

Identificação da região da *saglin* que interage com o domínio-A da proteína *Thrombospondin Related Anonymous Protein* (TRAP) e caracterização da interação entre TRAP e *saglin* em *Anopheles spp*

Tese de Doutorado

GIOVANA CARAMASCHI DEGELO

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Co-Orientadora: Débora Colombi

**Botucatu
2015**



Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho
Campus de Botucatu

Instituto de Biotecnologia (IBTEC)

Identificação da região da *saglin* que interage com o domínio-A da proteína *Thrombospondin Related Anonymous Protein* (TRAP) e caracterização da interação entre TRAP e *saglin* em *Anopheles spp*

Tese de Doutorado

GIOVANA CARAMASCHI DEGELO

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Co-Orientadora: Débora Colombi

Botucatu

2015



Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho
Campus de Botucatu

Instituto de Biotecnologia (IBTEC)

Identificação da região da *saglin* que interage com o domínio-A da proteína *Thrombospondin Related Anonymous Protein* (TRAP) e caracterização da interação entre TRAP e *saglin* em *Anopheles spp*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu (SP), para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Genética).

GIOVANA CARAMASCHI DEGELO

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Co-Orientadora: Débora Colombi

**Botucatu
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Degelo, Giovana Caramaschi.

Identificação da região da *saglin* que interage com o domínio-A da TRAP e caracterização da interação entre TRAP e *saglin* em *Anopheles darlingi* / Giovana Caramaschi Degelo.
- Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla
Coorientador: Débora Colombi
Capes: 20202008

1. Malária. 2. Anopheles. 3. Glândulas salivares. 4. Mosquito como transmissor de doenças.

Palavras-chave: Anopheles; Malária; Saglin; TRAP.

Foi o tempo que perdeste com tua rosa que a fez tão importante

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimientos

- Aos meus pais Flávio e Mailene, aos meus irmãos Flávia, Sarah e Francisco, meus cunhados Leonardo e Ana Carla, e meu sobrinho Raul. Obrigada pelo carinho e apoio de sempre. Obrigada por serem meus motivadores e meu porto seguro em vários aspectos. Amo vocês, família!

- A CAPES e a FAPESP, pela bolsa concedida. A FAPESP, muito obrigada pela bolsa no país (2011/09400-6), e pela bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (2012/16103-0).

- Ao meu orientador, Dr. Paulo Ribolla, por todas as oportunidades que me ofereceu durante o doutorado. Por ter me permitido fazer parte do grupo de coletas no Acre, que além de ter sido parte de minha formação profissional, foi uma lição de vida que levarei para sempre, e por ter me proporcionado uma experiência em um instituto de pesquisa no exterior, de tamanho renome. Muito obrigada por toda orientação e paciência durante o desenvolvimento deste projeto, e pelo cuidado com a correção da versão final da tese.

- Aos meus ex-orientadores, Selma Maria Michelin, Alaor Aparecido Almeida, Marcelo Sady Plácido Ladeira, Guaracy Tadeu Rocha e Débora Colombi, o meu muito obrigada por terem contribuído para a minha formação, e por terem me dado um pouquinho de vocês para que conseguisse me transformar na pesquisadora de hoje.

- Aos meus colegas de laboratório, Rita, Leticia, Aline (Bronza), Heitor, Rafael, Melina e Diego, pelas trocas e discussões que sempre foram de muita valia para que me aperfeiçoasse cada dia um pouco mais. A Rita, gostaria também de agradecer toda a ajuda durante a expressão e purificação das proteínas.

- Aos colegas de instituto, Dr. Jayme, Dr. Deilson e seus grupos de pesquisa – Leticia Oda, Leticia Gushi, Jaqueline, Bianca, Bruno, Carine, Barbara e Cleiton. A experiência de trabalhar em um instituto como o IBTEC, é muito enriquecedora todos os dias.

- Aos Valter, técnico do IBTEC que faz o dia-a-dia do Instituto muito mais prático e produtivo.

- Aos profissionais do IBTEC, Bernardo, Mari, Lilian, Edna, e tantos outros profissionais que cuidam para o bom funcionamento e segurança, de nossa equipe.

- Aos colegas de parasitologia, onde metade de meu doutorado foi desenvolvido, e lugar onde fui muito bem recebida e acolhida. Obrigada aos amigos Betina Metzger, Érica Boarato, Érica Zica, Alison, Ana Paula, Larissa, Valdir, Roberto (Bicho), Semiramis, Teresa. Trabalhar na parasito, e ter o privilégio de estar ao lado de vocês, foi um presente para mim. E obrigada também aos amigos que vieram em consequência da amizade de vocês, Danilo, Hassan, Cláudia, João Vitor, Janice. Claudinha, muito obrigada pelo carinho em momentos tão difíceis.

- Ao professor Valber de Albuquerque Pedrosa, por ter me aberto as portas de seu laboratório, e ao seu grupo Juliana, Lucas Recco, e especialmente a Caroline Rodrigues Basso, que me ajudou em toda a etapa de SPR.

- Ao meu supervisor no exterior, Dr. Marcelo Jacobs-Lorena, por ter me aberto as portas de seu laboratório, pela orientação, e pela possibilidade de trabalhar com sua equipe.

- Ao grupo MJL lab, Ryan Smith, Kyle McLean, Joel Vega-Rodrigues, Anil Ghosh, Yan Sun, Christopher Kizito, Sung-Jae Cha e André Santos, por tudo que fizeram por mim. Pela receptividade, pelos ensinamentos, momentos de discussões e confraternização.

- A professora Semíramis Guimarães e suas alunas Érica Boarato David e Ana Paula Oliveira Arbex, por sempre estarem de portas abertas, e me emprestar vários equipamentos durante o desenvolvimento do trabalho. Pela amizade, carinho e respeito que mostram por mim.

- Ao professor Marcelo Urbano, por ter me cedido as amostras de *Plasmodium falciparum*.

- Aos professores Jayme de Souza Neto e Valber de Albuquerque Pedrosa, pelas contribuições durante o exame de qualificação deste trabalho.

- Aos professores Maria Anice Sallun, Marcelo-Urbano, Marcos Fontes e Jayme de Souza-Neto por terem aceitado o convite para participar da banca.

- A minha “irmã” Fernanda Pezzato, que foi minha fortaleza em Baltimore. Obrigada pelos conselhos, carinho, momentos, por me ouvir, apoiar e estar sempre me motivando e fortalecendo nesse nosso ano de provações e conhecimento. Você foi e é fundamental na minha vida.

- Aos amigos que Baltimore e o Instituto Johns Hopkins me proporcionaram – Mariana Marques, Anna Caroline, Claudia Laso, Claudia Dick, André Santos, Juliana Marino, Patricia Ferrer, Maria Isabel Reyes Mantilla.

- As queridas Thaís, Merielen, Andreza e Silvana que cuidam de mim com tanto carinho todos os dias. Que muito mais do que profissionais que eu admiro muito, se tornaram amigas, companheiras, conselheiras.

- Aos meus amigos queridos, obrigada por estarem sempre comigo, me apoiando sempre.

Sumário

Resumo	I
Abstract	III
Lista de Figuras	V
Lista de Tabelas	V
Lista de Abreviações	VI
Introdução	1
Objetivos Gerais	12
Material e Métodos	14
1. Peptídeos	15
2. <i>Saglin</i> Recombinante	16
3. TRAP Recombinante	18
4. Transformação - <i>Saglin</i>	20
5. Expressão <i>Saglin</i>	21
6. Expressão da TRAP-A	21
7. Expressão da cauda de Histidina	22
8. Expressão da cauda GST	22
9. Purificação da <i>saglin</i>, da TRAP-A, da cauda GST e da cauda de histidina	23
10. Amostras utilizadas como controle em cada etapa de expressão / purificação	24
11. Quantificação das proteínas pelo Image J	25
12. Western-Blot	25
13. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	26
14. Coleta e identificação dos mosquitos	27
15. Obtenção do DNA	27
16. Desenho dos primers e PCR	28
17. Sequenciamento	32
Resultados e Discussão	34
Conclusões	53
Referências Bibliográficas	56
Anexos	62

Resumo

A invasão da glândula salivar pela forma de esporozoítos do gênero *Plasmodium* é um passo crucial para o ciclo de vida nos mosquitos do gênero *Anopheles*, e um passo obrigatório para que a transmissão da malária ocorra. A TRAP domínio-A, uma proteína de esporozoítos que é secretada na face anterior do parasita quando em contato com a glândula salivar, interage com a *saglin*, proteína majoritária da glândula. Esta interação é fundamental para que ocorra a invasão. Este processo ocorre em *Anopheles gambiae* infectado com *Plasmodium berghei* ou *Plasmodium falciparum*. No Brasil, o *Anopheles darlingi* é o principal vetor do parasita da malária. Aproximadamente 80% dos casos de malária são causados por *Plasmodium vivax*, anualmente e aproximadamente 20% por *Plasmodium falciparum*. Em um estudo prévio de nosso grupo, foi observado 80% de infecção por *P. falciparum* nos *An. darlingi* coletados em Rondônia, Porto Velho. Isto pode ser provavelmente porque o *An. darlingi* pode se infectar facilmente com *P. falciparum*, mas não o transmite de uma maneira eficiente. Comparamos a sequência da *saglin* de *An. gambiae* com sequências de *An. darlingi*, e SG1 e SG1B foram as sequências mais relacionadas, com 27% de similaridade. Sequenciamos isolados de *P. falciparum* brasileiros, e aminoácidos chave no processo de invasão da glândula se apresentaram conservados. Caracterizamos, pela primeira vez, a região da *saglin* de *An. gambiae*, responsável pela interação com o domínio-A da TRAP, e observamos que esta sequência não encontra homologia com sequências de *An. darlingi*. Anofelinos da espécie *An. gambiae* e *An. darlingi*, divergiram há aproximadamente 79 milhões de anos, e o processo de especiação provocou o surgimento de algumas barreiras para o desenvolvimento de espécies de *Plasmodium*, que habitam regiões geográficas distintas. Parasitas da espécie *P. falciparum* chegaram no Brasil a aproximadamente 500 anos, junto com os escravos vindos da África, portanto a adaptação aos novos vetores, foi fundamental para a sobrevivência destes parasitas.

Abstract

Salivary gland invasion by sporozoites of *Plasmodium* genus is a crucial step to life cycle in mosquitoes of *Anopheles* genus, and an obligate step to malaria transmission occurs. TRAP A domain, a sporozoite protein that is secreted on anterior tip of parasite upon contact with salivary glands, interacts with *saglin*, a major gland protein. This interaction is fundamental to gland invasion. This process occurs in *Anopheles gambiae* infected with *Plasmodium berghei* or *Plasmodium falciparum*. In Brazil, *Anopheles darlingi* is the main vector of malaria parasite. Near 80% of malaria cases are due *Plasmodium vivax*, annually, and about 20% due to *Plasmodium falciparum*. In previous studies of our lab, it was observed 80% of *P. falciparum* infection in *An. darlingi* collected in Rondonia, Porto Velho. This probably happens because *An. darlingi* can be easily infected with *P. falciparum*, but can not efficiently transmit them. We compare *An. gambiae saglin* sequence with *An. darlingi* sequences, and SG1 and SG1B were the most related sequences, with 27% of similarity. Brazilian *P. falciparum* isolated were sequenced, and key amino acids related to salivary gland invasion, are preserved. We characterize for the first time, *An. gambiae saglin* region responsible to interact with A domain of TRAP, and we observed that these sequences have no homology with *An. darlingi* ones. *An. gambiae* and *An. darlingi* diverged more than 79 million years ago, and speciation process put some barriers to *Plasmodium* development, that resides in other geographic regions. Parasites of *P. falciparum* species arrived in Brazil about 500 years, with the slaves from Africa, so the adaptation to new vectors was critical to the parasites survival.

Lista de Figuras

Figura 1 – Área de Transmissão de malária no mundo	02
Figura 2 – Área de Transmissão de malária no Brasil	03
Figura 3 – Distribuição geográfica das espécies de <i>Anopheles</i> no mundo	04
Figura 4 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp.	07
Figura 5 – Invasão da Glândula Salivar de <i>Anopheles</i> sp pelos esporozoítos	09
Figura 6 – Representação esquemática de como se dá a interação entre a TRAP, proteína do esporozoíto, e a <i>saglin</i> , proteína da glândula salivar.	11
Figura 7 – 19 peptídeos aleatoriamente desenhados ao longo da sequência da <i>saglin</i>	15
Figura 8 – Proteína <i>saglin</i> recombinante	17
Figura 9 – Proteína TRAP-A recombinante	19
Figura 10 – Mapa do plasmídeo pET-EGFP6xH utilizado na expressão do controle de histidina	22
Figura 11 – Método de captura dos mosquitos nos ramais de Granada e Remansinho	27
Figura 12 – Preparação do DNA com a resina Chelex	28
Figura 13 – Sequência do gene da <i>saglin</i> de <i>Anopheles gambiae</i>	29
Figura 14 – Comparação da sequência nucleotídica traduzida do gene da <i>saglin</i> de <i>An. gambiae</i> , com o banco de proteínas do NCBI	30
Figura 15 – Produtos de purificação das proteínas TRAP-A e <i>saglin</i>	36
Figura 16 – Ensaio ELISA com as proteínas recombinantes TRAP domínio-A e <i>saglin</i>	37
Figura 17 – Ensaio de ELISA com as caudas	38
Figura 18 – Experimento de ELISA mostrando a interferência dos peptídeos na ligação da TRAP-A com a <i>saglin</i> , em condição sub-saturante de TRAP	39
Figura 19 – Gráfico da porcentagem de casos devido ao <i>P. falciparum</i> na Amazônia entre 1999 e 2008	41
Figura 20 – Árvore filogenética construída com base nas sequências gênicas de SG1 de mosquitos fêmea da espécie <i>An. darlingi</i> .	43
Figura 21 – Comparativo dos resíduos conservados da TRAP nos isolados de região endêmica do Brasil	45
Figura 22 – Alinhamento da sequência de aminoácidos de diferentes espécies de <i>Plasmodium</i> : <i>P. berghei</i> , <i>P. yoelii</i> , <i>P. chabaudi</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. cynomolgi</i> , <i>P. knowlesi</i> , <i>P. gallinaceum</i>	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tampões utilizados na purificação das proteínas – <i>saglin</i> recombinante e TRAP-A recombinante	85
---	----

Lista de Abreviações

BCA: ácido bicinconínico

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BSA: albumina sérica bovina

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

ELISA: Ensaio imunoenzimático indireto

IDT: Integrated DNA Technologies

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

LB: Meio Luria-Bertani

l-glutathiona: Glutathiona reduzida

NCBI: National Center for Biotechnology Information

P.: *Plasmodium* spp.

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

r-GFP: proteína GFP recombinante

r-saglin: proteína *saglin* recombinante

r-TRAP-A: proteína TRAP-A recombinante

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SIAB: Sistema de Informação da Atenção Básica

SM1: salivary gland and midgut peptide 1

TCEP: Tris-(2-Carboxyethyl)phosphine, Hydrochloride

TRAP: thrombospondin-related anonymous protein

WHO: World Health Organization

Introdução

A malária é um problema de saúde mundial, que põe em risco metade da população global (aproximadamente 3.3 bilhões de pessoas). É transmitida principalmente em regiões subdesenvolvidas de áreas tropicais e subtropicais do mundo (CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*) (Figura 1). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO - *World Health Organization*), houve aproximadamente 198 milhões de casos, e 584 000 mortes devido a malária no ano de 2013. A maioria das mortes se deu na África, mais de 90% dos casos, onde as principais vítimas foram as crianças. Neste continente, uma criança morre a cada minuto devido a malária [WHO].

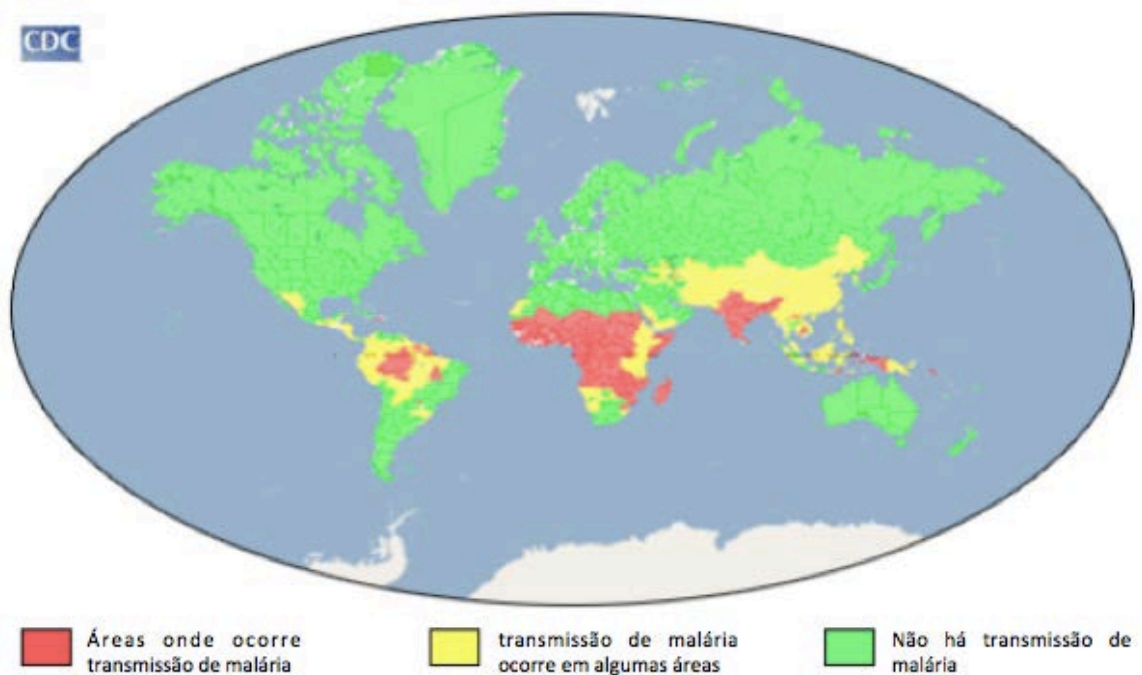


Figura 1 – Área de Transmissão de malária no Mundo (Fonte: CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*)

Segundo o *World Malaria Report* do ano de 2014, nas Américas, 120 milhões de pessoas correm o risco de contrair malária. Em todo o continente, apenas três países foram responsáveis pelo registro de 72% dos casos de malária no ano de 2013: no Brasil foram reportados 42% dos casos, seguido pela Venezuela com 18% dos casos, e a Colômbia registrou 12% dos casos. Foram 178 546 casos no Brasil e 41 mortes (metade das mortes registradas no continente) (World Malaria Report 2014). A

maioria dos casos foram registrados na região da Amazônia legal, área que corresponde a aproximadamente 60% do território brasileiro e engloba a quase totalidade dos casos de malária (Figura 2).

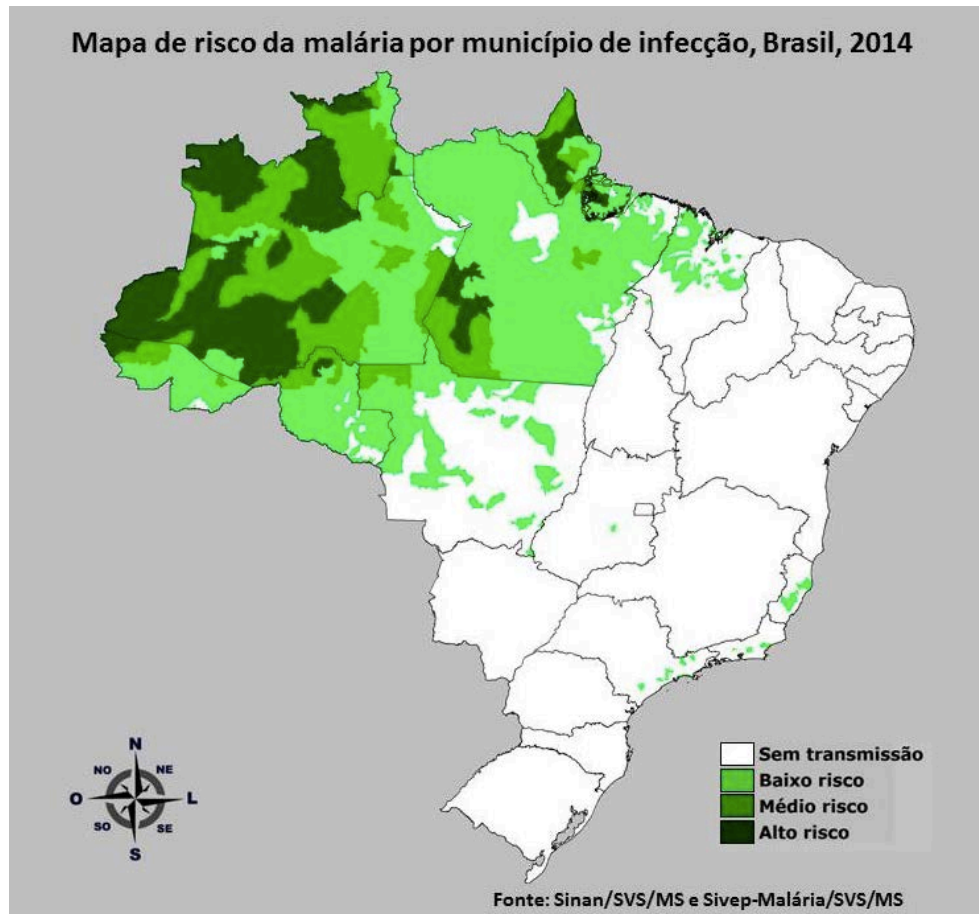


Figura 2 - Área de Transmissão de malária no Brasil. No Brasil, a região amazônica concentra as áreas de maior risco de transmissão da doença (Fonte: Ministério da Saúde).

O Brasil possui 3 perfis de transmissão de malária. O primeiro e mais importante, é na região amazônica, onde são registrados mais de 99% dos casos. O segundo perfil, corresponde aos casos de malária importados, que corresponde aos casos da doença diagnosticados fora da área onde o indivíduo mora ou foi diagnosticado. Neste caso, a infecção pelo parasita pode ter sido adquiridas ou em regiões endêmicas do Brasil, ou fora do país, como em países da América do Sul, África e Ásia. No terceiro perfil, a malária é devida a casos autóctones da Floresta

Atlântica, localizada principalmente ao longo da costa sudeste do Oceano Atlântico [Pina-Costa e cols., 2014].

Para que a transmissão da malária ocorra, o agente etiológico, *Plasmodium sp.*, necessita de um inseto que atue como vetor, o mosquito do gênero *Anopheles*, que picam as pessoas principalmente durante o entardecer e o amanhecer [WHO]. Aproximadamente 60 espécies são vetores na transmissão do parasita, em um total de 450 espécies de *Anopheles* conhecidas. Encontramos grande espectro no que diz respeito à importância epidemiológica na transmissão do plasmódio. Mesmo dentro da mesma espécie, algumas populações de mosquitos ou indivíduos podem ter diferentes impactos sobre a transmissão [Cohuet e cols., 2010].

O *Anopheles darlingi* é a principal espécie de anofelino encontrada no Brasil. É encontrado em 80% do território, embora a incidência de malária seja concentrada na região amazônica (mais de 99% do número de casos) [Oliveira-Ferreira e cols., 2010] (Figura 3). Das espécies que transmitem o parasita da malária para seres humanos, *Anopheles darlingi* é a mais abundante na região amazônica brasileira [Sinka e cols., 2010; Morais e cols., 2012; Angêlla e cols., 2014; Barbosa e cols., 2014]

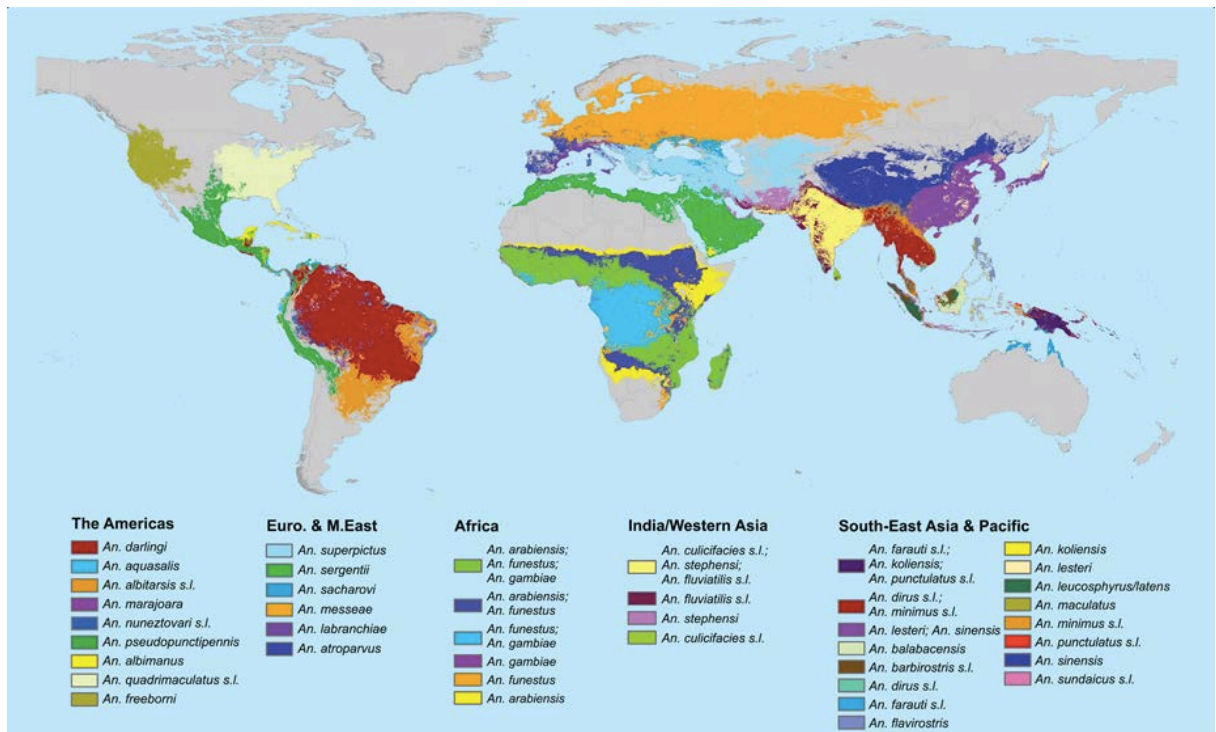


Figura 3 – Distribuição geográfica das espécies de *Anopheles* no mundo. No Brasil, o principal vetor de malária é o *Anopheles darlingi*, que é encontrado em praticamente todo o território nacional (Fonte: MAP – Malaria Atlas Project)

Na transmissão da malária humana há 5 espécies do gênero *Plasmodium* - *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. No Brasil há predomínio de *P. vivax*, que é responsável por aproximadamente 82% dos casos registrados, seguido pelo *P. falciparum*, responsável por cerca de 18% dos casos e o *P. malariae*, raramente observado [World Malaria Report, 2014]. A espécie *Anopheles darlingi* é responsável pela transmissão de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* em regiões endêmicas brasileiras [Oliveira-Ferreira e cols., 2010]. Sua distribuição na América é ampla, indo do sul do México ao norte da Argentina [Moreno e cols., 2010]. O parasita *Plasmodium* pertence ao Phylum *Apicomplexa*, formado por organismos eucariotos unicelulares que parasitam vertebrados e invertebrados, e fazem parte do reino Protista [Matuschewski e cols., 2002]. Este filo engloba patógenos intracelulares como espécies de *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Babesia*, e *Theileria*. O nome deste Filo é devido ao complexo apical, onde as vesículas secretórias – roptrias e micronemas - se encontram. O conteúdo de ambas as organelas se relaciona a motilidade dos apicomplexas, adesão, invasão da célula hospedeira, e geração de um vacúolo parasitóforo (PV) onde o parasita reside e se replica no interior da célula hospedeira. [Matuschewski e cols., 2002; Kappe e cols., 2004; Lim e McFadden, 2010]. A motilidade dos parasitas do filo Apicomplexa, é chamada “gliding motility”, ou motilidade por deslizamento, ou rastejamento, que é única nos membros deste filo. A motilidade por rastejamento, é substrato dependente, que não envolve mudança no formato da célula [Matuschewski e cols., 2002].

O ciclo de vida do *Plasmodium* sp no homem se inicia através do repasto sanguíneo onde esporozoítos são injetados na corrente sanguínea e invadem os hepatócitos. Nos hepatócitos, os estágios iniciais são caracterizados por estruturas circulares uninucleadas. O núcleo sofre divisões formando uma estrutura multinucleada, o esquizonte, que dará origem aos merozoítos (estágio invasivo). Os merozoítos invadem as hemácias, onde os primeiros estágios são denominados

trofozoítos que passarão por um novo ciclo de esquizogonia, dando origem aos merozoítos que serão liberados na corrente sanguínea. Alguns desses merozoítos invadirão novas hemácias e outros sofrerão diferenciação em gametócitos [Ferreira e cols., 2003, Ghosh & Jacobs-Lorena, 2009]. A diferenciação de merozoítos em gametócitos pode ocorrer em resposta a estresse causado por super-população de parasitas, resposta imune do hospedeiro e exposição a drogas, mas os mecanismos moleculares ficaram obscuros durante muitos anos. Em 2013, Regev-Rudzki e colaboradores descreveram que esta diferenciação se dá pela comunicação entre hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum*, utilizando exosome-like vesicles (ELVs). Os EVLs possuem forte atividade pró-inflamatória, o que faz com que possam ser combatidos por macrófagos e neutrófilos, por exemplo, levando a ativação celular e a produção de citocinas. A atividade pró-inflamatória pode ser benéfica ao parasita, por aumentar a expressão de receptores para as células endoteliais, evitando que as hemácias parasitadas sejam destruídas pelo baço, mas também podem levar a complicações como a malária cerebral, devido a inflamação desregulada. O mesmo grupo descreveu também que a proteína PfPTP2 de *P. falciparum* tem um papel chave para uma comunicação eficiente entre as populações de parasitas.

Na esporogonia, durante o repasto sanguíneo, o mosquito ingere as formas sexuais do *Plasmodium*, os gametócitos femininos e masculinos. No caso do *Plasmodium falciparum*, em aproximadamente 15 minutos (no caso de *P. falciparum*), o gametócito deixa a hemácia e se diferencia em gametas - o gameta feminino ou macrogameta e o gameta masculino ou microgameta. O microgameta sofre exflagelação, na qual o DNA replica para 8N, e em seguida forma 8 microgametas haplóides. Os gametas femininos e masculinos se unem na formação de um zigoto diplóide. O DNA deste zigoto sofre replicação se tornando tetraplóide e no estômago dos anofelinos se diferenciam em um estágio móvel e alongado conhecido como oocineto, que migra através do sangue que se encontra no intestino médio do mosquito, até reconhecer e penetrar na parede do intestino do mosquito originando o oocisto, uma forma circular e sem motilidade, entre o epitélio e a membrana basal (18 a 24 horas após a alimentação sanguínea). Nos próximos 10 a

14 dias, cada oocisto vai crescer em tamanho e passar pelo processo de esporogonia, para produzir milhares de esporozoítos. Após a maturação do oocisto, ele se rompe liberando milhares de esporozoítos na hemolinfa do mosquito. Os esporozoítos na hemolinfa migram e reconhecem apenas as glândulas salivares do mosquito, ocorrendo então a invasão das mesmas, e em um próximo repasto sanguíneo, serão transmitidos juntamente com a saliva [Ferreira e cols., 2003; Ghosh e Jacobs-Lorena, 2009; Ghosh e cols., 2009; Smith e cols., 2014] (Figura 4). Todo o caminho percorrido pelo parasita *Plasmodium* spp através dos mosquitos, até a glândula salivar, é um processo complexo que determina o sucesso da transmissão da malária (Vlachou e cols., 2006).

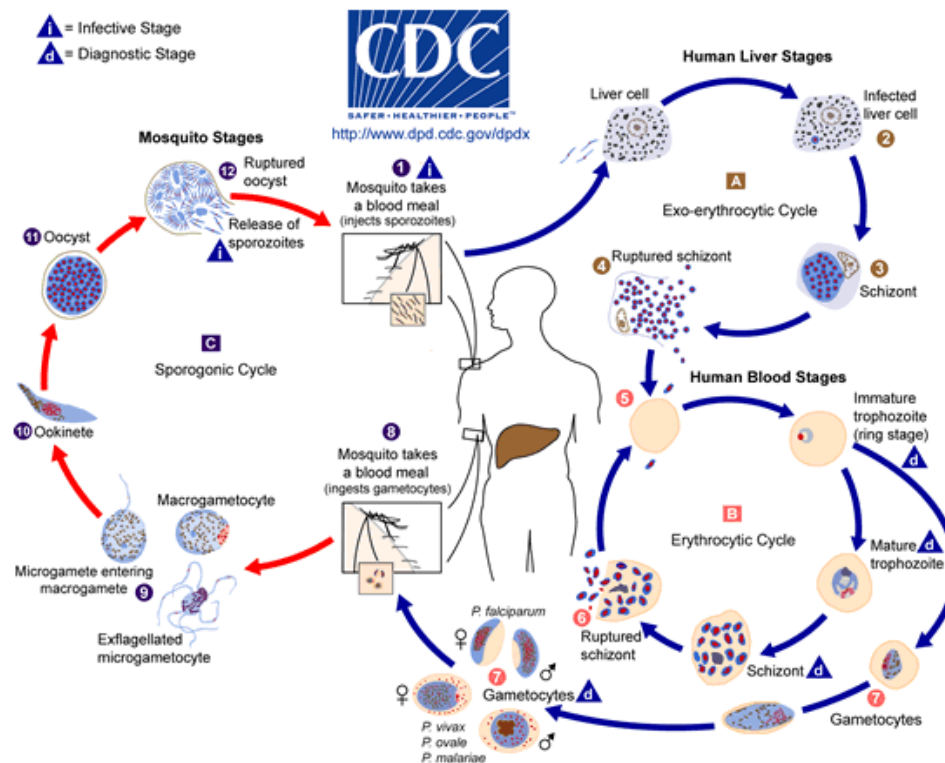


Figura 4 - Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. O ciclo do *Plasmodium* sp. envolve dois hospedeiros, o mosquito do gênero *Anopheles*, onde a reprodução é sexuada (esporogonia) e o homem onde o ciclo se dá de forma assexuada (esquizogonia). (Fonte: CDC - Centers for Disease Control and Prevention)

Cada mosquito apresenta duas glândulas salivares. A glândula salivar é formada de dois lobos laterais com três regiões estrutural e funcionalmente distintas e um lobo central funcionalmente uniforme [Okulate e cols., 2007]. A invasão pelos esporozoítos se dá nos lobos distais, laterais e no lobo médio da glândula salivar [Okulate e cols., 2007]. A invasão da glândula salivar é fundamental para que a transmissão da malária ocorra e, para haver esta invasão, o esporozoíto deve reconhecer a glândula através de um receptor. Esta ligação é específica [Ghosh e cols., 2001 e Okulate e cols., 2007] (esporozoítos de *Plasmodium knowlesi* são capazes de invadir a glândula salivar de *Anopheles dirus*, mas não são capazes de invadir a glândula salivar de *Anopheles freeborni*) [Rosemberg e cols., 1985].

A invasão da glândula salivar se inicia quando o esporozoíto penetra na lâmina basal e posteriormente na membrana plasmática basal, dos lobos distais das glândulas salivares (Figura 5 -1, 2, 3) [Ghosh & Jacobs-Lorena, 2009, Gosh e cols., 2001], fazendo com que o parasita se acumule no interior da célula (Figura 5 - 4). Ocorre então a invasão da membrana apical e entrada dos esporozoítos na cavidade secretória, onde se acumulam (Figura 5 - 5, 6, 7). Para que a transmissão ocorra, os esporozoítos entram no ducto secretório (Figura 5 - 8) [Ghosh e Jacobs-Lorena, 2009] e serão injetados juntamente com a saliva no hospedeiro (vertebrado) durante o repasto sanguíneo [Rodriguez e Hernández- Hernández, 2004].

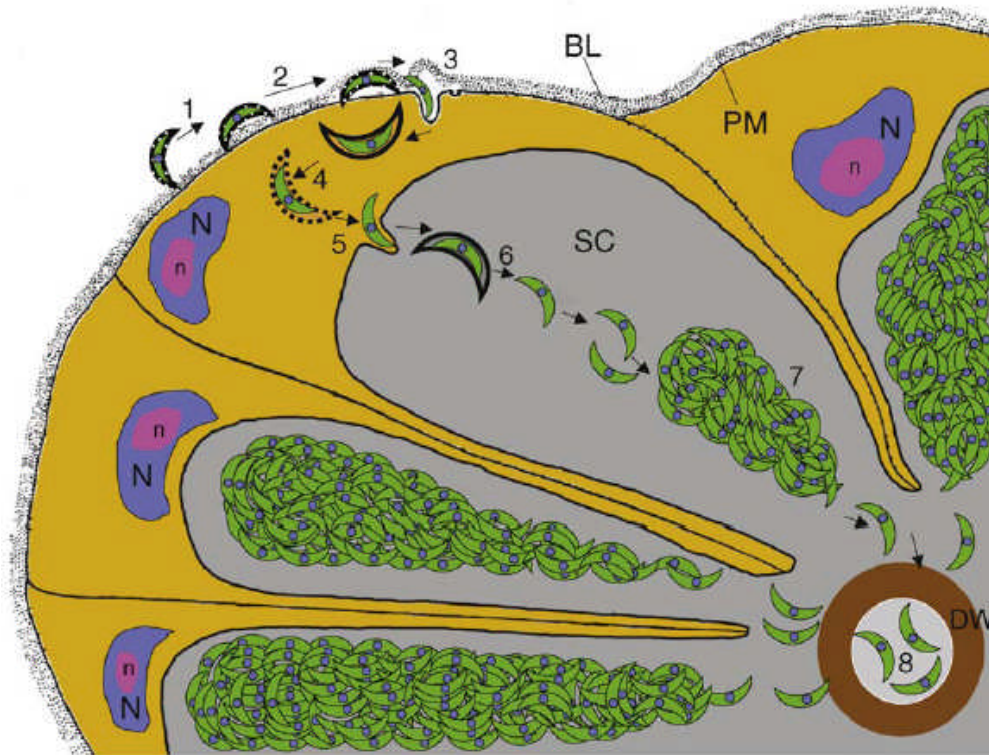


Figura 5 - Invasão da Glândula Salivar de *Anopheles* sp pelos esporozoítos. (Gosh e Jacobs-Lorena, 2009).

Em 2001, Ghosh e colaboradores descreveram, através da utilização da técnica de *phage display*, um peptídeo, denominado SM1 (*salivary gland and midgut peptide 1*), que é capaz de inibir fortemente a invasão da glândula salivar e de inibir a formação de oocisto, não afetando o número de oocinetos, sugerindo que este peptídeo prejudica o desenvolvimento do *Plasmodium* sp no *Anopheles* sp, provavelmente pela competição com os ligantes da glândula salivar e do intestino necessários ao ciclo do plasmódio. Em 2000, Brennan e colaboradores estudaram possíveis receptores para os esporozoítos na glândula salivar do principal vetor de malária no continente africano, o *Anopheles gambiae*. Neste estudo, foi purificado um anticorpo ("2A3"), que reconheceu uma proteína de 100 KDa encontrada na glândula salivar de mosquitos fêmea, que em ensaios *in vivo* com *Plasmodium yoelii* foi capaz de inibir em ~73% a invasão da glândula salivar. Em 2007 Okulate e colaboradores expressaram e caracterizaram a proteína anteriormente descrita. A proteína de glândula salivar de 100 KDa identificada pelo anticorpo 2A3 foi

nomeada de *saglin* (número de acesso no GENBANK AAW31598). Esta proteína de 412 aminoácidos existe como um homodímero de duas subunidades de aproximadamente 50 KDa, unidas por pontes dissulfeto. Acreditava-se que a *saglin* estaria envolvida no processo de invasão da glândula salivar pelos esporozoítos.

Os esporozoítos apresentam uma proteína de superfície, denominada TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*) que é relacionada à locomoção desta forma infectante pertencente ao gênero *Plasmodium* [Kappe e cols., 1999] e também a invasão da glândula salivar do mosquito [Sultan e cols., 1997]. A proteína TRAP é expressa nos esporozoítos e é conservada nas espécies do gênero *Plasmodium* [Sultan e cols., 1997]. Esta proteína possui 2 domínios extracelulares conservados, o domínio A (*von Willebrand factor-A domain*) [Girma e cols., 1987] e o TSR (*thrombospondin type I repeat*) [Lawler & Hynes, 1986]. No ano de 2009, Ghosh e colaboradores mostraram que o peptídeo SM1 descrito em 2001 se liga a *saglin*, e que a ligação SM1-*saglin* ocorre da mesma forma que ocorre a ligação do domínio-A da proteína TRAP a *saglin*, sendo estas ligações de alta afinidade, e que há competição do peptídeo SM1 e do domínio-A da proteína TRAP na ligação com a *saglin*. Ainda mostraram que uma mutação no domínio-A da proteína TRAP, é relacionada à perda da capacidade do esporozoíto de bloquear em 80% a glândula salivar dos anofelinos, apesar de não alterar sua motilidade, sendo, portanto a ligação do domínio-A da proteína TRAP, essencial para a invasão da glândula salivar. O processo acima descrito, da interação da TRAP com a *saglin*, ocorre para as espécies *P. falciparum* e *P. berghei* [Gosh e cols., 2009]. Em relação às demais espécies de plasmódio, não há relatos na literatura. A relação da ligação entre TRAP, *saglin* e SM1, está esquematizada na Figura 6.

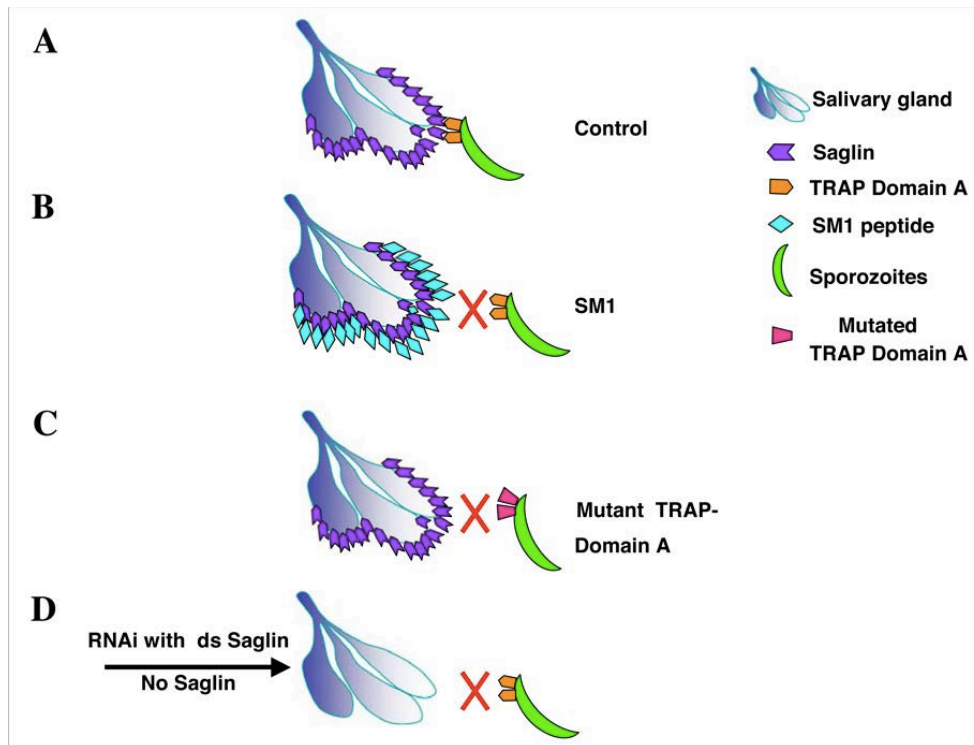


Figura 6 – Representação esquemática de como se dá a interação entre a TRAP, proteína do esporozoíto, e a *saglin*, proteína da glândula salivar. **(A)** ligaçãoo TRAP com a *saglin*, resultando na invasão da glândula salivar. **(B)** o peptídeo SM1 se liga a *saglin*, ocupando os sítios da ligação da TRAP, impedindo a invasão da glândula. **(C)** Mutação no domínio A da TRAP altera sua conformação, e impede a ligação com a *saglin* e a invasão da glândula. **(D)** RNAi da *saglin* diminui a quantidade de receptores da TRAP, diminuindo a invasão pelos esporozoítos.

Uma vez que a interação entre a *saglin* de *Anopheles gambiae* e TRAP de *Plasmodium berghei* e *Plasmodium falciparum* é bem descrita, o objetivo deste trabalho foi a caracterização da região da *saglin* que interage com a TRAP, para que se possa começar a entender como ocorre a invasão da glândula salivar do *Anopheles darlingi*, por *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, e por que o primeiro seria menos eficiente em invadir a glândula salivar do principal vetor de malária no Brasil. Fizemos também o sequenciamento da proteína SG1 de *Anopheles darlingi*, e da TRAP, domínios A e TSR, de isolados de *Plasmodium falciparum* proveniente de região endêmica brasileira, para que pudéssemos estabelecer se os vetores e parasitas brasileiros têm alguma peculiaridade na sequência, que possa nos dar indícios do funcionamento da interação entre essas proteínas no Brasil.

Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho, foi avaliar a variabilidade do gene que codifica a proteína *saglin* intraespecífica em *Anopheles darlingi* em regiões endêmicas brasileiras; analisar o domínio-A e TSR da proteína TRAP de isolados de *Plasmodium falciparum* no Brasil e avaliar qual a região da proteína *saglin* que interage com o domínio-A da proteína TRAP.

Material e Métodos

1. Peptídeos

Dezenove peptídeos foram aleatoriamente desenhados ao longo da sequência da proteína *saglin* (Figura 7) para a avaliação de qual a região desta proteína interage com o domínio-A da TRAP. Os peptídeos foram sintetizados pela empresa *GeneMed Synthesis, Inc* (Texas, EUA).

A)

```
MSRLPTVLLLLASAAVLAAGGQEATEDPFADETDQCQISVSAETMKS LHGGSMQPD
GTCNDLWESFLSQFHQVRENLTACQERAAAGPAPDPSSQFCQQLLDDAQRQMEQ
EHRQYAATLEQLHAAQQETQQEQEMKKALQKQLDALTDSPRNALYIDLLLANIAIGE
TKQALSYYNLM P ASMPIDKLHEQIVRFVYRVVTIYQDQRLNLMRFVRDIPSVEERRSL
YQLAQRE VQKRPSQRDGYVA AVYALS VREDLPVYQANRQLYDDLVRQSETRLKEQV
ANGNFKQAAELAARQPQHFRQLQTSLATIELKHWRFKDRFVPYANALPQPAQRLE
VLRVLLSQIGDREKKTSHKYL VKAARQFDICEQFIGR GKVDQAVKKQLEELR GK FATF
AKGKNYQH YLSERSKSSG
```

B)

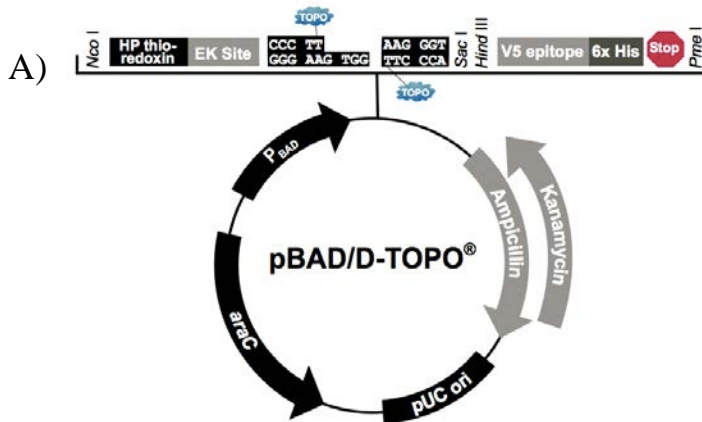
1	86-94	ENLTACQER
2	105-115	SQFCQQLLDD
3	116-126	AQRMEQEHRQY
4	132-142	EQLHAAQQETQQE
5	144-154	EQEMKKALQKQL
6	154-162	QLDALTDSP
7	209-216	VTIYQDQR
8	226-233	DIPSVEER
9	235-242	SLYQLAQR
10	265-274	EDLPVYQANR
11	275-282	QLYDDLVR
12	288-298	LKEQVANGNFK
13	299-306	QAAELAAR
14	307-312	QPQHFR
15	313-324	QLQTSLATIELK
16	332-345	FVPYANALPQPAQR
17	351-361	VLLSQIGDREK
18	394-399	QLEELR
19	410-419	NYQH YLSERS

Figura 7 – 19 peptídeos aleatoriamente desenhados ao longo da sequência da proteína *saglin*. A) Sequência completa de amino ácidos da proteína *saglin*, e em colorido, como os 19 aminoácidos se distribuem. B) Posições dos aminoácidos na proteína, e a sequência de cada aminoácido.

2. *Saglin* Recombinante

Para a expressão da *saglin* de *An. gambiae*, o gene correspondente a esta proteína foi clonado no vetor pBAD (Figura 8). Este vetor contém o gene β -lactamase (*bla*) que confere resistência aos antibióticos ampicilina ou carbenicilina, como um marcador seletivo, e tem uma cauda de 6x histidina (His tag), que aparece fusionada a proteína após a expressão, e utilizada para a purificação em colunas de afinidade a Níquel. O plasmídeo pBAD é controlado pelo promotor *ara*.

A transformação foi feita em bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) competentes Nico21 (DE3) (New England BioLabs). *E. coli* Nico21 (DE3) quimicamente competentes, são derivadas de bactérias *E. coli* BL21 (DE3), que foram modificadas para minimizar a contaminação de proteínas com afinidade a metais em cromatografia, que comumente co-purificam em frações de Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) em quantidades significativas.



B) **Anopheles gambiae SAGLIN gene, complete cds**
 GenBank: AY846632.1
 GenPept Graphics
 >gi|56809866|gb|AY846632.1| Anopheles gambiae SAGLIN gene,
 complete cds

```

caccATGTCACGTTTGGCCACTGTACTGTTGCTCTTAGCGAGCGCCGCAGTC
CTCGCGGCTGGCGGCCAGGAAGCAACCGAAGACCCGTTTCGCGGACGAAACC
GACCAGTGCCAGATCAGCGTTAGTGCCGAGACGATGAAATCCCTCCACGGC
GGGTGCATGCAGCCCGACGGCACGTGCGACAACCTGTGGGAAAGCTTTCTA
TCTCAGTTTACCAAGTCAGGGAAAACCTGACCGCGTGCCAGGAGCGGGCA
GCCGCCGACCAGCGCCCGATCCTTCCAGCCAGTTCTGTCAGCAGCTGCTGG
ACGATGCGCAGCGGCAGATGGAGCAGGAGCATCGCCAGTACGCCGCCACCC
TGGAGGAGCAGCTGCACGCAGCGCAGCAGGAAACCCAGCAGGAGCAGGAGA
TGAAGAAGGCGCTGCAGAAGCAGCTCGACGCGCTCACCGACTCCCGAACG
CGCTGTACATCGATCTGCTGCTAGCGAACATTGCGATCGGCGAAACGAAGC
AAGCCCTCTCGTACTACAACCTGATGCCGGCCAGCATGCCCATCGACAAGC
TGCACGAGCAGATCGTGCGCTTCGTCTACCGGGTGACGATCTACCAGGACC
AGCGGCTGCTCAACCTGATGCGGTTTCGTGCGCGACATTTCCAGCGTCGAGG
AGCGGCGCTCGCTGTACCAGCTGGCGCAGCGGAAGTGCAGAAGCGCCCGA
GCCAGCGGGACGGGTACGTGGCGGCCGTGTATGCGCTGAGCGTGCGCGAAG
ATCTGCCCCGTCTACCAGGCAAACCGGCAGCTGTACGACGACCTTGTCCGGC
AGTCCGAGACCCGCCTCAAGGAGCAGGTGGCGAACGGTAACCTCAAGCAGG
CGGCCGAGTTGGCCGCCGCCAGCCGCAGCACTTCCGGCAGCTGCAAACCA
GCCTCGCCACGATCGAGCTGAAGCACTGGCGCAAGTTCGACCGGTTTCGTAC
CGTACGCTAACGCGCTGCCCCAGCCAGCCAGCGGCTGGAGGTGCTGCGTG
TGCTGCTGAGCCAGATCGGCGACCGGGAGAAGAAGACTTCCCACAAATATC
TGGTAAAGGCGGCACGGCAGTTTGACATTTGCGAGCAGTTTATCGGCCGGG
GCAAGGTGGACCAGGCGGTCAAGAAGCAGCTGGAGGAACTGCGCGGGAAAG
TTTGCAACGTTTGC GAAGGGCAAGAACTACCAGCACTATCTGAGCGAGTCCG
CGCAAGTCGTCCGGCTAG

```

Figura 8 – Proteína *saglin* recombinante. (A) Figura esquemática do plasmídeo pBAD/D-TOPO utilizado para a clonagem do gene *saglin*. (B) Sequência do gene *saglin* de *Anopheles gambiae*, mostrando destacado em vermelho, a região onde os primers foram desenhados. Em letras minúsculas na sequência em vermelho, encontra-se uma pequena cauda adicionada ao primer, para que fosse adicionada a sequência da *saglin* durante a amplificação por PCR, um fragmento complementar a extremidade coesiva do plasmídeo (G TCC – no plasmídeo; e C TCC no primer).

A proteína fusão resultante deste plasmídeo, possui então 3 KDa de V-5 C-terminal, 6 x His e uma cauda N-terminal de *thioredoxin*. Somado ao tamanho da *saglin* (50 KDa) a proteína fusão total possui 66 KDa.

3. TRAP Domínio-A Recombinante

O Domínio-A da proteína TRAP (TRAP-A) de *Plasmodium berghei* foi clonado no plasmídeo pGEX 4T-1 e transformado em bactérias competentes *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) (*New England BioLabs*), como mostra a Figura 9. O plasmídeo tem o gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, como marcador seletivo, e uma cauda GST, que é fusionada a proteína TRAP-A após a expressão.

A)



B)

```
>gi|68070930|ref|XM_672287.1| Plasmodium berghei strain ANKA
sporozoite surface protein 2, (PB000374.03.0) partial mRNA
ATGAAGCTCTTAGGAAATAGTAAATATTTTTTTGTTGTGCTTTTATTATGC
ATAGTGTGTTTTCTTAATcgcGGTCAGGAAATTCTTGACGAAATAAAGTATAG
TGAAGAAGTATGTAACGAACAAATCGACCTTCATATATTATTGGATGGCTC
AGGAAGTATTGGTCATAGCAATTGGATTAGTCATGTTATTCCAATGCTCACT
ACTTTGGTTGATAACTTAAATATTTCAAGAGATGAAATTAATATATCTATGA
CACTTTTTTCAACATATGCACGTGAATTAGTCAGACTTAAAAGATATGGAT
CGACTAGTAAAGCTCGCTACGTTTTATAATTGCACAACCTTCAAATAATTA
TTCACCACATGGTACTACAAATTTAACGAGTGCATTATTGAATGTTGATAAT
TTAATTCAAAAAAAAAATGAATCGGCCCAATGCAATACAATTAGTTATTATA
TTAACAGATGGTATCCCAAATAATTTAAAGAAATCTACTACGGTTGTAAATC
AATTAAAAAAAAAAAGATGTAAACGTTGCAATCATAGGCGTTGGTGCAGGTG
TTAATAATATGTTTAATAGAATTTTAGTTGGATGTGGTAAACTCGGACCATG
TCCATACTACTCTTATGGTAGTTGGGATCAAGCCAAACTATGATAAAACCT
TTTCTTTCTAAAGTTTGTGAGGAGTAAAGTTGCTCTTTGTGGAAA
ATGGGAAGAATGGAGTGAATGTTCTACTACATGTGACAATGGAACAAAAAT
TAGAAAAAGAAAAGTATTACATCCTAATTGTGCTGGAGAGATGACTGCCCC
ATGTAAGGTTTCGTGATTGCCACCAAACCGGTAGCTCCTCCTGTCATTCCCT
ATTAAAGTTCCAGATGTGCCAGTAAAACCTGTAGAACCCTATAGAACCAGCA
GAACCAGCAGAACCAGCAGAACCAGCAGAACCAGCAGAACCAGCAGAACC
AGCAGAACCAGCAGAACCAGCAGAACCAGCAGAACCAGCAGAACCAGCAG
AACCAGCAGAACCAGCAGAACCAGCAGAACCAGCAGAACCAGCAGAGCCA
GCAGAACCAGCAGAACCAGCAAAACCAGCAGAACCAGCAGAACCAGCAGA
ACCAGCAGAGCCAGCAGAACCAGTCAACCCAGATAATCCAATTTACCAAT
AAAACCAGAAGAGCCATCAGGGGGTGCAGAACCATTAAATCCAGAAGTTG
AAAATCCATTTATAATACCAGATGAACCTATAGAACCC
```

Figura 9 – Proteína TRAP-A recombinante. (A) Ilustração esquemática do plasmídeo pGEX utilizado para clonar a sequência da TRAP-A. (B) Sequência do gene da TRAP-A de *Plasmodium berghei*, mostrando em vermelho onde os primers foram desenhados.

A proteína fusão resultante deste plasmídeo, possui 27,90 KDa de cauda GST, mais 22,44 KDa da TRAP-A, resultando em um peso total de 50,34 KDa.

4. Transformação - *Saglin*

A TRAP-A já estava previamente clonada em pGEX 4T-1 e o plasmídeo transformado em *E. coli* Bl21 (DE3), em estoque de permanente a -80°C (Ghosh e cols., 2009).

A *Saglin* que já estava clonada no vetor pBAD, estava transformada em *One Shot® TOP10 E. coli* (Life Technologies), que é uma cepa ideal para a propagação de plasmídeo, mas não para a expressão de proteínas. Portanto, foi feita mini-preparação do plasmídeo pBAD + *saglin* com o kit *GeneJet Plasmid Mini-Prep Kit* (Thermo Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a mini-preparação, foi feita a transformação em *E. coli* Nico21 (DE3).

Para a transformação, as células competentes foram descongeladas em gelo. 2 ul de plasmídeos provenientes da mini-preparação foram adicionados as bactérias e mantidas em gelo durante 20 minutos. Seguiu-se um choque térmico a 42°C por 30 minutos e, em seguida, as bactérias foram deixadas em gelo durante 1 minuto. 300 ul de meio SOC foi adicionado e as células cresceram sob agitação a 37°C por 35 minutos e plaqueadas em meio LB-ágar com carbenicilina ou ampicilina (concentração final 60 ug/ml).

Colônias isoladas que cresceram desse plaqueamento cresceram em meio LB-liquido com ampicilina ou carbenicilina (concentração final 60 ug/ml) e um volume de glicerol de 10% em relação ao volume final de cultura foi adicionado para se fazer cultura permanente. Essa cultura foi mantida a -80°C.

*Carbenicilina: demonstra uma melhor estabilidade sobre a ampicilina, em meio de cultura. É mais resistente ao calor e a degradação induzida por valores mais baixos de pH.

5. Expressão da *Saglin*

O plasmídeo pBAD + *saglin*, transformado em *E. coli* Nico21 (DE3), cresceu *overnight* em meio LB (Meio Luria-Bertani) com carbenicilina ou ampicilina (concentração final de 60 ug/ml) a 37°C. Depois disso, parte dessa cultura inicial foi inoculada em um meio LB novo com antibiótico (1/50 do volume total da cultura). As bactérias contendo o gene da *saglin* cresceram até a OD₆₀₀ 2.0 (fase estacionária de *E. coli* crescendo em meio LB), quando a expressão da proteína foi induzida com 0,2 % de concentração final de l-arabinose (de acordo com as recomendações do fabricante) (pBAD TOPO® TA Expression Kit, Invitrogen, life technologies). A cultura foi mantida a temperaturas que variaram entre 18-20°C *overnight*, para a expressão da proteína, e centrifugadas a 4500 xg. O pellet foi então congelado a -80°C até o momento da purificação.

6. Expressão da TRAP-A

O plasmídeo pGEX 4T-1 + TRAP-A, transformado em *E. coli* Bl21 (DE3), cresceu *overnight* em meio LB (Meio Luria-Bertani) com carbenicilina ou ampicilina (concentração final de 60 ug/ml) a 37°C. Depois disso, parte dessa cultura inicial foi inoculada em um novo meio LB com antibiótico (1/50 do volume total da cultura). As bactérias contendo o plasmídeo com o gene da TRAP-A cresceram até a OD₆₀₀ 0.6-0.8 (fase logarítmica de crescimento de *E. coli* crescendo em meio LB), quando foram induzidas a expressar proteína com IPTG em uma concentração final de 1mM. A cultura foi mantida a temperaturas que variaram entre 18-20°C *overnight*, para a expressão da proteína, e centrifugadas a 4500 xg. O pellet foi então congelado a -80°C até o momento da purificação.

7. Expressão da cauda de Histidina

Para a expressão da cauda de histidina, foi utilizado o plasmídeo pET, ligado ao gene GFP e a uma cauda de histidina (Figura 10). O plasmídeo contém o gene que confere resistência a ampicilina, e foi transformado em bactérias *E.coli* Bl21 (DE3). Esta bactéria foi semeada em meio LB, contendo ampicilina ou carbenicilina (concentração final de 60ug/ml), a 37°C, *overnight*. Depois disso, parte dessa cultura inicial foi inoculada em um novo meio LB com antibiótico (1/50 do volume total da cultura). As bactérias contendo o gene da cauda de histidina ligada ao gene da proteína GFP cresceram até a OD₆₀₀ 0.6-0.8 (fase logarítmica de crescimento de *E. coli* crescendo em meio LB), quando foram induzidas a expressar proteína com IPTG, em uma concentração final de 1mM. A cultura foi mantida a temperaturas que variaram entre 18-20°C *overnight*, para a expressão da proteína, e centrifugadas a 4500 xg. O pellet foi então congelado a -80°C até o momento da purificação.

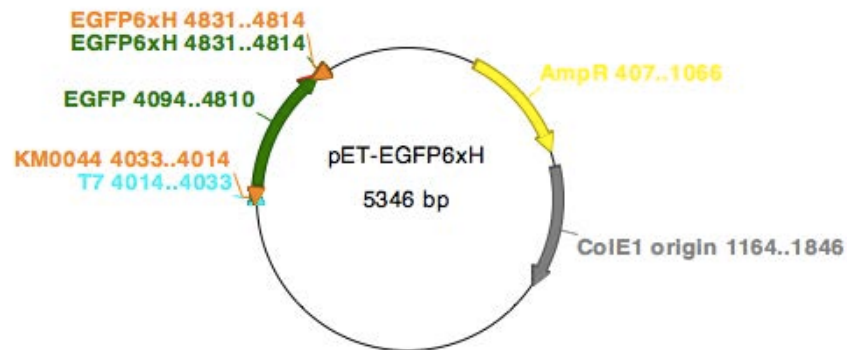


Figura 10 – Mapa do plasmídeo pET-EGFP6xH utilizado na expressão do controle de histidina.

8. Expressão da Cauda GST

O plasmídeo pGEX 4T-1 contendo a sequência da cauda GST, mesma cauda utilizada na expressão da proteína recombinante TRAP domínio-A, transformado em *E. coli* Bl21 (DE3), cresceu *overnight* em meio LB (Meio Luria-Bertani) com ampicilina (concentração final de 60 ug/ml) a 37°C. Parte desta cultura foi transferida para um erlenmyer contendo antibiótico (1/50 do volume total da cultura). As bactérias cresceram até a OD₆₀₀ 0,6 a 0,8 (assim como no caso da

expressão da TRAP-A), quando a expressão da proteína foi induzida com 1 mM de IPTG. A cultura foi mantida a temperatura que variou entre 18-20°C, overnight, e foi centrifugada a 4500 xg. O pellet foi então congelado a -80°C para posterior purificação.

9. Purificação da *Saglin*, da TRAP-A, da cauda GST e da cauda de histidina

- Rompimento das Células Bacterianas com *BugBuster Protein Extraction Reagent* (Novagen)

Após a expressão, 1 ml de cultura induzida foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 250 ul de BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) e 1 ul of Benzonase® Nuclease foi adicionado. A suspensão foi mantida em agitação leve a temperatura ambiente por 10 minutos, e então foi centrifugada a 16000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante “contendo” a proteína foi transferido para um novo tubo e preparado com Laemmli Buffer (concentração final de 1x) (tubo marcado como “fração solúvel”). Para o precipitado, 250 ul de água foi adicionada e a amostra foi então ressuspenso e preparada com Laemmli Buffer, como anteriormente descrito. (Tubo marcado como “Pellet”)

- Rompimento das Células Bacterianas com Quebra Mecânica (Sonicação)

Para cada 1 g de pellet gerado após a expressão de cada proteína, 1 ml de *Affinity Buffer* foi utilizado. 0,01 KU de Benzonase® Nuclease (Sigma Aldrich) foi adicionada para cada 1 ml de precipitado / affinity loading buffer. Também foi utilizado inibidor de protease 1x (Sigma Fast Protease Inhibitor Cocktail tablets – Sigma-Aldrich) e Tris (2-Carboxyethyl) Phosphine (TCEP - Sigma-Aldrich). Todo o restante do procedimento foi desenvolvido no gelo. 1mg/ml de lisozima (concentração final) foi adicionada a suspensão e agitada suavemente a 4°C por 10 minutos. as amostras foram então sonicadas e a confirmação da ruptura das paredes bacterianas foi feita por microscopia. As amostras foram posteriormente centrifugadas a 25 000 g em uma centrífuga Sorvall™ RC 6 Plus.

O lisado celular foi combinado com 1 ml da resina apropriada *Ni-NTA Agarose* (Qiagen), para cada litro de cultura crescida, para a purificação da *saglin* e

da cauda de histidina, ou *Glutathione-Superflow resin* (ClonTech) para a purificação da TRAP-A e da cauda GST), para cada 100 ml de cultura que foi induzida por l-(+)-arabinose (Sigma) ou IPTG (Invitrogen). O lisado foi então colocado em colunas de purificação (Poly-Prep Chromatography Columns – BioRad), contendo a resina apropriada, para que a ligação das proteínas com a resina fosse possível. 3 lavagens se sucederam com tampão de lavagem (His-Fusion wash buffer, ou GST-fusion wash buffer (Anexo 6). A eluição foi feita com excesso de imidazol (*saglin* e cauda de histidina – His-fusion elution buffer) ou de glutathione reduzida (TRAP-A e cauda GST – GST-fusion elution buffer) (Anexo 6).

* Todos os tampões usados neste experimento estão descritos no Anexo 6 deste trabalho.

10. Amostras utilizadas como controle em cada etapa de expressão / purificação

Algumas amostras foram preparadas com 1x laemmli buffer e submetidas a uma temperatura de 100°C por 5 minutos, seguida por 5 minutos de choque térmico em gelo. Estas amostras foram utilizadas em gel SDS-PAGE corado com *Comassie* e em experimentos de Western-Blot como controles experimentais para checar a eficiência na purificação e a especificidade da proteína purificada, com anticorpos específicos.

Os controles utilizados foram:

- Cultura não induzida: cultura de bactérias antes de serem induzidas com l-arabinose (*saglin* e cauda de His) ou IPTG (TRAP-A e cauda de GST);
- Cultura Induzida: cultura de bactérias induzidas com l-arabinose (*saglin*) ou IPTG (TRAP-A, cauda GST e cauda His);
- Fração Solúvel: após a centrifugação em centrífuga Sorvall™ RC 6 Plus, o sobrenadante denominado lisado celular, foi a fração utilizada para este controle;
- Pellet (precipitado): após a centrifugação em centrífuga Sorvall™ RC 6 Plus, o precipitado foi utilizado como outro controle;

- “flow through: após a incubação overnight com a resina, o sobrenadante foi coletado;
- Primeira lavagem;
- Segunda lavagem;
- Terceira lavagem: após o processo de lavagem, o tampão de lavagem (“Fusion Wash Buffer”) foi checado em 3 etapas (1ª lavagem, 2ª lavagem e 3ª lavagem), para checar se a proteína não estava sendo perdida em cada uma das etapas;
- E1: primeira eluição da proteína;
- E2: segunda eluição da proteína;
- E3: terceira eluição da proteína;
- resina: após a eluição, a resina foi preparada com laemmli buffer para ter certeza que toda a proteína fusão foi eficientemente eluída da resina.

11. Quantificação das proteínas pelo image J

Após a purificação, as proteínas foram quantificadas. Para a quantificação, utilizamos amostras de concentrações conhecidas de BSA (500, 400, 250, 200 e 125 ug/ml de BSA) para que uma curva padrão fosse construída, por densitometria, através da utilização do ImageJ. Com base nessa curva padrão, a quantidade de cada proteína foi estimada.

12. Western-Blot

As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel SDS-PAGE a 10% e então foram transferidas para uma membrana PVDF (Millipore). Após a transferência, as membranas foram lavadas 3 vezes com tampão TBST (Tris Buffered Saline com Tween 20) (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂ e 0,1% Tween-20, pH 7,5), bloqueadas com TBST + 4% BSA (Albumina Sérica Bovina), e inoculada com o anticorpo monoclonal apropriado (anticorpo anti-polyHistidine monoclonal produzido em camundongo para *saglin* e anticorpo anti-GST monoclonal produzido em cabra para TRAP-A) (diluição de 1:1000). Após a incubação, os blots foram lavados com TBST e incubados com anticorpos secundários ambos ligados a fosfatase alcalina (AP) - IgG anti-camundongo AP-ligado para *saglin* e IgG anti-

cabra AP-ligado para TRAP-A) (diluição de 1:10 000) em tampão de bloqueio (TBST + 4% BSA) por 1 hora. Após o bloqueio as membranas foram lavadas em TBST 3 vezes e então incubadas com substrato - *Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase* - (Promega). Após a visualização das bandas, a reação foi interrompida com água. O blot foi deixado secar e as imagens foram então feitas em scanner.

13. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

A proteína *saglin* recombinante com cauda de histidina foi diluída a 25 ng em tampão carbonato / bicarbonato (0,015 M Na₂HCO₃; 0,035 M NaHCO₃ em água destilada e pH 9,5) e incubada overnight em poços de placa de ELISA (Corning® 96 Well EIA/RIA Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind Microplate). Os poços foram então lavados 3 vezes com tampão TBST e bloqueados com BSA (1 mg/ml). A TRAP-A com cauda GST foi diluída na concentração de 300 ng em tampão TBST + 4% de BSA foi adicionada aos poços. Após 1 hora de incubação, os poços foram lavados novamente com TBST, e o anticorpo monoclonal Anti-GST produzido em cabra (GE Healthcare) e diluído em TBST com 4% de BSA foi colocado na placa, na concentração final de 1:500. Logo após, anticorpo policlonal IgG anti-cabra ligado a fosfatase alcalina (Sigma Aldrich) foi incubado nos poços por 1 hora. Os poços foram então lavados novamente 3 vezes com TBST, e o Kit *alkaline Phosphatase* (Bio-Rad) baseado no substrato *p-nitrophenylphosphate*, foi utilizado para o desenvolvimento da coloração. Foi feita então a leitura da placa em leitor LabSystems Multiskan EX no comprimento de onda de 415 nm.

Para os ensaios de ELISA que mediram a interferência de cada peptídeo na ligação da *saglin* com a TRAP-A, padronizamos a concentração de TRAP-A, para um valor que correspondia a aproximadamente 60% do ponto de saturação da proteína (resultados não mostrados), para que a sensibilidade do experimento aumentasse. O experimento foi realizado como descrito acima, porém, os peptídeos (na concentração de 100 μ M), foram misturados a TRAP-A em tubos eppendorf, e ficaram a temperatura ambiente durante 1 hora, para que pudessem interagir, se

fosse o caso, e posteriormente, foram colocados na placa previamente sensibilizada com *saglin*, e bloqueada por BSA.

14. Coleta e identificação dos mosquitos

As coletas de anofelinos foram realizadas nos ramais de Remansinho, estado do Amazonas, e Granada, estado do Acre, pela nossa equipe, em três períodos de 2011 – abril, setembro e novembro. O método de captura realizada foi isca humana, entre as 18 e as 6 horas (Figura 11).



Figura 11 – Método de captura dos mosquitos nos ramais de Granada e Remansinho.

Os anofelinos fêmeas coletados foram identificados morfologicamente, utilizando a chave de identificação do subgênero *Nyssorhynchus*.

15. Obtenção do DNA

A obtenção do DNA se deu com a utilização da resina Chelex (BioRad), de acordo com as recomendações do fabricante, com as seguintes modificações: para cada micro tubo com um único mosquito, foi colocado 300 uL da solução de Chelex 5% em tampão Tris-HCl (pH 8,0). Foi realizada a maceração completa do indivíduo, agitação em vórtex por 10 segundos e centrifugação com velocidade de 13.000 rpm,

por 20 segundos. O tubo foi incubado a 80°C, por 30 min em banho-seco (Eppendorf). Após esse período, novamente houve agitação em vórtex por 10 segundos e centrifugação com velocidade de 13.000 rpm, por 20 segundos. O DNA estava contido no sobrenadante da solução final.

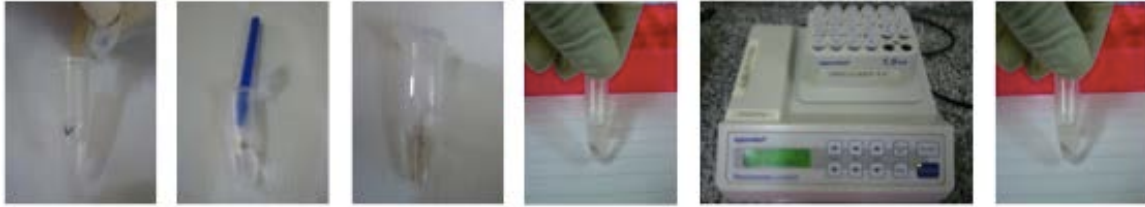


Figura 12 – Preparação do DNA com a resina Chelex.

16. Desenho dos Primers e PCR

Utilizamos pares de primers para a amplificação da *saglin* de *Anopheles gambiae* - (5'- CACCATGTCACGTTTGCCCACTGTACTGTTGCTC-3') e reverse (5'- AAAGCCGGACGACTTGCGCGACTCGCTCAGATA-3'), amplificando um fragmento de 1,2Kb (em vermelho na Figura 13), descrito por Ghosh e colaboradores (2009), para a amplificação do gene relacionado em *An. darlingi*. Além desse par de primer, outros 2 pares foram desenhados utilizando o software Primer3 (Figura 13). Todos os primers foram comparados ao banco de dados do NCBI para a confirmação de sua especificidade, e analisados no IDT Oligo Analyser quanto a formação de homodímeros e heterodímeros de primer e *hairpin*. Ainda em relação a Figura 13, em azul, os primers delimitam uma sequência de 401 pb, e em rosa, uma sequência de 593 pb.

Anopheles *gambiae* SAGLIN gene, complete cds

GenBank: AY846632.1

>gi|56809866|gb|AY846632.1| Anopheles *gambiae* SAGLIN gene, complete cds

ATGTCACGTTTGCCCACTG ACTGTTGCTCTTAGCGAGCGCCGAGTCCTCGCGGCTGGCGGC
CAGGAAGCAACCGAAGACCCGTTTCGCGGACGAAACCGACCAGTGCCAGATCAGCGTTAGTGC
CGAGACGATGAAATCCCTCCA CGGCGGGTCGATGCAGCCGACGGCACGTGCGACAACCTGT
GGGAAAGCTTTCTATCTCAGTTTACCAAGTCAGGGAAAACCTGACCGCGTGCCAGGAGCGG
GCAGCCCGCGGACCAGCGCCGATCCTTCCAGCCAGTTCTGT CAGCAGCTGCTGGACGATGC
GCAGCGGCAGATGGAGCAGGAGCATCGCCAGTACGCCGCCACCCTGGAGGAGCAGCTGCAC
GCAGCGCAGCAGGAAACCCAGCAGGAGCAGGAGATGAAGAAGGCGCTGCAGAAGCAGCTC
GACGCGCTCACCGACTCCCGAACGCGCTGTACATCGATCTGCTGCTAGCGAACATTGCGATC
GGCGAAACGAAAGCAAGCCCTCTCGTACTACAA CCTGATGCCGGCCAGCATGCCCATCGACAA
GCTGCACGAGCAGATCGTGCGTTCGTCTACCGGGTGACGATCTACCAGGACCAGCGGCTGC
TCAACCTGATGCGGTTCTGTGCGGACATTTCCAGCGTCGAGGAGCGGCGCTCGCTGTACCAG
CTGGCGCAGCGCGAAGTGCAGAAGCGCCGAGCCAGCGGGACGGGTACGTGGCGGCCGTGT
ATGCGCTGAGCGTGCGGAAGATCTGCCCGTCTACCAGGCAAACCGGCAGCTGTACGACGAC
CTTGTCCGGCAGTCCGAGACCCGCTCAAGGAGCAGGTGG CGAACGGTAACTTCAAGCAGGC
GGCCGAGTTGGCCGCCCGCCAGCCGAGCACTTCCGGCAGCTGCAAACCAGCCTCGCCACGA
TCGAGCTGAAGCACTGGCGCAAGTTCGACCGGTTCTGACCGTACGCTAACGCGCTGCCCCAGC
CAGCCAGCGGCTGGAGGTGCTGCGTGTGCTGCTGAGCCAGATCGGGCAGCCGGGAGAAGAA
GACTTCCCACAAATATCTGGTAAAGGCGGCACGGCAGTTTGACATTTGCGAGCAGTTTATCGG
CCGGGGCAAGGTGGACCAGGCGGTCAAGAAGCAGCTGGAGGAACTGCGCGGGAAGTTTGCA
ACGTTTGCGAAGGGCAAGAAC TACCAGCACTATCTGAGCGA GTCGCGCAAGTCGTCCGGCTA
G

Figura 13 – Sequência do gene da *saglin* de *Anopheles gambiae*. Destacados estão as sequências utilizadas para a amplificação do gene em *Anopheles darlingi*.

Nenhum dos primers baseados na sequência de *Anopheles gambiae* amplificaram a *saglin* de *Anopheles darlingi*.

Tomando-se a sequência de nucleotídeos da *saglin* de *An. gambiae*, e analisando com o banco de dados de proteína no NCBI, foi feita uma análise da sequência mais próxima de *Anopheles darlingi*. Duas sequências vieram deste levantamento, SG1B e SG1 (Figura 5). Foram desenhados primers, com o intuito de amplificar a maior região possível dessas sequências. O par F: ATGAACCAAGGAACCA(G)GGAA e R: TCGGTTTGGTTC(T)TTCTGGAAC, em amarelo no Anexo 1, amplificando um fragmento de 1.332pb, o F: TCGAGCTGAACGGAGAAAAG, que se usado com o reverso anterior, R: TCGGTTTGGTTC(T)TTCTGGAAC, amplifica um fragmento de 921 pb (em rosa no anexo 1) e o R: GTGCTTCGTACAGCGATTGA (em azul no anexo 1) que se combinado com o Foward ATGAACCAAGGAACCA(G)GGAA, amplifica um fragmento de 636 pb. Os primer foram desenhados pelo programa Primer3 Input (version 0.4.0)

(frodo.wi.mit.edu) e analisados no programa *IDT Oligo Analyzer* (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>), quanto a formação de homodímero, heterodímero e *hairpin*. posteriormente foram comparados com o banco de dados do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para garantir sua especificidade.

Foi possível a amplificação para as sequências de *An. darlingi*, em três combinações possíveis com os primers desenhados, portanto, o par de primer capaz de amplificar a maior sequência, foi escolhido para as análises posteriores (F: ATGAACCAAGGAACCA(G)GGAA e R: TCGGTTTGGTC(T)TTCTGGAAC, em amarelo no Anexo 1).

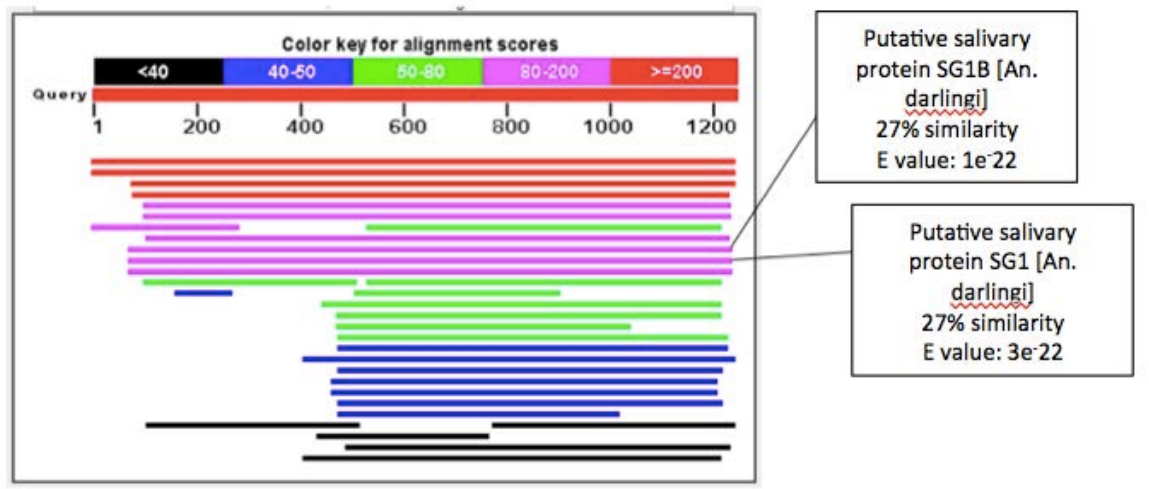


Figura 14 – Comparação da sequência nucleotídica traduzida do gene da *saglin* de *An. gambiae*, com o banco de proteínas do NCBI.

As reações de PCR foram padronizadas utilizando, 1x GoTaq Colorless Mastermix (Promega), 5 uM de cada um dos primers, e 1ul de DNA.

Para algumas amostras, em que não foi possível a amplificação com GoTaq Colorless Master Mix, a reação de PCR foi realizada com o kit PlatinumTaq DNA Polymerase (Life Technologies). A reação de PCR foi realizada utilizando 1X PCR Buffer, menos Mg, 0,4 uM de dntp, 1,8 mM de MgCl₂, 0,5 uM de cada primer, e 4 U de

Platinum® *Taq* DNA Polymerase.

A ciclagem utilizada para a amplificação foram 94°C por 1 minuto, seguido por um ciclo de 30 repetições de 94°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e um passo de 72°C por 5 minutos de extensão final foi adicionado a ciclagem.

Foram sequenciadas amostras dos ramais do Granada e Remansinho, em coletas realizadas em abril, setembro e novembro de 2011. Os indivíduos foram nomeados, de acordo com a data e local da coleta. Por exemplo, mosquitos coletados em abril, foram denominados A₁₁, em setembro, de B₁₁, e em novembro, C₁₁. O número 11, é referência ao ano da coleta (2011). Mosquitos coletados no ramal do Granada, foram denominados de G, e no ramal do Remansinho, de R. Por exemplo, o mosquito denominado A₁₁R001, é um indivíduo coletado em abril, no ramal do Granada, e foi o primeiro a ter seu DNA extraído. Da mesma maneira, um indivíduo denominado A₁₁G057, foi o 57º mosquito a ter seu DNA extraído, da coleta de abril, no ramal do Granada.

Para o sequenciamento do domínio-A da proteína TRAP, foram desenhados primers específicos com base na sequência do isolado BK3-17, proveniente da Índia, de *Plasmodium falciparum* (GenBank AJ581767.1) (Anexo 4), com o auxílio do software Primer 3 Input (version 0.4.0). Os pares de oligos desenhados foram F: TGAATCATCTTGGGAATGTTAAA e R: AGACCATTCGTCCCAAACAC (amplicon de 752 pares de bases - pb); F: AATGGTAGAGATGTGCAAACAA e R: AGACCATTCGTCCCAAACAC (amplicon de 684 pb); F: AATGGTAGAGATGTGCAAACAA e R: ATCTTCGGGTTTCATGTGGAA (amplicon de 834 pb); F: AATGGTAGAGATGTGCAAACAA e R: TAATGGTTCCTTTGGAG (amplicon de 810 pb) e o par F: AATGGTAGAGATGTGCAAACAA e R: TCTAATGGTTCCTTTGG (812 pb). Todos os pares de primers foram comparados no banco de dados no BLAST quanto a especificidade dos fragmentos amplificados e analisados no programa IDT Oligo Analyser quanto a formação de homodímero, heterodímeros e *hairpin*. O primer escolhido para as análises, foi o par F:

AATGGTAGAGATGTGCAAAACAA e R: ATCTTCGGGTTCATGTGGAA, que é o que apresenta a melhor cobertura da sequência gênica da proteína.

Para a amplificação a ciclagem utilizada foi de 94°C por 3 minutos, seguido por um ciclo de 30 repetições de 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e um passo de 72°C por 5 minutos de extensão final foi adicionado a ciclagem.

Amostras de pacientes infectados por *P. falciparum*, de região endêmica da Amazônia brasileira, foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

Os produtos de PCR de SGs e TRAP, foram purificados com ExoStar (GE Healthcare), e a quantidade de DNA nas amostras foi estimada pela utilização de Low DNA Mass ladder - Life Technologies), antes de serem enviadas para o sequenciamento.

17. Sequenciamento

O sequenciamento do gene da proteína *saglin* foi realizado parte pela empresa **Macrogen Korea**, no aparelho Applied Biosystems (ABI) 3730XL DNA Analyzer e parte no laboratório do Dr. João Pessoa Araújo Jr, no Sequenciador Automático ABI 3500 (Applied Biosystems). O sequenciamento da proteína TRAP foi feito pela Macrogen Korea, no aparelho Applied Biosystems (ABI) 3730XL DNA Analyzer.

As amostras foram sequenciadas em ambas as direções (forward e reverse), posteriormente foram unidas no software EMBOSS GUI (<http://imed.med.ucm.es/EMBOSS/>). O alinhamento das amostras foi feito no Clustal X2 [Larkin e cols., 2007] (Anexo 2).

As sequências foram então traduzidas (EMBOSS GUI), alinhadas (Clustal X2), e a construção da árvore filogenética foi feita no programa Mega 6 [Tamura e cols., 2013], pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), com bootstrap de

1000 repetições. A visualização também foi realizada no software Mega 6.

Resultados e Discussão

Para que a transmissão da malária ocorra, o parasita do gênero *Plasmodium* necessita se desenvolver em mosquitos do gênero *Anopheles*. Este desenvolvimento se inicia com a ingestão das formas sexuais – gametócitos feminino e masculino – e termina com a invasão das glândulas salivares. Este processo de invasão ocorre de forma específica, através da ligação entre a *saglin* (proteína majoritária da glândula salivar de anofelinos) e a TRAP (*Thrombospondin Related Anonymous Protein*, proteína do estágio de esporozoíto de *Plasmodium*) (Ghosh e cols., 2009).

Muito se sabe sobre a proteína TRAP, em *Plasmodium*. Seu papel na motilidade de esporozoítos, invasão de hepatócito, invasão da glândula salivar, a estrutura de cristal em alta resolução do domínio-A já foi obtida [Matusckewski e cols., 2002; Ghosh e col., 2009; Pihlajamaa e col., 2013]. Sobre a *saglin*, muito pouco se sabe. A fim de entender o processo de desenvolvimento do *Plasmodium falciparum* em *Anopheles darlingi*, buscamos pela parte da sequência da *saglin* que é responsável pela interação com o domínio-A da TRAP.

Em parceria com o Dr. Marcelo Jacobs-Lorena (*Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health*, Baltimore/USA), nosso objetivo foi expressar a *saglin* de *An. gambiae*, expressar a TRAP-A de *Plasmodium berghei*, repetir o ensaio de interação entre estas proteínas, descrever qual a região da *saglin* que interage com a TRAP domínio-A através da utilização de peptídeos sintéticos, baseados na sequência da *saglin*.

Para isso, primeiramente expressamos e purificamos as proteínas *saglin*, TRAP domínio-A (TRAP-A) (Figura 15), e as caudas GST e His. Como se observa na Figura 15, em A, um gel de poliacrilamida, mostrando a esquerda, a proteína TRAP-A purificada em 3 eluições, linhas 1, 2 e 3. A direita da mesma figura, estão 3 diluições da proteína *saglin*, linhas 4, 5 e 6. As setas em laranja especificam os tamanhos esperados para cada proteína, 50,34 kDa para a TRAP-A, e 66 kDa para a *saglin* recombinante. Em B, se observa as membranas de western-blot, relacionadas ao gel de poliacrilamida, da mesma figura. Após a expressão e purificação das proteínas, foi feita a quantificação das amostras, por densitometria, pelo software Image J, como descrito na metodologia.

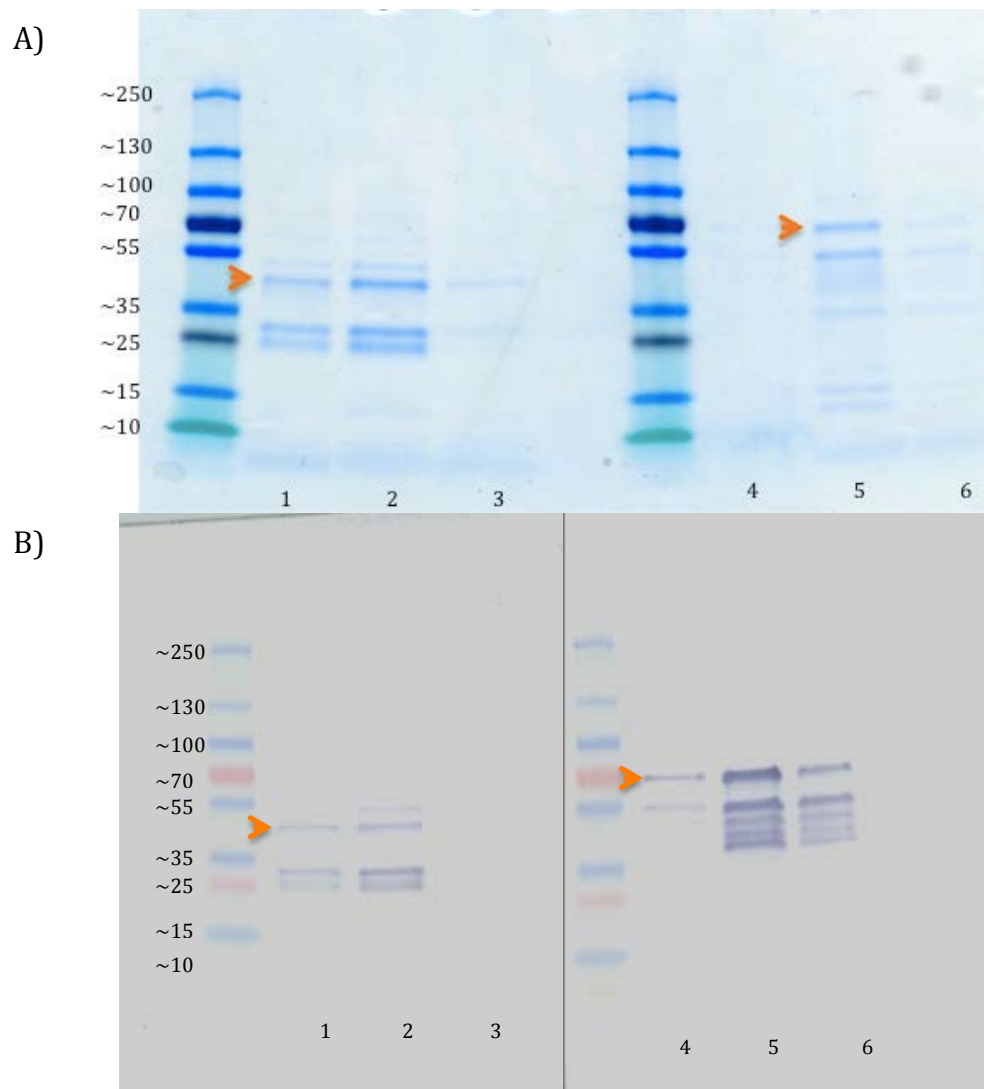


Figura 15 – Produtos de purificação das proteínas TRAP-A e *saglin*.

Para delimitarmos qual a região da *saglin* que interage com o domínio-A da proteína TRAP, utilizamos a técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Em um primeiro momento, mostramos que a ligação entre a *saglin* e a TRAP-A, ocorre de forma específica. Na Figura 16, podemos observar que a omissão em qualquer uma das etapas do ensaio (as omissões estão identificadas em cada linha da figura abaixo), resultam em absorvâncias muito baixas, próximas a zero. Com isso, conseguimos mostrar que a interação TRAP x *saglin* é específica. Fizemos também um experimento para verificar se uma proteína não estaria interagindo com a cauda da outra proteína, uma vez que as caudas fusão não foram clivadas

após a purificação das proteínas, e vimos que a interação ocorre mesmo entre TRAP e *saglin* (Figura 17). Um experimento controle foi incluído neste ensaio, onde a *saglin* foi omitida na sensibilização dos poços, e ao invés da *saglin*, utilizamos BSA overnight. O restante do processo seguiu como no experimento completo. Em um segundo momento, após a sensibilização dos poços com *saglin*, a cauda GST não fusionada a *saglin* foi adicionada ao experimento, e o anticorpo anti-GST foi utilizado na sequência. Não houve interação entre a cauda GST e a *saglin* (absorbância próxima a zero). Em outro experimento, ao invés da sensibilização dos poços com *saglin*, utilizamos a cauda de histidina ligada a proteína GFP, e o experimento seguiu com a adição de TRAP-A, anticorpo anti-GST e IgG anti-cabra ligado a fosfatase alcalina. Os valores de absorbância, mais uma vez, foram próximos a zero. Este experimento todo representado pela Figura 17, mostra a especificidade da interação entre TRAP-A e *saglin*, onde não há interação inespecífica entre a cauda de uma proteína com outra cauda ou outra proteína.

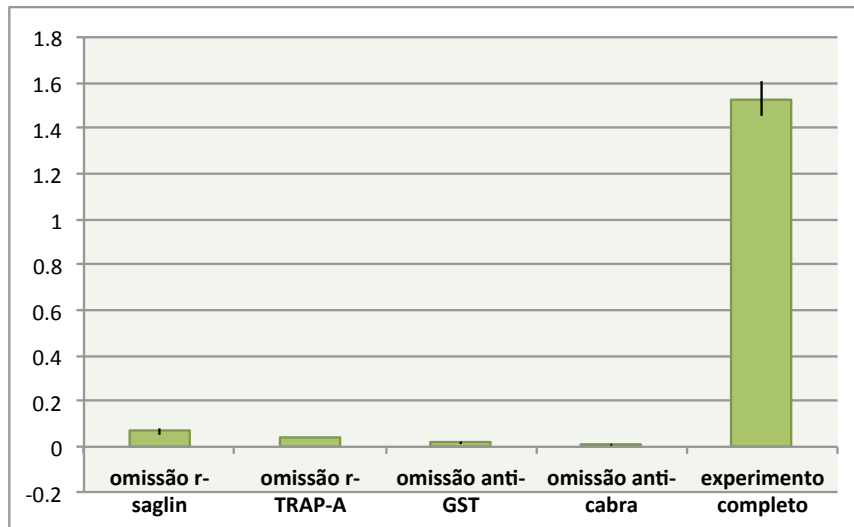


Figura 16 – Ensaio ELISA com as proteínas recombinantes TRAP domínio-A e *saglin*.

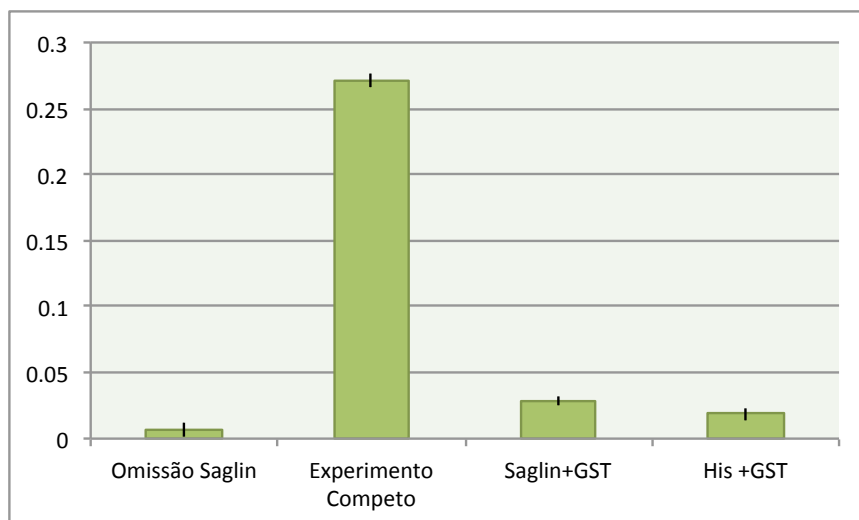


Figura 17 – Ensaio ELISA com as caudas.

O ensaio com os peptídeos desenhados aleatoriamente ao longo da sequência da *saglin*, como especificado na metodologia, foi feito em condições de sub-saturação da TRAP-A, aumentando assim a sensibilidade do experimento (dados não mostrados). Alguns peptídeos mostraram apresentar um pequeno papel na interferência na ligação das proteínas, como os peptídeos 2 e 7, por exemplo. Mas o peptídeo que mais interferiu no experimento, foi o 16 (FVPYANALPQPAQR), mostrando que provavelmente é a região da *saglin* responsável pela ligação com a TRAP domínio-A (Figura 18).

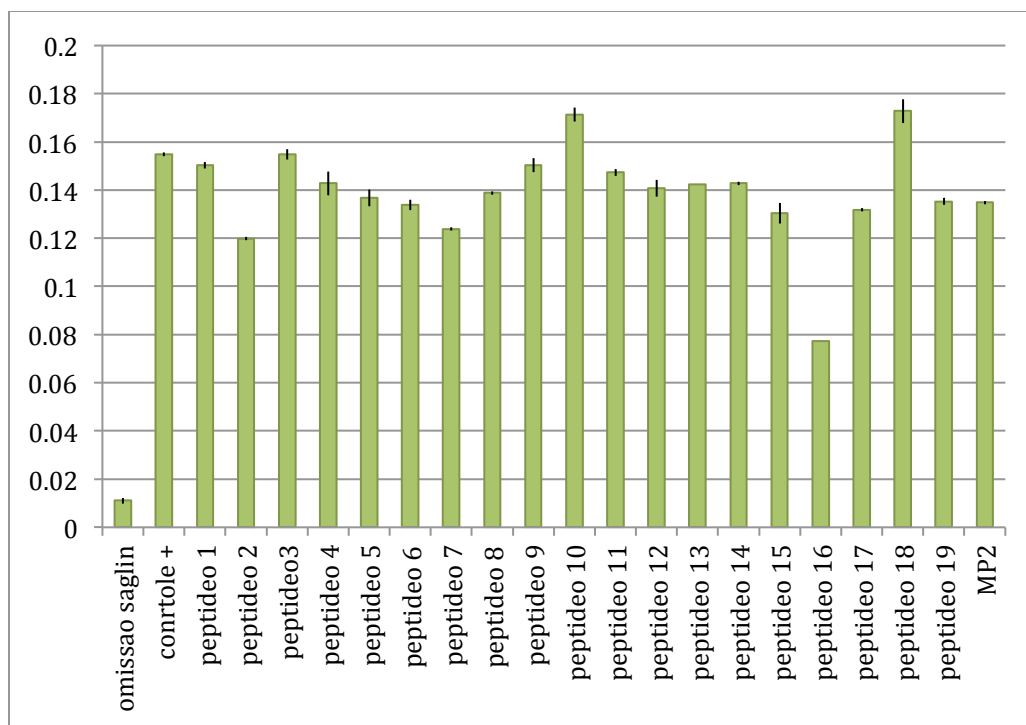


Figura 18 – Experimento de ELISA mostrando a interferência dos peptídeos na ligação da TRAP-A com a *saglin*, em condição sub-saturante de TRAP.

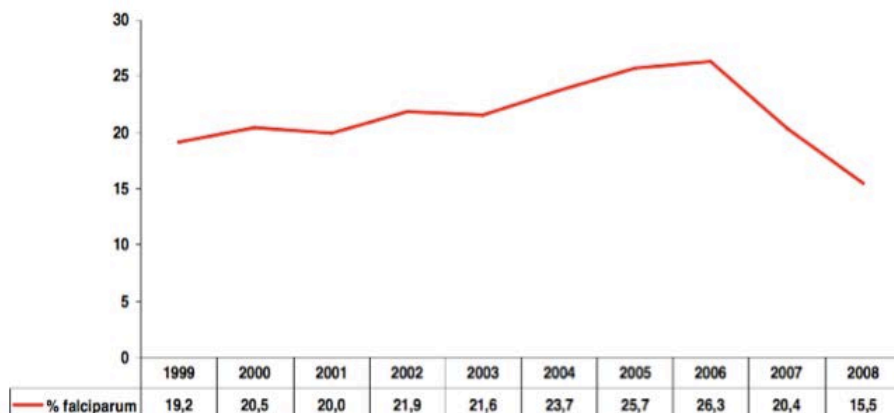
Após a caracterização da região da *saglin* que interage com o domínio-A da proteína TRAP, comparamos a sequência deste peptídeo no banco de dados do NCBI, para averiguar se o peptídeo possui alguma semelhança com as SGs de *Anopheles darlingi*. A única semelhança encontrada foi com uma proteína putativa de *Anopheles stephensi*, SG1B (GenBank AA006838.1). Quando a comparação é feita apenas com *Anopheles darlingi*, nenhuma semelhança é encontrada.

Os principais vetores de malária africana (“Velho Mundo”), *An. gambiae*, *An. funestus*, dentre outros, são espécies muito distantes das existentes como vetores na América do Sul (“Novo Mundo”)– *An. darlingi*, principalmente. Moreno e colaboradores (2010), mostraram que o tempo estimado de divergência entre os subgêneros *Nyssorhynchus* – ao qual o *Anopheles darlingi* pertence – e subgênero *Anopheles*, é de aproximadamente 79 milhões de anos. Também foi estimada a data de divergência entre os subgêneros *Anopheles* e *Cellia* em 58 milhões de anos. Este último possui membros que são importantes vetores de malária na África, como o *Anopheles gambiae*. Este tempo de divergência entre as espécies, pode ter criado

barreiras para que determinadas espécies de *Plasmodium* completem seu ciclo em seus vetores.

Em estudos realizados em nosso laboratório, com *Anopheles darlingi* coletados aos arredores de Porto Velho, estado de Rondônia, ao longo do rio Madeira, foram observadas diferenças no gene mitocondrial ND4, entre as populações de anofelinos do final da estação chuvosa (Abril) e anofelinos da segunda metade da estação seca (Outubro), do ano de 2005 [Angêlla e cols., 2007]. Outro estudo de Angêlla e cols., 2014, utilizou um total de 10 loci de microssatélites, em 7 localidades ao longo do Rio Madeira, em Porto Velho, capital do estado de Rondônia, para estudar a estruturação populacional de *Anopheles darlingi*, em 2 períodos do ano: final do período chuvoso, entre fevereiro e março, e final da estação de seca na região, entre outubro e dezembro, nos anos de 2007 e 2008. Neste estudo, verificou-se a existência de 2 subpopulações. Uma dessas subpopulações seria mais dependente do regime de chuvas, que podem explorar ambientes larvais temporários em áreas florestais, ribeirinhas e inundadas, e a outra subpopulação, que pode ter se derivado da primeira, seria adaptada ao período de seca, com habitats larvais de caráter mais permanente, em regiões urbanas e suburbanas. Ainda neste trabalho de 2014, Angêlla e cols., estudaram a infectividade por *Plasmodium falciparum*, e mostraram que aproximadamente 4% dos *Anopheles darlingi* coletados, estavam infectados por *Plasmodium* spp. Destas infecções, 87,5% era devido ao *Plasmodium falciparum*, 6,25% devido ao *Plasmodium vivax*, e outros 6,25% apresentavam infecção mista. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (Figura 19), a porcentagem de casos de malária devido ao *Plasmodium falciparum*, no período do estudo de Angêlla acima citado, não passou de 20,4%.

**Proporção de malária por *P. falciparum*
Amazônia, 1999 a 2008**



Fonte: SISMAL/SIVEP/SVS/MS – atualizado em 28.12.2009

Figura 19 – Gráfico da porcentagem de casos devido ao *P. falciparum* na Amazônia entre 1999 e 2008.

Nossa interpretação para tais observações, é que o mosquito da espécie *Anopheles darlingi* pode se infectar com *P. falciparum*, mas por algum motivo, o parasita não consegue atingir as glândulas salivares e ser transmitido durante o repasto sanguíneo. Como já apresentado, Ghosh e colaboradores (2009), descreveram a importância da ligação entre as proteínas TRAP e *saglin* para o sucesso da invasão da glândula salivar dos mosquitos na transmissão do parasita, então, foi feito também o sequenciamento da proteína TRAP de isolados de *Plasmodium falciparum* provenientes da região endêmica do Brasil, para que possamos entender se há alguma diferença na sequência desta proteína que possa explicar a diferença na proporção do número de mosquitos infectados pelo parasita / porcentagem do número de casos da doença causada pelo *P. falciparum*, em regiões endêmicas brasileiras.

Considerando que o principal vetor de malária no Brasil são mosquitos da espécie *Anopheles darlingi*, e a interação entre a proteína majoritária da glândula salivar – *saglin* – e a proteína do parasita – TRAP – se faz necessária para que a

transmissão ocorra, nosso próximo objetivo foi amplificar o gene homólogo a *saglin* de *Anopheles gambiae* em *Anopheles darlingi*.

Mosquitos coletados na região amazônica brasileira, no ano de 2011, como especificado na metodologia, foram sequenciados, quanto ao gene SG1 e SG1B. A árvore filogenética, resultante desta análise, esta apresentada na Figura 20. Na árvore, não foi observado o agrupamento de nenhum indivíduo, em relação ao período do ano em que foi feita a coleta e nem quanto ao local de coleta, portanto, a sazonalidade e distância geográfica, são fatores não correlacionados a variabilidade das SGs. Foram mostradas 11 sequências diferentes, em 34 amostras sequenciadas. Como a árvore foi construída com base na sequência de aminoácidos das SGs de *An. darlingi*, cada diferença é importante, porque pode alterar a função da proteína final.

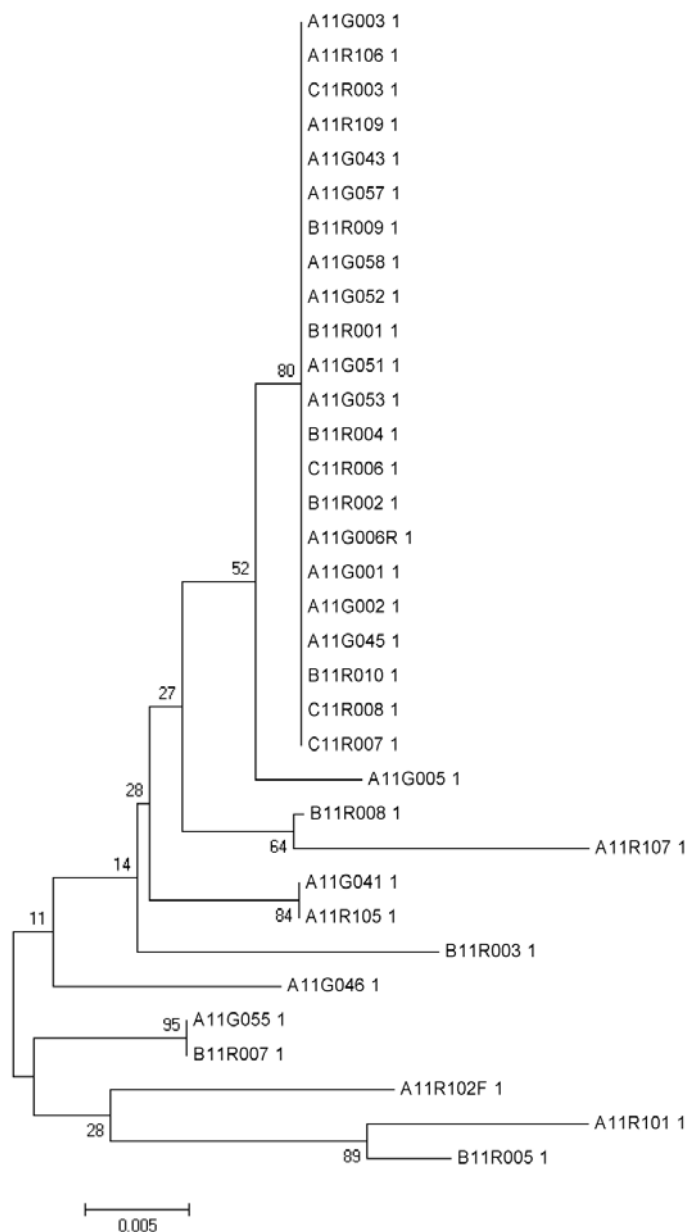


Figura 20 – Árvore filogenética construída com base nas sequências de aminoácidos de SG1 de mosquitos fêmea da espécie *An. darlingi*. As amostras foram coletadas em abril (A₁₁), setembro (B₁₁) e novembro (C₁₁) do ano de 2011, nos ramais do Granada (Estado do Acre) e Remansinho (Estado do Amazonas).

Em relação ao parasita, a proteína descrita como chave para que a invasão da glândula salivar ocorra, é a TRAP, mais especificamente o domínio-A [Ghosh e cols., 2009]. A proteína TRAP é parte de uma família de proteínas, relacionadas a invasão e motilidade parasitária, contendo proteínas estruturalmente relacionadas a outros

estágios do ciclo de vida do *Plasmodium*, como em estágio de oocinetos, a proteína CTRP (circumsporozoite protein/TRAP-related protein), em estágio de merozoito a proteína MTRAP (merozoite TRAP-like protein); e em outros membros do Filo Apicomplexa, como em *Toxoplasma gondii*, a proteína TgMIC2 (*Toxoplasma gondii* micronemal protein 2), em *Neospora caninum* a NcMIC2 (*Neospora caninum* micronemal protein 2) e em *Eimeria tenella*, a EtMIC1 (*Eimeria tenella* micronemal protein 1) [Pihlajamaa et al., 2013]. Esta família de proteínas é representada por proteínas integrais de membrana do tipo I, ou seja, proteínas que possuem um domínio alfa-helice transmembrana, e a porção C-terminal é citoplasmática [Maynard e cols., 2009].

A porção extracelular da TRAP apresenta dois domínios adesivos bem conservados – o *von Willebrand factor-A domain* (ou “domínio-A”), e o TSR (*Thrombospondin type I repeat*) [Ghosh e cols., 2009]. O domínio-A possui estreita semelhança com o domínio I das integrinas, sugerindo que provavelmente a TRAP esta envolvida na ligação à superfície celular ou a moléculas da matriz celular [Ahkouri e cols., 2004]. Alguns resíduos de aminoácidos são conservados ao longo do domínio-A, como por exemplo na sequência Asp-X-Ser-X-Ser (DXSXS), e os resíduos não contíguos T e D, sendo que T faz parte da sequência TNL, e D, da sequência TDG, todos que fazem parte do domínio chamado MIDAS (*metal-ion-dependent adhesion site*), que provavelmente desempenha um papel na ligação de cátions bivalentes (como o Mg^{2+}) e no reconhecimento de receptores [Ahkouri e cols., 2004 e Cantí e cols., 2005]. Matuschewski e colaboradores (2002), mostraram que mutações em resíduos específicos no domínio-A da TRAP, substituição da treonina 126 (Thr126) e do aspartato 157 (Asp157) por alanina, diminuíram em até 80% a infectividade por esporozoítos de *Plasmodium berghei* nas glândulas salivares de *Anopheles stephensi*. O grupo mostrou também que mutações específicas no domínio TSR eram responsáveis pela diminuição no número de esporozoítos nas glândulas salivares em 20%. Juntos, mutações nos domínios A e TSR causam 95% de inibição. As mutações descritas por Matuschewski e colaboradores são fenotipicamente indistinguíveis, mas causam perda da função adesiva do domínio-A da TRAP.

Amostras de pacientes infectados por *P. falciparum*, foram analisadas quanto a sequência da TRAP, para analisarmos se os resíduos chave na interação com a *saglin* eram mantidos em isolados brasileiros de *Plasmodium falciparum*.

Analisando o resultado do sequenciamento feito neste estudo, observamos que os aminoácidos “chave” responsáveis pela manutenção da infectividade nas glândulas salivares dos anofelinos, pelos parasitas, estavam preservados nos isolados brasileiros (Figura 21 e Anexo 6). Na Figura 21-A, esta representada a figura esquemática apresentada por Matuschewski e colaboradores (2002) indicando onde foram feitas as mutações, que causam uma diminuição no número de esporozoítos nas glândulas salivares em 80% (Domínio-A) e 20% (Domínio TSR). Em B, resultado gerado pelo alinhamento das sequências do presente trabalho, com delimitação pela cor vermelha do Domínio-A, e azul do Domínio TSR, dos aminoácidos correspondentes aos mutados por Matuschewski e colaboradores (2002).

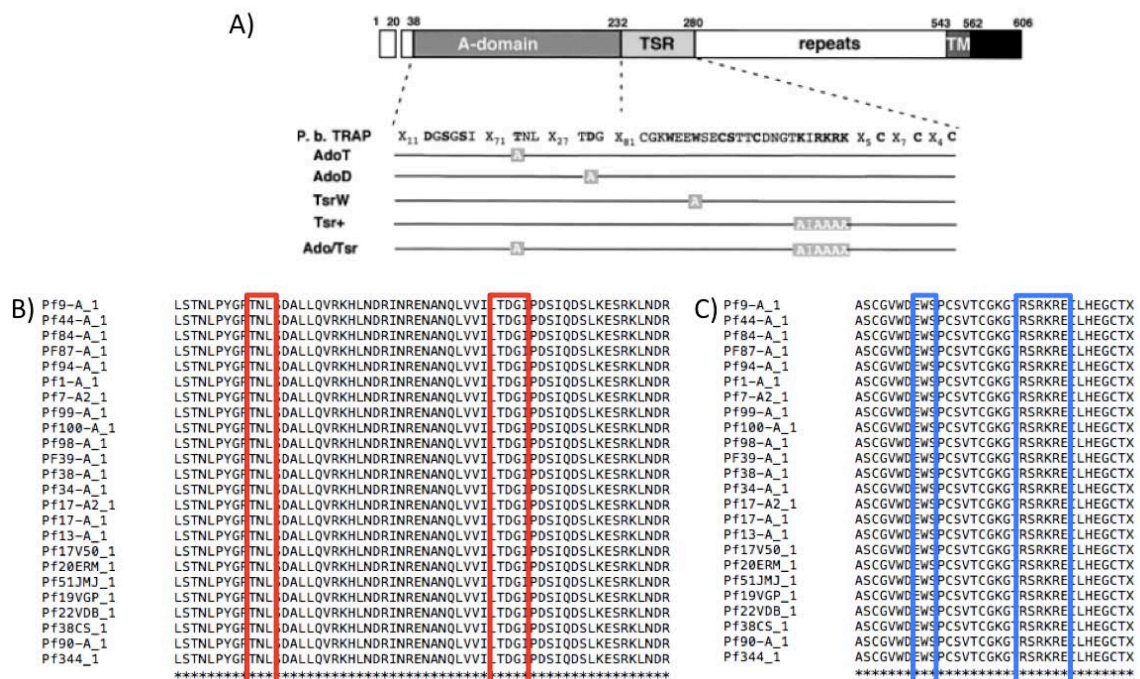


Figura 21 – Comparativo dos resíduos conservados da TRAP nos isolados de região endêmica do Brasil. A) Figura esquemática da proteína TRAP, apontando quais são os aminoácidos conservados no domínio-A e TSR (Matuschewski e col., 2002). B) Sequências do Domínio-A da TRAP, de isolados de *P. falciparum* do Brasil, com

destaque para as regiões conservadas. C) Sequências do Domínio TSR da TRAP, de isolados de *P. falciparum* do Brasil, com destaque para as regiões conservadas.

Buscamos entender também se as demais espécies de *Plasmodium* possuem preservados os aminoácidos chave da TRAP. Alinhamos sequências disponíveis no banco de dados do NCBI - *P. berghei* (GenBank AAB63302.1), *P. yoelii* (GenBank ETB62747.1), *P. chabaudi* (GenBank CDR15931.1), *P. vivax* (GenBank AIU97065.1), *P. knowlesi* (GenBank AAG24613.1), *P. cynomolgi* (GenBank XP_004223648.1), *P. gallinaceum* (GenBank AAC47461.1) (Figura 22), e observamos que os aminoácidos se mantêm conservados, sugerindo que todas as espécies de *Plasmodium* estudadas utilizam o mesmo mecanismo na invasão da glândula salivar.

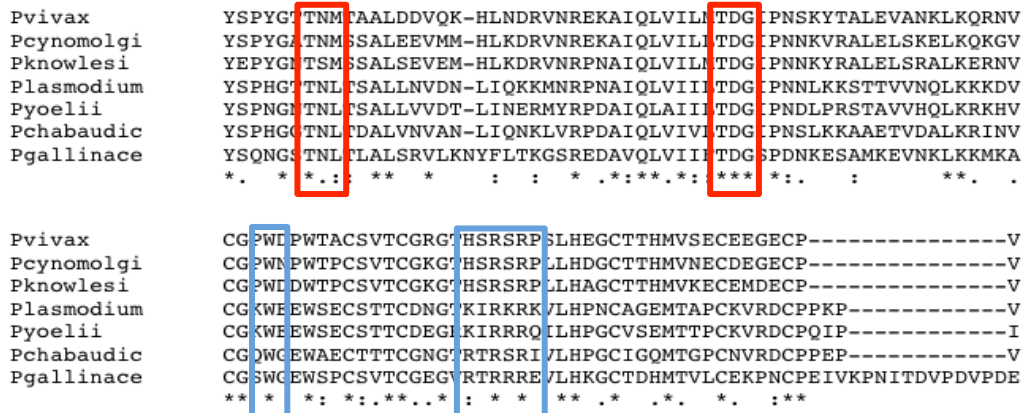


Figura 22 – Alinhamento da sequência de aminoácidos de diferentes espécies de *Plasmodium*: *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi*, *P. vivax*, *P. cynomolgi*, *P. knowlesi*, *P. gallinaceum*.

O *Plasmodium falciparum*, causador da forma mais grave da malária, teve sua origem no continente africano. Conway e colaboradores (2000) estudaram a origem do *P. falciparum*, através do estudo de polimorfismos de base única (SNPs) em sequência de DNA mitocondrial (mtDNA). Compararam a sequência completa do mtDNA de 6 isolados de diferentes localidades, e encontraram 4 SNPs entre estas sequências. Com primers específicos para a amplificação de sequências que continham esses SNPs, genotiparam 104 isolados, provenientes do continente

africano, do sudeste asiático e da América do Sul. Cinco haplótipos foram encontrados, sendo 3 na África, 1 na Malásia, e 2 no Brasil (um dos haplótipos encontrados no Brasil, é igual a um africano). O grupo mostrou que existe uma clara expansão do *P. falciparum* a partir da África, com haplótipos únicos no sudeste da Ásia e na América do Sul, relacionados aos haplótipos africanos por apenas uma mudança de nucleotídeo. O resultados indicaram que o *P. falciparum* teve origem na África, e posteriormente colonizou o sudeste da Ásia, e a América do Sul, separadamente. No ano de 2010, Prugnolle e colaboradores encontraram, em chimpanzés e gorilas selvagens provenientes do oeste africano, uma diversidade de espécies de *Plasmodium*. Dentre as espécies, *P. gaboni* e *P. reichenowi*, além de linhagens genéticas desconhecidas até então, de *Plasmodium* em gorilas selvagens, como a denominada GorA, que é próxima, mas estatisticamente diferente de *P. gaboni*, e a linhagem denominada GorB, que é semelhante ao *P. falciparum* e *P. reichenowi*. Esta similaridade grande entre *P. falciparum* e GorB, quase geneticamente idênticos, sugere fortemente que o *P. falciparum* possa ter se originado de gorilas africanos. Também identificaram *P. falciparum* em gorilas selvagens, levantando a hipótese de que gorilas podem ser reservatório desta espécie de *Plasmodium*, que é tão virulenta [Prugnolle e cols., 2010]. Tanabe e colaboradores (2010 e 2013), mostraram que a diversidade nucleotídica em isolados de *Plasmodium falciparum*, é alta em populações africanas, e que diminui conforme aumenta a distância geográfica em relação a África, corroborando com a teoria da origem africana desta espécie de parasita. Yalcidag e colaboradores (2012) também descreveram a população de *P. falciparum* africana como a mais geneticamente diversa, seguida pela população asiática, e por último a população da América do Sul.

Na América do Sul, a população de *P. falciparum* é subdividida em pelo menos 2 clusters principais, um ao norte, que inclui a região da Colômbia, e outro ao Sul, cobrindo regiões da Guiana Francesa, Brasil e Bolívia. A população da Venezuela e Peru é representada por uma região de transição entre estes 2 clusters. Estes clusters foram introduzidos de maneira independente durante o comércio transatlântico de escravos, onde indivíduos infectados, deixaram a África,

carregando o *Plasmodium falciparum* consigo, deixando seus vetores, *Anopheles gambiae*, *An. funestus* dentre outros, para encontrar novos vetores no continente americano (Yalcindag e cols., 2012).

Considerando que o *Plasmodium falciparum* teve que se adaptar ao novo ambiente do continente americano, há de se considerar fatores de seus 2 hospedeiros, o homem e o mosquito. No caso do homem, a princípio, o grande número de escravos trazidos, mais de 7 milhões foram trazidos para o Novo Mundo entre 1514-1866, deve ter mantido alta a diversidade genética da população do parasita. Posteriormente, com o uso de drogas no combate a malária, esta diversidade deve ter diminuído. Não há evidências da seleção do parasita em relação a diferentes grupos étnicos (Molina-Cruz e Barillas-Mury, 2014).

Em relação ao mosquito, como já foi discutido, o subgênero *Nyssorhynchus* divergiu do subgênero que deu origem ao *An. gambiae*, a aproximadamente 79 milhões de anos. Alguns dos principais vetores encontrados pelo *P. falciparum*, de acordo com a atual distribuição dos anofelinos na América do Sul, e levando-se em consideração os principais locais de desembarque dos negros, vindo como escravos da África, foram *An. darlingi*, *An. aquasalis* e *An. albitarsis*, todos pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus*, [Molina-Cruz e Barillas, 2014]. Logo, deve-se considerar que a adaptação aos novos vetores, foi fundamental para a sobrevivência do parasita.

Todos estes dados vem reforçar nossa teoria de que o *Anopheles darlingi* provavelmente se infecta bem por *Plasmodium falciparum* [Angêlla e cols., 2013], mas são maus transmissores do parasita, e que esta dificuldade de ser transmitido, pode ser devido a diferenças em receptores da glândula salivar. Uma vez que a espécie *P. falciparum* existe no Brasil a muito pouco tempo, desde a época do tráfico de escravos vindo da África entre 1514-1866, o processo de adaptação por seleção genética aos novos vetores provavelmente ainda está em curso.

A susceptibilidade de mosquitos do gênero *Anopheles* se infectarem por *Plasmodium*, é definida pela habilidade no mosquito em suportar a infecção pelo parasita como um todo, desde a formação do zigoto, até a produção de esporozoítos e infecção das glândulas salivares. Diferentes espécies de anofelinos, e diferentes

indivíduos de uma população, possuem susceptibilidade variável a infecção, podendo ser totalmente suscetíveis, totalmente resistentes, ou apresentar diferentes graus de susceptibilidade [Hume e cols, 2007]. Nesta linha de pensamento, há exemplos de seleção que ocorre naturalmente, em diferentes espécies de *Plasmodium*. No caso do *Plasmodium vivax*, há sucesso na infecção, levando-se em consideração a formação de oocistos e invasão das glândulas salivares, em *An. darlingi* e *An. deaneorum*. Já em *An. triannulatus* e *An. oswaldoi*, a taxa de infecção por esporozoítos e o número deles nas glândulas salivares, é muito baixa. Em *An. braziliensis* e *An. benarrochi*, apesar de haver formação de oocisto, nunca se observou esporozoítos em suas glândulas salivares [Klein e cols., 1991]. No caso de *Plasmodium falciparum*, isolados de diferentes localidades, possuem prevalência de infecção distintas – isolados de Papua Nova Guiné (Oceniania), produzem zero ou um número muito limitado de oocistos em *An. gambiae* e *An. stephensi*; isolados da África infectam muito bem ambas as espécies, embora a prevalência de infecção seja variável; isolados da Tailândia, sudeste asiático, são mais eficiente em infectar mosquitos da espécie *An. stephensi*, do que *An. gambiae* [Hume e cols., 2007]. Em populações de anofelinos da América Central, mais especificamente de Belize, susceptibilidades diferentes a infecção por *Plasmodium falciparum* NF54, oferecidos por alimentadores artificiais (“membrane feeders”) foram observadas por Grieco e colaboradores (2005). Mosquitos da espécie *An. darlingi*, apresentaram 41% das glândulas salivares dissecadas, positivas para *P. falciparum*. Em *An. vestitipennis*, apenas 9,3% das glândulas dissecadas eram positivas para o parasita, e em *An. albimanus*, nenhum indivíduo dissecado possuía esporozoíto em suas glândulas salivares, embora aproximadamente 20% dos indivíduos possuíssem infecção no intestino. Uma vez que a seleção dos parasitas por seus vetores ocorre na natureza, os mecanismos responsáveis por esta adaptação não estão esclarecidos até hoje. Este projeto trouxe uma nova possibilidade na explicação do *bottleneck* que seleciona tais parasitas, mostrando as especificidades na interação glândula salivar e parasita, através da interação TRAP x *saglin*.

Além da invasão da glândula salivar, o parasita deve vencer outra barreira para que consiga estabelecer infecção em anofelinos, a barreira do intestino. Assim como Ghosh e colaboradores (2009) mostraram que a invasão da glândula salivar é um processo específico, que envolve basicamente 2 proteínas, a *saglin* do *Anopheles* e a TRAP do *Plasmodium*, Vega-Rodríguez e colaboradores (2014), mostraram que a invasão do intestino do mosquito pelo estágio de oocineto do *Plasmodium*, também ocorre de forma específica, e que há o envolvimento de pelo menos 2 receptores. Neste trabalho, verificou-se que existem cepas de *P. berghei* que são resistentes e cepas que são sensíveis a invasão do intestino de *Anopheles gambiae*, na presença de SM1 (o mesmo peptídeo usado por Ghosh e cols., 2009). No intestino, o SM1 mimetiza a enolase, presente na superfície de oocinetos, que se liga a um receptor de ligação a enolase (EBP - *enolase binding protein*), fazendo com que cepas sensíveis consigam infectar o anofelino. Outro peptídeo, o segundo mais abundante, descrito em um estudo de phage-display prévio (Ghosh e cols., 2001), denominado MP2 (*Midgut Peptide 2*) se mostrou eficiente em inibir fortemente a invasão das cepas de *P. berghei*, que eram resistentes ao bloqueio por SM1, sugerindo que o MP2 se liga separadamente a outro receptor. Para a espécie *P. falciparum*, a invasão do intestino funciona da mesma maneira que para as cepas resistentes de *P. berghei*. Ambos os receptores relacionados a invasão do intestino do mosquito, foram descritos para o anofelino africano, *An. gambiae*, que como discutido anteriormente, se divergiu do subgênero *Nyssorhynchus*, do qual os vetores brasileiros fazem parte, há 79 milhões de anos. Assim como acontece com as sequências de SG1, em *An. darlingi* e *saglin* em *An. gambiae*, pode ser que essas interações no intestino funcionem como uma barreira ao desenvolvimento do *Plasmodium* em seu vetor.

Outro fator do vetor deve ser considerado para o desenvolvimento do parasita, é o sistema imune, para o qual o parasita da malária teve de desenvolver mecanismos de evasão, para poder se adaptar ao seu vetor. Quando as células do epitélio do intestino do mosquito são invadidas pelo parasita, reações de nitração são ativadas, diminuindo a sobrevivência do parasita. Isto ocorre porque há modificação no parasita, levando a lise pela proteína *thioester-containing protein 1* (TEP1), proteína esta que faz parte do sistema complemento do mosquito [Molina-

Cruz e cols., 2013]. Anofelinos da espécie *An. quadrimaculatus*, pertencentes ao complexo *An. gambiae*, nunca foram observados naturalmente infectados por parasitas na malária humana. O oocineto é frequentemente eliminado por lise ou melanização, processo controlado pelo sistema imune dos mosquitos. Quando há silenciamento de genes induzidas em resposta a infecção por *Plasmodium*, como o TEP1, LRIM1 e LRIM2, ocorre o aumento significativo na densidade de oocistos, e a completa inibição da melanização dos oocinetos [Habtewold e cols., 2008]. Na população de *P. falciparum*, diferentes linhagens diferem quanto a habilidade em infectar os anofelinos, por exemplo, uma linhagem brasileira de *P. falciparum*, isolado 7G8, é melanizada quando entra em contato com a linhagem *Anopheles gambiae* L3-5 refractory (R), mas isso não acontece com as linhagens africanas 3D7, NF54, e GB4. Porém quando proteínas do sistema imune são silenciadas, TEP1, LRIM1 e APL1, a melanização na linhagem brasileira é prevenida, e nenhum efeito é observado em infecção com NF54, sugerindo que o último é capaz de evadir a lise mediada por TEP1 [Molina-Cruz e cols., 2012]. Molina-Cruz e colaboradores (2013), identificaram o gene capaz de promover a infecção, através da modulação do sistema imune do hospedeiro, o Pfs47. Este gene é expresso em gametócitos femininos e esta presente na superfície de oocinetos. Quando este gene sofre *knockout*, parasitas da linhagem NF54, que se desenvolvem e infectam mosquitos da espécie *An. gambiae*, se desenvolvem e atravessam a parede do intestino, mas logo depois são eliminados por mosquitos resistentes (ocorre melanização em 99% dos parasitas). Este gene, Pfs47, previne a nitrificação do *Plasmodium*, após a invasão das células do epitélio intestinal, prevenindo a morte do parasita da lise por TEP-1 [Molina-Cruz e cols., 2013]. O Pfs47 é altamente polimórfico, com estruturação em populações de campo, sugerindo que esta estruturação ocorre para que os parasitas se adaptem aos seus vetores em regiões fora da África, um importante fator a se considerar na transmissão da malária.

O intestino médio de insetos vetores de doenças humanas contém não apenas os agentes patogênicos prejudiciais para a saúde humana, mas também uma microbiota diversificada. Gendrin e colaboradores (2014), demonstraram a importância da microbiota em relação ao *fitness* de mosquitos e a susceptibilidade a

infecção por *Plasmodium*. Após a alimentação sanguínea, há uma proliferação massiva de bactérias no intestino dos mosquitos. Se a alimentação for feita com sangue contendo doses terapêuticas de penicilina e estreptomicina, essa proliferação cai em 70%, 24 horas após a alimentação, e a composição bacteriana é completamente alterada. A presença de antibiótico ainda foi capaz de aumentar a prevalência, ou o número de mosquitos com presença de oocistos em *An. gambiae* infectados por *P. berghei* ou *P. falciparum*, assim como o número de oocistos por mosquito infectado também aumentou. O tratamento com antibiótico também influencia fatores relacionados a competência vetorial de anofelinos, uma vez que aumentou o número de fêmeas ovíparas, e o número de ovos por fêmea, ou seja, a fecundidade foi aumentada. A taxa de sobrevivência dos mosquitos também foi aumentada após a alimentação sanguínea com presença de antibiótico, aumentando as chances de transmissão do parasita a novos hospedeiros. Todos estes resultados, mostram a importância da microbiota na susceptibilidade a infecção por *Plasmodium*, e a capacidade em transmiti-lo. Cirimotich e colaboradores (2011), também mostraram um importante papel da microbiota no estabelecimento de infecção pelo *Plasmodium*. Identificaram uma espécie de bactéria, a *Enterobacter bacterium*, de isolados de populações de mosquitos da Zâmbia, que tornou os mosquitos quase completamente resistentes a infecção por *Plasmodium falciparum*, interferindo no desenvolvimento do parasita, antes que pudesse atravessar a parede do intestino. Esta capacidade de tornar o mosquito refratário a infecção, é independente da interação do mosquito com o parasita da malária. Outros estudos tem sido publicados mostrando o papel da microbiota no estabelecimento de infecção por *Plasmodium* em vetores anofelinos, mostrando uma relação negativa entre a microbiota e o desenvolvimento do *P. vivax* e *P. falciparum* em mosquitos [Smith e cols., 2014].

Todos esses mecanismos envolvidos no desenvolvimento do parasita em seu hospedeiro, se mostram complexos, e podem ser determinantes no desenvolvimento ou adaptação do parasita em seus vetores, e conseqüentemente, na transmissão da malária. O parasita deve vencer muitas barreiras antes de ser transmitido por seu vetor. Neste trabalho, mostramos as diferenças em receptores

de glândulas salivares, existentes entre o competente vetor africano *An. gambiae*, e o principal vetor de malária no Brasil, o *An. darlingi*.

Conclusões

Observamos que as sequências mais proximamente relacionadas a *saglin* de *Anopheles gambiae*, em *Anopheles darlingi*, possuem apenas 27% de similaridade (SG1 e SG1B) com a *saglin*. Esta baixa similaridade pode ser por causa do grande tempo de divergência entre estas duas espécies, que é de aproximadamente 79 milhões de anos.

As sequência traduzida dos genes SG1 e SG1B em *Anopheles darlingi*, possuem algumas alterações não sinônimas, que podem levar a alteração final da proteína.

O sequenciamento da TRAP de isolados brasileiros de *Plasmodium falciparum*, mostrou que os aminoácidos considerados chave na interação desta proteína com a *saglin*, se mantem conservados em isolados brasileiros.

Uma vez que a interação entre TRAP e *saglin* é descrita como fundamental na invasão das glândulas salivares de *Anopheles gambiae* por *Plasmodium falciparum*, nossa hipótese de que o principal vetor de malária no Brasil, o *An. darlingi*, se infecta bem por *Plasmodium falciparum* mas não consegue transmiti-lo, põe seu foco na grande diferença existente entre as glândulas salivares de *An. gambiae* e *An. darlingi*. Teoria também confirmada após termos descrito, pela primeira vez, qual a região da *saglin* que participa da interação com a TRAP. Mostramos que a sequência de *An. gambiae*, não encontra nenhuma similaridade com sequências de aminoácidos de *An. darlingi*, quando foram comparada ao banco de proteína no NCBI.

Referências Bibliográficas

AHKOURI R.R.; BHATTACHARYYA A.; PATNAIK P.; MALHOTRA P.; SHARMA A. Structural and functional dissection of the adhesive domains of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein (TRAP). **Biochem. J.** v. 379, p. 815–822, 2004.

ANGÊLLA A.F.; GIL L.H.S.; da SILVA L.H.P.; RIBOLLA P.E.M. Population Structure of the malária vector *Anopheles darlingi* in Rondônia, Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102(8), p. 953-958, 2007.

ANGÊLLA A. F.; SALGUEIRO P.; GIL L. H. S.; VICENTE J. L.; PINTO J.; RIBOLLA P. E. M. Seasonal genetic partitioning in the neotropical malária vector, *Anopheles darlingi*. **Malaria Journal**. v. 13, p. 1-10, 2014.

BRENNAN, J. D. G.; KENT, M.; DHAR, R.; FUJIOKA, H.; KUMAR, N. *Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. **PNAS**. v. 97, n. 25, p. 13859-13864, 2000.

CANTÍ C., NIETO-ROSTRO M., FOUCAULT I., HEBLICH F., WRATTEN J., RICHARDS M.W., HENDRICH J., DOUGLAS L., PAGE K.M., DAVIES A., DOLPHIN A.C. The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca²⁺ channels. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 102(32), p. 11230-5, 2005.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention: disponível em www.cdc.gov/malaria. Acesso em: 07 out. 2014

CIRIMOTICH C.M.; DONG Y.; CLAYTON A.M.; SANDIFORD S.L.; SOUZA-NETO J.A.; MULENGA M.; DIMOPOULOS G. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. **Science**. v.332(6031), p.855-858, 2011.

COHUET A., HARRIS C., ROBERT V., FONTENILLE D., Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector. **Trends in Parasitology**, v. 26(3), p. 130-136, 2010.

CONWAY D. J.; FANELLO C.; LLOYD J. M.; AL-JOUBORI B. M. A.-S; BALOCH A. H.; SOMANATH S. D.; ROPER C.; ODUOLA A. M. J.; MULDER B.; POVOA M. M.; SINGH B.; THOMAS A. W. Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 11, p. 163-171, 2000.

FERREIRA M. U.; FORONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. T. S. Plasmódios e a Malária. In: **Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana**. Barueri: Manole, 2003. p. 5-15.

GENDRIN M.; RODGERS F.H.; YERBANGA R.S.; OUÉDRAOGO J.B.; BASÁÑEZ M-G, COHUET A.; CHRISTOPHIDES G.K. Antibiotics in ingested human blood affect

the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. **Nat Commun.**, 2015. doi: 10.1038/ncomms6921.

GIRMA, J. P.; MEYER, D.; VERWEIJ, C. L.; PANNEKOEK, H.; SIXMA, J. J. Structure- function relationship of human von Willebrand factor. **Blood**. v. 70, n. 3, p. 605–611, 1987.

GHOSH, A. K.; DEVENPORT, M.; JETHWANEY, D.; KALUME, D. E.; PANDEY, A.; ANDERSON, V. E.; SULTAN, A. A.; KUMAR, N.; JACOBS-LORENA, M. Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the *Plasmodium* TRAP and the *Anopheles saglin* proteins. **PLoS Pathog**. v. 5, n. 1, p.1-13, 2009.

GHOSH, A. K.; JACOBS-LORENA, M. *Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. **Curr Opin Microbiol**. v. 12, n. 4, p. 394-400, 2009.

GHOSH, A. K.; RIBOLLA, P. E.; JACOBS-LORENA, M. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. **Proc Natl Acad Sci**. v. 98, n. 23, p.13278-13281, 2001.

GRIECO J.P.; ACHEE N.L.; ROBERTS D.R.; ANDRE R.G. Comparative susceptibility of three species of *Anopheles* from Belize, Central America, to *Plasmodium falciparum* (NF-54). **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 21(3), p. 279-290, 2005.

Habtewold T.; Povelones M.; Blagborough A.M.; Christophides G.K. Transmission Blocking Immunity in the Malaria Non-Vector Mosquito *Anopheles quadriannulatus* Species A. **PLOS Pathogens**, v. 4(5), 2008. doi: 10.1371/journal.ppat.1000070

HUME J.C.C.; TUNNICLIFF M.; RANFORD-CARTWRIGHT L.C. DAY K.P. Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**. v.6:139, p. 1-6, 2007

KAPPE, S.; BRUDERER, T.; GANTT, S.; FUJIOKA, H.; NUSSENWEIG, V.; MÉNARD, R. Conservation of a Gliding Motility and Cell Invasion Machinery in Apicomplexan Parasites. **The Journal of Cell Biology**. v. 147, n. 5, p. 937–943, 1999.

KAPPE, S. H.; BUSCAGLIA, C. A.; NUSSENZWEIG, V. *Plasmodium* sporozoite molecular biology. **Annu Rev Cell Dev Biol**. v. 20, p. 29-59, 2004.

KLEIN T.A.; LIMA J.B.; TADA M.S.; MILLER R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. **Am J Trop Med Hyg**. v. 45(4), p. 463-470, 1991.

LARKIN M.A.; BLACKSHIELDS G.; BROWN N.P.; CHENNA R.; McGETTIGAN P.A.; McWILLIAM H.; VALENTIN F.; WALLACE I.M.; WILM A.; LOPEZ R.;

THOMPSON J.D.; GIBSON T.J.; HIGGINS D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LAWLER, J.; HYNES, R. O. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. **J Cell Biol**. v. 103, n. 5, p. 1635–1648, 1986.

LIM, L.; MCFADDEN, G. I. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v. 365, n. 1541, p. 749-763, 2010.

MAYANARD J.A.; LINDQUIST N.C.; SUTHERLAND J.N.; LESUFFLEUR A.; WARRINGTON A.E.; RODRIGUEZ M.; OH S-H. Next generation SPR technology of membrane-bound proteins for ligand screening and biomarker discovery. **Biotechnol J**. v.4(11), p. 1542-1558, 2009.

MATUSCHEWSKI K.; NUNES, A. C.; NUSSENZWEIG, V.; MÉNARD, R. *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. **The EMBO Journal**. v. 21, n. 7, p. 1597-1606, 2002.

MOLINA-CRUZ A., BARILLAS-MURY C. The remarkable journey of adaptation of the *Plasmodium falciparum* malaria parasite to New World anopheline mosquitoes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109(5), p. 662-667, 2014.

MOLINA-CRUZ A.; DEJONG R.J.; ORTEGA C.; HAILE A.; ABBAN E.; RODRIGUES J.; JARAMILLO-GUTIERREZ G.; BARILLAS-MURY C. Some strains of *Plasmodium falciparum*, a human malaria parasite, evade the complement-like system of *Anopheles gambiae* mosquitoes. **PNAS**, v. 109(28):E1957-62. doi: 10.1073/pnas, 2012.

MORENO, M.; MARINOTTI, O.; KRZYWINSKI, J.; TADEI, W. P.; JAMES, A. A.; ACHEE, N. L.; CONN, J. E. Research Complete mtDNA genomes of *Anopheles darlingi* and an approach to anopheline divergence time. **Malar J**. v. 8, p. 14, 2010.

OKULATE, M. A.; KALUME, D. E.; KRISTIANSSEN, T.; BHATTACHARYYA, M.; CHAERKADY, R.; PANDEY, A.; KUMAR, N. Identification and Molecular Characterization of a novel proteins *Saglin* as a target of a monoclonal antibodies affecting salivary gland infectivity of *Plasmodium* sporozoites. **Insect Molecular Biology**. v. 16, n. 6, p. 711-722, 2007.

OLIVEIRA-FERREIRA J.; LACERDA M. V. G.; BRASIL P.; LADISLAU J. L. B.; TAUIL P. L.; DANIEL-RIBEIRO C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria J**. v. 9, p. 115, 2010.

PINA-COSTA A., BRASIL P., SANTI S.M.D., ARAÚJO M. P., SUÁREZ-MUTIS M. C., SAUTELLI A. C. F. S., OLIVEIRA-FERREIRA J., LOURENÇO-de-OLIVEIRA R.,

DANIEL-RIBEIRO C. T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic area. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109(5), p. 618-633, 2014.

PRUGNOLLE F.; DURANDA P.; NEEL C.; OLLOMO B.; AYALA F.J.; ARNATHAU C.; ETIENNE L.; MPOUDI-NGOLE E.; NKOGHE D.; LEROY E.; DELAPORTE E.; PEETERS M.; RENAUD F. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. **PNAS**. v. 107, n.4, p.1458-1463, 2010.

REGEV-RUDZKI N.; WILSON D. W.; CARVALHO T. G.; SISQUELLA X.; COLEMAN B. M.; RUG M.; BURSAC D.; ANGRISANO F.; GEE M.; HILL A. F.; BAUM J. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. **Cell**. v.153, p. 1120-1133, 2013.

ROSEMBERG, R. Inability of *Plasmodium knowlesi* sporozoites to invade *Anopheles freeborni* salivary glands. **Am J. Trop. Med. Hyg.** v. 34, n. 4, p. 687-691, 1985j

SAITOU N.; NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SINKA M.E.; RUBIO-PALIS Y.; MANGUIN S.; PATIL A.P.; TEMPERLEY W.H.; GETTING P.W.; BOECKEL T.V.; KABARIA C.W.; HARBACH R.E.; HAY S.I. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. **Parasites & Vectors**, v.3:72, 2010. (doi: 10.1186/1756-3305-3-72).

SMITH R.; VEGA-RODRIGUEZ J.; JACOBS-LORENA M. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109(5), p. 644-661, 2014.

SULTAN, A. A.; THATHY, V.; FREVERT, U.; ROBSON, K. J. H.; CRISANTI, A.; NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; MÉNARD, R. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. **Cell**. v. 90, n. 3, p. 511–522, 1997.

TANABE K.; MITA T.; JOMBART T.; ERIKSSON A.; HORIBE S.; PALACPAC N.; RANFORD-CARTWRIGHT L.; SAWAI H.; SAKIHAMA N.; OHMAE H.; NAKAMURA M.; FERREIRA M.U.; ESCALANTE A.A.; PRUGNOLLE F.; BJORKMAN A.; FARNERT A.; KANEKO A.; HORII T.; MANICA A.; KISHINO H.; BALLOUX F. *Plasmodium falciparum* Accompanied the Human Expansion out of Africa. **Current Biology**. v. 20, p. 1283–1289, 2010.

TANABE K.; JOMBART T.; HORIBE S.; PALACPAC N.M.Q; HONMA H.; TACHIBANA S.I.; NAKAMURA M.; HORII T.; KISHINO, H.; MITA T. *Plasmodium falciparum* mitochondrial genetic diversity exhibits isolation-by-distance patterns supporting a sub-Saharan African origin. **Mitochondrion**. v. 13, p. 630-636, 2013.

VEGA-RODRÍGUEZ J.; GHOSH A.; KANZOK S.M.; DINGLASAN R.R.; WANG S.; BONGIO N.J.; KALUMED.E; MIURA K.; LONG C.A.; PANDEY A.; JACOBS-LORENA M. Multiple pathways for *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. **PNAS**. v. 111(4), p. 492–500, 2014.

VLACHOU, D.; SCHLEGELMILCH, T.; RUNN, E.; MENDES, A.; KAFATOS, F. C. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. **Curr Opin Genet Dev**. v. 16, n. 4, p. 384-91, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO**: Malaria. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/malaria/en/>>. Acesso em: 28 out. 2013 e em julho de 2015.

World Malaria Report 2013 – Chapter: Country Profiles – World Health Organization, pag. 110

YALCIDAG E.; ELGUERO E.; ARNATHAU C.; DURAND P.; AKIANA J.; ANDERSON T. J.; AUBOUY A.; BALLOUX F.; BESNARD P.; BOUGREAU H.; CARNEVALE P.; D’ALESSANDRO U.; FONTENILLE D.; GAMBOA D.; JOMBART T.; LE MIRE J.; MAESTRE A.; MAYXAY M.; MÉNARD D.; MUSSET L.; NEWTON P. N.; NKOGHÉ D.; NOYA O.; OLLOMO B.; ROGIER C.; VERON V.; WIDE A.; ZAKERI S.; CARME B.; LEGRAND E.; CHEVILLON C.; AYALA F. J.; RENAUD F.; PRUGNOLLE F. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. **PNAS**. v. 109, n. 2, p. 511-516, 2012.

Anexos

Anexo 1

>gi|208657776|gb|EU934407.1| TSA: Anopheles darlingi AD-86 putative salivary protein SG1 mRNA, complete cds

ATGAACCAAGGAACCAGGAAAGCTCTGCTGTTACTACTACTGCTGGTGGTGGTGGACGG
TGCATGGTCCCACCCGGCTGAATCCGATCCGTTTACCGCGGATGACGGTCCGGTGTGTAC
GCTGCAGGTTGGCAACGGGCTACTGCAGCAACTCGGCACTCGGCTAACCCTCGCATCGTC
CTCCTCCTCCTCGGCGCTCGAATGCTCTACCGCCTGGACAACGCTACTGCTTCGGTTCAC
GAGACGCGCAAAAACCTCACCGACTGTGTGGAACGTGAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAA
ACCTCCGCCACCGACTTCTGTGAGCTGCTGCTCGATGACGTGCGACGTGAGATGCGCCAG
GAACGGCAGCGCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGTCTCCAGGCCATCCAGCTCGAGCTG
AACGGAGAAAAGGCCCGCTCGGTACAGCTGACGGCCGATGTCCGGTGCCGTACAGCAGGAG
CTAACCCGGTGTACCAGGAGCTCGTCCTCACCAACGTCCGGCATCGGTGATACGAAGCAA
GCGCACCGGTAATAACGCTACAACGAGCAGCAGCAGAAGGTGCAGCAAGAGAAGTTCG
CAGCAGAAAGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCACGTGATCGCGACCGTCTACCGGAAG
GCGGCACACGCACAGGAACGGGTAGGGTATCTGCTCGATTTTCGTGCGCCATCTCGGACCG
GACGCACCGGACCAGAAGCTGACGCTCTACCGGTTGCTGAAGGTGGAGCTGGATAAGCGC
AAGCCCGCCACACAACCCCAAACGCTCGTCATGGCGTTCGATGCGCTGAATGGGACGGCA
CCGGACCGTTCGACGGCCGATAGTCCACTGCACAAGCTTTACCTCGACACGTCCGGACCG
ATCGTGCGTGCCTGGCAGCAGCAGATCATCGCTGGCGAGTGGCGCACGGTCCGGGACTTT
GCCGAGCACTATCCGGACTACTATCAGCGCTGCTACCGGATGCTGCTGACCGTCGATGCG
ACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATCCTAGTGGTCAACACACTGCCCCGG
TCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTGTGGATTGATGCGCCGGTACGAACGG
CAGGATGCCGTACCGCTCGACCGGCTCAAGGTCTCGCCGCGCACACCGAAATCTTCGAA
ACGTTTCATCAAGAAGAAGGGCCTCGGGCAGGACGCCAGGACCGGCTGGCGAAGGTGAA
GGAGCTGTTCAAGGGCTTCAAACCGAACACCGACTACGGTTACTATCTGAAGGAGTTCCA
GAAGACCAAACCGAAGACGGGCTAA

Amarelo

F: ATGAACCAAGGAACCAGGAA

R: TCGGTTTGGTCTTCTGGAAC

Amplicon: 1.332pb

Rosa (forward para o reverse do amarelo)

F: TCGAGCTGAACGGAGAAAAG

Amplicon: 921 pb

Azul (reverse para o forward do amarelo)

R: GTGCTTCGTACAGCGATTGA

Amplicon: 636 pb

>gi|208657766|gb|EU934402.1| TSA: Anopheles darlingi AD-85 putative salivary protein SG1B mRNA, complete cds

ATGAACCAAGGAACCGGGAAAGCTCTGCTGTTACTACTACTGCTGGTGGTGGTGGACGGT
GCATGGTCCTACCCGGCTGAATCCGATCCGTTTACCGCGGATGACGGTCCGGTGTGTACG
CTGCAGGTTGGCAACGGGCTACTGCAGCAACTCGGCACTCGGCTAACCCCTCGCATCGTCC
TCCTCCTCCTCCTCGGCGCTCGAATGCTCTACCGCCTGGACAACGCTACTGCTTCGGTTCC
ACGAGACGCGCAAAAACCTCACCGACTGTGTGGAACGTGAGGAGCGCGCCCGGACCGATC
AAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGATGACGTACGGCGTCAGATGCGCC
AGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGTCTCCAGGCCATCCAGCTCGAGC
TGAACGGAGAAAAGGCCCGCTCGGTACAGCTGACGGCCGATGTCGGTGCCGTACAGCAGG
AGCTAACCCGGCTGTACCGGGAGCTCGTCCTCACCAACGTCGGCATCGGTGATACGAAGC
AAGCGCACCGGTAATAACACGCTACAACGAGCAGCAGCAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGG
AGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCACATGATCGCGACCGTCTACCGGA
AGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGCTCGATTTTCGTGCGCCATCTCGGAC
CGGACGCATCGGACCAGAAGCTGACCATCTACCGGTTACTGAAGGTGGAGCTGGATAAGC
GCACGCCCGCCTCACAACCCCAAACGCTCGTTATGGCGTTCGATGCGCTGAATGGGACGG
CACCGGACGCGTCGACGGCCGATAGTCCACTGCACAAGCTTTACCTCGACACGTCCGGAC
CGATCGTGCGCGCCTGGCAGCAGCAGATCATCGCTGGCGAGTGGCGCACGGTGCGGGACT
TTGCCGAGCACTATCCGGACTACTATCAGCGCTGCTACCGGATGCTGCTGACCGTCGATG
CGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATCCTAGTGGTTAACACGCTGCCCC
GGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTGTGGATTGATGCGCCGGTACGAAC
GGCAGGATGCCGTACCGCTCGACCGGCTCAAGGTGCTCGCCGCGCACACCGAAATCTTCG
AAACGTTTCATCAAGAAGAAGGTCTCGGGCAGGACGCACAGGACCGGCTGGCGAAGGTG
AAGGAGCTGTTCAAGGGCTTCAAACCGAACACCGACTACGGTACTACCTGAAGGAGTTC
CAGAAAACCAAACCGAAGACGGGCTAA

Amarelo

F: ATGAACCAAGGAACCGGGAA

R: TCGGTTTGGTTTTCTGGAAC

Amplicon: 1.336 pb

Anexo 2

Alinhamento das sequências de nucleotídeos geradas pelo sequenciamento das sequências de SG1 e SG1B de *An. darlingi* coletados de abril a novembro de 2011.

A11G041 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11R105 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGTGAGCTGCTGCTCGAT
C11R008 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G006R GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
C11R007 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
C11R006 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
C11R003 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
B11R010 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
B11R009 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
B11R004 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
B11R002 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
B11R001 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11R109 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11R106 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G058 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G057 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G053 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G052 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G051 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G045 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G043 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G003 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G001 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G002 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G005 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G055 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
B11R007 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11G046 GAGGAGCGGTCCCGGGCCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
B11R008 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11R107 GAGGAGCGCGCCCGGTCCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
B11R003 GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11R102F GAGGAGCGCGCCCGGACCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
A11R101 GAGGAGCGGTCCCGGGCCGATCAAACCTCCAGCACGGACTTCTGCGAGCTACTGCTCGAT
B11R005 GAGGAGCGCGCCCGGGCCGATCAAACCTCCGCCACCGACTTCTGCGAGCTGCTGCTCGAT
***** *****

A11G041 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11R105 GACGTGCGACGTTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
C11R008 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11G006R GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
C11R007 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
C11R006 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
C11R003 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
B11R010 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
B11R009 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
B11R004 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
B11R002 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
B11R001 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11R109 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11R106 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11G058 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11G057 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11G053 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11G052 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11G051 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11G045 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT
A11G043 GACGTACGGCGTCAGATGCGCCAGGAACGGCAGCGCCTAACCAGCGAATCCGACCAGCGT

B11R010 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
B11R009 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
B11R004 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
B11R002 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
B11R001 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11R109 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11R106 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G058 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G057 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G053 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G052 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G051 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G045 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G043 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G003 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G001 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G002 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G005 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G055 CAG-----CAGCAGTCCCAGGAGCAACAAAAAGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
B11R007 CAG-----CAGCAGTCCCAGGAGCAACAAAAAGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11G046 CAGAAGAAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAAGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCG
B11R008 CAGAAGGAGCAGCAGTCCCAGGAGCAGCAGAAGGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11R107 CAGCAGAAGGAGCAG---CAGCAGCAGCAGAAAGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAATCG
B11R003 CAGCAGAAGGAGCAAGAGAAGTCGCAGCAGAAAGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCG
A11R102F CAGC-----AACAAAGAGAAGTCGCAGCAGAAAGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
A11R101 CAGC-----AACAAAGAGAAGTCGCAGCAGAAAGCGAACCTTCAATCCCTGTACGAAGCA
B11R005 CAGC-----AACAAAGAGAAGTCGCAGCAGAAAGCGAACCTTCAATCGCTGTACGAAGCA
*** * ** ** *** ** * ***** * ***** *

A11G041 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGGAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11R105 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGGAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
C11R008 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G006R CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
C11R007 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
C11R006 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
C11R003 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
B11R010 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
B11R009 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
B11R004 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
B11R002 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
B11R001 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11R109 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11R106 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G058 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G057 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G053 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G052 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G051 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G045 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G043 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G003 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G001 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G002 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G005 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGGAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G055 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGGAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
B11R007 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGGAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11G046 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
B11R008 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11R107 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGACAGGAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
B11R003 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGCAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11R102F CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCATACGTGCAGGAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
A11R101 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGACAGGAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
B11R005 CTGATCGCGACCGTCTACCGGAAGGCGGCACACGCGCAGGAACGGGTAGGGTATCTGTCTC
***** ** ** * ***** ** *****

A11G057 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G053 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G052 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G051 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G045 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G043 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G003 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G001 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G002 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G005 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G055 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
B11R007 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11G046 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
B11R008 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGCAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11R107 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGCAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
B11R003 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGCAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11R102F CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
A11R101 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGCAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC
B11R005 CGGATGCTGCTGACCGTCGATGCGACCGTCTGGCGGAAGCTCGACTTTAGCAAGTACATC

A11G041 CTAGTGGTCAACACACTGCCCGGTCCACGTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11R105 CTAGTGGTCAACACACTGCCCGGTCCACGTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
C11R008 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G06R CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
C11R007 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
C11R006 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
C11R003 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
B11R010 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
B11R009 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
B11R004 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
B11R002 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11R001 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11R109 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11R106 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G058 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G057 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G053 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G052 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G051 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G045 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G043 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G003 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G001 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G002 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G005 CTAGTGGTAAACACACTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G055 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
B11R007 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11G046 CTAGTGGTAAACACGCTGCCCGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
B11R008 CTAGTGGTCAACACACTGCCCGGTCCACGTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11R107 CTAGTGGTCAACACGCTGCCCGGTCCACGTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
B11R003 CTAGTGGTCAACACACTGCCCGGTCCACGTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11R102F CTAGTGGTAAACACGCTGCCCTGGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
A11R101 CTAGTGGTCAACACACTGCCCGGTCCACGTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG
B11R005 CTAGTGGTAAACACGCTACCCCGTCAACCTTCCGGATGGAAGCGTTCGAGTTGGTG

Anexo 3

Alinhamento das sequencias de aminoácidos traduzidas da sequencia de nucleotídeos geradas pelo sequenciamento das sequências de SG1 e SG1B de *An. darlingi* coletados de abril a novembro de 2011.

```
A11G041_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11R105_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G001_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G002_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G003_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
C11R008_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G006R_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
C11R007_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
C11R006_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
C11R003_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
B11R010_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
B11R009_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
B11R004_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
B11R002_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
B11R001_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11R109_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11R106_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G058_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G057_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G053_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G052_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G051_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G045_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G043_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G005_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
B11R008_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11G055_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLAG
B11R007_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLAG
A11G046_1 EERSRADQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLAG
A11R107_1 EERARSDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLTA
A11R101_1 EERSRADQTSSTDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLAG
B11R005_1 EERARADQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLAG
A11R102F_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLAS
B11R003_1 EERARTDQTSATDFCELLLDDVRRQMRQERQRLTSESDQLQAIQLELNGEKARSVQLAS
***.*.***.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:..

A11G041_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKVQQEKSSQQKANLQSLYEA
A11R105_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKVQQEKSSQQKANLQSLYEA
A11G001_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
A11G002_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
A11G003_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
C11R008_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
A11G006R_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
C11R007_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
C11R006_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
C11R003_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
B11R010_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
B11R009_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
B11R004_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
B11R002_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
B11R001_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
A11R109_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
A11R106_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
A11G058_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
A11G057_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
A11G053_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
A11G052_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
A11G051_1 DVGAVQQELTRLYRELVL TNVIGIDTKQAHRYRYRYNEQQQKEQQSQQEQQKANLQSLYEA
```


A11R109_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11R106_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11G058_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11G057_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11G053_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11G052_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11G051_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11G045_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11G043_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11G005_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
B11R008_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIVAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11G055_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
B11R007_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11G046_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11R107_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIVAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11R101_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
B11R005_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
A11R102F_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
B11R003_1 FDALNGTAPDASTADSPLHKLYLDTSGPIVRAWQQQIIAGEWRTVRDFAEHYPDYYQRCY
*****:*****:*****

A11G041_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11R105_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G001_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G002_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G003_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
C11R008_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G006R_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
C11R007_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
C11R006_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
C11R003_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
B11R010_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
B11R009_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
B11R004_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
B11R002_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
B11R001_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11R109_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11R106_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G058_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G057_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G053_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G052_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G051_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G045_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G043_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G005_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
B11R008_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G055_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
B11R007_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11G046_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11R107_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11R101_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
B11R005_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
A11R102F_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
B11R003_1 RMLLTVDATVWRKLDfskyILVVNTLPRSTFRMEAFELV
*****:***** *****

Anexo 4 – Regiões onde foram desenhados os primers que amplificaram as sequências da TRAP, domínio-A e TSR de *Plasmodium falciparum*.

***Plasmodium falciparum* partial trap gene, isolate BK3-17**
GenBank: AJ581767.1

1 ATGAATCATCTTGGGAATGTTAAATATTTAGTCATTGTGTTTTGATTTTCTTGATTTG
61 TTTCTAGTTAATGGTAGAGATGTGCAAAACAATATAGTGGATGAAATAAAATATCGTGAA
121 GAAGTATGTAATGATGAGGTAGATCTTTACCTTCTAATGGATTGTTCTGGAAGTATACGT
181 CGTCATAATTGGGTGAAGCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAAT
241 CTTAATGAAAATGCAATTCACCTTATATGTTAATATTTTTTCAAACAATGCAAGGGAAATT
301 ATTAGATTACATAGTGATGCATCTAAAAACAAAGAGAAGGCTTTATTTATTATAAAGTCA
361 CTCTTAAGTACAAATCTCCATATGGTAGAACAACTTAACTGATGCACTGTTACAAGTA
421 AGAAAACATTTAAATGACCGAATCAATAGAGAGAATGCTAGTCAATTAGTTGTTATATTA
481 ACAGATGGAATTCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGAT
541 CTTGGTGTAAAATAGCTGTTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGA
601 TTTCTTGTAGGTTGTCATCCATCAGATGGTAAATGTAAGTGTATACTGATTCTGCATGG
661 GAAAATGTAAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAA
721 ACAGCAAGTTGTG**GTGTTTGGGACGAATGGTCT**CCATGTAGTGTAAGTGTGGTAAAGGT
781.ACCAGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAGTGAATTACAAGAACAA
841 TGTGAAGAAGAAAGATGTC**CT(CCAAAACGGGAACCTTAGA)**TG**TTCCACATGAACCCGAA**
901 **GAT**GATCAACCTAGACCAAGAGGAGATAATTTTGTGTCGAAAAACCAAAAGAAAATATA
961 ATAGATAATAATCCACAAGAACCTTCACCAAATC

Sublinhado (PRIMER 1)

primer F: 5'-AATGGTAGAGATGTGCAAAACAA-3' (TRAP-A1345 F)

primer R: 5'-AGACCATTCGTCCCAAACAC-3' (TRAP-A12 R)

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	70	23	58.69	34.78	4.00	0.00	AATGGTAGAGATGTGCAAAACAA
RIGHT PRIMER	753	20	59.83	50.00	5.00	0.00	AGACCATTCGTCCCAAACAC

SEQUENCE SIZE: 994
INCLUDED REGION SIZE: 994

PRODUCT SIZE: 684, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 0.00
TARGETS (start, len)*: 160,436

Verde (PRIMER 2)

primer F: 5'-TGAATCATCTTGGGAATGTAAA-3' (TRAP-A2 F)

primer R: 5'-AGACCATTCGTCCCAAACAC-3' (TRAP-A12 R)

4 LEFT PRIMER	2	23	58.48	30.43	5.00	3.00	TGAATCATCTTGGGAATGTAAA
RIGHT PRIMER	753	20	59.83	50.00	5.00	0.00	AGACCATTCGTCCCAAACAC

PRODUCT SIZE: 752, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

Laranja (PRIMER 3)

primer f: 5'-AATGGTAGAGATGTGCAAAACAA-3' (TRAP-A1345 F)

primer r: 5'-ATCTTCGGGTTTCATGTGGAA-3' (TRAP-A3 R)

3 LEFT PRIMER	70	23	58.69	34.78	4.00	0.00	AATGGTAGAGATGTGCAAAACAA
RIGHT PRIMER	903	20	60.32	45.00	4.00	2.00	ATCTTCGGGTTTCATGTGGAA

PRODUCT SIZE: 834, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

Azul (PRIMER 4)

primer f: 5'-AATGGTAGAGATGTGCAAAACAA-3' (TRAP-A1345 F)

primer r: 5'-TAATGGTTCCCGTTTTGGAG-3' (TRAP-A4 R)

1 LEFT PRIMER	70	23	58.69	34.78	4.00	0.00	AATGGTAGAGATGTGCAAAACAA
RIGHT PRIMER	879	20	59.79	45.00	3.00	0.00	TAATGGTTCCCGTTTTGGAG

PRODUCT SIZE: 810, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

(PRIMER 5)

Primer F: 5'-AATGGTAGAGATGTGCAAAACAA-3' (TRAP-A1345 F)

Primer R: 5'-TCT AAT GGT TCC CGT TTT GG-3' ENTRE ()

2 LEFT PRIMER	70	23	58.69	34.78	4.00	0.00	AATGGTAGAGATGTGCAAAACAA
RIGHT PRIMER	881	20	59.79	45.00	3.00	0.00	TCTAATGGTTCCCGTTTTGG

PRODUCT SIZE: 812, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

Anexo 5- Alinhamento das sequencias de nucleotídeos da proteína TRAP, domínios A e TSR, em diferentes espécies de *Plasmodium*.

Pf9-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf44-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf84-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf87-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf94-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf1-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf7-A2 CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf99-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf100-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf98-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf39-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf38-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf34-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf17-A2 CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf17-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf13-A CATAATTGGGTGAACCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf17V50 CATAATTGGGTGAAGCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf20ERM CATAATTGGGTGAAGCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf51JMJ CATAATTGGGTGAAGCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf19VGP CATAATTGGGTGAAGCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf22VDB CATAATTGGGTGAAGCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf38CS CATAATTGGGTGAAGCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf90-A CATAATTGGGTGAAGCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT
 Pf344 CATAATTGGGTGAAGCATGCAGTACCTCTAGCTATGAAATTGATACAACAATTAATCTT

Pf9-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf44-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf84-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf87-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf94-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf1-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf7-A2 AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf99-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf100-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf98-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf39-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf38-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf34-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf17-A2 AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf17-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf13-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf17V50 AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf20ERM AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf51JMJ AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf19VGP AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf22VDB AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf38CS AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf90-A AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT
 Pf344 AATGAAAATGCAATTCACCTTATATGCTAATATTTTTTCAAACAATGCAAAAAGAAATTATT

Pf9-A AGATTACATAGTGATGCATCTAAAAACAAAGAGAAGGCTTTAATTATTATAAAGTCACTC
 Pf44-A AGATTACATAGTGATGCATCTAAAAACAAAGAGAAGGCTTTAATTATTATAAAGTCACTC
 Pf84-A AGATTACATAGTGATGCATCTAAAAACAAAGAGAAGGCTTTAATTATTATAAAGTCACTC
 Pf87-A AGATTACATAGTGATGCATCTAAAAACAAAGAGAAGGCTTTAATTATTATAAAGTCACTC
 Pf94-A AGATTACATAGTGATGCATCTAAAAACAAAGAGAAGGCTTTAATTATTATAAAGTCACTC
 Pf1-A AGATTACATAGTGATGCATCTAAAAACAAAGAGAAGGCTTTAATTATTATAAAGTCACTC
 Pf7-A2 AGATTACATAGTGATGCATCTAAAAACAAAGAGAAGGCTTTAATTATTATAAAGTCACTC
 Pf99-A AGATTACATAGTGATGCATCTAAAAACAAAGAGAAGGCTTTAATTATTATAAAGTCACTC

Pf38CS AAACATTTAAATGACCGAATCAATAGAGAGAATGCTAATCAATTAGTTGTTATATTAACA
Pf90-A AAACATTTAAATGACCGAATCAATAGAGAGAATGCTAATCAATTAGTTGTTATATTAACA
Pf344 AAACATTTAAATGACCGAATCAATAGAGAGAATGCTAATCAATTAGTTGTTATATTAACA

Pf9-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf44-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf84-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf87-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf94-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf1-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf7-A2 GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf99-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf100-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf98-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf39-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf38-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf34-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf17-A2 GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf17-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf13-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf17V50 GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf20ERM GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf51JMJ GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf19VGP GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf22VDB GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf38CS GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf90-A GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT
Pf344 GATGGAATCCAGATAGTATTCAAGATTCATTAAGAATCAAGAAAATTAATGATCGT

Pf9-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf44-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf84-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf87-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf94-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf1-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf7-A2 GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf99-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf100-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf98-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf39-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf38-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf34-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf17-A2 GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf17-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf13-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf17V50 GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf20ERM GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf51JMJ GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf19VGP GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf22VDB GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf38CS GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf90-A GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT
Pf344 GGTGTTAAAATAGCTGTTTTGGTATTGGACAAGGTATTAATGTAGCTTTCAACAGATTT

Pf9-A CTTGTAGGTTGTCATCCATCAGATGGTAAATGTAACCTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf44-A CTTGTAGGTTGTCATCCATCAGATGGTAAATGTAACCTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf84-A CTTGTAGGTTGTCATCCATCAGATGGTAAATGTAACCTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf87-A CTTGTAGGTTGTCATCCATCAGATGGTAAATGTAACCTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf94-A CTTGTAGGTTGTCATCCATCAGATGGTAAATGTAACCTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf1-A CTTGTAGGTTGTCATCCATCAGATGGTAAATGTAACCTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf7-A2 CTTGTAGGTTGTCATCCATCAGATGGTAAATGTAACCTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf99-A CTTGTAGGTTGTCATCCATCAGATGGTAAATGTAACCTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA

Pf100-A CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf98-A CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
PF39-A CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf38-A CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf34-A CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf17-A2 CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf17-A CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf13-A CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf17V50 CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf20ERM CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf51JMJ CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf19VGP CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf22VDB CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf38CS CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf90-A CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA
Pf344 CTTGTAGGTTGT CATCCATCAGATGGTAAATGTAAC TTGTATGCTGATTCTGCATGGGAA

Pf9-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGTCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf44-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGTCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf84-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGTCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
PF87-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGTCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf94-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGTCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf1-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf7-A2 AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf99-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf100-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf98-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
PF39-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf38-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf34-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf17-A2 AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf17-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf13-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf17V50 AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGTCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf20ERM AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGTCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf51JMJ AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGTCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf19VGP AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf22VDB AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf38CS AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf90-A AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA
Pf344 AATGTA AAAAATGTTATCGGACCCTTTATGAAGGCTGTTTGTGTTGAAGTAGAAAAAACA

Pf9-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf44-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf84-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
PF87-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf94-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf1-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf7-A2 GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf99-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf100-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf98-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
PF39-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf38-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf34-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf17-A2 GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf17-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf13-A GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf17V50 GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf20ERM GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf51JMJ GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf19VGP GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC
Pf22VDB GCAAGTTGTGGTGT TTTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAAC TTGTGGTAAAGGTACC

Pf38CS	GCAAGTTGTGGTGTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAACCTTGTGGTAAAGGTACC
Pf90-A	GCAAGTTGTGGTGTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAACCTTGTGGTAAAGGTACC
Pf344	GCAAGTTGTGGTGTGGGACGAATGGTCTCCATGTAGTGTAACCTTGTGGTAAAGGTACC

Pf9-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf44-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf84-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf87-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf94-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf1-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf7-A2	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf99-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf100-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf98-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf39-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf38-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf34-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf17-A2	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf17-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf13-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf17V50	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf20ERM	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf51JMJ	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf19VGP	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf22VDB	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf38CS	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf90-A	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG
Pf344	AGGTCAAGAAAAAGAGAAATCTTACACGAAGGATGTACAAG

Anexo 5 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína TRAP, domínios A e TSR, em diferentes espécies de *Plasmodium*.

Pf9-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf44-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf84-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf87-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf94-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf1-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf7-A2_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf99-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf100-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf98-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf39-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf38-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf34-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf17-A2_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf17-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf13-A_1 HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf17V50_1 HNWVKHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf20ERM_1 HNWVKHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf51JMJ_1 HNWVKHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf19VGP_1 HNWVKHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf22VDB_1 HNWVKHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf38CS_1 HNWVKHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf90-A_1 HNWVKHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL
 Pf344_1 HNWVKHAVPLAMKLIQQLNLENENAIHLYANIFSNNAKEIIRLHSDASKNKEKALIIKSL

Pf9-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf44-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf84-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf87-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf94-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf1-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf7-A2_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf99-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf100-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf98-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf39-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf38-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf34-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf17-A2_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf17-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf13-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf17V50_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf20ERM_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf51JMJ_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf19VGP_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf22VDB_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf38CS_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf90-A_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR
 Pf344_1 LSTNLPYGRTNLSDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDR

Pf9-A_1 GVKIAVFGIGQGINAVAFNRFLVGCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKSVCVEVEKT
 Pf44-A_1 GVKIAVFGIGQGINAVAFNRFLVGCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKSVCVEVEKT
 Pf84-A_1 GVKIAVFGIGQGINAVAFNRFLVGCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKSVCVEVEKT
 Pf87-A_1 GVKIAVFGIGQGINAVAFNRFLVGCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKSVCVEVEKT
 Pf94-A_1 GVKIAVFGIGQGINAVAFNRFLVGCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKSVCVEVEKT
 Pf1-A_1 GVKIAVFGIGQGINAVAFNRFLVGCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf7-A2_1 GVKIAVFGIGQGINAVAFNRFLVGCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf99-A_1 GVKIAVFGIGQGINAVAFNRFLVGCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT

Pf100-A_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf98-A_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf39-A_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf38-A_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf34-A_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf17-A2_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf17-A_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf13-A_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf17V50_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKSVCVEVEKT
 Pf20ERM_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKSVCVEVEKT
 Pf51JMJ_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKSVCVEVEKT
 Pf19VGP_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf22VDB_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf38CS_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf90-A_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 Pf344_1 GVKIAVFGIGQGINVAFNRFLVGCCHPSDGGKCNLYADSAWENVKNVIGPFMKAVCVEVEKT
 *****:*****

Pf9-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf44-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf84-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf87-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf94-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf1-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf7-A2_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf99-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf100-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf98-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf39-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf38-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf34-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf17-A2_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf17-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf13-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf17V50_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf20ERM_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf51JMJ_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf19VGP_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf22VDB_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf38CS_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf90-A_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX
 Pf344_1 ASCGVWDEWSPCSVTGKGRSRKREILHEGCTX

Anexo 6

2x Lysis Buffer (pH 8.0)

0.1M	sodium phosphate monobasic
1.0 M	Sodium chloride
10 mM	Imidazole
10% (v/v)	glycerol
0.5 mM	TCEP
1x	Protease inhibitor
0.4ul/ml	Benzonase nuclease

Affinity Loading Buffer (pH 8.0)

0.05 M	sodium phosphate monobasic
0.5 M	Sodium Chloride
50 mM	Imidazole
5% (v/v)	Glycerol
0.5 mM	TCEP

His-Fusion Wash Buffer (pH 8.0)

0.1 M	Sodium phosphate monobasic
1.0 M	Sodium Chloride
50 mM	Imidazole
5% (v/v)	Glycerol
2% (v/v)	Triton-X 100
0.5 mM	TCEP

His-Fusion Elution Buffer (pH 8.0)

0.05 M	Sodium phosphate
0.5 M	Sodium Chloride
250 mM	Imidazole
5% (v/v)	Glycerol
0.5 mM	TCEP

GST-Fusion Wash Buffer (pH 8.0)	
50 mM	Tris-HCl
500 mM	Sodium chloride
5% (v/v)	Glycerol
0.5 mM	TCEP
1x	Protease inhibitor
GST-Fusion Elution Buffer (pH 8.0)	
50 mM	Tris-HCl
500 mM	Sodium chloride
5% (v/v)	Glycerol
9 mg/ml	L-glutathione
0.5 mM	TCEP
1x	Protease inhibitor

Tabela 1 – Tampões utilizados na purificação das proteínas – *saglin* recombinante e TRAP-A recombinante.