission in the Brazilian amazon region. Infect Immun. 1999;67(11):5906-5916.

D'Alessandro U, Leach A, Drakeley CJ, Bennett S, Olaleye BO, Fegan GW, Jawara M, Langerock P, George MO, Mellville OG, Targett GA, Greenwood BM. Efficacy trial of malaria vaccine SPf66 in Gambian infants. Lancet. 1995;346(8973):462-7.

Dzikowski R, Templeton TJ, Deitsch K. Variant antigen gene expression in malaria. Cell Microbiol. 2006;8(9):1371-81.

Escalante AA, Ayala FJ. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium* derived from rRNA gene sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91(24):11373-11377.

Escalante AA, Barrio E, Ayala FJ. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. Mol Biol Evol. 1995;12(4):616-26.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. c2003 – [updated 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome *b* from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):8124-8129.

Felger I, Marshal VM, Reeder JC, Hunt JA, Mgone CS, Beck HP. Sequence diversity and molecular evolution of the merozoite surface antigen 2 of *Plasmodium falciparum*. *J Mol Evol*. 1997;45(2):154-60.

Ferreira Mu, Liu Q, Kimura M, Ndawi BT, Tanabe K, Kawamoto F. Allelic diversity in the merozoite surface protein-1 and epidemiology of multiple-clone *Plasmodium falciparum* infections in northern Tanzania. *J Parasitol*. 1998a;84(6):1286-1289.

Ferreira MU, Liu Q, Kaneko O, Kimura M, Tanabe K, Kimura EA, Katzin AM, Isomura S, Kawamoto F. Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the southwestern Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 1998b;59:474-80.

Ferreira MU, Ribeiro WL, Tonon AP, Kawamoto F, Rich SM. Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. *Gene*. 2003;304:65-75

Ferreira MU, da Silva Nunes M, Wunderlich G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(6):987-995.

Ferreira MU, Hartl DL. *Plasmodium falciparum*: Worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2). *Exp Parasitol*. 2007;115(1):32-40

Frevert U. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol*. 2004;20:417-24.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* *Nature*. 2002;419(6906):498-511.

Garnham PCC. Malaria parasites and other haemosporidia. Oxford, Inglaterra: Blackwell Scientific Publications; 1966. p. 60-85.

Gaur D, Mayer DC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. Int J Parasitol. 2004;34(13-14):1413-1429.

Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders RF, Saul A, Rare L, Baisor M, Lorry K, Brown GV, Pye D, Irving DO, Smith TA, Beck HP, Alpers MP. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. J Infect Dis. 2002;185(6):820-827

Goel VK, Li X, Chen H, Liu SC, Chishti AH, Oh SS. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(9):5164-5169.

Graur D, Li W. Fundamentals of Molecular Evolution. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2000. p. 67-98.

Guerra CA, Gikandi PW, Tatem AJ, Noor AM, Smith DL, Hay SI, Snow RW. The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. PLoS Med. 2008;5(2):300-311.

Han ET, Song TE, Park JH, Shin EH, Guk SM, Kim TY, Chai JY. Allelic dimorphism in the merozoite surface protein-3alpha in Korean isolates of *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg. 2004;71(6):745-749.

Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, McCallum-Deighton N, Shai S. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87 Suppl 3:37-42.

Hughes AL, Nei M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. Nature. 1988;335(6186):167-170.

Hughes AL. Positive selection and interallelic recombination at the merozoite surface antigen-1 (MSA-1) locus of *Plasmodium falciparum*. Mol Biol Evol. 1992;9(3):381-393.

Hughes MK, Hughes AL. Natural selection on *Plasmodium* surface proteins. Mol Biochem Parasitol. 1995;71(1):99-113.

Hughes AL, Verra F. Ancient polymorphism and the hypothesis of a recent bottleneck in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Genetics. 1998;150(1):511-513.

Jeffares, D.C., Pain, A., Berry, A., Cox, A.V., Stalker, J., Ingle, C.E., Thomas, A., Quail, M.A., Siebenthall, K., Uhlemann, A.C., Kyes, S., Krishna, S., Newbold, C., Dermitzakis, E.T., Berriman, M. Genome variation and evolution of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nat Genet. 2007;39(1):120-125.

Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, Allison JB, editors. Mammalian protein metabolism. New York: Academic Press; 1969. p. 21-132.

Kariuki MM, Li X, Yamodo I, Chishti AH, Oh SS. Two *Plasmodium falciparum* merozoite proteins binding to erythrocyte band 3 form a direct complex. Biochem Biophys Res Commun. 2005;338(4):1690-1695.

Kauth CW, Woehlbier U, Kern M, Mekonnen Z, Lutz R, Mucke N, Langowski J, Bujard H. Interactions between merozoite surface proteins 1, 6 and 7 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem. 2006;281(42):31517-31527

Lee EA, Flanagan KL, Minigo G, Reece WH, Bailey R, Pinder M, Hill AV, Plebanski M. Dimorphic *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 epitopes turn off memory T cells and interfere with T cell priming. Eur J Immunol. 2006;36(5):1168-1178.

Levine ND. The Protozoan Phylum Apicomplexa. Boca Raton, Flórida: CRC Press; 1988. p. 1-8.

Machado RL, Pova MM, Calvosa VS, Ferreira MU, Rossit AR, dos Santos EJ, Conway DJ. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. J Infect Dis. 2004;190(9):1547-1555.

Mackintosh CL, Beeson JG, Marsh K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. Trends Parasitol. 2004;20(12):597-603.

Marsh K. Immunology of malaria. In: Warrell DA, Gilles HM, editors. Essential Malariology. 4th. Ed. New York: Arnold Publishers; 2002. p. 252-267.

Matuschewski K, Mueller A. Vaccines against malaria – an update. FEBS J. 2007;274(18):4680-4687.

McBride JS, Heidrich HG. Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. Mol Biochem Parasitol. 1987;23(1):71-84.

McCutchan TF, Li J, Mcconkey GA, Rogers MJ, Waters AP. The cytoplasmic ribosomal RNAs of Plasmodium spp. Parasitol Today. 1995;11(4):134-138

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf. 2005 [2008 Jun 23].

Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Malária do Brasil, Ano de 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/folder_malaria_2006_web.pdf. [2008 Jun 11].

Ministério da Saúde. Sistema de Informações Gerenciais – SIG – Malária - http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria/TAB99449:tab_resumo_n?Ano_n=2007 [2008 Jun 26].

Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press; 1987. p. 255-286.

Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Mol Biol Evol. 1986;3(5):418-426.

Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. New York: Oxford University Press; 2000. p. 55.

O'donnell RA, Saul A, Cowman AF, Crabb BS. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-1₁₉ across distantly related *Plasmodium* species. Nat Med. 2000;6:91-95.

Organização Mundial de Saúde – World Malaria Report 2005, Section I: Global malaria situation. Disponível em: <http://rbm.who.int/wmr2005/pdf/section1.pdf> [2008 Jun 11].

Pachebat JA, Kadekoppala M, Grainger M, Dluzewski AR, Gunaratne RS, Scott-Finnigan TJ, Ogun SA, Ling IT, Bannister LH, Taylor HM, Mitchell GH, Holder AA. Extensive proteolytic processing of the malaria parasite merozoite surface protein 7 during biosynthesis and parasite release from erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;151(1):59-69.

Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P, Tascon R, Franco A, Murillo LA, Ponton G, Trujillo G. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 1988;332(6160):158-161.

Pearce JA, Triglia T, Hodder AN, Jackson DC, Cowman AF, Anders RF. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 6 is a dimorphic antigen. *Infect Immun*. 2004;72(4):2321-2328.

Perkins SL, Schall JJ. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J Parasitol*. 2002;88(5):972-978.

Polley SD, Weedall GD, Thomas AW, Golightly LM, Conway DJ. Orthologous gene sequences of merozoite surface protein 1 (MSP1) from *Plasmodium reichenowi* and *P. gallinaceum* confirm an ancient divergence of *P. falciparum* alleles. *Mol Biochem Parasitol*. 2005;142(1):25-31

Polley SD, Tetteh KK, Lloyd JM, Akpogheneta OJ, Greenwood BM, Bojang KA, Conway DJ. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection. *J Infect Dis*. 2007;195(2):279-287.

Prajapati SK, Verma A, Adak T, Yadav RS, Kumar A, Eapen A, Das MK, Singh N, Sharma SK, Rizvi MA, Dash AP, Joshi H. Allelic dimorphism of *Plasmodium vivax* gam-1 in the Indian subcontinent. *Malar J*. 2006;5:90

Rich SM, Licht MC, Hudson RR, Ayala FJ. Malaria's Eve: evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4425-4430.

Rich SM, Ayala FJ. Population structure and recent evolution of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(13):6994-7001.

Rich SM, Ayala FJ. Progress in malaria research: the case for phylogenetics. *Adv Parasitol*. 2003;54: 255-280.

Richman A. Evolution of balanced genetic polymorphism. *Mol Ecol*. 2000;9(12):1953-1963.

Roy SW, Ferreira MU, Hartl DL. Evolution of allelic dimorphism in malarial surface antigens. *Heredity*. 2008;100(2):103-110.

Rozas J, Sanchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003;19(18):2496-2497.

Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406-425.

Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(9):722-735 .

Silva NS, Silveira La, Machado RL, Pova MM, Ferreira MU. Temporal and spatial distribution of the variants of merozoite surface protein-1 (MSP-1) in *Plasmodium falciparum* populations in Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000;94(7):675-688.

Sinden RE, Gilles HM. The malaria parasites. In: Warrell DA, Gilles HM, editors. *Essential Malariology*. 4th. Ed. New York: Arnold Publishers; 2002. p. 8-34.

Singh S, Soe S, Roussilhon C, Corradin G, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 6 displays multiple targets for naturally occurring antibodies that mediate monocyte-dependent parasite killing. *Infect Immun*. 2005;73(2):1235-1238.

Smythe JA, Coppel RL, Day KP, Martin RK, Oduola AM, Kemp DJ, Anders RF. Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(5):1751-1755.

Snegin VA, Herrera M, Sanchez G, Scherf A, Langsley G, Herrera S. Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in *Plasmodium falciparum* wild isolates from Colombia. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;49(2):265-275.

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005;434(7030):214-217.

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;313(5791):1287-1290.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24(8):1596-1599.

Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol*. 1987;195(2):273-287.

Tanabe K, Sakihama N, Hattori T, Ranford-Cartwright L, Goldman I, Escalante AA, Lal AA. Genetic distance in housekeeping genes between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium reichenowi* and within *P. falciparum*. *J Mol Evol*. 2004;59(5):687-94.

Tanabe K, Sakihama N, Walliker D, Babiker H, Abdel-Muhsin Am, Bakote'e B, Ohmae H, Arisue N, Horii T, Rooth I, Färnert A, Björkman A, Ranford-Cartwright L. Allelic dimorphism-associated restriction of recombination in *Plasmodium falciparum* *msp1*. *Gene*. 2007a;397(1-2):153-160

Tanabe K, Escalante A, Sakihama N, Honda M, Arisue N, Horii T, Culleton R, Hayakawa T, Hashimoto T, Longacre S, Pathirana S, Handunnetti S, Kishino H. Recent independent evolution of *msp1* polymorphism in *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*. 2007b;156(1):74-9.

Taylor WR. The classification of amino acid conservation. *J Theor Biol*. 1986;119(2):205-218.

Troye-Blomberg M, Weidanz WP, Van Der Heyde H. The role of T cells in immunity to malaria and the pathogenesis of disease. In: Wahlgren M, Perlmann P, editors. *Malaria: Molecular and Clinical Aspects*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 1999. p. 403-438.

Trucco C, Fernandez-Reyes D, Howell S, Stafford WH, Scott-Finnigan TJ, Grainger M, Ogun SA, Taylor WR, Holder AA. The merozoite surface protein 6 gene codes for a 36 kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;112(1):91-101.

Tsuji M, Rodrigues EG, Nussenzweig S. Progress toward a malaria vaccine: efficient induction of protective anti-malaria immunity. *Biol Chem*. 2001;382(4):553-70

Volkman SK, Sabeti PC, DeCaprio D, Neafsey DE, Schaffner SF, Milner DA Jr, Daily JP, Sarr O, Ndiaye D, Ndir O, Mboup S, Duraisingh MT, Lukens A, Derr A, Stange-Thomann N, Waggoner S, Onofrio R, Ziaugra L, Mauceli E, Gnerre S, Jaffe DB, Zainoun J, Wiegand RC, Birren BW, Hartl DL, Galagan JE, Lander ES, Wirth DF. A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. Nat Genet. 2007;39(1):113-9.

Wahlgreen M, Barragan A, Chen Q, Fernandez V, Hagblom P, Heddini A, Schlichtherle M, Scholander C, Sundström A, Treutiger CJ, Von Euler, Carlson J. Rosetting of malaria infected erythrocytes: ligands, host receptors and the involvement of serum proteins. In: Sherman IW, editor. Malaria: Parasite biology, pathogenesis and protection. Washington, D.C.: ASM Press; 1998. p. 387-398.

Wang L, Crouch L, Richie TL, Nhan DH, Coppel RL. Naturally acquired antibody responses to the components of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 complex. Parasite Immunol. 2003;25(8-9):403-12.

Warrel DA. Clinical features of malaria. In: Warrell DA, Gilles HM, editors. Essential Malariology. 4th. Ed. New York: Arnold Publishers; 2002. p. 191-205.

Waters AP, Higgins DG, McCutchan TF. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88(8): 3140-3144.

Weedall G. Applications of molecular evolutionary analyses of *Plasmodium* genomes to detect genes under natural selection [Ph D Thesis (Biology)]. London: Department of Infectious and Tropical Diseases; London School of Hygiene and Tropical Medicine; 2008.

Zavala F, Tam JP, Hollingdale MR, Cochrane AH, Quakyi I, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. Science. 1985;228(4706):1436-1440

ANEXO A – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE *msp-6*

As seqüências acima da linha tracejada são do tipo 3D7, e as abaixo são do tipo K1. Os sítios dimórficos, com exceção dos *indels*, estão marcados em vermelho claro. A origem das amostras está indicada no Quadro 4, com exceção das amostras 106, 54 e ICBIII, que são provenientes de Rondônia.

3D7	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
D10	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
NHC-1	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
IT	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
NF7	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
T9/96	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
32	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
B3	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
DE28	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
HB3	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
04	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
7G8	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
42	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
BA24	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
PC17	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
B1	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
106	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
59	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
54	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
45	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
27	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
-----	-----	-----
06	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
20	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
134	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
608	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
MC	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
D2	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
62	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
W2mef	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
B2	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
B7	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
ICBIII	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
K1	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
IC	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
Dd2	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60

3D7	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
D10	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
NHC-1	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
IT	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
NF7	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
T9/96	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
32	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
B3	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
DE28	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
HB3	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
04	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
7G8	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
42	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
BA24	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
PC17	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
B1	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
106	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
59	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
54	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
45	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
27	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120

06	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACTATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
20	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACTATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
134	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACTATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
608	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACTATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
MC	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
D2	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
62	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
W2mef	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
B2	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
B7	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
ICBIII	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
K1	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
IC	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
Dd2	AATAACTTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120

3D7	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
D10	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
NHC-1	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
ITC	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
NF7	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
T9/96	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
32	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
B3	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
DE28	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
HB3	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
04	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
7G8	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
42	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
BA24	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
PC17	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
B1	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
106	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
59	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
54	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
45	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
27	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
-----	-----	-----
06	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
20	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
134	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
608	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
MC	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
D2	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
62	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
W2mef	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
B2	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
B7	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
ICBIII	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
K1	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
IC	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
Dd2	GAA AATAGTATTACGAACTCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT	240
	*****	*****

3D7	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
D10	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
NHC-1	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
IT	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
NF7	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
T9/96	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
32	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
B3	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
DE28	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
HB3	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
04	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
7G8	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
42	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
BA24	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
PC17	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
B1	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
106	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
59	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
54	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
45	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342
27	ATTCTTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGA---	342

06	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
20	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
134	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
608	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
MC	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
D2	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
62	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
W2mef	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
B2	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
B7	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
ICBIII	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
K1	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
IC	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360
Dd2	ATTCTTTTTCTGGTTCTGATATACAGGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAAGA	360

3D7	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
D10	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
NHC-1	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
IT	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
NF7	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
T9/96	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
32	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
B3	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
DE28	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
HB3	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
04	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
7G8	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
42	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
BA24	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
PC17	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
B1	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
106	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
59	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
54	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
45	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375
27	-----GGAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAACAA-----	375

06	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
20	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
134	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
608	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
MC	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
D2	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
62	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
W2mef	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
B2	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
B7	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
ICBIII	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
K1	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
IC	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGGA	420
Dd2	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATACGTGAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGT---	417

3D7	-----	
D10	-----	
NHC-1	-----	
IT	-----	
NF7	-----	
T9/96	-----	
32	-----	
B3	-----	
DE28	-----	
HB3	-----	
04	-----	
7G8	-----	
42	-----	
BA24	-----	
PC17	-----	
B1	-----	
106	-----	
59	-----	
54	-----	
45	-----	
27	-----	
<hr/>		
06	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
20	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
134	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
608	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
MC	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
D2	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
62	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
W2mef	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
B2	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
B7	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
ICBIII	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
K1	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
IC	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
Dd2	-----	

3D7	-----	
D10	-----	
NHC-1	-----	
IT	-----	
NF7	-----	
T9/96	-----	
32	-----	
B3	-----	
DE28	-----	
HB3	-----	
04	-----	
7G8	-----	
42	-----	
BA24	-----	
PC17	-----	
B1	-----	
106	-----	
59	-----	
54	-----	
45	-----	
27	-----	
<hr/>		
06	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
20	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
134	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
608	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
MC	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
D2	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
62	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
W2mef	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
B2	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
B7	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
ICBIII	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
K1	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
IC	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
Dd2	-----	

3D7	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
D10	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
NHC-1	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
IT	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
NF7	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
T9/96	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
32	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
B3	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
DE28	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
HB3	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
04	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
7G8	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
42	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
BA24	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
PC17	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
B1	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
106	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
59	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
54	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
45	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432
27	---AGTGGAGAAAAATCAATATATACTGTTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGGAGCAAAAT	432

06	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
20	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
134	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
608	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
MC	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
D2	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
62	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
W2mef	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
B2	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
B7	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
ICBIII	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
K1	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
IC	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	600
Dd2	GAAAGTGGAGAAAAATCACCATATTGTTTACAACAGACCAAATACTCAAACCGGAGCAAAA	477

3D7	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
D10	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
NHC-1	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
IT	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
NF7	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
T9/96	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
32	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
B3	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
DE28	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
HB3	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
04	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
7G8	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
42	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
BA24	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
PC17	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
B1	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
106	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
59	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
54	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
45	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552
27	AAAAATCCTACTTCTCATAGTAATAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	552

06	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
20	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
134	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
608	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
MC	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
D2	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
62	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
W2mef	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
B2	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
B7	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
ICBIII	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
K1	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
IC	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	720
Dd2	AAAAATCCTACTTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTTCTCTGAATAATAATATACTTGG	597

3D7	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
D10	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
NHC-1	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
IT	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
NF7	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
T9/96	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
32	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
B3	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
DE28	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
HB3	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
04	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
7G8	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
42	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
BA24	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
PC17	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
B1	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
106	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
59	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
54	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
45	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
27	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672

06	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
20	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
134	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
608	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
MC	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
D2	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
62	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
W2mef	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
B2	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
B7	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
ICBIII	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
K1	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
IC	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
Dd2	TTACTAGAACAAATAAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	717

3D7	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
D10	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
NHC-1	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
IT	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
NF7	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
T9/96	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
32	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
B3	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
DE28	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
HB3	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
04	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
7G8	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
42	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
BA24	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
PC17	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
B1	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
106	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
59	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
54	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
45	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786
27	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	786

06	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
20	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
134	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
608	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
MC	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	960
D2	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
62	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
W2mef	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
B2	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
B7	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
ICBIII	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
K1	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
IC	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	954
Dd2	ACAGAAACAGAAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAA	831

3D7	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
D10	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
NHC-1	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
IT	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
NF7	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
T9/96	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
32	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
B3	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
DE28	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
HB3	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
04	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
7G8	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
42	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
BA24	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
PC17	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
B1	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
106	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
59	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
54	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
45	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
27	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	906
<hr/>		
06	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
20	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
134	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
608	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
MC	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1080
D2	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
62	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
W2mef	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
B2	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
B7	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
ICBIII	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
K1	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
IC	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	1074
Dd2	GAAGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAAGGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAAT	951

S3D7	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
D10	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
NHC-1	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
IT	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
NF7	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
T9/96	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
32	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
B3	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
DE28	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
HB3	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
04	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
7G8	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
42	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
BA24	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
PC17	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
B1	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
106	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
59	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
54	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
45	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
27	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1026
<hr/>		
06	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
20	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
134	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
608	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
MC	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1200
D2	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
62	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
W2mef	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
B2	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
B7	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
ICBIII	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
K1	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
IC	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1194
Dd2	TCTAATAAGAAATAAAAAAGAAATGATGAAACAAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAAAACA	1071

3D7	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
D10	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
NHC-1	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
IT	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
NF7	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
T9/96	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
32	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
B3	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
DE28	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
HB3	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
04	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
7G8	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
42	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
BA24	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
PC17	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
B1	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
106	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
59	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
54	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
45	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
27	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113

06	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
20	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
134	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
608	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
MC	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1287
D2	GAAATGATCTATCTATTTAGTAATAAT	1281
62	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
W2mef	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
B2	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
B7	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
ICBIII	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
K1	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
IC	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
Dd2	GAAATGATCCATCTATTTAGTAATAAT	1158

ANEXO B – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS REPRESENTATIVAS DOS ALELOS DE *msp-6* DE *P. falciparum* COM O GENE ORTÓLOGO EM *P. reichenowi*

K1	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
3D7	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60
Preich	ATGAATAAGATTTATAATATTACTTTTCTTTTCATTCCTTTTAAACTTATATATAAATGAA	60

K1	AATAACTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
3D7	AATAACTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120
Preich	AATAACTTTATCAGAAATGAACCTTATAAACGAAAAAAACCATAATTTAAGAAATGGTTCA	120

K1	ATGTATAATAACGATAAAATATTAAGTAAAAATGAAGTAGATACTAATATAGAAAGTAAC	180
3D7	ATGTATAATAACGATAAAATATTAAGTAAAAATGAAGTAGATACTAATATAGAAAGTAAC	180
Preich	ATATATAATAACGATAAAATATTAAGTAAAAATGAAGTAGATACTAATATAGAAAGTAAT	180
	** *****	
K1	GAAAATAGTATTCACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAAGCTAAT	240
3D7	GAAAATAGTATTCACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAAGCTAAT	240
Preich	GAAAATAGTATTCACGAATCTGGACATAAGATTGAGGGGAAGAAGTTTCAAAGCTAAT	240
	***** *****	
K1	CAAGAACAAGCTAATGTAGAAGATATAACATACAAAAAATGTTGATGATTAGAA	300
3D7	-----GTAGATGATATAACATACAAAAAATGTTGATGATTAGAA	285
Preich	CAAGAACAACCTAATGTAGAAGATATAACATACAAAAAAGATGTTGCTGATTAGAA	300
	***** *****	
K1	ATTCCTTTTCTGGTTCGTATATACAGGCAACATATCAATTTCTCTACACCAGGAAGA	360
3D7	ATTCCTTTTCTGGTTCGTATATACAGGCAACATATCAATTTCTCTACATCAGGA---	342
Preich	ATTCCTTTTCTGGTTCGTATATACAGGGAACATATCAATTTCTCTGTAACAGGAAGA	360
	***** ***** * ***** ** *	
K1	ATTATAAATCCTCGTACTGGAGGAAATCTGTAATTCACCTCCTAGAAGACTAAGTGA	420
3D7	-----GGAAATAATGTAATTCACCTCCTATAAAAC-----	373
Preich	ATTACAAATCCTCGTACTGGAGGAAATCTGTAATTCACCTCCTAGTAGACTAAGTGA	420
	***** * ***** * **	
K1	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCACATGTATTACATCTTCTAATCAATCACATCCTCAAAGA	480
3D7	-----	
Preich	CTAGAAGGTGTTTCTTATCCATTGTATATACATCTTCTAATCAACCACGTCCTCAAAGA	480
K1	GCCAACATCGGAGGAATATCCCATTTATCAGGGACACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
3D7	-----	
Preich	GCCAACATCGGAGGCATATCCCATTTATCAGGGATACGTGGAATTCATACTTATTCAGGT	540
K1	GAAAGTGGAGAAATCACCATATTGTTACAACCAGACCAAACTACTCAAAACCGAGCAAAA	600
3D7	-AAAGTGGAGAAATCAATATACTGTTACATCTATATCAGGTATTCAAAGGGAGCAAAAT	432
Preich	GAAAGTGGAGAAATCAACATATTGTTACATCCAGATCAAATACTCAAAACCGAGCAAAAT	600
	***** *** ***** * * * ** * *****	
K1	GGTTTAACTGGTGCAACAGAAAAAATTACACACGGTGCAAGAAACTCTGAACAAAT	660
3D7	GGTTTAACTGGTGCAACAGAAAAAATTACACAAGTTGTACAAGCAAACTCTGAACAAAT	492
Preich	GATTTAACTGGTGCAACACAAGAAATTACACAAGGTGAACAAGCAAGCTCTGAACAAAT	660
	* ***** ***** * * * ***** * * * *****	
K1	AAAAATCCTACTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTCTCTGAATAATAATATACTTGA	720
3D7	AAAAATCCTACTCTCTAGTAAAGTACTACAACCTCTCTGAATAATAATATACTTGA	552
Preich	AGAAATCCTACTCTGGTAGTAAAGTACTACAACCTCTCTGAATAATAATATACTTGGC	720
	* ***** * *****	

K1	TGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTCAAAATGGAGCTGCAGAAGATAAAAAGACAGAATAT	780
3D7	TGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTCAAAATGGAGCTGCAGAAGATAAAAAGACAGAATAT	612
Preich	TGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTCAAAATGGAGCTGCAGAAGATAAAAAGACAAATCAT	780
	***** * **	
K1	TTACTAGAACAAATAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840
3D7	TTACTAGAACAAATAAAAATTCATCATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAA	672
Preich	TTACTAGAACAAATAAAAATTCATCATGGGATAGAGATAACATCCCCGATGAGAATGAA	840

K1	CAAGTAAAGAGGACCCTCAAGAAGATAATAAAGATGAAGATGAAGATGAAGAAACAGAA	900
3D7	CAAGTAATAGAGGACCCTCAAGAAGATAATAAAGATGAAGATGAAGATGAAGAAACAGAA	732
Preich	CAAGTAATAGAGGACCCTCAAGAAGATAATAAATGACGAGGAAGAAACAGAAACAGAA	900
	***** ** *	
K1	ACAGAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAAGAAGAT	960
3D7	ACAGAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAAGAAGAT	792
Preich	ACAGAAAATTTGGAACAGAAAGATGATAATAATGAAGAGATAGAAGAAAATGAAGAAGAT	960

K1	GACATAGATGAAGAAAGTGTAGAAGAAAAGGAAGAAGAGGAAGAAAAAGGAAGAAGAA	1020
3D7	GACATAGATGAAGAAAGTGTAGAAGAAAAGGAAGAAGAGGAAGAAAAAGGAAGAAGAA	852
Preich	GATATAGATGAAGAAATTTGTAAGAAAACGAAGAAGATGACATAAATGATGAAGTGTA	1020
	** ***** ** *** * ** *	
K1	GAAAAAAGGAAGAAAAAAGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAATGAAGTT	1080
3D7	GAAAAAAGGAAGAAAAAAGAAGAAAAAACCAGACAATGAAATTACAAATGAAGTT	912
Preich	GAAGAAAAGGAAGAAAAACAGAAGAAAAA---CAGAAAATAAAATTACAAATGAAGTT	1077
	*** ***** **** * ***** *	
K1	AAAGAGGAACAAAAATATAGTTCACCAAGTGATATAAATGCCCAAATTTAATTTCTAAT	1140
3D7	AAAGAGGAACAAAAATATAGTTCACCAAGTGATATAAATGCCCAAATTTAATTTCTAAT	972
Preich	AAAGAGGAACAAAAGAATAATTCACCAAGTGATATAAATGCCCAAATTTAATTTCTAAT	1137
	***** ** *	
K1	AAGAATAAAAAGATGATGAAACAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAACATTGGTT	1200
3D7	AAGAATAAAAAGATGATGAAACAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAACATTGGTT	1032
Preich	AAGCATAAAAAGATGATGAAACAAAAAGACTGCTGAAAATATAGTTAAACATTGGTT	1197
	*** *****	
K1	GGATTATTTAATGAAAAAATGAGATAGATTCTACTATAAATAATTTAGTACAAGAAATG	1260
3D7	GGATTATTTAATGAAAAAATGAGATAGATTCTACTATAAATAATTTAGTACAAGAAATG	1092
Preich	GGATTATTCAGTGAAAAAATCAGATAGATTCTACTATAAATAATTTAGTACAAGAAATG	1257
	***** * *****	
K1	ATCCATCTATTTAGTAATAAT	1281
3D7	ATCCATCTATTTAGTAATAAT	1113
Preich	ATCCATCTATTTAGTAATAAT	1278