

LEIDIANE AMORIM SOARES GALVÃO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE MSP-1 DE *PLASMODIUM VIVAX* DE
PACIENTES ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DA
CIDADE MANAUS – AM**

Manaus

2010

LEIDIANE AMORIM SOARES GALVÃO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE MSP-1 DE *PLASMODIUM VIVAX* DE
PACIENTES ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DA
CIDADE MANAUS – AM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito avaliativo para a obtenção do título de Mestre em: Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia em área de concentração: Determinantes Bio-Sociais do processo saúde-doença na Amazônia.

Linha de Pesquisa: Biologia de Agentes infecciosos e parasitários

Orientador: Dr. Paulo Afonso Nogueira

Co-orientadora: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

Manaus

2010

LEDIANE AMORIM SOARES GALVÃO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE MSP-1 DE *PLASMODIUM VIVAX* DE
PACIENTES ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DA
CIDADE MANAUS – AM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito avaliativo para a obtenção do título de Mestre em: Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia em área de concentração: Determinantes Bio-Sociais do processo saúde-doença na Amazônia.

Linha de Pesquisa: Biologia de Agentes infecciosos e parasitários

Orientador: Dr. Paulo Afonso Nogueira

Co-orientadora: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

Banca Examinadora

Dr. Paulo Afonso Nogueira

Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ - AM

Dr. Felipe Naveca

Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ - AM

Dr. Danivaldo Vieira

Centro Universitário Uninilton-Lins – Manaus/AM

A Deus, meu alicerce, minha luz... meu rochedo nos momentos mais difíceis. Obrigada por estar sempre comigo e por me provar que com fé e coragem a gente chega a qualquer lugar que sonhar.

** * **

Ao meu esposo Lenilson Galvão Rocha, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos de minha vida, ele é a força que me motiva a não desistir de meus objetivos, mesmo quando são difíceis e complicados.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia – UFAM, CpqLMD, UFPA, pela oportunidade de realização dessa dissertação;
- A pessoa que me concedeu a oportunidade de entrar em um Mestrado, a essa pessoa que me estendeu a mão quando precisei lançando o convite para morar em Manaus e recomeçar; minha orientadora de Monografia, Co-orientadora de mestrado e futuramente orientadora de doutorado Dra. Patrícia Orlandi;
- Ao Dr. Paulo Nogueira, por ter me aceitado como orientanda, por ter intermediado oportunidades em congressos que participei durante o mestrado, pela paciência e pela confiança em minha competência profissional;
- Ao Mestre Luis André Mariúba, meu supervisor de mestrado, amigo, me ajudou muitas vezes quando precisei obrigada pela paciência em ensinar, pela disposição e boa vontade;
- A Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade e concessão de bolsa de estudos;
- A secretaria do Programa PPSSEA – SECA pela competência e disposição e dedicação;
- Ao Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane pelo fornecimento de materiais e infra-estrutura para o desenvolvimento desse estudo;
- Ao Dr. Marcus Vinícios Lacerda pela colaboração em relação às amostras de sangue dos pacientes positivos para malária, atendidos na Fundação de Medicina Tropical;
- A Dra. Silvana Paz da Fiocruz BA, pelo Sequenciamento das amostras;
- Ao laboratório de biotecnologia da UFAM, na pessoa do Prof. Dr. Spartaco Astolfi e a Mestranda Enedina Nogueira pela colaboração com equipamentos;
- Aos colegas de laboratório que muitas vezes me socorreram em alguns experimentos, em especial a Luciana, Davi, Yuri e Fernanda que colaboraram grandemente em momentos sufocantes com as purificações, géis e etc...;
- A meu marido Lenilson, por mais uma vez ter enfrentado e agüentado junto comigo os desafios que é um curso de formação superior, a cada etapa cumprida o crescimento pessoal e profissional com certeza é desfrutado não só por mim, mais por ele também que vivenciou e vivencia todos os momentos de minha carreira profissional;

- A toda família Amorim, família de fibra, coragem e com certeza uma família de vitórias; em especial aqueles que vivenciaram minha mudança à cidade de Manaus, me apoiaram e acreditam que tudo é possível;
- A minha mãe, pai e irmãos que são pessoas especiais para mim;
- A família Galvão Rocha que torcem por mim e sempre acreditam em dias melhores;
- Aos amigos verdadeiros que conquistei em Manaus;
- Aos colegas de Porto Velho que em Manaus se tornaram meus amigos, dividindo nossos rumores e nossos temores;
- Aos meus amigos queridos espalhados pelo Brasil;

A TODOS MUITO OBRIGADA!

*“Algo só é impossível até que alguém duvide
e acabe provando o contrário”*

Alberts Einstein

RESUMO

No Brasil a malária ao lado de leishmanioses está em processo de expansão. O seu controle total pela intervenção no seu ciclo biológico é difícil, não só pelas condições sócio-econômicas da população sob risco, mas porque envolvem elementos como insetos vetores cujo controle ou eliminação são racionalmente irrealizáveis. A vacina, portanto, é uma ferramenta que poderia contribuir efetivamente para esse controle. Um dos grandes problemas para o desenvolvimento da vacina é a diversidade antigênica das proteínas candidatas. Dentre as proteínas candidatas a vacina, a proteína 1 de superfície do *Plasmodium vivax* (pvMSP1) é uma forte candidata, já que possui um papel protetor espécie – específico. Em nosso estudo, realizamos a genotipagem de isolados de *Plasmodium vivax* através de Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento dos blocos polimórficos 2, 6 e 10 da pvMSP1 com o objetivo de analisar filogeneticamente através de análise computacional a estrutura gênica e a diversidade alélica de isolados de *P.vivax* circulantes no entorno de Manaus. Os isolados do bloco 2 mostraram ser blocos bastante polimórficos, porém, com características semelhantes, formando haplótipos diferentes. Em todos os blocos analisados, detectamos genótipos semelhantes às cepas encontradas no Brasil, bem como a cepas encontradas em outras regiões geográficas. O bloco 6 apresentou um perfil semelhante ao já descrito por estudos anteriores, sendo um bloco rico em glutamina que é um determinante de recombinação gênica entre cepas e pode ser determinante de cepas pertencentes ao genótipo Belém. O bloco 10 foi o bloco mais conservado do nosso estudo. Percebemos que esse bloco tem seqüências que não são conservadas apenas em nossa região, mas também em outras regiões geográficas, como é o caso de regiões da Ásia, por exemplo.

Palavras Chaves: MSP1, Malária, *Plasmodium vivax*

ABSTRACT

Malaria in Brazil, beside leishmaniasis disease, is under an expansion process. Its complete control through life cycle intervention is too difficult, not only by economic and social conditions of population under risk, but because it involves elements like the invertebral vector, which control or elimination are rationally unrealistic. A vaccine, therefore, is a tool which could effectiveness contributes to malaria control. One of the biggest problems on vaccine development is the antigenic diversity of candidates proteins. Among these candidates, “merozoite surface protein 1” (pvMSP1) of *Plasmodium vivax* is a strong one, since it has a protector role (specie-specific). In this study, we made a genotyping of *P. vivax* isolates using polymerase chain reaction (PCR) and sequencing the polymorphic blocks 2, 6 and 10 of pvMSP1, with the goal to analyze (using phylogenetic tools) the genetic structure and allelic diversity of *P. vivax* from periphery Manaus-AM, Brazil. The isolates of block 2 shown to be very polymorphic, although having similar characteristics, they formed different haplotypes. On each block analyzed, we detected genotypes similar to others clones found in Brazil, likewise clones found in other regions of the globe. The block 6 shown results similar to previous studies, being a glutamine rich block. It's a characteristic which lead to genomic recombination between clones and could be a key region to determine clones that belong to Belem genotype. The block 10 was the most conserved one of our study. We realized that block 10 has sequences not only conserved in our region, but in other regions of the globe too, like Asia, for example.

Key words: MSP1; Malaria; *Plasmodium vivax*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica e endemicidade da malária no mundo.

Figura 2: Mapa esquemático, mostrando a distribuição da incidência parasitária de malária anual no Brasil.

Figura 3: Ciclo de vida da malária.

Figura 4: Herança de genes cromossômicos em parasitas da malária.

Figura 5: Método para analisar os cruzamentos entre os clones de parasitas da malária.

Figura 6: Processamento MSP1.

Figura 7: Amostras positivas no PCR bloco 2 com fragmentos com tamanhos 473 a 515 PB.

Figura 8: Amostras positivas no PCR bloco 6 com fragmentos com tamanhos 470 a 515 PB.

Figura 9 e 10: Amostras positivas no PCR bloco 10 com fragmentos com tamanhos 500 a 615 PB.

Figura 11: Identidade das seqüências do bloco 2 dos isolados deste estudo com seqüência disponibilizadas no genbank.

Figura 12a: Alinhamento dos isolados do bloco 2 com isolados oriundos do genbank.

Figura 12b: Alinhamento dos isolados do bloco 2 com isolados oriundos do genbank

Figura 13: Cladograma referente ao alinhamento entre bloco 2 e seqüências disponibilizadas no genbank

Figura 14: Seqüência peptídica SDENAKRGGQSTN conservada em alguns isolados.

Figura 15: Recombinação na seqüência PAPAAPSSTNANYEAKKIIYQAIYNGI.

Figura 16: Recombinação ISDENAKRGSQ SPAPAAPSSTNANYE.

Figura 17: Repetições de SSX, onde X refere-se a qualquer aminoácido.

Figura 18: Identidade das seqüências do bloco 2 dos isolados deste estudo com seqüências disponibilizadas no genbank.

Figura 19a: Alinhamento das seqüências do bloco 6 com seqüências do genbank

Figura 19 b: Alinhamento das seqüências do bloco 6 com seqüências do genbank

Figura 20: Cladograma entre seqüências do bloco 6 do gene MSP-1 com seqüências do genbank.

Figura 21: Identidade das seqüências do bloco 10 dos isolados deste estudo com seqüências disponibilizadas no genbank.

Figura 22: Alinhamento referente a seqüências dos isolados do bloco 10 do gene MSP1 associadas a seqüências do genbank.

Figura 23: Cladograma referente a seqüências do bloco 10 associadas com seqüências do geenbank

Figura 24: Percentual de identidade e divergência entre os isolados do bloco 2 associados com seqüências do genbank.

Figura 25: Percentual de identidade e divergência entre os isolados do bloco 6 associados com seqüências do genbank.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICOS

Gráfico 1: Amplificação por PCR Real Time com alvo para *P.vivax*

Gráfico 2: Distribuição das repetições dos produtos de PCR do bloco 2, 6, 10 nos isolados.

TABELAS

Tabela 1: Variação no tamanho dos fragmentos de bandas do bloco 2 do gene MSP1 visualizados em gel de agarose

Tabela 2: Variação no tamanho dos fragmentos de bandas do bloco 6 do gene MSP1 visualizados em gel de agarose.

Tabela 3: Variação no tamanho dos fragmentos de bandas do bloco 10 do gene MSP1 visualizados em gel de agarose.

Tabela 4: Isolados positivos comparados a negativos de acordo com a amplificação de cada bloco.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 A Malária no Mundo.....	17
1.2 Malária no Brasil.....	18
1.3 Aspectos Gerais da doença.....	20
1.4 Genes Polimórficos em <i>Plasmodium</i>	22
1.5 Recombinação Genética.....	23
1.6 Vacina contra a malária.....	28
1.7 Proteína de Superfície do Merozoíto.....	32
2. OBJETIVO	36
2.1 Objetivos Específicos.....	36
3. METODOLOGIA	38
3.1 População e Área de Estudo.....	38
3.2 Coleta e Considerações Éticas.....	38
3.3 Processamentos das Amostras e Extração de DNA.....	38
3.4 Primers e PCR.....	38
3.5 Purificações de amostras de DNA genômico em gel de agarose.....	39
3.6 Sequenciamento dos Produtos de PCR.....	39
3.7 Análises das Seqüências.....	39
4. RESULTADOS	41
4.1 Amostras do gene MSP1 com PCR positivo.....	41
4.2 Variações no tamanho dos fragmentos de bandas visualizados em gel de agarose.....	42

4.2.1 Bloco 2.....	42
4.2.2 Bloco 6.....	43
4.2.3 Bloco 10.....	44
4.3 Isolados positivos comparados a negativos de acordo com a amplificação de cada bloco.....	45
4.4 Análises das Seqüências.....	47
4.4.1 Bloco 2.....	47
4.4.2 Alinhamento entre seqüências do bloco 2 com seqüências disponibilizadas no genbank.....	47
4.4.3 Cladograma referente ao alinhamento entre bloco 2 e seqüências disponibilizadas no genbank.....	50
4.5 Recombinações de seqüências encontradas no bloco 2.....	51
4.5.1 Seqüência peptídica SDENAKRGGQSTN conservada em alguns isolados.....	51
4.5.2 Recombinação na seqüência PAPAPPSSTNANYEAKKIIYQAIYNGI.....	52
4.5.3 Seqüência contendo evidência de processo recombinatório LISDENAKRGSQ SPAPAAPSSTNANY.....	53
4.5.4 Repetições de SSX.....	54
4.6 Identidade das sequências do bloco 6 dos isolados deste estudo com sequências disponibilizadas no genbank.....	55
4.6.1 Alinhamento das sequências do bloco 6 com sequências do genbank.....	55
4.6.2 Cladograma da seqüência obtida através do seqüenciamento entre os isolados do bloco 6.....	58
4.7 Análises das seqüências do bloco 10 do gene MSP1.....	59
4.7.1 Identidade das seqüências do bloco 10 dos isolados deste estudo com seqüências disponibilizadas no genbank.....	59
4.7.2 Alinhamento referente a seqüências do bloco 10 associadas com seqüências do genbank.....	59

4.7.3 Cladograma referente a seqüências do bloco 10 associadas com seqüências do genbank.....	61
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
8. ANEXO.....	77

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 A malária no mundo

A Malária é a doença parasitária com maior número de internações e mortes por ano em todo o mundo, sendo um dos maiores problemas de saúde pública na África, América do Sul e Ásia Oriental, segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, 243 milhões de pessoas ficaram doentes em 2008 (WHO, 2009). Em geral os países que apresentam maior endemia são os países subdesenvolvidos.

A malária está distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde epidemias podem ocorrer em populações com pouca ou nenhuma imunidade, fatores naturais (tais como variações climáticas) ou ações humanas que modificam o meio ambiente (abertura de campos para agricultura, construção de barragens, mineração) aumentam a população dos mosquitos vetores da malária (Guerra *et al.*, 2006).

A transmissão da doença não ocorre de forma homogênea, havendo regiões com menor risco de infecção (regiões hipo-mesoendêmicas) e maior (hiper-holoendêmicas) (Figura 1). A grande divergência observada no estabelecimento da malária entre as diferentes regiões do mundo é resultado da variação da dinâmica de transmissão parasito-vetor-hospedeiro, que favorece ou limita a transmissão dos riscos da doença e morte (Brasil, 2006).

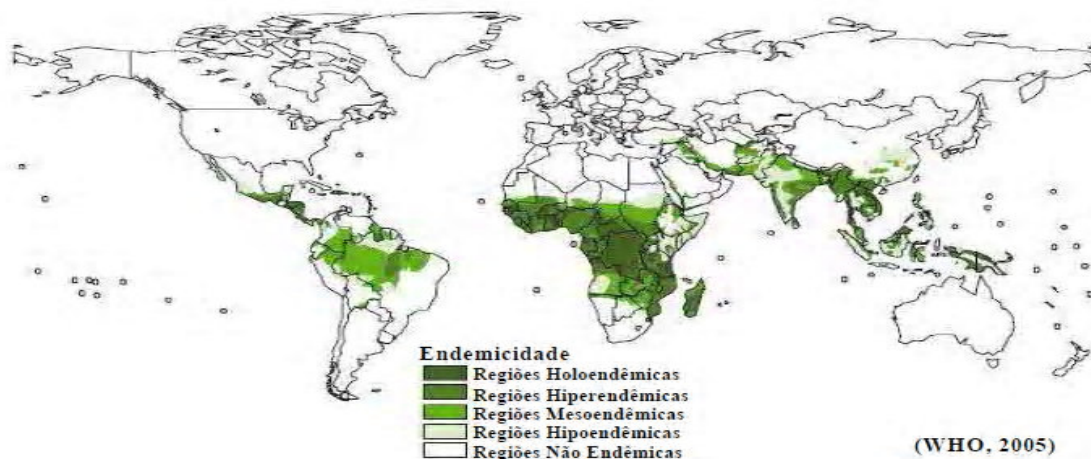


Figura 1: Distribuição geográfica e endemicidade da malária no Mundo.

Em localidades onde as condições são favoráveis à transmissão predomina a espécie mais virulenta, o *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), esta espécie está associada a mais de 95% dos casos de malária registrados anualmente em todo o mundo, sendo capaz de causar a forma grave da doença (WHO, 2005). O *P.falciparum* se restringe a determinadas regiões do globo, principalmente ao continente Africano. Nas áreas do continente Americano e Asiático o número de casos de malária pelo *Plasmodium falciparum* oscila entre 20 a 32% (WHO, 2005).

Com 35 milhões de casos anuais, o *Plasmodium vivax* (*P.vivax*) é o segundo maior patógeno responsável pela malária em humanos e a espécie de maior distribuição geográfica. Na América Central e México, quase 100% dos casos são causados por *P.vivax* (WHO., 2000), na região das Andinas, que abrange os países da Venezuela, Colômbia, Peru, Equador e Bolívia, quase 80% dos casos são causados por *P.vivax*.

Embora a “malária *vivax*” não apresente a mesma gravidade e mortalidade comparada a “malária *falciparum*”, ela possui uma alta morbidade e conseqüentemente um impacto econômico nas comunidades onde é endêmica (Herrera & Arévalo-Herrera.,2007). Estima-se que cada indivíduo residente em uma área mesoendêmica de *P.vivax* possa ter de 10 a 30 episódios de malária, durante a infância e vida adulta produtiva (Mendis *et al.*, 2001).

1.2 Malária no Brasil

No Brasil são encontrados três espécies do protozoário causador da malária, *P.vivax*, *P.malariae* e *P.falciparum*, noventa e nove por cento dos casos de malária são registrados anualmente na região da Amazônia legal, que é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão (DATASUS 2008).

De acordo com uma nova avaliação do Ministério da Saúde, os casos da doença notificados em 2008 totalizaram 309.419 registros, 32,4% menos que o acumulado em 2007, que chegou a 457.569 casos na

mesma região. Essa redução vem sendo resultado de um importante plano de intensificação das ações de controle de malária (PIACM) para a Amazônia legal, o qual foi implantado a partir do ano 2000, com o objetivo de reduzir a incidência da doença, evitando o surgimento de epidemias localizadas e reduzindo a gravidade das infecções com diagnóstico e tratamento precoce. As medidas priorizaram municípios com índice parasitário anual (IPA) maior que 49,9 (responsáveis por 80% dos casos da doença na região), além daqueles com prevalência de “malária *falciparum*” maior que 20% (DATASUS, 2008).

O risco de transmissão de malária na região da Amazônia legal pode ser estimado pelo IPA, esse índice baseia-se na determinação do número anual de casos por 1000 habitantes. A Figura 2 mostra as áreas classificadas para malária como de alto risco (mais de 100 casos/ 1000 Hab), médio risco (entre 1 e 100 casos /1000 Hab) e baixo (menos que 1 caso/ 1000 Hab) (Martinez- Spinosa *et al.*,2004).

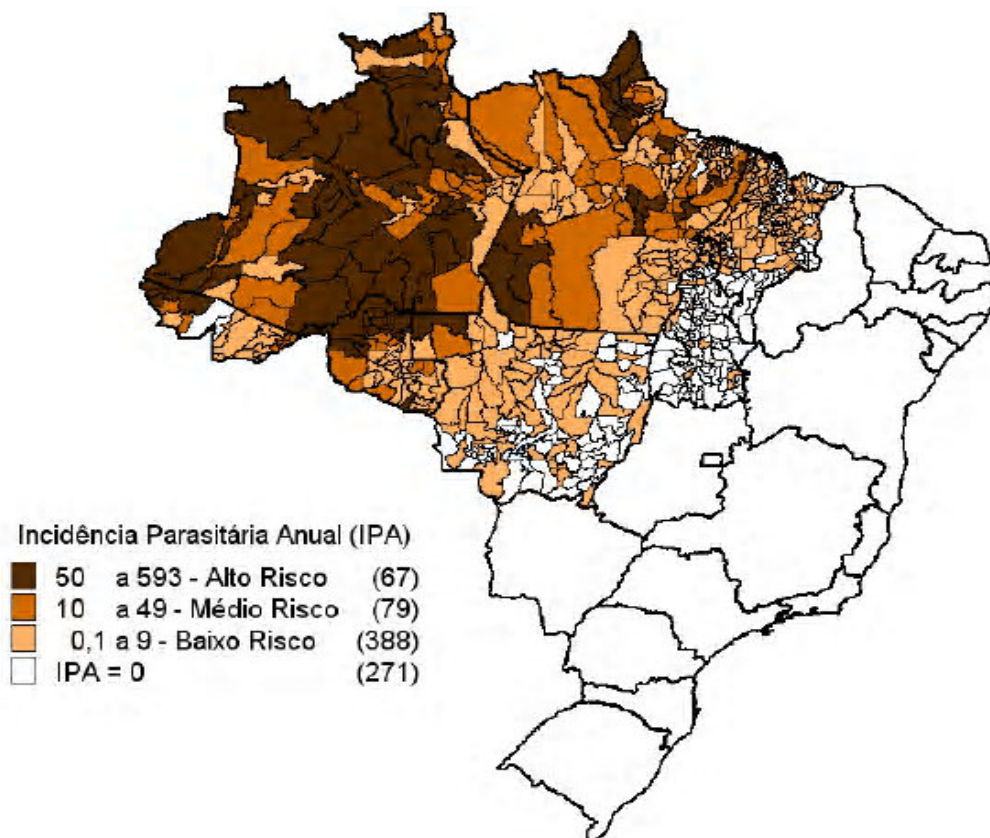


Figura 2: Mapa esquemático, mostrando a distribuição da incidência parasitária de malária anual no Brasil.

1.3 Aspectos Gerais da Doença

O ciclo eritrocítico do parasito é responsável pela patogenia e manifestações da doença que se caracterizam por padrões clínicos (paroxismo) tais como febre alta, calafrios, sudorese e cefaléia, como conseqüência da ruptura das hemácias infectadas com esquizontes e do processo inflamatório sistêmico decorrente do material oriundo desta ruptura.

De um modo geral, as formas clínicas mais graves são causadas por *P.falciparum*, onde o quadro clínico pode evoluir para formas de malária complicada, através de outros processos fisiopatológicos levando a malária cerebral, anemia, edemas, malária gestacional, insuficiência renal aguda dentre outras (Brasil, 2006).

O ciclo de vida da malária (Figura 3) é iniciado quando a fêmea de mosquito do gênero *Anopheles* exerce hematofagia em um hospedeiro humano, durante seu repasto sanguíneo, contendo formas sexuadas maduras denominadas gametócitos femininos e masculinos. No estômago do mosquito o gametócito masculino sofre exflagelação originando gametas masculinos ou microgametas, e o gametócito feminino sofre maturação formando gameta feminino ou macrogametas. O microgameta fertiliza o macrogameta e a fusão desses dois forma zigoto, que após tornar-se móvel é chamado oocineto. O oocineto fixa-se na parede do estômago, entre as células epiteliais, sendo denominado oocisto dentro deste formam-se muitos esporozoítos, que são as células alongadas e móveis com um núcleo central, que, após a liberação na cavidade corpórea do mosquito alcançam as glândulas salivares tornando-o infectivo. Quando o mosquito novamente, realiza o repasto sanguíneo, os esporozoítos são injetados na corrente circulatória. Após um tempo máximo de 30 minutos, os esporozoítos entram nos hepatócitos e iniciam o processo de divisão assexual conhecido como esquizogonia pré – eritrocítica. Após 12 a 15 dias os esquizontes rompem as células e liberam merozoítos na circulação (Perlmann & Troye Blomberg., 2002).

Os merozoítos invadem células vermelhas no sangue e transformam-se em trofozoítas jovens ou anéis. Quando começam a crescer e seu citoplasma torna-se mais irregular, são denominados trofozoítas maduros que após a esquizogonia contem vários merozoítas em seu interior. Após o término de divisão o esquizonte rompe a hemácia e os merozoítas liberados na corrente circulatória invadem novas hemácias e fazem novo ciclo eritrocítico (Rey, 2002).

Esta liberação de parasitas na circulação é responsável pelo aparecimento dos sintomas devido à liberação de fatores do parasito, tais como hemozoína, âncoras glicosilfosfatidilinositol (GPI) e metabólitos oriundos da clivagem celular que estimulam a reação inflamatória sistêmica com a produção de citocinas pró-inflamatórias. A duração do ciclo eritrocítico determina a periodicidade desses sintomas, variando entre as espécies de *Plasmodium* (Amino *et al.*, 2006).

Após algumas gerações de merozoítas alguns se diferenciam em formas sexuadas (gametócitos) sofrem maturação e são ingeridos por fêmeas de anofelinos durante o repasto sanguíneo, fechando o ciclo (Amino *et al.*, 2006).

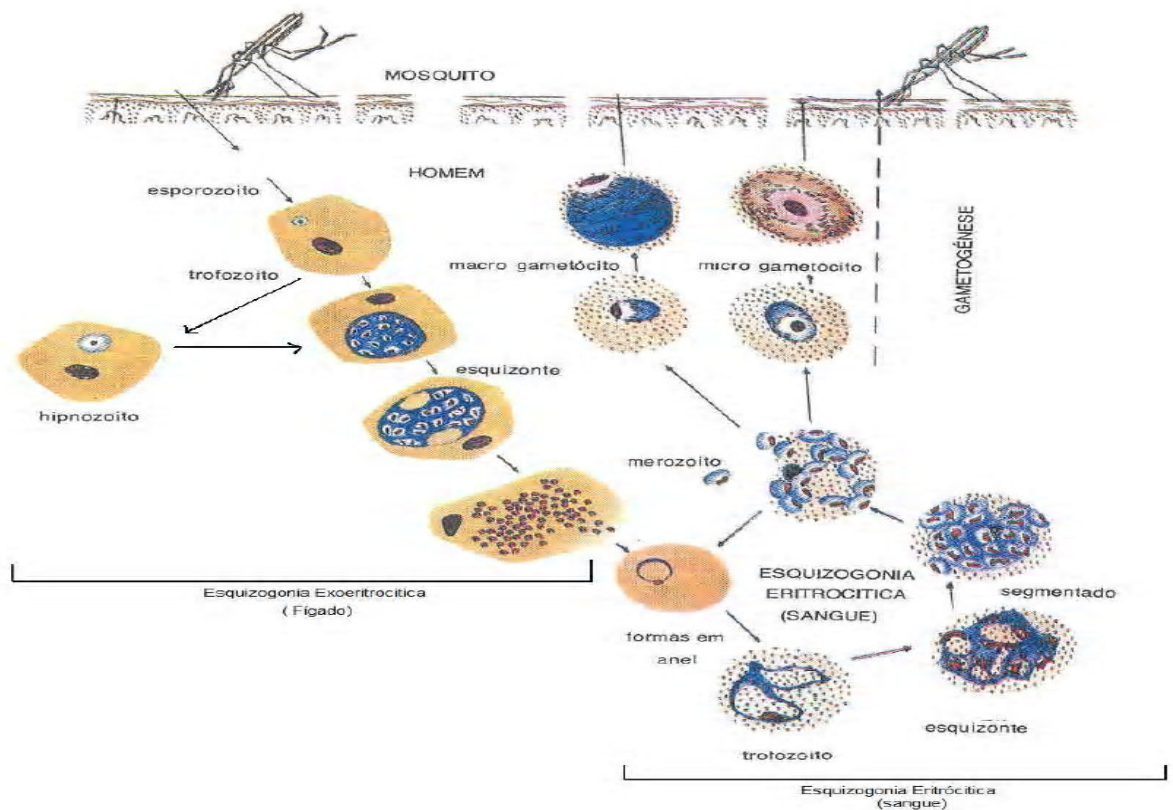


Figura 3: Ciclo de vida da malária

Fonte: WHO, 2009.

1.4 Genes Polimórficos em *Plasmodium*

A existência de cepas de *P. vivax* e *P. falciparum* tem sido documentada ao longo dos últimos 100 anos. A manifestação de cepas resistentes ao tratamento com drogas antimaláricas é um exemplo evidente do surgimento de novas formas do parasito em resposta à seleção, e só em tempos relativamente recentes, entretanto, que a verdadeira extensão dos polimorfismos genéticos em populações naturais de parasitas tornou-se evidente. Formas eletroforéticas de enzimas estavam entre os primeiros marcadores bioquímicos usados para diferenciar isolados de *Plasmodium* (Carter, 1973), esse método foi complementado por eletroforese bidimensional para diferenciar formas alélicas de proteínas, através do ponto isoelétrico e tamanho molecular, cerca de 20 proteínas de *P. falciparum* puderam ser diferenciadas (Fenton, 1985). Métodos sorológicos, especialmente aqueles que utilizam

anticorpos monoclonais também foram extremamente valiosos para diferenciar formas variantes de antígenos isolados de campos (McBride *et al.*, 1985). Em tempos mais recentes, a identificação de genes e seqüências de *Plasmodium* levaram ao amplo uso de metodologias baseadas no DNA, especialmente Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para obter marcadores genéticos, e isso tornou-se o método de escolha para estudos de campo sobre a diversidade genética. A principal vantagem do método da PCR é que pode ser aplicado sobre parasitas em pequenas amostras de sangue ou mesmo em mosquitos sem necessidade de uma cultura parasitária. Através dessa técnica foi possível identificar alguns genes constituintes da superfície do merozoíto em *Plasmodium falciparum*, como a Proteína 1 de Superfície do Merozoíto, Proteína 2 de Superfície do Merozoíto (MSP1, MSP2) (Kimura *et al.*, 1990), Proteína rica em glutamato (GLURP) (Borre *et al.*, 1991), a Proteína circunsporozoíto (CSP) (Arnott *et al.*, 1993) e microssatélites de seqüências de DNA repetidas, que variam em número de alelos diferentes (Su & Wellems, 1996). Alelos desse tipo diferem em tamanho e podem ser facilmente distinguidos pela eletroforese de seus produtos de PCR amplificados em gel de agarose. Variação da seqüência entre os alelos de MSP1 e MSP2 podem ser detectadas usando seqüência de primers específicos em reações de PCR ou por hibridização de seqüências através de sondas específicas para os produtos da PCR amplificados (Babiker *et al.*, 1994).

A extensão destes genes polimórficos nas populações de parasitas aumenta a diversidade antigênica das cepas circulantes de modo que a imunidade adaptativa é cepa específica. Este fenômeno representa o grande entrave para desenvolvimento de uma vacina anti - malárica efetiva (Su *et al.*, 1997).

1.5 Recombinação genética

Toda a variação genética se origina ou por mutação genética ou por recombinação. Este último é o principal mecanismo para a geração de formas de um organismo com novos genótipos. Em eucariontes, a

recombinação ocorre principalmente na meiose e muito mais raramente na mitose. No *Plasmodium*, a meiose ocorre na formação do zigoto. Em termos gerais, a meiose permite (I) uma variedade independente de genes em cromossomos diferentes, (II) crossing-over entre genes ligados no mesmo cromossomo, e (III) eventos de recombinação intragênica. Os mecanismos I e II dão origem a formas com novas combinações de genes, tais como duplicações e deleções enquanto (III) é um mecanismo de geração de novos alelos dos genes. O parasito da malária é haplóide para a maioria de seu ciclo (Walliker *et al.*, 1975), com um único estágio diplóide sendo o zigoto formado pela união de gametas no mosquito. No caso de o mosquito exercer hematofagia contendo gametócitos de apenas um único clone, somente a autofecundação poderá acontecer devido os gametas serem geneticamente idênticos, produzindo zigotos homozigóticos. Se ocorrer gametócitos de mais de um clone podem ocorrer eventos de passagem, resultando em recombinação heterozigóticas (Figura 4). A Recombinação meiótica não deverá ter grandes efeitos genéticos nos homozigotos porque ambos os alelos de todos os genes são idênticos, no entanto, processos como a replicação de derrapagem e crossing-over desigual poderiam resultar em situações como novos alelos que apresentam variações no número de unidades repetidas, visto em alguns genes. Em heterozigotos, entretanto, a recombinação meiótica inevitavelmente leva à produção de formas haplóides recombinantes (Figura 4) (Sherman, 1998).

Estes eventos ocorrem dependentemente do índice de transmissão de malária em áreas hipo ou hiperendêmicas. Em áreas de baixa endemicidade é mais provável que a formação de novos alelos ocorra por processos de autofecundação acontecendo preferencialmente através de deleção ou duplicação de seqüências gênicas do que trocas entre diferentes alelos. Este último deve ser mais encontrado, provavelmente, em áreas de alta endemicidade onde vários estudos observaram multiclonalidade de cepas em pacientes infectados por *Plasmodium falciparum* ou *Plasmodium vivax*.

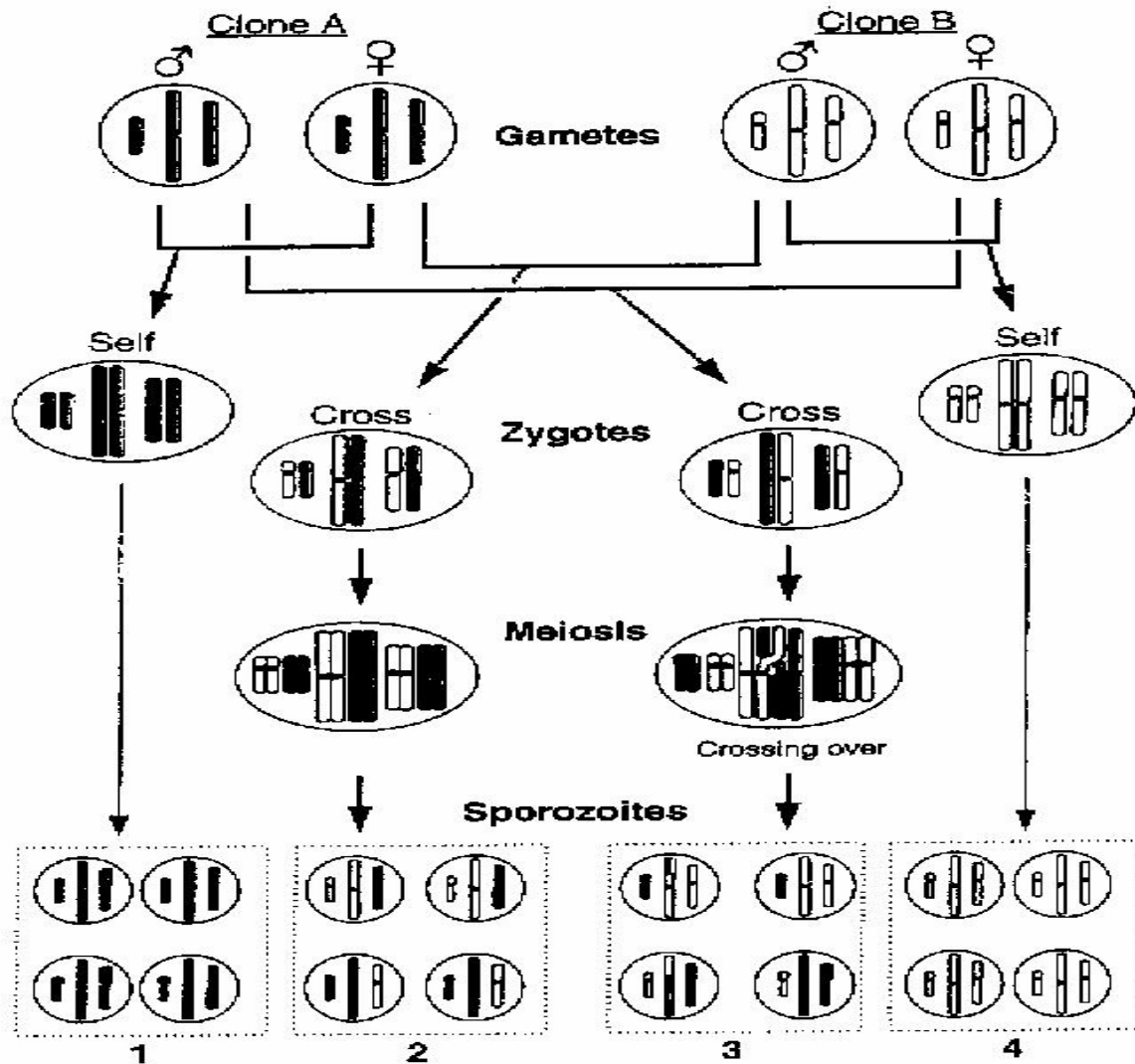


Figura 4: Herança de genes cromossômicos em parasitas da malária. (1) Esporozoítos homocigotos derivados da autofecundação de gâmetas do clone A, (2,3) esporozoítos heterocigotos derivados do cruzamento entre os clones A e B, (4) esporozoítos homocigotos derivados da autofecundação de gâmetas do clone B.

Fonte: (Sherman, 1998)

A hipótese acima pode ser evidenciada por pesquisa de genótipos em estudos de estrutura populacional. Exame de parasitas não clonados em uma amostra de sangue fornece apenas informações limitadas sobre o número de clones presentes. Se o único locus polimórfico é examinado e, por exemplo, três alelos são vistos, o número mínimo de clones presentes deve ser de três. No entanto, se um segundo locus examinado tiver na mesma amostra, por exemplo, dois alelos, o número de clones sobe para seis, desde que há seis combinações possíveis dos alelos em cada locus. O número preciso de clones só pode ser determinado através do isolamento e caracterização de clones individuais de tais isolados. A

composição clonal em um determinado paciente pode mudar ao longo do tempo, mesmo de dia para dia. Por exemplo, Farnert e colaboradores em 1997 estudaram amostras diárias de *P. falciparum* em crianças assintomáticas residentes de uma aldeia em uma área da Tanzânia, onde a malária é altamente endêmica, utilizou-se a técnica de PCR para examinar alelos dos genes MSP1 e MSP2 e GLURP (Figura 5), na maioria dos casos, os padrões complexos de infecções multiclonais foram encontrados. Uma descoberta particularmente surpreendente foi a de que algumas crianças tiveram mudanças em genótipos de cada 24 h, por exemplo, parasitas identificados nos dias 1 e 3 foram semelhantes entre si mas diferiram daqueles observados nos dias 2 e 4. A explicação mais provável para essa mudança foi que as diferentes cepas de parasitas foram submetidas a seqüestro em dias alternados, ainda nesse estudo foi observado quem em muitas pessoas até três genes alelos de novos parasitas foram observados, durante o período de 2 semanas.

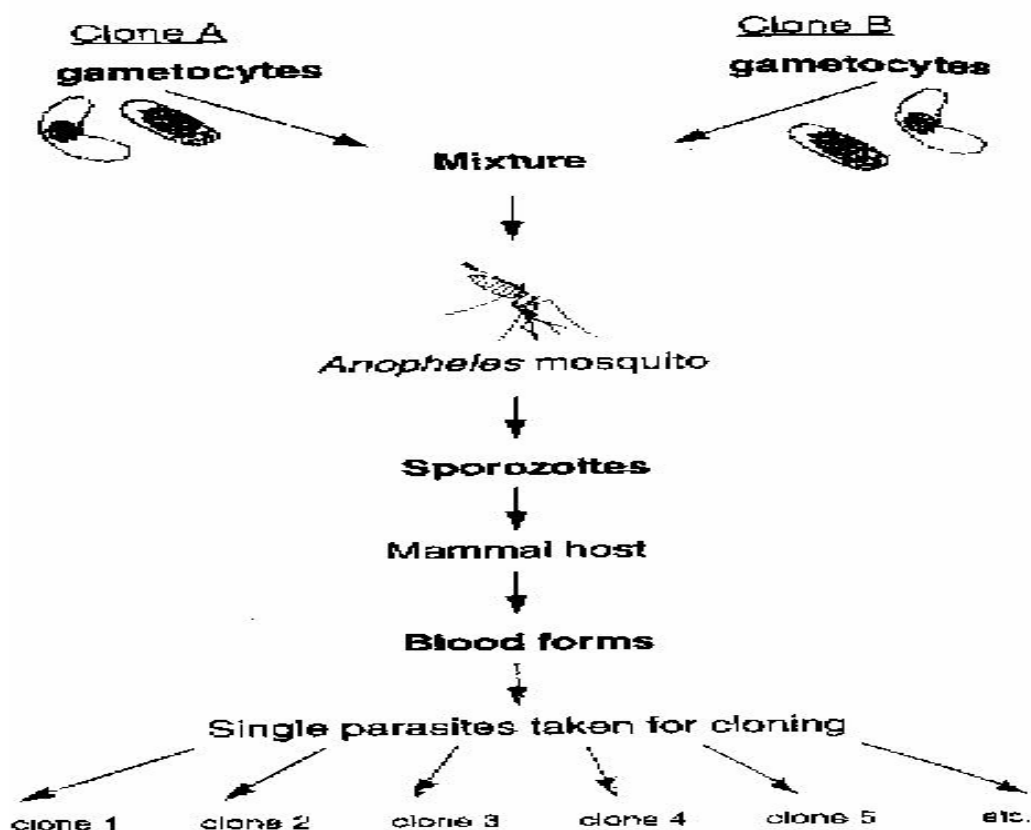


Figura 5: Método para analisar os cruzamentos entre os clones de parasitas da malária.

Fonte: (Sherman,1998).

Outros estudos longitudinais foram feitos em pacientes com intervalos de tempo mais longo, Daubersies e colaboradores 1996, analisaram os alelos MSP1 e MSP2 de *P.falciparum* de pacientes em duas aldeias no Senegal, que tinham diferentes taxas de transmissão de malária durante os períodos de 3 meses onde, amostras de sangue foram coletadas a cada 2 semanas e, pelo menos onde, cinco clones foram presentes em alguns casos. Flutuações de alelos também foram observadas em amostras colhidas em alguns pacientes a 2 a 4 intervalos de dias. Em Pikine, um subúrbio de Dakar, onde a transmissão foi sazonal, foram retiradas amostras de três pessoas, cinco vezes ao longo de um período de 5 semanas durante a estação seca, nestas infecções, os alelos de cada gene semelhantes foram observados em cada amostragem, mostrando que os clones persistiram ao longo deste período (Sherman., 1998).

Estudos sobre a estrutura populacional de *P.vivax* era até 2008 prejudicado pela falta de informação sobre o genoma do parasita. Porém agora com o genoma do *P.vivax* completo, novos marcadores poderão ser utilizados ao lado daqueles já conhecidos. Antes do genoma, pesquisas têm sido realizadas a respeito da variação de alelos de dois genes, *PvCSP* e o homólogo *PvMSP1*. Análise de isolados de *P.vivax* em Papua Nova Guiné, Brasil, Sri Lanka, Tailândia, Filipinas e China revelou a heterogeneidade ampla destes genes. A diversidade alélica de *PvCSP* geralmente não é tão grande como o observado no *PvMSP1* (Del Portillo *et al.*, 1991). Outros estudos realizados na China e nas Filipinas, revelaram idênticos alelos *PvCSP* em três dos seis isolados chineses e seis de sete filipinos isolados, em cada caso, os parasitas presentes nos isolados diferiram no locus *PvMSP1* e por isso não foram considerados clones do mesmo parasita (Mann *et al.*, 1994). A taxa de infecções multiclonais por *P.vivax* parece à primeira vista, ser inferior ao *P.falciparum*, no entanto, devido à diversidade limitada de alguns genes, o número de loci incluídos na análise precisa ser levado em conta. Por exemplo, em Papua Nova Guiné, 38% das infecções por *P.vivax* foram multiclonais usando *PvMSP1*, mas essa porcentagem sobe para 65% em dois outros locais que foram incluídos na análise (Kolakovich *et al.*,

1996). Um grande estudo realizado na Índia, utilizando três enzimas polimórficas concluiu que 20% dos isolados foram *P. vivax* multiclonais (Joshi et al., 1997). Parece haver nenhuma diferença significativa na taxa de infecção multiclonal entre os tempos de transmissão de baixa e alta, nem qualquer diferença nas frequências alélicas ao longo dos 8 anos de estudo (Sherman.,1998).

1.6 Vacina contra a malária

Várias protozooses constituem-se em grandes problemas de saúde pública no mundo, e dentre elas a malária é a que traz maiores preocupações pela prevalência e morbidade, sendo incluída pela Organização Mundial da Saúde entre as seis endemias prioritárias para investimento em pesquisa. No Brasil, a malária ao lado de leishmanioses está em processo de expansão, porém o seu controle total pela intervenção no seu ciclo biológico é difícil ou não realizável, não só pelas condições sócio-econômicas da população sob risco, mas, porque envolvem elementos como insetos vetores cujo controle ou eliminação são racionalmente irrealizáveis. A vacina, portanto, é uma ferramenta que poderia contribuir efetivamente para esse controle (Lindoso.,2000).

Há muitas pesquisas em desenvolvimento visando vacinas contra malária, porém não há produtos liberados para uso na população geral. Há vários fatores que resultam nesta situação atual, um dos fatores é decorrente da complexidade do ciclo biológico onde o parasito toma formas morfológicas diversas, este fato leva ao envolvimento de antígenos diversos nas várias fases do ciclo. Além disso, os parasitos têm a capacidade de modificar as moléculas de seus antígenos, variação antigênica, diante de uma resposta imune protetora (Stoute *et al.*, 1998).

Para o desenvolvimento de qualquer vacina o ponto de partida é a constatação da possibilidade de induzir imunidade no hospedeiro contra a infecção em questão. Na malária esta evidência foi verificada há mais de 30 anos em animais experimentais e em homens imunizados com esporozoítos atenuado (Nussensweig *et al.*, 1967), porém, não sendo

factível o uso destes como vacina, pela impossibilidade de produção em grande escala de esporozoítos dentre outras questões práticas, iniciou-se a busca de outros imunógenos obtidos utilizando tecnologias bioquímicas e de biologia molecular avançadas. Vacinas voltadas para a fase pré-eritrocítica que tem o esporozoíto como alvo ou que impeçam a invasão do hepatócito pelo parasito, ou ainda que o eliminem durante a esquizogonia dentro do hepatócito são interessantes por bloquear a infecção no seu início, porém, a sua eficácia há de ser absoluta considerando que escape de um único parasito pode levar à fase eritrocítica da infecção com suas conseqüências patológicas. Ao lado de estudos visando esta fase pré-eritrocítica, duas outras linhas de pesquisa são desenvolvidas tendo como alvo a fase eritrocítica e o bloqueio da transmissão, esta última visando impedir o desenvolvimento do parasito dentro do inseto vetor com indução de anticorpo no hospedeiro que teria efeito dentro do tubo digestivo do inseto, interferindo na reprodução do parasito (Ling *et al.*, 1994).

Na busca de imunógenos candidatos à vacina, principalmente quando se buscam moléculas sintéticas, o conhecimento do mecanismo imune protetor é essencial. A proteína que cobre o esporozoíto é conhecida como Proteína do Circunsporozoíto do inglês “circunsporozoite protein” (CSP). O epítipo B imunodominante desta proteína é a porção central repetitiva NANP encontrada no *P. falciparum*, mas presente e conservada nas diversas espécies de *Plasmodium*. Em um estudo, o gene da CSP foi clonado (Dame *et al.*, 1984) e, subseqüentemente, foram obtidos produtos recombinantes (Ballou *et al.*, 1987) e sintéticos (Herrington *et al.*, 1987) considerados seguros para uso em seres humanos, porém, estudos clínicos não mostraram proteção além de 20 – 30% (Ballou *et al.*, 1987, Guiguemende *et al.*, 1990, Fries *et al.*, 1992). Segundo Stoute e colaboradores (1997), uma formulação que consiste de proteína de fusão de uma porção da CSP e antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), denominada RTS.S, foi testada em voluntários humanos com adjuvantes diversos e imunoestimulantes. Resultados iniciais com RTS.S em emulsão água e óleo acrescida de imunoestimulantes monofosforil lipídio A e QS21

despertaram entusiasmo por conferir proteção em seis dos sete indivíduos vacinados quando desafiados com mosquito infectado por *P. falciparum* três semanas após a terceira dose da vacina. No entanto, quando cinco destes indivíduos e outros dois que receberam outro tipo de adjuvante e que mostraram proteção inicial foram desafiados novamente após 6 meses, cinco desenvolveram infecção (Stoute *et al.*, 1998), abortando prosseguimento para a fase III da vacina.

Epítomos da fase eritrocítica também são objeto de intenso estudo e há 25 anos foi observada proteção de macacos injetados com merozoítos de *P. knowlesi* e *P. falciparum* utilizando adjuvante completo de Freund (Mitchel & Cohen 1975, Sidiqqi 1977). A Proteína 1 da superfície de merozoito (MSP-1) de *P. yoelii* foi purificada com anticorpo monoclonal e esta induziu imunidade em camundongo contra a infecção com o parasito homólogo (Holder & Freeman 1981); proteína homóloga de MSP-1 também foi encontrada em outras espécies de *Plasmodium* incluindo *P. falciparum* (Holder *et al.*, 1985). Utilizando proteína de fusão MSP-1 - glutathione S transferase foi possível proteger camundongo à infecção por *P. yoelii* (Ling *et al.*, 1994) e MSP-1 recombinante de *P. falciparum* induziu proteção em macacos *Aotus* (Kumar *et al.*, 1995). Proteína de fusão de MSP-1 e epítipo T do toxóide tetânico foi para teste de fase I em seres humanos e observaram-se algumas reações adversas, recomendando-se maior cautela no uso (Keitel *et al.*, 1999).

Constatando-se que a imunidade dirigida exclusivamente a uma fase do ciclo do parasito dificilmente levaria a uma proteção efetiva, vários compostos combinando epítomos de diferentes fases do ciclo do parasito foram elaborados para estudo. O mais estudado é o SPf66, desenvolvido na Colômbia, que contém a seqüência PNAMP do CSP da fase pré-eritrocítica e três antígenos da fase eritrocítica incluindo um epítipo do MSP-1, que mostrou efeito protetor parcial quando testado no macaco e em voluntários humanos (Patarroyo *et al.*, 1987, Patarroyo *et al.*, 1988).

Numa abordagem diferente da obtenção simples de proteínas recombinantes para uso como vacina, alguns compostos são resultantes de inserção de segmentos de gene que codificam para proteínas do

parasito de interesse em microrganismos que por si só suscitam resposta imune que possam contribuir na imunização com o composto vacinal. Uma destas preparações é o NYVAC-Pf7 que não só associa epítomos de fases diferentes do ciclo do parasito, mas, estes são expressos pelo vírus da vaccinia NYVAC. Foram inseridos neste vírus genes que codificam para proteínas expressas por parasitos na fase de esporozoito (CSP e PfSSP2), fases hepática (LSA1), eritrocítica (MSP1, SERA, AMA1) e sexuada (Pfs25). Não tendo observado nenhum efeito colateral da NYVAC-Pf7 em macaco *Rhesus*, foi testado em voluntários humanos em teste de fases I e II. Houve indução tanto da resposta humoral quanto celular a diferentes componentes antigênicos, mas, somente retardou o aparecimento da parasitemia, não induzindo proteção (Ockenhouse *et al.*, 1998).

Vacina de DNA é uma outra possibilidade explorada tendo como vantagem a facilidade na sua obtenção e indução de resposta de células T, principalmente CD8+ além da persistência no hospedeiro com estimulação imune por período prolongado. DNA de CSP de *P. yoelii* (PyCSP) foi testada em camundongos BALB/c conferindo proteção parcial dependente de células T CD8+. DNA de CSP de *P. falciparum* foi testada em voluntários humanos quanto à toxicidade e segurança. Num estudo em que se combina o uso de DNA de PyCSP e um recombinante constituído por vírus da vaccinia contendo segmento de gene de PyCSP observa-se melhor proteção e produção maior de anticorpos com o uso inicial de DNA seguido de recombinante como reforço do que o uso de duas doses de vacina de DNA (Sedegah *et al.*, 1998).

Embora o *P. vivax* seja considerada uma espécie importante do ponto de vista epidemiológico pela frequência, os estudos para o desenvolvimento de vacina com esta espécie de *Plasmodium* ocorrem numa escala mais modesta. Os estudos mais avançados são de testes em várias espécies de primatas não humanos com diferentes compostos vacinais. O primeiro teste em primata foi com esporozoito atenuado e com o antígeno recombinante de CSP de *P. vivax*, observando-se produção de anticorpos e proteção em alguns e prolongamento do

período prepatente em outros (Collins *et al.*, 1989). A imunogenicidade de peptídeos da proteína da fase eritrocítica MSP-1 de *P. vivax* vem sendo estudada (Damangel *et al.*, 1996) e Perera e colaboradores 1998, viram que no modelo de primata infectado com *P. cynomolgi*, considerado similar à infecção humana por *P. vivax*, foi utilizado antígeno recombinante de MSP-1 de *P. cynomolgi* em baculovírus obtendo-se proteção grande que não se alterou após seis meses. O papel protetor espécie-específico do antígeno MSP1, observado principalmente em estudos envolvendo a espécie *P. falciparum* fortalecem a MSP1 como forte candidata a vacina antimalárica (Mertens *et al.*, 1993), já que sua importância biológica na invasão do merozoíto *in vitro* e o efeito de anticorpos inibitórios a penetração do parasita no eritrócito já são bem conhecidos através de estudos (Holder *et al.*, 1999).

1.7 Proteína de Superfície do Merozoíto

O antígeno MSP-1 é uma proteína de superfície do merozoíto presente tanto em *P. falciparum* quanto em *P. vivax* e apresenta um padrão genômico e genético comum. Em relação ao genômico tem sido demonstrado à estrutura gênica da MSP-1 a existência de regiões conservadas, semiconservadas e polimórficas. Geneticamente os blocos conservados do gene MSP-1 apresentam dimorfismo genético. Em relação à MSP-1 de *P. vivax*, Del portillo e colaboradores mostraram pela biologia molecular a presença de dois alelos MSP-1 presentes no Brasil, em Belém e Salvador (Mertens *et al.*, 1993). Essas glicoproteínas são acopladas à superfície dos merozoítos através de âncoras GPI e compreendem motivos repetitivos que variam em seqüência e número de repetições.

A ocorrência de polimorfismos nesses motivos, os quais apresentam epítomos imunodominantes para células T e B, ou a simples variação no número de repetições, parece contribuir para o escape imune do parasito (Anders *et al.*, 1994). Realmente, anticorpos naturalmente adquiridos são capazes de distinguir entre motivos repetitivos distintos

de antígenos pertencentes à mesma família alélica (Ranford-Cartwright, *et al.*, 1996; Da Silveira *et al.*, 1999; Tonhosolo *et al.*, 2001), mesmo se a diferença entre eles residir somente no número de vezes em que um mesmo motivo se repete (Tonhosolo *et al.*, 2001).

O gene que codifica esta proteína apresenta-se em cópia única e possui um peptídeo de 1796 aminoácidos (Del Portillo *et al.*, 1991). É sintetizada com um precursor de 200-250 kDa (Undagama *et al.*, 1989). Sofre dois processos de proteólise (Figura 6) no primeiro dividindo-se em dois fragmentos, um contendo 506 aminoácidos, denominada região N-terminal. O outro fragmento contendo 111 aminoácidos que corresponde a 42 kDa (Sakai *et al.*, 2003). Na segunda proteólise uma parte equivalente a 19 kDa não tem papel de ligante, porém a proteólise é importante para a invasão, pois anticorpos que bloqueiam a proteólise estão associados a inibição da invasão *in vitro* (Blackmam *et al.*, 1990).

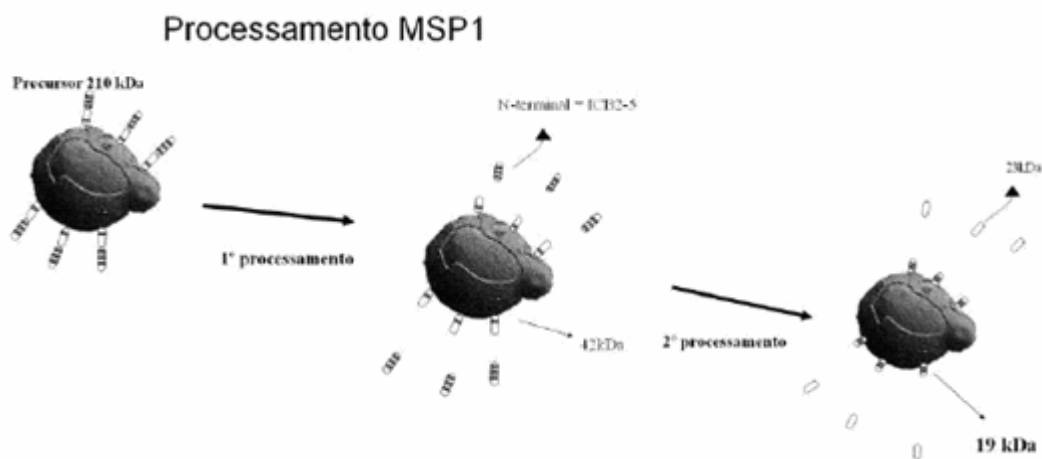


Figura 6: Processamento MSP1

Fonte: Sakai *et al.*, 2003)

Dentre as proteínas de estágio sanguíneo de *Plasmodium*, a proteína 1 de superfície do merozoíto tem sido estudada intensivamente como um potencial alvo para proteção imunológica. Sua função está relacionada ao processo de invasão do eritrócito, pois estudos de Holder e colaboradores (1994) demonstraram que anticorpos denominados inibitórios do processamento do precursor impediam a invasão das hemácias pelo merozoíto do *P.falciparum*. A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é fundamental para o estabelecimento e manutenção da infecção malárica em um indivíduo (Cowman *et al.*, 2001), como esse

estágio do parasita se encontra na circulação sanguínea ele se torna um potencial alvo para ação de vacinas.

Em um estudo realizado com uma população ribeirinha da Amazônia legal, Portuchuello (RO) onde se, identificaram pacientes assintomáticos e sintomáticos, a aquisição natural de anticorpos avaliada contra uma proteína recombinante correspondente a região N terminal do MSP1 de *P.vivax* passou a ser considerada uma importante candidata à vacina anti - malárica (Nogueira *et al*, 2006). Nesse mesmo estudo, dados mostraram que pacientes assintomáticos apresentavam anticorpos IgG3 contra a região N-terminal da MSP1 de *P.vivax*, no entanto, soros de alguns indivíduos assintomáticos não reconheceram a proteína recombinante N-term MSP1 construída a partir de DNA da cepa Belém. Assim, a variabilidade das regiões polimórficas poderia ser explicação para o não reconhecimento por parte de alguns assintomáticos.

Considerando-se que a aquisição de imunidade contra os plasmódios humanos em áreas altamente endêmicas tem sido fortemente atribuída à contínua exposição ao parasito, é sabido que esta imunidade esteja associada com aquisição de repertório de anticorpos contra antígenos do parasito com o elevado polimorfismo (Day & Marsh, 1991, Tetteh *et al* 2005; Nogueira *et al* 2006,). Embora alguns estudos venham sendo conduzidos no Brasil com a finalidade de caracterizarem geneticamente isolados de parasitos que circulam em regiões de transmissão, não existe nenhum estudo no entorno de Manaus no estado do Amazonas, havendo somente estudos de Del Portillo e Urbano em isolados de Rondônia (Del Portillo *et al.*, 1991; Mancilla *et al.*, 1994; Da Silveira *et al.*, 1999;). Portanto, a análise genotípica dos isolados que pretendemos realizar em zonas periféricas de Manaus deve fornecer informações sobre os alelos e a dinâmica de transmissão dos mesmos.

Objetivos

2. OBJETIVO

O presente projeto visa analisar a estrutura gênica e a diversidade alélica de isolados de *P.vivax* circulantes no entorno de Manaus baseando-se em três seqüências gênicas correspondentes aos blocos polimórficos 2, 6 e 10 do gene MSP1.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a seqüência gênica de três blocos polimórficos do gene *PvMSP-1*;
- ✓ Avaliar as seqüências e compará-las com as já disponíveis em banco de dados;
- ✓ Determinar a freqüência das seqüências do gene *PvMSP-1* e agrupá-las na forma de cladograma para determinar o repertório gênico dos isolados circulantes nas regiões de coleta.

Metodologia

a

3. METODOLOGIA

3.1 População e Área de Estudo: O estudo foi realizado com amostras sanguíneas positivas para malária, causada por *P.vivax*, de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical de Manaus – AM, residentes no entorno de Manaus, no qual diagnóstico por PCR “Real Time” e lâmina de gota espessa foram utilizados para detecção e constatação da parasitemia.

3.2 Coleta e Considerações Éticas: Dispondo das informações de diagnóstico, foram convidados para participar indivíduos que tiverem resultado de (Reação em Cadeia da Polimerase) PCR ou lâmina gota espessa positivos para “malária *vivax*”. Os mesmos ou seus representantes responderam um questionário epidemiológico e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Amazonas sob CAAE: 3640.0.000.115-07.

3.3 Processamento das Amostras e Extração de DNA: A extração de DNA foi feita através do Kit comercial *Charge Switch gDNA 50-100ul Blood kit* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

3.4 Primers e PCR: Para realizar análise do polimorfismo foram utilizados os primers do estudo de Bastos e colaboradores (2007), Bloco 2 pvF1 (5’CTCTGACAAAGAGCTGGAC3’) pvR9 (5’GCTCCTTCAGCACTTTCACGCG 3’), Bloco 6 pvF4 (5’TACTACTTGATGGTCCTCAAAAG 3’), pvR6 (5’GTGCTTGTGACATGCGTA 3’), Bloco 10 pvF7 (5’CCTTAAGAATACCGAGATTTTGCTGAAG 3’) pvR3 (5’GCGATTACTTTGTCGTAG 3’) na concentração de 10 pM. Para o preparo da reação foram utilizados: Tampão 10X, DNTP 100 µM, Mgcl 1,5 Mm e Taq Polimerase 1 U, nas seguintes condições: 95° 5Min. 1X, 94° 1Min., 63° 1Min., 72° 1Min., 36X, 72° 1X 10Min. As amostras foram visualizadas em gel de agarose 1%.

a

3.5 Purificação de amostras de DNA genômico em gel de agarose: Os produtos de PCR amplificados em gel de agarose, foram purificados utilizando o Kit comercial de Purificação QIAquick Gel Extraction - QIAGEN, conforme instruções do fabricante.

3.6 Sequenciamento dos produtos de PCR: Os produtos foram analisados em seqüenciador automático de DNA MegaBace 1000 da FIOCRUZ/BA, pelo método de terminação da cadeia ou dideoxi. Cada amostra foi seqüenciada pelo menos 3 vezes.

3.7 Análise das seqüências: Os eletroferogramas oriundos do seqüenciamento foram visualizados e editados pelo SeqMan II do pacote Lasergene versão 4.05 (DNASTar). As seqüências dos produtos da PCR foram comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados disponíveis no GenBank (National Center for Biotechnology Information), através do Blast-p do inglês “Blast Protein”. Alinhamentos foram realizados entre as seqüências resultantes dos blocos 2, bloco 6 e bloco 10 do gene MSP-1 com outras seqüências do mesmo gene depositadas no GenBank, utilizando os programas EditSeq e MegAlign do pacote Lasergene versão 4.05 (DNASTar). A partir destas seqüências foram construídas árvores filogenéticas, utilizando o programa Megaline, também do pacote Lasergene. As árvores filogenéticas foram comparadas às tabelas de percentual de similaridade e divergência entre seqüências alinhadas, através do Megaline.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Amostras do gene MSP1 com PCR positivo

Obtivemos 130 amostras diagnosticadas positivas por gota espessa para *P. vivax* pela Fundação de Medicina Tropical da cidade de Manaus - AM, indivíduos procedentes do entorno de Manaus.

Das 130 amostras oriundas da Fundação de Medicina Tropical, obtivemos 73 amostras positivas para o bloco 2 na PCR, onde foi possível verificar variações nos tamanhos dos fragmentos amplificados. Utilizamos um plasmídeo (ICB2-5) e (ICB-10) contendo uma construção gênica correspondente à região N-terminal do gene MSP-1 do isolado Belém, cedido gentilmente por Dr. Hernando Del Portillo para ser usado como controle da reação da PCR. Para os blocos 6, foi feita PCR em 100 amostras sanguíneas e dessas 61 foram positivas, onde também foi observado a variação no tamanhos dos fragmentos. Já para o bloco 10 foi feita PCR em 70 amostras e 61 foram positivas, houve variação nos fragmentos.

Bloco 2

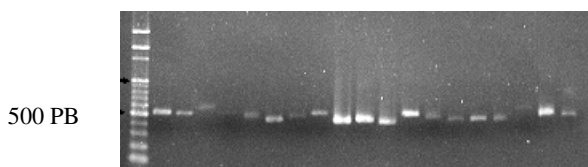


Figura 7: Amostras positivas no PCR bloco 2 com fragmentos com tamanhos 473 a 515 PB.

Bloco 6

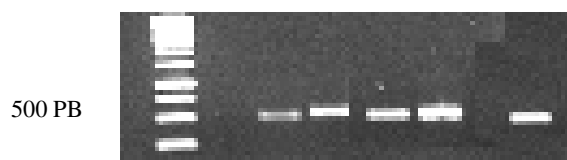
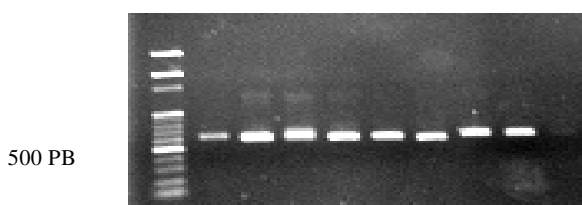


Figura 8: Amostras positivas no PCR bloco 6 com fragmentos com tamanhos 470 a 515 PB.

Bloco 10



Bloco 10

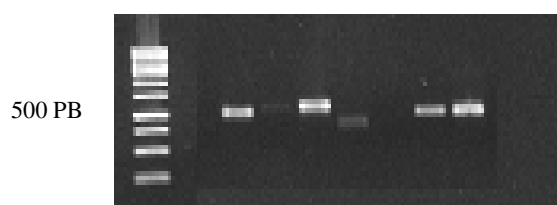


Figura 9 e 10: Amostras positivas no PCR bloco 10 com fragmentos com tamanhos 500 a 615 PB.

4.2 Variações no tamanho dos fragmentos de bandas visualizados em gel de agarose

4.2.1 Bloco 2

A tabela abaixo mostra a variação dos fragmentos amplificados da região 2 (bloco 2) e visualizados em gel de agarose os fragmentos variaram de tamanho sendo < 500 pb (≈ 490 pb) a ≥ 500 pb (com variações de ≈ 500 a 600 pb), sugerindo diferenças nos genótipos amplificados. As variações de tamanhos dos fragmentos de PCR obtidas aqui também foram detectadas por estudos de Bastos e Urbano em 2007, na região do Acre.

Bloco 2	Tamanhos dos fragmentos visualizados em gel de agarose	
	< 500 pb	≥ 500 pb
Isolado 1		
Isolado 2		
Isolado 3		
Isolado 4		
Isolado 5		
Isolado 6		
Isolado 7		
Isolado 8		
Isolado 9		
Isolado 10		
Isolado 11		
Isolado 12		
Isolado 13		
Isolado 14		
Isolado 15		
Isolado 16		
Isolado 17		
Isolado 18		
Isolado 19		
Isolado 20		
Isolado 21		
Isolado 22		
Isolado 23		
Isolado 24		
Isolado 25		
Isolado 26		
Isolado 27		
Isolado 28		
Isolado 29		
Isolado 30		
Isolado 31		
Isolado 32		
Isolado 33		
Isolado 34		
Isolado 35		
Isolado 36		

Bloco 2	Tamanhos dos fragmentos visualizados em gel de agarose	
	< 500 pb	≥ 500 pb
Isolado 37		
Isolado 38		
Isolado 39		
Isolado 40		
Isolado 41		
Isolado 42		
Isolado 43		
Isolado 44		
Isolado 45		
Isolado 46		
Isolado 47		
Isolado 48		
Isolado 49		
Isolado 50		
Isolado 51		
Isolado 52		
Isolado 53		
Isolado 54		
Isolado 55		
Isolado 56		
Isolado 57		
Isolado 58		
Isolado 59		
Isolado 60		
Isolado 61		
Isolado 62		
Isolado 63		
Isolado 64		
Isolado 65		
Isolado 66		
Isolado 67		
Isolado 68		
Isolado 69		
Isolado 70		
Isolado 71		
Isolado 72		
Isolado 73		

Tabela 1: Variação no tamanho dos fragmentos de bandas do bloco 2 do gene MSP1 visualizados em gel de agarose.

Os diferentes tamanhos dos produtos obtidos na reação de PCR do Bloco 2 já evidenciam a diversidade genética da população de parasitas (Tabela 1). Contudo pôde-se verificar o predomínio de um dos produtos, de 500pb. Estes dados funcionam como um marcador importante para a estrutura populacional dos parasitos circulantes.

4.2.2 Blocos 6

Notamos duas variações nos tamanhos dos fragmentos no bloco 6 de 500 pb e > 500 pb (\approx 530 pb) . Apesar da pequena variação do bloco 6, esses produtos de PCR são sugestivos de isolados polimórficos.

Bloco 6	Tamanhos dos fragmentos visualizados em gel de agarose			
	500 pb	> 500 pb		
Isolado 1				
Isolado 2				
Isolado 3				
Isolado 4				
Isolado 5				
Isolado 6				
Isolado 7				
Isolado 8				
Isolado 9				
Isolado 10				
Isolado 11				
Isolado 12				
Isolado 13				
Isolado 14				
Isolado 15				
Isolado 16				
Isolado 17				
Isolado 18				
Isolado 19				
Isolado 20				
Isolado 21				
Isolado 22				
Isolado 23				
Isolado 24				
Isolado 25				
Isolado 26				
Isolado 27				
Isolado 28				
Isolado 29				
Isolado 30				

Bloco 6	Tamanhos dos fragmentos visualizados em gel de agarose			
	500 pb	> 500 pb		
Isolado 31				
Isolado 32				
Isolado 33				
Isolado 34				
Isolado 35				
Isolado 36				
Isolado 37				
Isolado 38				
Isolado 39				
Isolado 40				
Isolado 41				
Isolado 42				
Isolado 43				
Isolado 44				
Isolado 45				
Isolado 46				
Isolado 47				
Isolado 48				
Isolado 49				
Isolado 50				
Isolado 51				
Isolado 52				
Isolado 53				
Isolado 54				
Isolado 55				
Isolado 56				
Isolado 57				
Isolado 58				
Isolado 59				
Isolado 60				
Isolado 61				

Tabela 2: Variação no tamanho dos fragmentos de bandas do bloco 6 do gene MSP1 visualizados em gel de agarose.

4.2.3 Bloco 10

No bloco 10 verificamos variações entre 500 a > 500 pb (\approx 600 pb), sendo que a altura 500 pb foi mais encontrada (Tabela 3). Esses dados também indicam indícios de polimorfismos devido aos diferentes tamanhos dos produtos amplificados.

Novamente os resultados obtidos com os produtos do bloco 10, onde os mesmos foram únicos, corroboram os dados dos blocos 2 e 6 indicando infecções por populações monoclonais.

Bloco 10	Tamanhos dos fragmentos visualizados em gel de agarose			
	500 pb	> 500 pb		
Isolado 1	■			
Isolado 2	■			
Isolado 3	■			
Isolado 4	■			
Isolado 5	■			
Isolado 6	■			
Isolado 7		■		
Isolado 8	■			
Isolado 9	■			
Isolado 10	■			
Isolado 11		■		
Isolado 12	■			
Isolado 13	■			
Isolado 14	■			
Isolado 15		■		
Isolado 16		■		
Isolado 17		■		
Isolado 18		■		
Isolado 19		■		
Isolado 20		■		
Isolado 21		■		
Isolado 22		■		
Isolado 23		■		
Isolado 24		■		
Isolado 25		■		
Isolado 26		■		
Isolado 27		■		
Isolado 28		■		
Isolado 29	■			
Isolado 30				

Bloco 10	Tamanhos dos fragmentos visualizados em gel de agarose			
	500 pb	> 500 pb		
Isolado 31	■			
Isolado 32	■			
Isolado 33	■			
Isolado 34	■			
Isolado 35	■			
Isolado 36	■			
Isolado 37		■		
Isolado 38		■		
Isolado 39	■			
Isolado 40	■			
Isolado 41	■			
Isolado 42	■			
Isolado 43	■			
Isolado 44	■			
Isolado 45	■			
Isolado 46	■			
Isolado 47	■			
Isolado 48	■			
Isolado 49	■			
Isolado 50	■			
Isolado 51		■		
Isolado 52		■		
Isolado 53		■		
Isolado 54	■			
Isolado 55	■			
Isolado 56	■			
Isolado 57	■			
Isolado 58	■			
Isolado 59	■			
Isolado 60	■			
Isolado 61	■			

Tabela 3: Variação no tamanho dos fragmentos de bandas do bloco 10 do gene MSP1 visualizados em gel de agarose.

4.3 Isolados positivos comparados a negativos de acordo com a amplificação de cada bloco

A Tabela 4 mostra resultados da amplificação dos produtos de PCR para os três blocos estudados em todas as amostras, distinguindo-as daqueles que foram positivos ou negativos para um bloco.

Dos 61 isolados, trinta e seis foram positivos para o bloco 2, trinta e cinco foram positivos para o bloco 6 e quarenta e três foram positivos para o bloco 10. Pode-se perceber que o bloco 10 foi o bloco mais amplificado já que quase todos os produtos de PCR puderam ser visualizados em gel de agarose, corroborando os dados encontrados na literatura que apontam entre os blocos polimórficos o bloco 10 é mais conservado.

Entre os resultados, houve doze que amplificaram na PCR em apenas 1 bloco (Tabela 4). Esses resultados sugerem que a existência de polimorfismos na região alvo dos primers utilizados nesta pesquisa, já que as reações positivas confirmam a estabilidade do DNA extraído e a reação do específico bloco amplificou vários outros isolados.

Apesar do polimorfismo destes poucos isolados a grande maioria das amostras foi amplificada demonstrando que os pares de primers utilizados neste estudo (e desenhados por Bastos e colaboradores, 2007) são aplicáveis nos estudos genéticos dos isolados no Brasil. Experimentos preliminares realizados com primers desenhados Inwong e colaboradores (2005) não serviram para amplificar os blocos 2, 6 e 10 dos isolados do Brasil (dados não mostrados). O estudo de Inwong e colaboradores foram aplicados na Ásia e os primers foram desenhados para os isolados desta região. Portanto, o polimorfismo nas seqüências alvos destes primers é responsável pela ineficácia das nossas ampliações.

Isolados	Blocos		
	2	6	10
Isolado 1			
Isolado 2			
Isolado 3			
Isolado 4			
Isolado 5			
Isolado 6			
Isolado 7			
Isolado 8			
Isolado 9			
Isolado 10			
Isolado 11			
Isolado 12			
Isolado 13			
Isolado 14			
Isolado 15			
Isolado 16			
Isolado 17			
Isolado 18			
Isolado 19			
Isolado 20			
Isolado 21			
Isolado 22			
Isolado 23			
Isolado 24			
Isolado 25			
Isolado 26			
Isolado 27			
Isolado 28			
Isolado 29			
Isolado 30			

Isolados	Blocos		
	2	6	10
Isolado 31			
Isolado 32			
Isolado 33			
Isolado 34			
Isolado 35			
Isolado 36			
Isolado 37			
Isolado 38			
Isolado 39			
Isolado 40			
Isolado 41			
Isolado 42			
Isolado 43			
Isolado 44			
Isolado 45			
Isolado 46			
Isolado 47			
Isolado 48			
Isolado 49			
Isolado 50			
Isolado 51			
Isolado 52			
Isolado 53			
Isolado 54			
Isolado 55			
Isolado 56			
Isolado 57			
Isolado 58			
Isolado 59			
Isolado 60			
Isolado 61			

Tabela 4: Isolados positivos comparados a negativos de acordo com a amplificação de cada bloco.

4.4 Análises das seqüências

4.4.1 Bloco 2

Selecionamos seqüências já depositadas em banco de dados (genbank) através do blast(p) que se assemelhassem aos isolados encontrados no bloco 2, a figura 11 mostra os dados dessas seqüências.

Organismo	Identidade %	Região	Registro	Referências
MSP-1	60	Taiândia	AAN86213.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	85	Vanuatu	AF435632.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	72	Coréia do Sul	AF435037.1	Han and Chai (2001)
MSP-1	70	Taiândia	AF435615.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	82	Taiândia	AF435622.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	78	Coréia do Sul	AF435037	Han and Chai (2001)
MSP-1	85	Coréia do Sul	AAN86213.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	80	Brasil	AAN86237.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	58	Vanuatu	AAN86243.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	96	Acre-Brasil	ABV25923.1	Bastos <i>et al.</i> , (2007)
MSP-1	100	Acre-Brasil	ABV25925.1	Bastos <i>et al.</i> , (2007)
MSP-1	88	Coréia do Sul	AAN86236.1	Han and Chai (2001)
MSP-1	77	Taiândia	AAN86227.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	99	Taiândia	AAN86235.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	92	Bangladesh	AAN86232.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	96	Bangladesh	AAN86210.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	60	Taiândia	AAN86231.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1	96	Taiândia	AAN86288.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)
MSP-1C (Pv200)	90	Cepa Belém	AAA63427.1	Del Portillo <i>et al.</i> , (1999)
MSP-1	75	Taiândia	AAN86226.1	Putapontip <i>et al.</i> , (2002)

Figura 11: Identidade das seqüências do bloco 2 dos isolados deste estudo com seqüência disponibilizadas no genbank

4.4.2 Alinhamento entre seqüências do bloco 2 com seqüências disponibilizadas no genbank

Foram selecionadas do genbank através do programa blast(p) cepas com perfil de similaridade de 58% a 100% referentes aos isolados desse estudo (Figura 11). Na formação do alinhamento (Figura 12a 12b), identificamos seqüências de aminoácidos que se repetem tanto nos isolados de nosso estudo, como em cepas oriundas de outras regiões geográficas. A figura 24 no anexo indica o percentual de similaridade entre as seqüências em questão.

4.4.3 Cladograma referente ao alinhamento entre bloco 2 e seqüências disponibilizadas no genbank

Todos os isolados do bloco 2 foram agrupados e combinados em um cladograma (Figura 13) com seqüências provenientes de outras regiões (seqüências do genbank), indicando uma aproximação dos isolados da região da Amazônia com isolados de outras regiões geográficas, um dado interessante é que cepas de regiões distantes como é o caso da Tailândia, Bangladesh e Coreia foram similares a alguns isolados do bloco 2, isso mostra que evolutivamente houve alterações em parasitas encontrados em nossa região, entretanto, o perfil de similaridade ainda é importante. Cepas com registro inicial ABV, ficaram entre os grupos mais próximos dos isolados de nosso estudo, essas cepas são oriundas também de uma região da Amazônia Legal e foram descritas nos estudos de Bastos em 2007. Em anexo, a figura (24) confirma o percentual de similaridade e divergência em relação aos nossos isolados e aos encontrados em outras regiões geográficas.

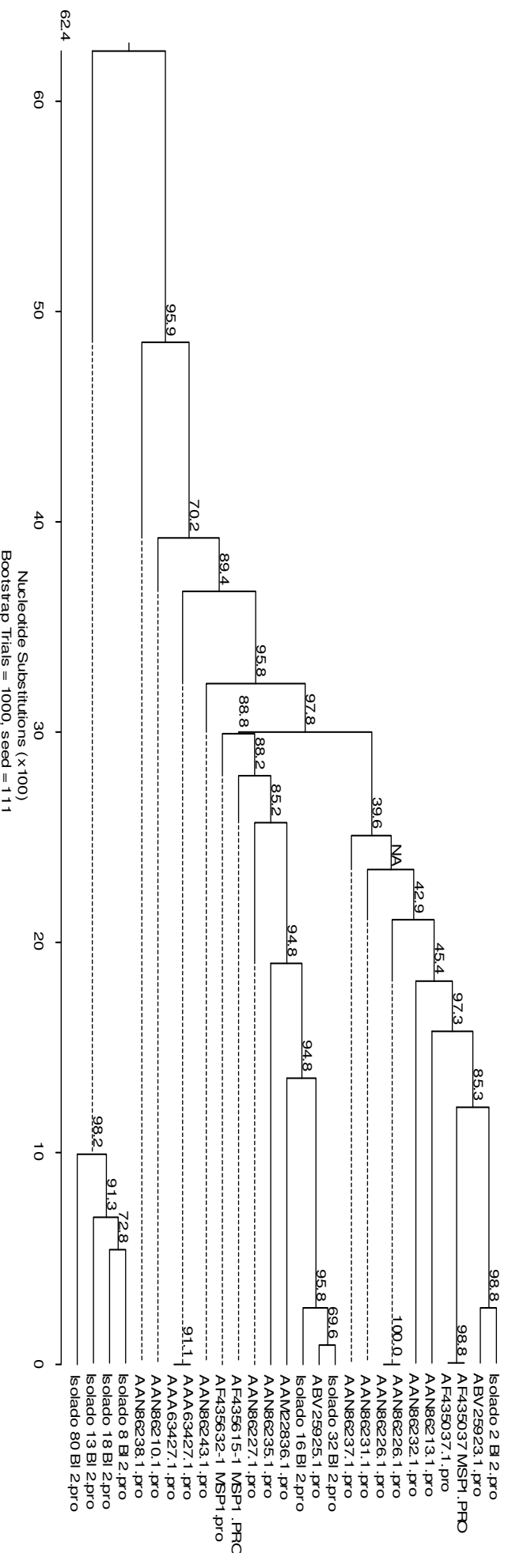


Figura 13: Cladograma referente ao alinhamento entre bloco 2 e seqüências disponibilizadas no genbank

4.5 Recombinações de seqüências encontradas no Bloco 2

4.5.1 Seqüência peptídica SDENAKRGGQSTN conservada em alguns isolados

Através do alinhamento realizado entre algumas amostras que mostraram ser mais semelhantes de acordo com suas seqüências de aminoácidos, podemos notar que alguns isolados são mais similares do que outros de acordo com alguns fatores, como por exemplo, uma repetição de um peptídeo. Os isolados 2 e 58 se assemelham na repetição as seqüência peptídica SDENAKRGGQSTN (Figura 14), enquanto que outros isolados 18, 13, 8 e 59 não possuem esta seqüência (figura 15).

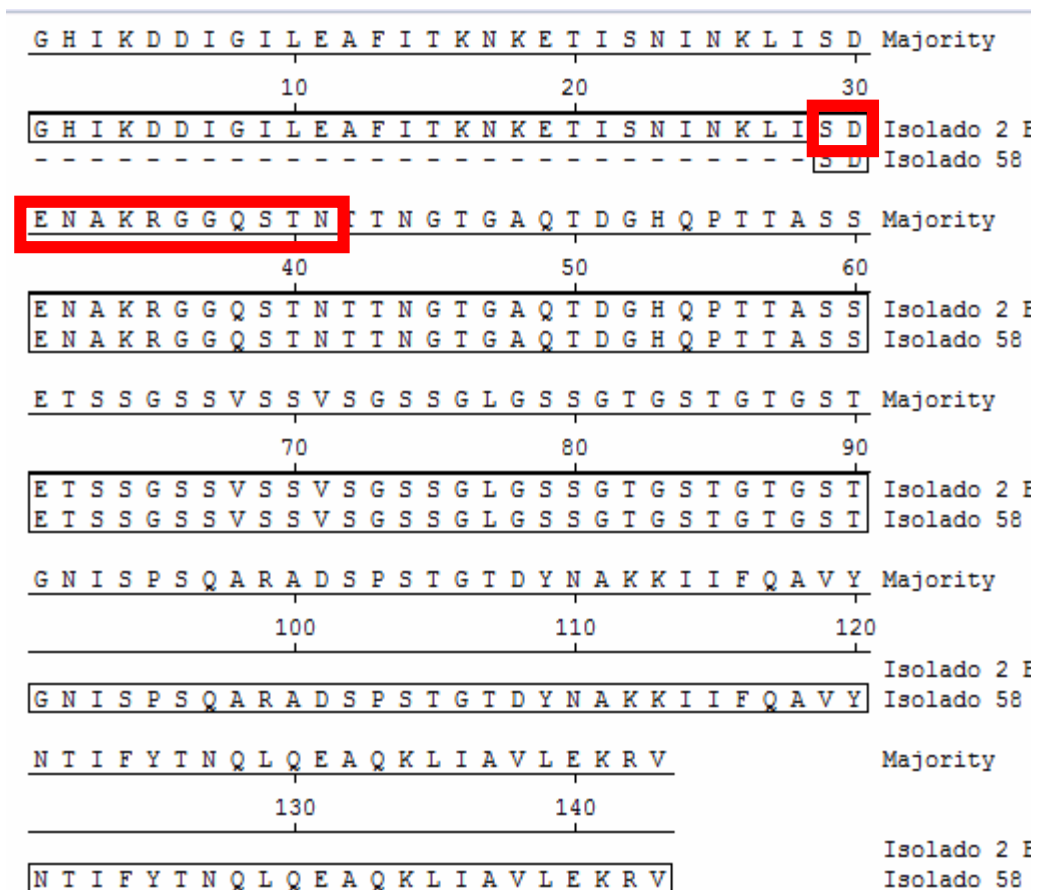


Figura 14: Seqüência peptídica SDENAKRGGQSTN conservada em alguns isolados

4.5.2 Recombinação na seqüência PAPAAPSSTNANYEAKKIIYQAIYNGI

A seqüência majoritária que aparece para o grupo de isolados 18, 13, 8 e 59 seqüência PAPAAPSSTNANYEAKKIIYQAIYNGI, parece ser um peptídeo conservado para os isolados do bloco 2, porém nos isolados 2 e 58 não encontramos esta seqüência.

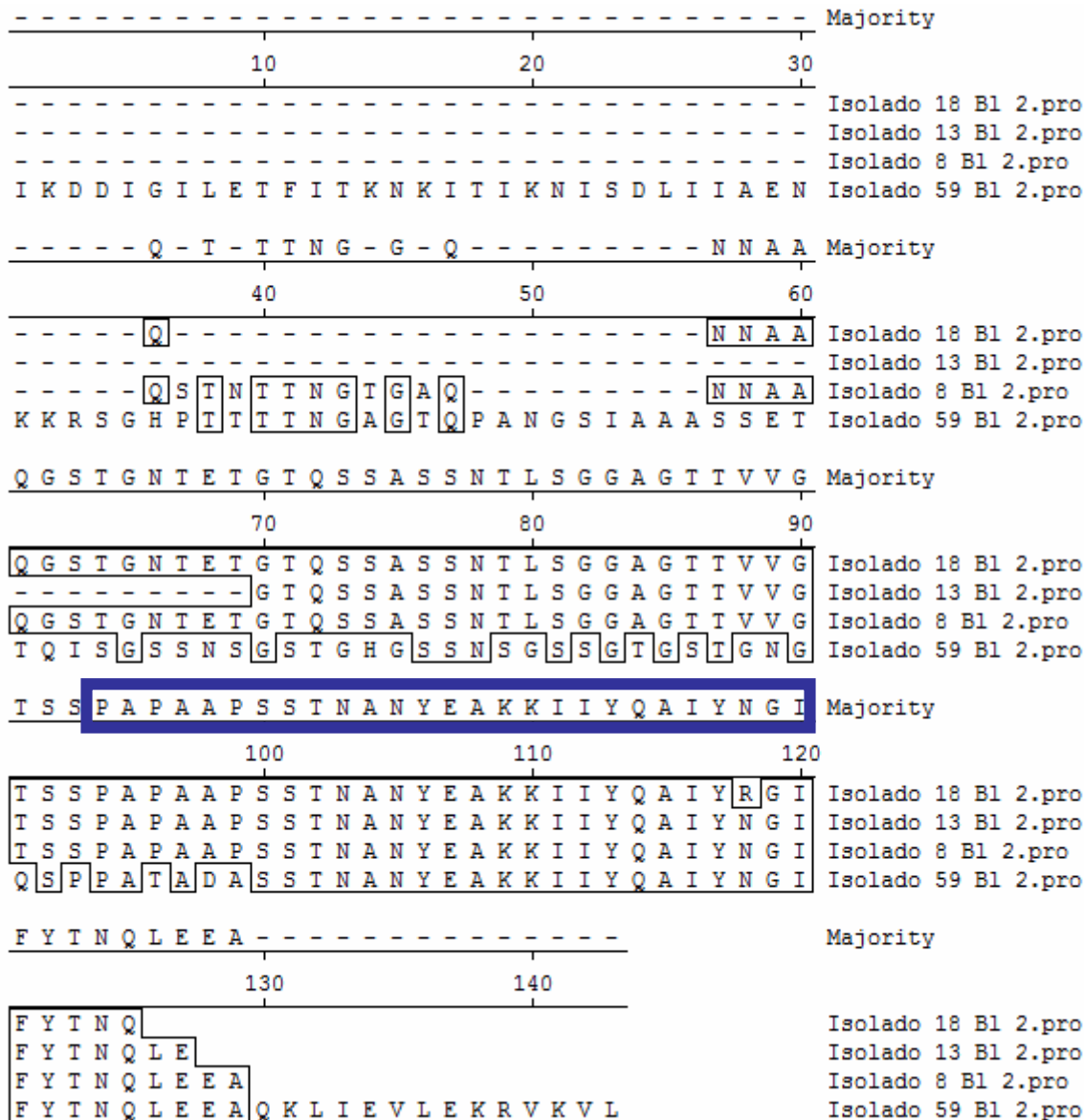


Figura 15: Recombinação na seqüência PAPAAPSSTNANYEAKKIIYQAIYNGI

4.5.3 Seqüência contendo evidência de processo recombinatório LISDENAKRGSQ SPAPAAPSSTNANY

Na análise do alinhamento, identificamos também dois outros grupos com perfis semelhantes, nesses grupos identificamos o peptídeo KLISDENAKR e o SPAPAAPSSTNANY, onde os isolados 61 e 80 puderam ser classificados.

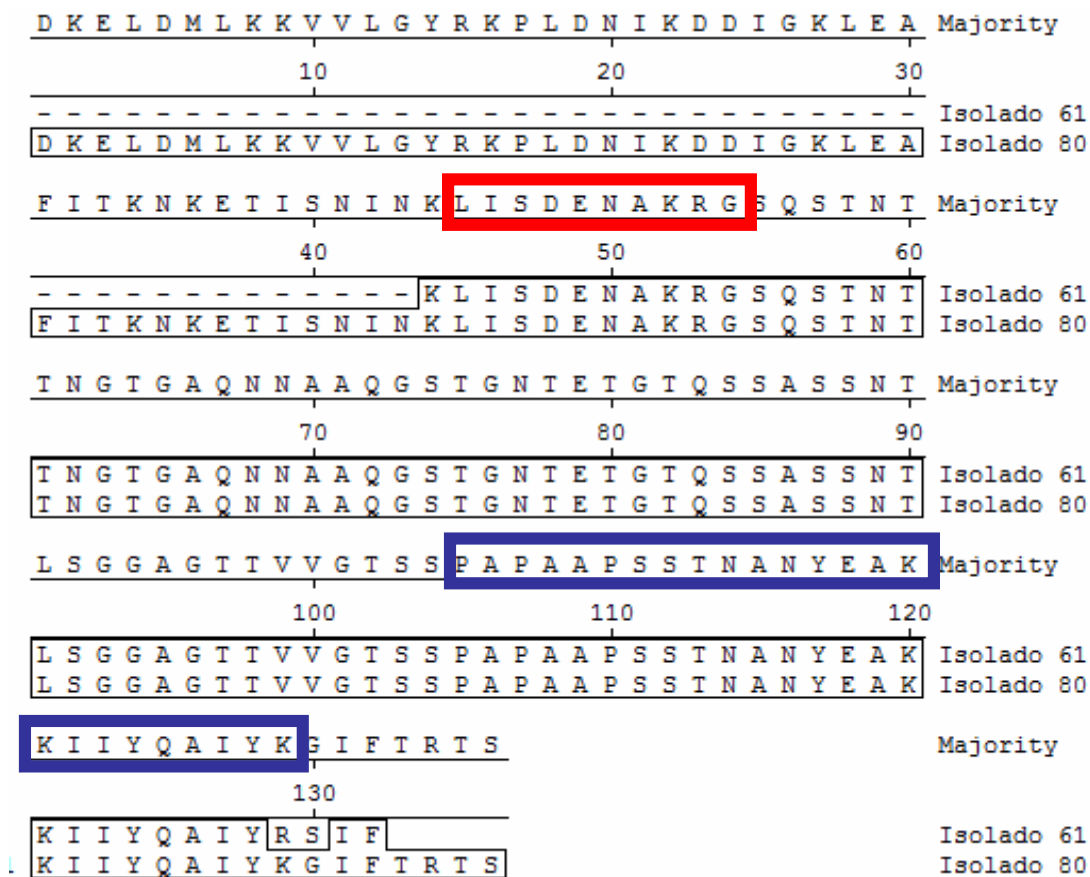


Figura 16: Recombinação ISDENAKRGSQ SPAPAAPSSTNANYE

4.5.4 Repetições de SSX

Putaporntip e colaboradores (2002) identificaram oligômeros nas seqüências do bloco 2 para diferenciação de vários haplótipos. Nos isolados de nosso estudo encontramos um trímero de aminoácidos que se repetem, com um perfil semelhante ao do estudo de Putaporntip SSX (onde X é definido como qualquer resíduo). Percebemos quatro tipos de combinações de trímero, com isolados contendo 6 repetições, 5, 4 e duas repetições (Figura 17). O isolado 58 há seis repetições desta seqüência, nos isolados 18, 13, 8 e 61 quatro repetições e no isolado 59 há cinco repetições.

GHIKDDIGILEAFITKNKETISNINKLISDENAKRGGQSINTTNGTGAQTDGHQPT TASSEISSGSSVSSVSGSSGLGSSGTGSGTGTGST	Isolado 2: 6 repetições
S DENAKRGGQSINTTNGTGAQTDGHQPTTASSEISSGSSVSSVSGSSGLGSSGT GSTGTGSGTGNISPSQARADSPSTGTDYNAKKIIFQAVYNTIFYTNQLQEAQKLI VLEKRV	Isolado 58: 6 repetições
IKDDIGILETFITKNKITIKNISDLIAENKKRS GHPTTTINGAGTQPANGSIAAASS ETTQISGSSNSGSGTGHGSSNSGSSGTGSGTGNQSPATADASSTNANYEAKKIIA YNGIFYTNQLEE AOKLIEVLEKRVKVL	Isolado 59: 4 repetições
QNNAAQGS TGNTETGTQSSASSNITLGGAGTTVVGTSSPAPAAPSSTNANYEA KKIYQAIYRGIFYTNQ	Isolado 18: 4 repetições
GTQSSASSNITLGGAGTTVVGTSSPAPAAPSSTNANYEAKKIYQAIYNGIFYTN QLE	Isolado 13: 4 repetições
QSTNTTNGTGAQNNAAQGS TGNTETGTQSSASSNITLGGAGTTVVGTSSPAPA PSSTNANYEAKKIYQAIYNGIFYTNQLEEA	Isolado 8: 4 repetições
KLISDENAKRGSQSINTTNGTGAQNNAAQGS TGNTETGTQSSASSNITLGGAG TTVVGTSSPAPAAPSSTNANYEAKKIYQAIYRSIF	Isolado 61: 4 repetições

Figura 17: Repetições de SSX, onde X refere-se a qualquer aminoácido.

4.6 Identidade das seqüências do bloco 6 dos isolados deste estudo com seqüência disponibilizadas no Genbank

Selecionamos seqüências já depositadas em banco de dados (genbank) através do blast(p) que se assemelhassem aos isolados encontrados no bloco 6, a figura 18 mostra os dados dessas seqüências.

Organismo	Identidade %	Região	Registro	Referências
ISP-1 (T-117)	98	Tailândia	BAA18972.1	Putapomtip <i>et al.</i> , 2002
MSP-1	85	Bangladesh	AAN86232.1	Putapomtip <i>et al.</i> , 2002
MSP-1	98	Brasil	AAN86238.1	Putapomtip <i>et al.</i> , 2002
MSP-1	98	China	AAR30530.1	Zhang <i>et al.</i> , 2004
MSP-1	98	Venezuela	AAV41015.1	Leclerc <i>et al.</i> , 2005
MSP-1	99	Amazonas-Brasil	ABJ53012.1	Santos-Ciminera <i>et al.</i> , 2007
MSP-1	99	Amazonas-Brasil	ABJ52047.1	Santos-Ciminera <i>et al.</i> , 2007
MSP-1	98	Amazonas-Brasil	ABJ53048.1	Santos-Ciminera <i>et al.</i> , 2007
MSP-1	87	Paquistão	ACU56867.1	Zakeri <i>et al.</i> , 2009
MSP-1	98	Itália	CAD41952.1	Severine <i>et al.</i> , 2002
MSP-1	98	Itália	CAB60129.1	Severine <i>et al.</i> , 1999
MSP-1	87	Paquistão	ACU56868/Bangkok	Zakeri <i>et al.</i> , 2009
MSP-1	98	Paquistão	ACU56853.1/Irã	Zakeri <i>et al.</i> , 2009

Figura 18: Identidade das seqüências do bloco 6 dos isolados deste estudo com seqüência disponibilizadas no genbank.

4.6.1 Alinhamento das seqüências do bloco 6 com seqüências do Genbank

Foram selecionadas do genbank através do programa blast(p) cepas com perfil de similaridade de 85% a 99% referentes aos isolados do bloco 6. Alinhamos os isolados do bloco 6 (Figura 19a 19b) com as seqüências encontradas no genbank, e a partir da análise podemos encontrar perfis de seqüências de aminoácidos de cepas oriundas de outras regiões geográficas, bem como de nossa região, como é o caso das seqüências com início de registro ABJ, semelhantes aos perfis dos isolados encontrados em nosso estudo. Assim como no bloco 2 isolados do bloco 6, também apresentaram um percentual alto de similaridade em relação a cepas procedentes de outras regiões geográficas e ao alinharmos ambas as seqüências percebemos que existem porções de aminoácidos conservadas tanto nas cepas oriundas de regiões diferentes da região de nosso estudo, quanto dos isolados provenientes do nosso estudo.

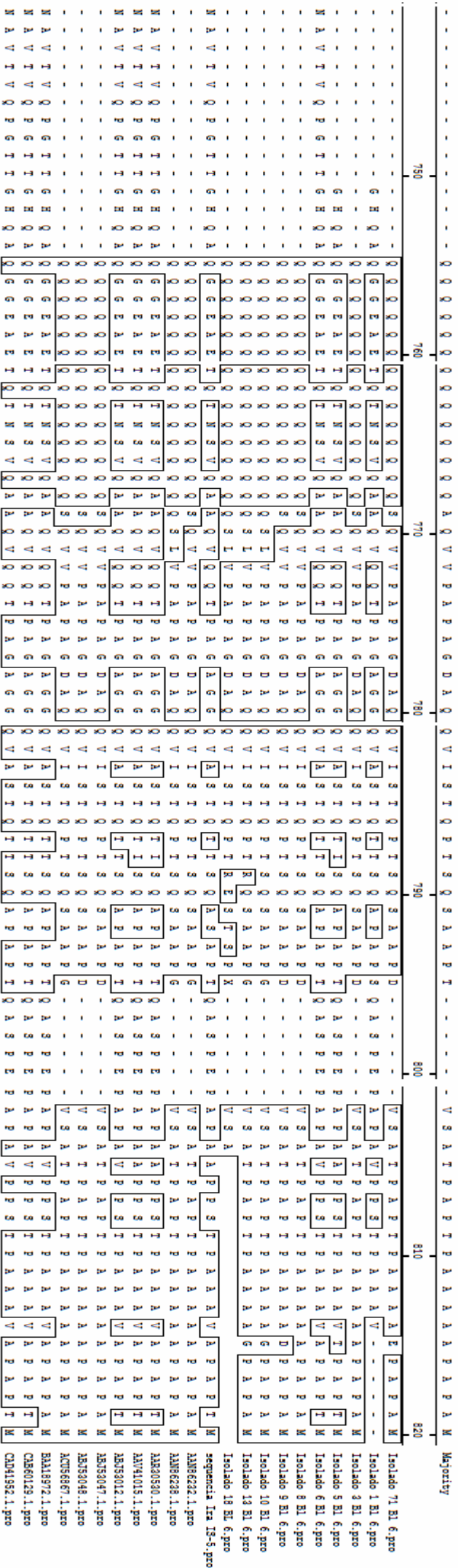


Figura 19 a: Alinhamento das seqüências do bloco 6 com seqüências do genbank

4.6.2 Cladograma da seqüência obtida através do seqüenciamento entre os isolados do bloco 6 com seqüências do genbank

Todos os isolados do bloco 6 foram agrupados e combinados com seqüências provenientes de outras regiões (seqüências do genbank) na árvore filogenética (Figura 20), indicando uma aproximação dos isolados da região da Amazônia com isolados de outras regiões geográficas. Percebemos na figura que existem dois grandes grupos de isolados que estão conectados por um ramo maior na árvore filogenética, indicando assim isolados que combinam mais com algumas seqüências do que com outras. O percentual de identidade e divergência de cada isolado combinado encontra-se no anexo na figura 25.

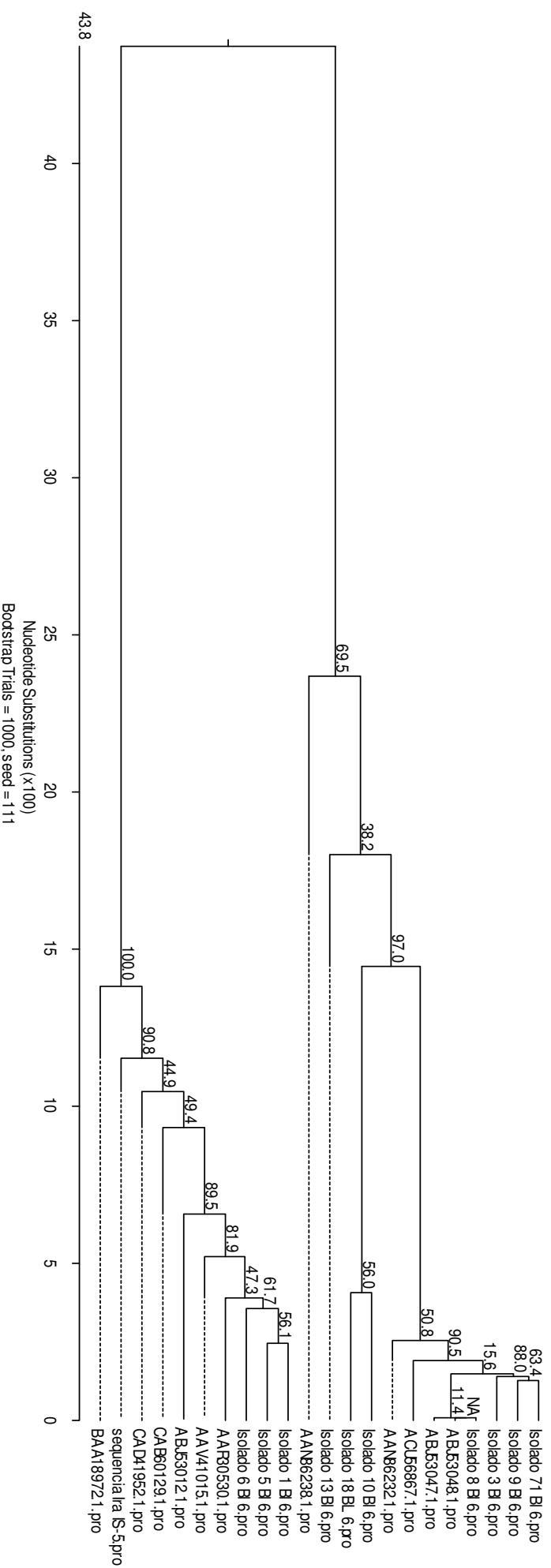


Figura 20: cladograma entre seqüências do bloco 6 do gene MSP-1 com seqüências do genbank.

4.7 Análises das seqüências do bloco 10 do gene MSP1

4.7.1 Identidade das seqüências do bloco 10 dos isolados deste estudo com seqüências disponibilizadas no Genbank

Selecionamos seqüências já depositadas em banco de dados (genbank) através do blast(p) que se assemelhassem aos isolados encontrados no bloco 10, a figura 21 mostra os dados dessas seqüências.

Organismo	Identidade	Região	Registro	Referências
	96			
MSP-1/SalI	96	Salvador I (<i>P.vivax</i>)	XP001614842	Carlton, 2008
MSP-1	96	Taiândia	AAN86240	Putaporntip <i>et al.</i> , 2002
MSP-1	96	Taiândia	AAN86234	Putaporntip <i>et al.</i> , 2002
MSP-1	95	Coréia	AAM22864	Han and Chai.,2001
MSP-1	98	Taiândia	AAN86217	Putaporntip <i>et al.</i> , 2002
MSP-1	96	Coréia do Sul	AAAF91164.1	Putaporntip <i>et al.</i> , 2000

Figura 21: Identidade das seqüências do bloco 10 dos isolados deste estudo com seqüências disponibilizadas no genbank.

4.7.2 Alinhamento referente a seqüências do bloco 10 associadas com seqüências do genbank

O alinhamento entre isolados do bloco 10 (figura 22) mostra seqüências majoritárias entre o grupo, seqüências fora da marcação representam aminoácidos diferentes do grupo majoritário de aminoácidos. Pode-se perceber que houve significativas seqüências de aminoácidos em comum entre o Bloco 10. Foram selecionadas do Genbank através do programa blast(p) cepas oriundas de outras regiões geográficas com perfil de similaridade de 95% a 98% referentes aos isolados do bloco 10 percebemos no alinhamento que o perfil de isolados do bloco 10 é semelhante ao perfil de isolados de outras regiões geográficas, inclusive foi possível perceber que esse bloco assim como os outros também apresenta peptídeos conservados. A partir desse alinhamento podemos confirmar que o bloco 10 realmente é o bloco mais conservado de nosso estudo, não apenas na região estudada mais também em outras regiões geográficas

4.7.3 Cladograma referente a seqüências do bloco 10 associadas com seqüências do genbank

Através dos cladograma (figura 23) percebemos que os genótipos com o registro AANM22864, AAN86240, AAF91164, XP 00161842 e o AAN86217, são similares aos encontrados nesse estudo, o interessante disso é que somente o XP00161842 – Sal I - é um genótipo conservado nas diversas regiões com potencial malarígeno, os outros genótipos encontrados são oriundos de regiões pertencentes à Ásia, apesar de pertencerem a outro continente percebemos que os isolados da região do Amazonas, têm um perfil muito semelhante aos encontrados naquela região.

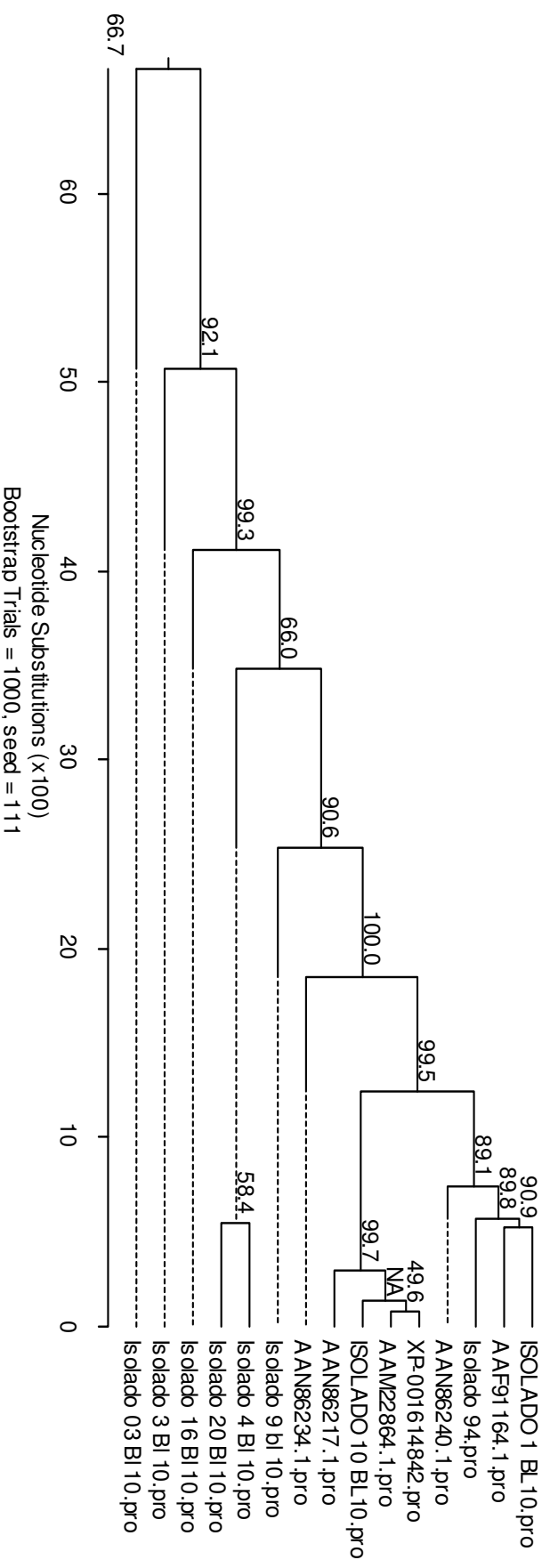


Figura 23: Cladograma referente a seqüências do bloco 10 associadas com seqüências do genbank

Discussão

5. DISCUSSÃO

A malária causada por *Plasmodium vivax* representa um grande problema para saúde pública em muitos países tropicais e subtropicais. Um dos grandes problemas para o desenvolvimento da vacina contra a essa doença é a diversidade antigênica das proteínas candidatas a vacina. A crítica para o problema emergente é que a resposta do hospedeiro a um alelo, não é muito eficaz contra parasitas que expressam diferentes formas alélicas (Keittel *et al.*, 1999). Portanto, estudos de variação genética para os antígenos de vacinas contra *Plasmodium vivax* são muito importantes.

O estudo do polimorfismo é importante não só para estabelecer o repertório antigênico dos isolados de regiões onde a malária é endêmica, mas também para elucidar os mecanismos que são gerados através da diversidade antigênica. Dentre as proteínas candidatas a vacina, a proteína 1 de superfície do *Plasmodium vivax* (PvMSP1) é uma forte candidata, já que possui um papel protetor espécie – específico e segundo Holder e colaboradores (1999), sua importância biológica na inibição da penetração de parasita no eritrócito através de anticorpos já é bem conhecida.

Os genes que codificam a MSP-1 dos plasmódios encontram-se em cópia única no genoma haplóide, cada clone expressa somente uma das subsequências-tipo encontradas na natureza. (Rich *et al.*, 2000), entretanto, novas variantes desses genes podem ser geradas, predominantemente por meio de recombinação intragênica durante a meiose que ocorre no inseto, nos casos em que os zigotos resultantes da fusão de gametócitos carregam alelos geneticamente diferentes (Kemp, 1992). O polimorfismo de PvMSP-1 tem sido considerado como resultado de recombinação interalélica na natureza (Putaporntip *et al.*, 2002). Em relação ao polimorfismo do gene MSP-1 de *P. falciparum*, pouco se sabe sobre o polimorfismo de *P. vivax* MSP-1. Dessa forma, este estudo tende a contribuir com novos dados a respeito dessa diversidade da PvMSP1 na região do entorno de Manaus.

Em nosso estudo, identificamos diferentes seqüências de isolados do gene MSP-1 nos blocos 2, 6 e 10 na região de Manaus, verificamos que essas seqüências encontradas possuem características que classificam o isolado como do Bloco 2, Bloco 6 e Bloco 10, apesar de encontrarmos algumas características que são conservadas para um bloco determinado, verificamos que em alguns isolados esses perfis diferem, resultando em uma grande variabilidade genética. Em um estudo realizado por Bastos e colaboradores na região do Acre (2007), observou-se a grande variabilidade genética do gene MSP-1 nesses mesmos blocos.

As seqüências destes antígenos provenientes de isolados circulantes em uma região de Rondônia e outra do Pará foram comparadas às encontradas nos parasitos da região do Acre, notou-se que nenhum dos blocos pôde ser considerado dimórficos, ou seja, nenhuma das seqüências pôde ser agrupada como do tipo Belém ou do tipo Salvador, já que algumas delas divergiram de ambas, muitas delas sendo geradas por recombinação entre as duas cepas. Estes dados reforçam a versatilidade do polimorfismo do gene MSP1 na geração da diversidade antigênica da proteína nos isolados de *P. vivax* circulantes nas regiões do Brasil.

De acordo com os resultados da amplificação dos produtos de PCR para os três blocos estudados (Tabela 4) de 61 isolados, trinta e seis foram positivos para o bloco 2, trinta e cinco foram positivos para o bloco 6 e quarenta e três foram positivos para o bloco 10. Pode-se perceber que o bloco 10 foi o bloco mais amplificado já que quase todos os produtos de PCR puderam ser visualizados em gel de agarose, corroborando os dados encontrados na literatura que apontam entre os blocos polimórficos o bloco 10 é mais conservado. Entre os resultados, houve doze que amplificaram na PCR em apenas 1 bloco. Esses resultados sugerem que há existência de polimorfismos na região alvo dos primers utilizados nesta pesquisa. Apesar do polimorfismo nestes isolados a grande maioria das amostras foi amplificada demonstrando que os pares de primers utilizados neste estudo (e desenhados por Bastos e colaboradores, 2007) são aplicáveis nos estudos genéticos dos isolados

no Brasil. Experimentos preliminares realizados com primers desenhados Inwong e colaboradores (2005) não serviram para amplificar os blocos 2, 6 e 10 dos isolados do Brasil (dados não mostrados). O estudo de Inwong e colaboradores foram aplicados na Ásia e os primers foram desenhados para os isolados desta região. Portanto, o polimorfismo nas seqüências alvos destes primers é responsável pela ineficácia das nossas ampliações.

Os isolados do bloco 2 de nosso estudo, foram considerados blocos mais susceptíveis a recombinações, percebemos durante a análise do alinhamento entre as suas seqüências uma variação alélica, entre os seguimentos de aminoácidos, o que pôde ser detectado através de perfis de peptídeos que foram característicos em algumas seqüências de nossos isolados, isso indica que há uma variedade de haplótipos do gene MSP1 na região do Amazonas. Em estudo feito na Ásia por Putaporntip e colaboradores (2002), também foram encontrados isolados caracterizados por variações alélicas. Esses isolados foram classificados como haplótipos de acordo com cada perfil de variação. Nos eucariotos, a recombinação genética homóloga esta geralmente associada à divisão celular (garantindo a segregação ordenada dos cromossomos) e ao reparo de DNA. A recombinação ocorre com maior freqüência durante a meiose, processo no qual células diplóides da linhagem germinativa, com dois conjuntos iguais de cromossomos, dividem-se para produzir gametas haplóides, cada gameta possuindo apenas um membro de cada par de cromossomos que em outro estágio serão referidos como cromátide irmãs. É nessa etapa que ocorre recombinação genética homóloga que aumentará a diversidade genética da população (Lehninger.,2002), de modo que a imunidade adaptativa será cepa específica. Este fenômeno representa o grande entrave para desenvolvimento de uma vacina anti - malárica efetiva.

Outro dado muito importante em relação ao bloco 2 que pôde ser detectado foi que esses isolados, foram semelhantes a cepas oriundas de regiões geográficas bem distantes da Amazônia Brasileira, indicando assim que apesar da evolução das espécies de parasitas, muitos ainda

carregam identidades genotípicas que assemelham-se a seus ancestrais. Segundo historiadores e evolucionistas, antes da separação do novo e velho mundo era possível haver a existência de parasitos causadores da malária, a partir da separação houve migração de espécies diferentes para diferentes regiões, influenciados por fatores climáticos. Porém, até hoje ainda existem discussões a esse respeito, alguns historiadores acreditam, que algumas espécies de parasitos possam ter sobrevivido em uma viagem por mar ou mesmo uma sucessão de viagens do Sul da Ásia para o leste da costa das Américas (Carter and Mendis., 2002).

As análises do seqüenciamento para o bloco 6 apresentaram um interessante perfil a respeito dos isolados desse bloco, o alinhamento entre as seqüências mostrou que existe uma grande quantidade do aminoácido glutamina (Q) entre as seqüências. Putaporntip e colaboradores (1997) falaram a respeito desse grupo de aminoácidos que eles chamam de grupo polyglutamina (Poli-Q), segundo o autor esse marcador é característico da cepa Belém e representa a principal fonte de diversidade genética da cepa. Além disso, uma região Poli-Q é considerada importante sítio de recombinação entre tipos de Belém e Sal I, e como mostrado na literatura, recombinações interalélicas entre esses tipos são muito freqüentes. Santos-Ciminera (2007) e Putaporntip e colaboradores (2007) encontraram genótipos na região Amazônica que foram semelhantes aos isolados encontrados em nosso estudo, isso mostra que perfis do gene MSP1 de *P. vivax* para esse bloco já esta sendo bem caracterizado.

Os isolados do bloco 10 foram caracterizados em nosso estudo como isolados com genótipos mais conservados, visto que apresentaram seqüências de aminoácidos conservadas tanto para região da Amazônia quanto para regiões mais distantes. Isolados pertencentes a esse bloco são geralmente caracterizados por muitos autores como dimórficos, isto é, são considerados como genótipos Salvador ou genótipos Belém. Em nosso estudo podemos perceber que as seqüências foram muito semelhantes à cepa Salvador, mas também apresentaram similaridade com outros genótipos, sendo similares inclusive com os encontrados na

Tailândia por Putaporntip e colaboradores (2002) e Han e Chai (2001) na Coreia do Sul.

Nossos resultados mostraram que na região do estado do Amazonas, assim como em outras regiões com potencial malarígeno, também é possível encontrar diferentes genótipos da Proteína 1 de Superfície de Merozoita de *Plasmodium vivax*. Essa proteína tem sido estudada intensivamente como uma grande candidata a vacina. Nogueira e colaboradores (2005), em estudos realizados em uma região também incluída na Amazônia Legal, demonstraram que pacientes assintomáticos com malária apresentaram anticorpos contra uma proteína recombinante que foi construída a partir de uma cepa Belém. Em acordo com diversos estudos referentes a essa proteína, o estudo do perfil de genótipos encontrados em diferentes regiões geográficas é de extrema importância, já que poderão dar suporte para novos conhecimentos em relação à PvMSP1, podendo contribuir, com o aceleração da produção de uma vacina eficaz contra o *Plasmodium vivax*.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

1. Nossos resultados mostraram que na região do entorno de Manaus, assim como em outras regiões com potencial malarígeno, também é possível encontrar diferentes genótipos da Proteína 1 de Superfície de Merozoita de *Plasmodium vivax*.

2. Os isolados do bloco 2 de nosso estudo mostraram ser blocos bastante polimórficos, porém, com características semelhantes, formando haplótipos diferentes. Detectamos genótipos semelhantes a isolados no Brasil, bem como genótipos isolados em outras regiões geográficas, como, por exemplo, genótipos oriundos da Ásia.

3. O bloco 6 apresentou um perfil semelhante ao já descrito em outros estudos, com por exemplo, o grupo Poli-Q que é um determinante de recombinação gênica entre cepas e pode ser determinante de cepas pertencentes ao genótipo Belém.

4. O bloco 10 foi o bloco mais conservado do nosso estudo, percebemos que esse bloco tem seqüências que não são conservadas apenas em nossa região, mais também em outras regiões geográficas, como é o caso de regiões da Ásia, por exemplo.

5. A partir desses resultados serão construídas proteínas recombinantes das seqüências mais encontradas nos isolados aqui estudados. Com isso, em um futuro próximo, poderemos analisar o nível de anticorpos de pacientes contra esses epítomos recombinantes.

Dispondo de resultados favoráveis, continuaremos nosso estudo para em um futuro em longo prazo, realizarmos testes para avaliar o potencial de anticorpos contra esses epítomos na inibição da invasão do merozoíto no eritrócito.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anders. R.F., Falk, M., Al-Yaman, F., Genton, B., Triglia, T., T., Lewis, D., HII, J., Beck, H.P, Alpers, M.p. Relationship between humoral response to plasmodium falciparum merozoite surface antigen – 2 and malaria morddity in um higly endemic area of Papua New Guinea. AM. J. Trop. Med. Hyg. 51: 593-602, 1994.

Bastos Melissa and Urbano et al., Antigenic Polymorphism and Naturally Acquired Antibodies to *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in Rural, Clinical and Vaccine Immunology, 2007.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso. Ministério da Saúde, 6º ed. Rev. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

Camargo, L.M.A.; Noronha, E.; Salcedo, J.M.; Dutra, A.P.; Krieger, H.; Pereira da Silva, L.H. .; Camargo, E.P.The epidemiology of malaria in Rondônia (Western Amazon region, Brazil): study of a riverine population. Acta Trop., v.72, pp.1-11,1999.

Cowman AF, O'Donnel RA, Koning – Word TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder Jc, Crabb BS. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)- 1₁₉ area a major component of the invasion-inhibitoryresponse in individuals immune to malaria. J. Exp. Med.; 193: 1493-12, 2001.

Da Silveira, L.A., M.L. Dorta, E. A. Kimura, A. M. Katzin, F. Kawamoto, K. Tanabe and M. U. Ferreira. Allelic diversity and antibody recognition of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 during hypoendemic malaria Transmission in the Brasillian amazon region. Infect Immun. 67: 5906 – 5916, 1999.

Datusus, Ano '2008' Casos atuais de Malaria. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria

Acesso em 02 de Junho de 2009.

Day, K. P., Marsh, K. Naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum. Immunol. Today. 12:68-71, 1991.

Del Potillo, H.A.; Longacre, S.; Khouri, E.; David, P.H. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:4030-4, 1991.

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

Guerra CA, Snow RW, Ray SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. Trends in parasitology. 22:353-8, 2006.

Herrera S, Arévalo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. Trends in Parasitology. 23: 122-8. 2007.

Holder, A.A & Blackman, M.J. What is the function of MSP1 on the malaria merozoite? Parasitol Today, 10:182-4, 1996.

Howard, R. J. Pasloske, B. L. Target antigens for asexual malaria vaccine development. Parasitol. Today. 9: 369-374, 1993.

Kemp, D. J. Antigenic diversity and variation in blood stages of *Plasmodium falciparum*. Cell Biology. 70: 201-207, 1992.

Mancilla, L.I., G. Levitus, K. Kirchgatter, F. Mertens, S. Herrera and H. A. del Portillo. *Plasmodium vivax*: Dimorphic DNA sequences from the MSP – 1 gene code for regions that are immunogenic in natural infections. Exp. Parasitol. 79:148-158, 1994.

Martinez-Espinosa FE, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim WD. Malaria During Pregnancy in a Reference Center from the Brazilian Amazon Unexpected increase in the Frequency of *Plasmodium falciparum* infections. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Feb. 99(1) Rio de Janeiro. 2004.

Mendis K N, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The Neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. ; 64:97-106; 2001.

Ministério da Saúde, 2007 www.saude.gov.br/ms

Acesso 16 de Abril de 2009.

Nogueira, P.A., F.P. Alves, C. Fernandez-Becerra, O. Pein, N.R. Santos, L.H. Pereira da Silva, E.P. Camargo, and H.A. del Portillo. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.* 74:2726-2733, 2006.

Perlmann P, Troye-Blomberg M (eds): *Malaria Immunology*. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira Mu, Kho Wg, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(25):16348-53, 2002.

Putaporntip, C.; Jongwutiwes, S; Tanabe, K.; Thithong, S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai gene of *Plasmodium vivax* from Thai Isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.* , 84:49-56, 1997.

Ranford-Cartwright, Babiker, H. A., L.c., Currie, D., Charlwood, J. D., Billingsley, P., Teuscher, T., Walliker, D. Random. Mating in a natural population of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitol.* 109: 413-421, 1996.

Rey L. *Bases da Parasitologia Médica*. 2º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.

Rich, S.M., Ferreira, M.U., Ayala, F.L, The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today.* 16:390-396, 2000.

Tetteh Kevin K. A, Spencer D. Polley David R. Cavanagh, Richard J. Pearce, Jennifer M. Lloyd, Kalifa A. Bojang, Daniel M. N. Okenu, Brian M. Greenwood, Jana S. McBride, and David J. Conway Repeat Sequences in Block 2 of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Are Targets of Antibodies Associated with Protection from Malaria, *Infection and Immunity*, p. 5928–5935, 2005.

Tonhosolo, R., Wunderlich, G., Ferreira, M.U. Differential antibody recognition of four allelic variants of the merozoite surface protein 2 (MSP-2) of *Plasmodium falciparum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48: 556-563, 2001.

World Health Organization (WHO) World Malaria Situation in 2000.
<http://www.who.in/health-tropios/malaria.htm>

Acesso em 10 de Abril de 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Situation in 2005.
<http://www.who.int/health-tropics/malaria.htm>Acesso em 12 de Abril de 2009.

Anexos

		Percent Identity																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	Isolado 94.pro	90.6	37.8	49.5	55.4	70.5	87.5	77.5	76.8	50.5	47.4	11.5	68.6	58.8	78.3	87.7	71.0	78.3	78.3	98.6	1
2	ISOLADO 1 BL10.pro	7.6	35.6	45.4	53.1	88.6	98.4	64.4	72.5	44.4	48.5	13.1	86.4	52.9	76.1	85.9	62.0	76.1	69.3	85.9	2
3	Isolado 03 Bl 10.pro	59.4	56.6	100.0	66.7	9.1	6.7	100.0	33.3	100.0	66.7	4.4	35.6	100.0	35.6	37.8	33.3	35.6	66.7	37.8	3
4	Isolado 3 Bl 10.pro	34.1	55.6	0.0	82.5	15.9	10.9	99.0	52.6	99.0	74.2	6.6	46.4	92.8	53.6	46.4	51.5	53.6	82.5	51.5	4
5	Isolado 4 Bl 10.pro	27.5	49.9	26.4	12.6	13.6	32.8	79.2	58.5	83.8	99.0	9.8	52.5	84.3	60.0	52.3	57.7	60.0	93.1	56.9	5
6	Isolado 5 Bl 10.pro	6.3	12.4	0.0	79.9	0.0	84.1	77.3	65.9	15.9	13.6	11.4	15.9	15.9	90.9	90.9	45.5	90.9	90.9	90.9	6
7	Isolado 8 Bl 10.pro	5.3	1.6	0.0	79.9	4.7	2.7	93.8	84.4	10.9	10.9	13.1	26.6	15.6	95.3	96.9	70.3	95.3	95.3	95.3	7
8	Isolado 9 bl 10.pro	17.8	29.9	0.0	1.0	10.7	8.6	4.9	74.6	98.0	75.3	11.5	51.7	99.0	69.9	64.4	60.1	69.9	87.1	69.3	8
9	ISOLADO 10 BL10.pro	17.1	25.1	127.5	44.7	31.8	0.0	1.8	22.7	53.5	52.6	11.5	55.1	61.8	99.3	68.3	90.8	99.3	76.8	73.2	9
10	Isolado 16 Bl 10.pro	30.9	56.1	0.0	1.1	10.9	0.0	0.0	2.0	41.0	74.2	6.6	45.5	92.9	54.5	45.5	52.5	54.5	82.8	52.5	10
11	Isolado 20 Bl 10.pro	41.6	58.1	26.4	13.7	1.0	0.0	0.0	12.2	46.8	13.7	8.2	45.4	74.2	54.6	47.4	51.5	54.6	91.8	50.5	11
12	Isolado 27 Bl 10.pro	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.1	6.6	27.9	13.1	13.1	13.1	26.2	27.9	24.6	12
13	Isolado 46 Bl 10.pro	18.3	9.6	56.6	54.0	55.8	0.0	23.3	49.8	42.8	55.1	59.2	1000.0	52.9	64.4	75.4	62.7	64.4	52.5	76.3	13
14	Isolado 89 Bl 10.pro	26.6	40.0	0.0	0.0	10.5	0.0	0.0	1.0	35.2	0.0	13.7	0.0	40.0	62.7	52.9	60.8	62.7	84.3	60.8	14
15	XP-001614842.pro	17.1	25.4	127.5	59.4	42.0	9.7	4.8	30.4	0.7	55.2	52.4	182.9	43.9	40.2	86.6	97.7	89.7	92.2	86.3	15
16	AAF91164.1.pro	13.5	13.4	60.6	58.6	52.4	9.7	3.2	31.5	31.3	59.0	63.7	0.0	23.1	45.3	13.1	78.1	90.5	91.1	91.8	16
17	AAM22864.1.pro	19.2	27.2	151.3	62.6	43.9	0.0	2.2	34.4	2.3	58.4	58.0	0.0	45.5	44.6	2.0	21.2	97.7	81.6	85.5	17
18	AAN86217.1.pro	17.1	25.4	127.5	59.4	42.0	9.7	4.8	30.4	0.7	55.2	52.4	207.0	43.9	40.2	10.1	8.6	2.0	90.0	95.0	18
19	AAN86234.1.pro	17.9	35.1	27.1	14.4	0.8	9.7	4.8	8.8	22.1	12.8	0.0	187.4	56.9	11.1	7.6	7.5	17.6	8.7	88.7	19
20	AAN86240.1.pro	1.5	10.2	59.4	43.9	34.7	9.7	4.8	23.1	17.1	40.5	43.2	204.0	21.4	27.9	13.4	7.1	8.7	4.6	10.4	20
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Figura 27: Percentual de identidade e divergência entre os isolados do bloco 6 associados com seqüências do genbank.