



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas**

LUIZ CARLOS GEBRIM DE PAULA COSTA

**Caracterização genotípica e fenotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de
galinhas caipiras criadas de forma extensiva no município de Uberlândia- MG**

UBERLÂNDIA - MG

2016

LUIZ CARLOS GEBRIM DE PAULA COSTA

Caracterização genotípica e fenotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras criadas de forma extensiva no município de Uberlândia- MG

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

UBERLÂNDIA - MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837c
2016 Costa, Luiz Carlos Gebrim de Paula, 1977-
Caracterização genotípica e fenotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras criadas de forma extensiva no município de Uberlândia- MG / Luiz Carlos Gebrim de Paula Costa. - 2016.
96 p. : il.

Orientador: José Roberto Mineo.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. - Teses. 4. - Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Nessun Dorma

Nessun dorma! nessun dorma!

Tu pure, o, principessa,

Nella tua fredda stanza,

Guardi le stelle

Che fremono d'amore

E di speranza.

Ma il mio mistero e chiuso in me,

Il nome mio nessun saprà!

No, no, sulla tua bocca lo dirò

Quando la luce splenderà!

Ed il mio bacio scioglierà il silenzio

Che ti fa mia!

(il nome suo nessun saprà!...

E noi dovrem, ahime, morir!)

Dilegua, o notte!

Tramontate, stelle!

Tramontate, stelle!

All'alba vincerò!

Vincerò, vincerò!

Giacomo Puccini

In memoriam

LUIZ CARLOS DE PAULA COSTA

★23/08/1945

†30/11/2015

“O que tem começo, tem fim.”

Nicolau Maquiavel

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais

Luiz Carlos de Paula Costa e Sandra Gebrim de Paula Costa;

À minha esposa

Leiliane Bernardes Gebrim;

Ao meu orientador

Prof. Dr. José Roberto Mineo

A minha família

Luzia (avó)

Camila (irmã)

Pop Up e Winnicott (animais de estimação)

Líbia, Marcia, Daniel, Tânia, Eliane (Tios)

Ionei (Sogra)

Rone, Livia e João (Cunhados)

Primos...

Amizades construídas durante o doutorado

Silas, Heber, Vinícius, Cristina, Zilda, Marley, Kleber, Patrício e Ana Cláudia

Amigos de longa data

*Jean, Luiz Fernando, Lourenço, Miguel, Fernando, Emerson, Pedro Henrique, Heron,
André, Tatiana, Lia Raquel, Adriana, Fernando Hulman....*

Aos professores membros da banca examinadora

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara – ICB/UFMG

Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior – UNIUBE

Prof. Dr. Siomar de Castro Soares – ICBN/UFTM

Prof. Dr. Jean Ezequiel Limongi – IG/UFU

Aos professores

Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo e Dr Carlos Ueira Vieira

Aos colaboradores

*Silas, Mylla, Patrício, Kleber, Patrícia Tiemme, Patrícia Soares, Fernando, Heber e
Vinícius.*

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia

Flávia, Eliézer, Miguel, Vanessa, Mylla, Maraísa, Tamires, Carolina...

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia

Ana Cláudia, Zilda, Márley e Max

Aos técnicos e funcionários do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal

(CBEA)

Taísa, Junão, Murilo, Fabiano, Marcelo, Fátima e Luciene

**Aos professores e colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas**

Às agências brasileiras financiadoras de pesquisa

CAPES, CNPq e FAPEMIG

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

**Aos professores e Técnicos da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de
Uberlândia**

Mario Paulo, Reginaldo, Sebastião, Deise, Noriel, Cintia, Leonice, Ralciane...

Aos meus alunos do Curso de Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde

RESUMO

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, doença com ampla distribuição mundial, principalmente no Brasil. A patogenia desta doença envolve alterações oculares, malformações fetais, hidrocefalia e neuropatias, porém na maioria das vezes não há manifestações clínicas nos indivíduos infectados. Este protozoário apresenta linhagens clonais (I, II e III) e recombinantes que diferem entre si principalmente pelas propriedades de virulência. As cepas recombinantes são encontradas preferencialmente em países de clima quente e úmido, como América do Sul e África. As linhagens de *T. gondii* brasileiras isoladas de animais domésticos e de amostras clínicas são designadas como tipo BrI a BrIV, sendo que a BrI é mais frequente em pacientes com toxoplasmose ocular. Uma das principais formas de infecção é por meio da ingestão de oocistos que contaminam alimentos, água e o solo e, por causa disto, a utilização de sentinelas de contaminação ambiental e dispersão, como as galinhas criadas de forma extensiva, têm sido utilizadas devido ao fato delas se alimentarem no solo. Desta forma, realizamos um levantamento sorológico de *T. gondii* em galinhas criadas de forma extensiva no Município de Uberlândia; isolamos e caracterizamos a virulência das novas cepas de *T. gondii* obtidas e caracterizamos geneticamente uma nova cepa. O nosso levantamento sorológico identificou uma porcentagem de 89,91 % de positividade nas 216 amostras avaliadas. Destas amostras conseguimos isolar três novas cepas (TgChBrUD3, TgChBrUD4 e TgChBrUD5) que apresentaram diferenças na virulência em camundongos BALB/c. As cepas TgChBrUD3 e TgChBrUD5 apresentaram alta virulência enquanto que na TgChBrUD4 nenhuma morte ou sinal de morbidade foi observado. Foi realizado um estudo de genotipagem com as cepas TgChBrUD1 e TgChBrUD5 avaliando o polimorfismo de sequências de microssatélites e dos genes SAG1, GRA6, GRA7, PK1 e ROP18, que indicou que a cepa TgChBrUD5 é resultante de recombinações gênicas entre as cepas do Tipo I, II e III, porém mais relacionadas com o tipo clonal I ou BrI. A alta virulência deste isolado pode ser explicada pelo perfil Th2 da resposta induzido permitindo a disseminação do parasito nos hospedeiros e possivelmente pela maior expressão da ROP 18, um dos principais fatores envolvidos na virulência. Nossos resultados revelaram uma diversidade de genótipos de *T. gondii* circulando no ambiente urbano e a utilização dos marcadores SAG1, PK1, GRA6, GRA7 e ROP18 são candidatos fortes para a caracterização gênica de novas cepas isoladas.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, cepas recombinantes, SAG1, GRA6, GRA7, PK1, ROP18, virulência e genotipagem.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an ubiquitous parasite of animals and humans. We report here the isolation and genotyping of a new *T. gondii* strains from free-range chicken in Uberlândia, Brazil. The parasite showed new atypical genotypes when compared with the clonal lineages (I, II and III). The virulence of this isolate, named TgChBrUD5 was tested using BALB/c mice in order to observe the mortality during the period of 30 days. All infected mice with 10^3 parasites died after 14th days post-infection. TgChBRUD5 genotyping was performed using the single nucleotide polymorphism (SNP) by use of 7 microsatellite loci and 5 gene markers (GRA6, GRA7, SAG1, PK1 and ROP18 sequences). The comparison of microsatellite sequences and SNP indicate that TgChBRUD5 are resultant of combinations of Type I, II and III strains, but more related to the type clonal I or recombinant BrI. The genomic characterization of *T. gondii* isolates based on SNPs constitutes a useful tool to determine the virulence degrees of the parasite population, as mirror of its epidemiology and pathogenicity.

Key words: *Toxoplasma gondii*, recombinants strains, SAG1, GRA6, GRA7, PK1, ROP18, virulence and genotyping.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Aspectos biológicos e ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.1.1	Taquizoítos	12
1.1.2	Bradizoítos	13
1.1.3	Esporozoítos	13
1.2	Descoberta e descrição do <i>T. gondii</i>	14
1.3.	Ciclo de vida do <i>T. gondii</i>	15
1.4	Cepas e genoma do <i>T. gondii</i>	17
1.5	Patogenia e manifestações clínicas da toxoplasmose	18
1.6	Resposta imune e inflamatória da toxoplasmose em humanos	19
1.7	Epidemiologia e transmissão da toxoplasmose em humanos	20
1.8	Detecção do <i>T. gondii</i> em amostras ambientais	21
1.9	Diagnóstico clínico da toxoplasmose em humanos	21
2	OBJETIVOS	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Aspectos éticos da pesquisa e animais de experimentação	25
3.2	Coleta das amostras de soros de galinhas criadas de forma extensiva em diversos pontos do município de Uberlândia.	25
3.3	Parasitas e antígenos	25
3.4	Testes sorológicos	26
3.5	Isolamento das cepas de <i>T. gondii</i>	27
3.6	Determinação da virulência das cepas de <i>T. gondii</i>	28
3.7	Quantificação do DNA das amostras	28
3.8	Sequenciamento do DNA das cepas TgChBrUD1 e TgChBRUD5	29
3.9	Análises de genotipagem	29
3.10	Análise estatística	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Levantamento sorológico das galinhas criadas de forma extensiva no município de Uberlândia	31

4.2	Isolamento das cepas de <i>T. gondii</i> obtidas de galinhas criadas de forma extensiva no município e Uberlândia-MG.	31
4.3	Ensaio de virulência	31
4.4	Caracterização genotípica da cepa e TgChBrUD1 e TgChBrUD5	42
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÕES	50
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
8	ANEXOS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos biológicos e ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, este filo encerra diversas espécies de interesse clínico, entre elas, o *Plasmodium*, agente causador da malária.

O *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório, agente etiológico da toxoplasmose, doença com ampla distribuição mundial, preferencialmente em territórios de clima quente e úmido, que atinge animais, como mamíferos (inclusive o homem) e aves (BOOTHROYD, 2009).

Esta doença apresenta quadro clínico variado, desde infecção assintomática até manifestações sistêmicas extremamente graves como alterações oculares, malformações fetais, hidrocefalia, neuropatias e alterações neuromusculares (DYBAS et al., 2008; PFAFF et al., 2014).

As formas de vida infectantes que *T. gondii* apresentam durante seu ciclo biológico são: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; LUDER; BOHNE; SOLDATI, 2001).

Os taquizoítos estão envolvidos na fase aguda da doença enquanto os bradizoítos, presentes no interior de cistos teciduais, na fase crônica. Os esporozoítos, presentes no interior de oocistos, estão relacionados com a dispersão deste parasito no meio ambiente (BAKER, 1987; GALLAS-LINDEMANN et al., 2013).

1.1.1. Taquizoítos

Os taquizoítos são células alongadas e curvadas em forma de um arco, medindo em torno de 4 a 8 µm de comprimento e 2 a 4 µm de largura (SCHLUTER et al., 2014). Esta forma apresenta um ciclo celular bastante ativo com a finalidade de disseminar o parasito no hospedeiro, sendo capaz de invadir e proliferar teoricamente em qualquer tipo de célula (DIAB; EL-BAHY, 2008).

Estas células apresentam organelas específicas do filo Apicomplexa, que formam o complexo apical sendo constituído de: micronemas, roptrias, estruturas do citoesqueleto e conóide (LI; CHILD; BOGYO, 2012; ROBIBARO et al., 2001).

Micronemas estão localizadas na região anterior do taquizoítos, esta organela contém proteínas envolvidas na invasão (adesão e mobilidade) do parasito no hospedeiro (SOLDATI; DUBREMETZ; LEBRUN, 2001).

As roptrias também são organelas secretoras (proteínas ROP), localizadas próximas as micronemas e ligadas pela porção anterior ao conóide. A secreção desta organela aumenta a fluidez da membrana da célula hospedeira facilitando a invasão do parasito. As roptrias também estão envolvidas na formação do vacúolo parasitóforo, estrutura formada após a invasão na célula hospedeira, que ira acolher o parasito (FENTRESS et al., 2012; NICHOLS; CHIAPPINO; O'CONNOR, 1983; SALIBA; KIRK, 2001).

O conóide é uma estrutura microfilamentosa (anéis filamentosos e microtúbulos) também envolvido no processo de invasão celular (WOODCROFT et al., 2012). Em todo o citosol estão distribuídas organelas esféricas denominadas de grânulos densos que secretam diversas proteínas durante a fase intracelular do ciclo biológico (TOMAVO, 2014).

As principais proteínas de membranas expressas pelos taquizoítos são: SAG1, SAG2a, SAG3, SR1, SR2 e SR3 (BOOTHROYD, 2009; LEKUTIS et al., 2001; SANTANA et al., 2012). Estas proteínas estão relacionadas com a adesão do parasito à célula hospedeira e com a ativação da resposta imune do hospedeiro (JUNG et al. 2004).

O apicoplasto, uma organela provavelmente relacionada evolutivamente ao cloroplasto, provavelmente adquirida a partir de uma endossimbiose com algas vermelhas, também está presente nas formas de vida do *T. gondii*. Sua função primária parece estar relacionada com a síntese de ácidos graxos e isoprenoides (BREINICH et al., 2009; KIM; WEISS, 2004; MORENO; AYONG; PACE, 2011; WALLER; MCFADDEN, 2005).

1.1.2 Bradizoítos

Os bradizoítos, formas celulares que apresentam um ciclo de replicação lento, estão presentes no interior de cistos localizados em diversos tecidos do hospedeiro, principalmente tecido neural e muscular (ZHANG et al., 1999). Estruturalmente são semelhantes aos taquizoítos, no entanto, expressam uma gama de proteínas bastante diferentes, entre elas as SAG2C, SAG2D, SAG2X, SAG2Y, SR9 e SAG4 (DUBEY et al., 1998; KASPER, 1989; LEKUTIS et al., 2001; LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002; WEISS; KIM, 2000).

1.1.3 Esporozoítos

O esporozoítos apresenta uma forma ovalada e é encontrado dentro de oocistos dispersos nas fezes de felinos, especialmente o gato doméstico (100.000 oocistos/g de fezes). Em cada oocisto estão dispostos 8 esporozoítos (ELMORE et al., 2010; ZULPO et al., 2012).

Os oocistos são muito resistentes no meio ambiente podendo sobreviver por longos períodos de tempo em solo úmido e sombreado devido à presença de uma parede bastante resistente (DUMETRE et al., 2013; SU et al., 2003).

1.2. Descoberta e descrição do *T. gondii*

Os pesquisadores Charles Nicolle e Louis Manceaux do Instituto Pasteur da Tunísia em 1908 foram os responsáveis pela descoberta do *T. gondii*. Em suas pesquisas sobre leishmaniose, eles utilizavam o roedor africano *Ctenodactylus gundi* e isolaram deste animal um parasito que apresentava diferenças morfofisiológicas em relação aos do gênero *Leishmania*. Outra importante característica detectada foi a presença de parasitos livres e no interior de células mononucleadas fora do sangue (DUBEY, 2008).

No início, esta nova espécie fora designada de *Leishmania gondii* (FERGUSON, 2009). De forma independente, no ano de 1909, o pesquisador brasileiro Affonso Splendore estudando a leishmaniose visceral em coelhos também observou a presença de parasitos diferentes com formas múltiplas de divisão, aos quais denominou de esquizogônicos, e a presença de cistos típicos nos tecidos. Splendore denominou este novo parasito de *Toxoplasma cuniculi* (FERGUSON, 2009; KIM; WEISS, 2008; WEISS; DUBEY, 2009).

Diversos casos de hidrocefalia e encefalites em crianças foram descritos no início do século XX sem conhecer o agente etiológico, no Brasil no ano de 1927 Mangarino Torres descreveu um quadro de meningoencefalite em um recém-nascido sendo causado por protozoários do gênero *Encephalitozoon* e *Toxoplasma*. Em 1937 nos Estados Unidos da América foi descrito o primeiro caso de morte por toxoplasmose. Um menino de seis anos de idade que apresentava quadro clínico de encefalite, convulsões, linfadenopatia e esplenomegalia faleceu 30 dias após a internação. Na necropsia do tecido neural e da medula raquidiana realizada foram observadas lesões não supurativas. Amostras destes tecidos foram inoculadas em ratos que sucumbiram 21 depois. Finalmente foi isolada destas amostras teciduais uma cepa de *T. gondii* denominada “RH” (iniciais do nome do paciente) (WEISS; DUBEY, 2009). Após os anos de 1950 foram estudadas as formas infectantes do parasito, porém, ainda não se conhecia as formas de contaminação ambiental conhecidas hoje como esporozoítos. Em 1954 Gustafson iniciou a descrição morfológica das formas de proliferação rápida sendo resolvida por Sheffield e Menton no ano de 1968. Em 1973, Frenkel denominou esta forma de taquizoítos (*thachys*-rápido) (FRENKEL, 1974a;1974b;1988; FREYRE et al., 1989).

Em 1962, Wanko et al. iniciou a descrição morfológica do *T. gondii* encontrada na fase crônica e em 1973 Frenkel designou esta forma de bradizoíto (*brady*=lento).

Em 1965, Hutchinson descreveu o papel dos felinos no ciclo de vida do toxoplasma e em seguida foram descritas a forma eliminada nas fezes do gato, o esporozoíto. (HUTCHINSON, 1966).

Atualmente, *T. gondii* é classificado como pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiida (Coccidia), subordem Eimeriorina, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma* e espécie *Toxoplasma gondii*.

1.3. Ciclo de vida do *T. gondii*

T. gondii apresenta um ciclo de vida heteroxênico. A fase assexuada deste protozoário ocorre nos linfonodos e tecidos dos hospedeiros intermediários e definitivos, e a fase sexuada somente no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos (COHEN; TRAPUCKD, 1984; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

O ciclo biológico começa quando os hospedeiros definitivos ingerem oocistos presentes em alimentos, água e/ou ambiente ou cistos contendo bradizoítos que estão presentes nos tecidos (muscular, neural ou vísceras) das presas. No processo de digestão a parede destas estruturas (cisto ou oocisto) é rompida e os milhares de bradizoítos ou esporozoítos são liberados ocorrendo a invasão do parasito nas células intestinais. No interior das células o parasito multiplica-se de forma assexuada por um processo denominado esquizogonia gerando as formas merozoítos (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007; SWIERZY et al., 2014)

Os merozoítos rompem as células intestinais dos felinos invadindo outras células, e num processo agora denominado de gamogonia são gerados os gametas, masculino e feminino (ROBERT-GANGNEUX, 2014).

Desta maneira acontece a reprodução sexuada do parasito, e por meio da fertilização dos gametas, os oocistos são gerados. Esses são liberados nas fezes dos felídeos na forma não esporulada no ambiente (solo e água) (DUBEY, 1998).

No ambiente acontece a esporulação num intervalo de 2 a 5 dias e, dependendo das condições climáticas, temperatura, umidade e oxigenação, são gerados no interior do oocisto, por um processo de esporogonia, 8 esporozoítos (LINDSAY; BLAGBURN; DUBEY, 2002). Oocistos esporulados são capazes de permanecer viáveis por longos períodos no ambiente sendo responsáveis pela infecção dos hospedeiros (VANWORMER et al., 2013).

Quando hospedeiros intermediários, incluindo o homem, ingerem cistos teciduais contendo bradizoítos ou oocistos contendo esporozoítos acontece somente reprodução assexuada (MAUBON et al., 2008). Desta forma, após a ingestão das formas infectantes pelo hospedeiro, seus envoltórios também são destruídos pelas enzimas digestivas e os bradizoítos e/ou esporozoítos são liberados, de modo a invadir as células epiteliais intestinais, onde se multiplicam assexuadamente por endodiogenia e se diferenciam em taquizoítos. Após este ciclo inicial de multiplicação, os taquizoítos são liberados pelo rompimento da membrana das células epiteliais intestinais, atingindo a corrente sanguínea e invadindo, de forma ativa, qualquer tipo de célula, multiplicando-se novamente por endodiogenia (BARRAGAN; SIBLEY, 2003).

A invasão celular pelo taquizoíto é um processo dinâmico que envolve a participação de moléculas receptoras da célula hospedeira e secreção coordenada de proteínas das organelas do parasito (LACHENMAIER et al., 2011). Os eventos que ocorrem durante a invasão do *T. gondii* na célula hospedeira podem ser resumidos na seguinte sequência de eventos: adesão à célula hospedeira; formação de junção molecular móvel, que desloca o parasito para o interior da célula hospedeira; protusão do conóide; exocitose do conteúdo das micronemas e roptrias e formação de um vacúolo parasitóforo (GOLDSZMID et al., 2009).

Os taquizoítos aderem às superfícies da célula hospedeira e secretam diversas proteínas provenientes do micronema. Estas proteínas (MIC 1, 2, 3, 4, 6 e 8) ligam-se a moléculas presentes na superfície da célula hospedeira (CEREDE et al., 2005; PAYNE; LUND; KNOLL, 2011). Assim as proteínas MIC desempenha um papel fundamental na mobilidade do parasito que leva à invasão uma vez que também ocorre à ativação do complexo actina-miosina do parasito induzindo um movimento de rotação em parafuso do taquizoíto em direção ao citoplasma da célula hospedeira (LOURIDO; TANG; SIBLEY, 2012).

Proteínas ROPs 2, 4, 5 e 8 estão associadas a uma proteína proveniente do micronema, (antígeno de membrana apical- AMA 1), com a finalidade de estruturar um complexo molecular necessário para que ocorra a internalização do parasito na célula hospedeira (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011; YOSHIDA; TYLER; LLEWELLYN, 2011).

No interior da célula hospedeira o taquizoíto é envolto em um vacúolo parasitóforo que é derivado de uma combinação da membrana fornecida pelo parasita durante a invasão e da membrana da célula hospedeira. Posteriormente, o parasito secreta proteínas dentro desse espaço vacuolar, tomando-o metabolicamente ativo para seu o crescimento (CHARRON; SIBLEY, 2002).

Na membrana do vacúolo parasitóforo e na rede de nanotúbulos são encontradas as proteínas GRA (GRA2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) e ROP (ROP1 e ROP2) envolvidas na estabilização deste complexo de membranas (SUN et al., 2015).

Aproximadamente 18 tipos de proteínas ROP estão envolvidos no processo de invasão e manutenção do vacúolo parasitóforo impedindo a fusão com lisossomos, no que resultaria na digestão intracelular do conteúdo vacuolar (CAMEJO et al., 2014).

A ROP2 e proteínas GRA estão relacionadas com a íntima adesão entre a membrana deste vacúolo com a mitocôndria e retículo endoplasmático da célula hospedeira com o objetivo de adquirir substratos metabólicos para o taquizoítos (WITOLA et al., 2014).

A intensa multiplicação de taquizoítos no organismo hospedeiro define a fase aguda da toxoplasmose (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Logo, com a higidez do sistema de defesa do hospedeiro, é induzida uma intensa resposta inflamatória contra o *T. gondii* estimulando a conversão da forma de taquizoítos em bradizoítos, devido a um retardo no ciclo celular, que ficam confinados no interior de cistos teciduais, podendo permanecer latente por toda a vida do hospedeiro (LYONS et al., 2002). Durante o encistamento, os bradizoítos estão protegidos de anticorpos circulantes graças a sua resistente parede. Ocasionalmente alguns cistos podem se romper e liberar bradizoítos que são convertidos em taquizoítos, estes são capazes de infectar células vizinhas, estimulando mais uma vez o sistema imune do hospedeiro que irá controlar esta nova proliferação. (SILVA, N. M. et al., 1998).

1.4. Cepas de *T. gondii*

T. gondii apresenta cepas ou linhagens bem caracterizadas, adotando-se métodos moleculares baseados nas técnicas de análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genômico (RFLP) associada à reação de cadeia da polimerase (PCR), evidenciou-se na América do Norte e na Europa a existência de três linhagens clonais designadas como tipo I, II, III que diferiam entre si em uma taxa de aproximadamente 1 a 2% de seus genes (KHAN et al., 2014).

Há uma significativa correlação entre o genótipo do parasito e sua patogenicidade em animais de laboratório, como ratos e camundongos. A linhagem do tipo I, como exemplos RH, BK1 ou GT1, é altamente virulenta tendo uma DL100 (dose letal de 100%) de somente 1 parasito, isto é, 1 taquizoíto inoculado é capaz de matar um camundongo na fase aguda, enquanto as linhagens do tipo II (ME49) e do tipo III (NED ou VEG) são bem menos virulentas em

camundongos, com uma DL50 (Dose Letal de 50%) em torno de 10^3 - 10^5 parasitos, sendo designadas como avirulentas ou pouco virulentas (HILL; SU, 2012).

Em isolados de *T. gondii* obtidos de outras localidades, como América do Sul e África, os estudos de genotipagem revelaram uma estrutura populacional muito mais complexa, devido a maior taxa de recombinação genética entre as linhagens, que ocorre durante o ciclo de reprodução sexuada dos parasitos nos hospedeiros definitivos (SU et al., 2010). Isto leva à geração de genótipos atípicos, com polimorfismos únicos.

Linhagens de *T. gondii* brasileiras isoladas de animais domésticos (gatos, cachorros e galinhas) e de amostras clínicas são designados como tipo BrI (altamente virulenta), tipo BrII (virulência intermediária), tipo BrIII (não virulentas, não fatal) e tipo BrIV (virulência intermediária). A cepa BrII é a mais frequente na população brasileira enquanto que a cepa BrI é mais frequente em pacientes com toxoplasmose ocular (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013; FERREIRA et al., 2006; FERREIRA et al., 2008; OARES et al., 2011).

1.5. Patogenia e manifestações clínicas da toxoplasmose

A patogenia da toxoplasmose depende do modo como houve à infecção, da competência imunológica do hospedeiro e do tipo de cepa de *T. gondii* (BHOPALE, 2003).

A infecção aguda de toxoplasmose geralmente se manifesta como doença assintomática ou subclínica em indivíduos adultos e mulheres grávidas imunocompetentes (XIAO; YOLKEN, 2015).

Em alguns pacientes apresentam sinais e sintomas da infecção, com febre prolongada, fadiga e retinocoroidite (CHOUDHURY et al., 2015; JONES et al., 2015). Ainda, linfadenopatia cervical é a apresentação clínica mais comum. Raramente os pacientes podem apresentar pneumonite, hepatite e miocardite (ARRIBADA; ESCOBAR, 1968)

A toxoplasmose congênita ocorre quando a mãe se infecta durante a gestação e o feto entra em contato com os taquizoítos circulantes que atravessam invadirem a placenta. As crianças infectadas congenitamente apresentam lesões nos olhos- toxoplasmose ocular (retinocoroidite, estrabismo, cegueira), calcificações intracranianas e retardo psicomotor, encefalite e microcefalia (CARLIER et al., 2012; PETERSEN; POLLAK; REITER-OWONA, 2001).

Aproximadamente 10% dos casos de toxoplasmose congênita resultam em abortamento devido ao agravamento das lesões fetais como esplenomegalia, hepatomegalia e

meningoencefalite e a alterações no desenvolvimento embrionário (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013)

Em indivíduos imunocomprometidos, pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), cancer ou transplantados, há um aumento da frequência de encefalite e alterações oculares. A toxoplasmose nestes pacientes é na maioria das vezes o resultado de reativação de doença latente após a ruptura do cisto na parte central do sistema neural (KAMERKAR; DAVIS, 2012). No Brasil, a toxoplasmose cerebral é a principal causa de encefalite associadas à pacientes com AIDS, sendo responsável por cerca de 50% dos casos (XAVIER et al., 2013).

A toxoplasmose ocular é muito prevalente no Brasil, sendo que os casos retinocoroidite podem chegar a 18%, como observada a prevalência na população de Erechim, região do Alto Uruguai, no Norte do Estado do Rio Grande do Sul (GLASNER et al., 1992; JONES et al., 2006).

1.6. Resposta imune e inflamatória da toxoplasmose em humanos

A resposta do hospedeiro contra *T. gondii* envolve os mecanismos de imunidade humoral e celular. Após a infecção e multiplicação intracelular do parasito ocorre sua disseminação por todo o organismo através das vias linfática e sanguínea e desencadeando a ativação não específica de macrófagos, células *Natural Killers* (NK) e outras células como fibroblastos durante os estágios iniciais da infecção (BUZONI-GATEL; WERTS, 2006; LUDER; SEEBER, 2001; MILLER et al., 2009).

Os taquizoítos estimulam os macrófagos a produzirem interleucina - 12 (IL-12) que ativa as células NK e linfócitos T levando a produção do interferon- γ (IFN- γ), induzindo desta forma um perfil de resposta imune Th1 (*T helper* 1), resultando na proteção do hospedeiro contra a rápida proliferação do taquizoíto por induzir uma resposta imune celular (DENKERS, 1999; 2010; HAUSER; SHARMA; REMINGTON, 1982).

Outro papel importante do IFN- γ é durante a infecção é o estímulo ou indução da expressão de GTPases relacionadas com a imunidade (IRG). Estas IRGs são responsáveis pela desestruturação das membranas do vacúolo parasitóforo resultando na morte do taquizoítos (GADDI; YAP, 2007).

Assim, em conjunto, com a ativação dos linfócitos e produção de citocinas, inicia-se a formação de anticorpos específicos responsáveis pela destruição dos taquizoitos extracelulares (JACOBS; VERCAMMEN; SAMAN, 1999). A produção de imunoglobulinas (Ig) da classe

IgM aparece inicialmente (primeiros 7 dias de infecção) seguida de IgG (após 1 ou 2 semanas de infecção), após a infecção do hospedeiro. A infecção, via oral, em alguns hospedeiros pode induzir formação de anticorpos IgA (DE SAINT-BASILE; LISOWSKA-GROSPIERRE; GRISCELLI, 1981; LAGO; OLIVEIRA; BENDER, 2014).

Como consequência, durante a fase crônica da toxoplasmose, somente os bradizoítos persistem e são responsáveis pela manutenção de títulos sorológicos que podem durar toda a vida do hospedeiro (KAMERKAR; DAVIS, 2012).

1.7. Epidemiologia e transmissão da toxoplasmose em humanos

Toxoplasma gondii tem ampla distribuição geográfica, aproximadamente 20-30% da população mundial estão infectados, porém, conforme já mencionado, somente uma proporção reduzida desenvolve a doença (DUBEY; JONES, 2008; DUBEY et al., 2012; HUFFMAN et al., 1981; ZEMENE et al., 2012). A maior prevalência de infecção geralmente é encontrada em regiões de clima tropical, com umidade e temperaturas altas que favorecem a viabilidade dos oocistos no ambiente.

O homem pode adquirir toxoplasmose por meio da ingestão de formas infectantes de oocistos que contaminam alimentos, água e o solo (ALVARADO-ESQUIVEL; ESTRADA-MARTINEZ; LIESENFELD, 2011). Deste modo, a água constitui uma via de transmissão importante para a toxoplasmose, atuando como um disseminador de oocistos para a população que venha a utilizá-la. A contaminação de reservatórios municipais de água pode levar a surtos ou epidemias, envolvendo uma cidade ou até uma região (DUBEY, 2004; JONES; DUBEY, 2010).

A presença de oocistos no ambiente, principalmente no solo pode ser um dos fatores importantes para a infecção de animais utilizados na produção de carne para consumo humano, uma vez que a infecção também pode ocorrer pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, mais comumente carneiro, porco ou bovino (KIJLSTRA; JONGERT, 2008).

Vegetais mal lavados também podem abrigar os cistos do toxoplasma, por terem tido contato com as fezes de animais hospedeiros (THOMPSON, 2014).

No Brasil, no ano de 2001, foi registrado um grande surto de toxoplasmose em Santa Isabel do Ivaí, uma pequena cidade do Estado do Paraná, sendo que 426 pessoas apresentaram sorologia positiva para toxoplasmose (IgM). Alterações oculares em 14 indivíduos e um caso

de abortamento relacionado à toxoplasmose foram relatadas. A contaminação de um reservatório de água com fezes de gatos foi a causadora desse surto (VAUDAUX et al., 2010). A toxoplasmose pode ser transmitida por via placentária se a mãe se infectar ou se a imunossupressão reativar uma infecção prévia durante a gravidez. Se a infecção se der durante a gravidez, os parasitos podem atravessar a barreira placentária e infectar o feto, o que pode levar a malformações, mas se a infecção tiver sido antes do início da gravidez e a mãe apresentar sorologia para *T. gondii* positiva, o risco é menor, haja vista que já foram relatados casos de toxoplasmose congênita em mães soropositivas (BOUGHATTAS et al., 2011). A transmissão pode também ocorrer por transfusão de sangue ou leucócitos ou por transplante de um órgão de doador soropositivo.

1.8. Detecção do *T. gondii* em amostras ambientais

A detecção e o monitoramento da contaminação de amostras ambientais, como água e solo, com *T. gondii* é uma forma indireta de relacionar os dados epidemiológicos da toxoplasmose em humanos devido ao alto grau de dispersão deste parasito, principalmente pelo oocisto.

Oocistos provenientes das fezes de gatos infectados são detectados no solo e água pelo método de concentração, que envolve as etapas de centrifugação, filtração, eluição e separação imunomagnética. Após sofrerem esporulação os oocistos obtidos são inoculados em camundongos para pesquisa de cistos cerebrais, esta laboriosa técnica não é muito utilizada devido à baixa sensibilidade a ela relacionada (KOURENTI; KARANIS, 2006).

As galinhas criadas de forma extensiva (*Gallus gallus domesticus*) têm sido utilizadas como indicadores ou sentinelas de contaminação do solo com *T. gondii*, pois elas se alimentam do chão (devido ao ato de ciscar o solo) que possam estar contaminados com oocistos, assim os levantamentos sorológicos da toxoplasmose nesses animais servem para avaliar, além da ocorrência dessa infecção, o grau de dispersão do parasito no ambiente (DE OLIVEIRA et al., 2009).

1.9. Diagnóstico clínico da toxoplasmose em humanos

Uma grande diversidade de protocolos de diagnóstico tem sido desenvolvida, desde a descoberta da toxoplasmose, com o objetivo de se obter um diagnóstico mais preciso da infecção, bem como a determinação da fase da infecção. As técnicas se baseiam na detecção do próprio parasita ou de algumas de suas moléculas específicas (métodos diretos) ou na

detecção de anticorpos específicos contra os parasitos presentes no soro ou em outros fluidos biológicos de indivíduos infectados (métodos indiretos ou sorológicos).

Os primeiros métodos de diagnóstico da toxoplasmose em humanos foram realizados inoculando em animais de experimentação tecidos de pacientes suspeitos. A confirmação era realizada pela visualização do parasito em cortes histológicos e/ou por testes sorológicos nestes animais inoculados (CHAPARAS; SCHLESINGER, 1959; MACDONALD, 1949).

Outra técnica sorológica que objetivavam detectar imunoglobulinas anti toxoplasma no soro humano era o teste de neutralização sobre membranas cório-alantóide do desenvolvimento embrionário de galinha, neste teste o soro do paciente que continha anticorpos específicos contra o *T. gondii* era capaz de neutralizar as lesões provocadas nestas membranas pelos taquizoítos (MACDONALD, 1949).

O diagnóstico imunológico para a detecção de toxoplasmose durante a fase aguda como durante a fase crônica da doença, também era realizado pela reação sorológica de Sabin Feldman (RSF), também conhecida como teste do corante (FUJITA; KAMEI; SHIOIRI-NAKANO, 1970)

O diagnóstico de toxoplasmose aguda pode ser estabelecido pela demonstração de cúmulos de taquizoítos em cortes de tecidos corados. Os taquizoítos podem ser detectados mediante colorações de PAS (*Periodic acid-Schiff*) e HE (hematoxilina-eosina); no entanto, são mais observados em preparações por impressão coradas com Wright-Giemsa.

A reação de imunofluorescência indireta (RIF) pode ser usada tanto na fase aguda, pela pesquisa de IgM como na fase crônica (pesquisa de IgG). Esfregaços de *T. gondii* formalizados em lâmina são usados como antígeno. Oito a dez dias após o início da infecção humana, o anticorpo pode ser detectável, o resultado de um título de 1:1000 indica toxoplasmose aguda. Títulos baixos, persistentes, entre 1:10 e 1500 indicam infecção crônica.

A detecção de anticorpos IgM, utilizando as técnicas de RIF associadas com ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), no sangue do cordão umbilical ou no soro infantil é necessária para o diagnóstico da toxoplasmose congênita, uma vez que os anticorpos IgM não atravessam a placenta é confirmado que houve a infecção fetal pela produção de imunoglobulina do próprio recém nascido (MONTROYA, 2002).

A PCR é uma técnica molecular sensível, específica e rápida para detectar o *T. gondii* em tecidos humanos. A detecção de DNA do taquizoíto em fluidos e tecidos corporais é eficaz para diagnosticar a toxoplasmose congênita, ocular e cerebral (FALLAHI et al., 2014).

A detecção precoce de taquizoítos de *Toxoplasma* que circulam no sangue, utilizando PCR é recomendada para pacientes imunossuprimidos com alto risco de toxoplasmose disseminada (BRENIER-PINCHART et al., 2015).

Este estudo se justifica devido ao fato da Toxoplasmose ser uma doença altamente difundida em todo o Brasil e há necessidade premente em se determinar as características genotípicas e fenotípicas os isolados de *T. gondii*, a partir das fontes conhecidas de infecção.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Realizar um levantamento sorológico do *T. gondii* em galinhas criadas de forma extensiva no município de Uberlândia-MG;
- Isolar e caracterizar a virulência das cepas encontradas de *T. gondii* no município de Uberlândia-MG
- Genotipar cepa de *T. gondii* isolada no município de Uberlândia-MG.
- Correlacionar a virulência de cepas de *T. gondii* com marcadores genéticos de virulência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos da pesquisa e animais de experimentação

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU) sob o protocolo de aprovação número 054/11 (ANEXO 1).

Camundongos da linhagem BALB/c utilizados em todos os ensaios foram mantidos em gaiolas no Centro de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEBEA) sob um ciclo de claro escuro de 12 horas, ambiente de temperatura controlada ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$) e recebendo água e ração *ad libitum*.

3.2. Coleta das amostras de soros de galinhas criadas de forma extensiva em diversos pontos do município de Uberlândia

Com o objetivo de realizar um levantamento sorológico da toxoplasmose em galinhas criadas de forma extensiva no município de Uberlândia ($18^{\circ} 54' 41''$ Sul, $48^{\circ} 15' 44''$ Oeste) do Estado de Minas Gerais, Brasil foi executado uma busca ativa destes animais em diversos pontos desta cidade.

As coletas de sangue foram realizadas durante o segundo semestre de 2012 e primeiro semestre de 2013.

Amostras de sangue (1-3 mL) das galinhas foram coletadas através da punção da veia ulnar da asa utilizando seringas com agulha (tamanho 20 a 22) e armazenadas em tubos de coleta identificados por numeração e levadas para o Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Para obtenção das amostras de soros, as amostras de sangue foram mantidas a temperatura ambiente por 2 horas centrifugada a 800 xg por 10 minutos. Os sobrenadantes (soros) foram transferidos para um tubo tipo *ependorf* (devidamente identificado) e acondicionados a -20°C até a análise sorológica.

3.3. Parasitas e antígenos

Taquizoítos da cepa RH foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos BALB/c, por meio de passagens seriadas em intervalos de 48-72 horas de um

inóculo de aproximadamente 1×10^6 taquizoítos obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980). Os exsudatos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem da cavidade abdominal do animal com solução salina estéril tamponada com fosfatos a 0,01 M (PBS, pH 7,2) e, em seguida, as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover debris celulares do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C) com PBS e, quando necessário, para a remoção de hemácias, os parasitas foram tratados com solução tampão de lise (NH₄Cl 14 mM e TRIS-HCl 17 mM, pH 7,2) por 1 minuto à temperatura ambiente. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspenso em 10 mL de PBS e os parasitas contados em câmara hemocitométrica. Após nova lavagem com PBS, o sedimento foi armazenado a -20°C para posterior preparação de antígenos solúveis de *T. gondii*.

Taquizoítos das cepas ME49 e VEG foram cultivados em células HeLa em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementados com 5% de soro fetal bovino.

O antígeno solúvel de taquizoítos de *T. gondii* (STAg) foi preparado como descrito por Carvalho et al. (2008), com algumas modificações. Suspensões parasitárias (1×10^8 taquizoítos/mL) foram tratadas com coquetel de inibidores de proteases (Complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche Applied Science, Penzberg, Bavaria, Alemanha) e então submetidas a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido por dois ciclos de ultrassom a 60 Hz, em banho de gelo, em sonicador (Sonopuls mini20 Ultrasonic Homogenizer, Bandelin Electronic GmbH & Co., Berlim, Alemanha), sendo cada ciclo com duração de 5 minutos, com pulsos de 30 segundos e intervalo de 10 segundos entre eles. Após centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado, a concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (1976) e o perfil antigênico da preparação foi analisado em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS-PAGE). Alíquotas dos antígenos foram armazenadas a -20°C até a utilização.

3.4. Testes sorológicos

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado para avaliar a presença de anticorpos (IgY) anti-STAg dos soros obtidos das galinhas caipiras criadas de forma extensiva em diversas localidades do município de Uberlândia-MG ou anticorpos anti-STAg (IgG) dos soros de camundongos BALB/c inoculados com as cepas isoladas de *T. gondii*.

Para isto placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (*Corning Laboratories Inc.*, New York, NY, EUA) foram sensibilizadas com uma solução de antígeno de *T. gondii* (STAg), na concentração de 10 µg/mL diluída em tampão carbonato na concentração de 0.06 M em um pH de 9.6 durante 12 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e as amostras de soro foram adicionadas em duplicata, na diluição 1:50 em PBS-T contendo 5% de leite desnatado como tampão diluente (Molico, Nestlé, São Paulo, SP, Brazil) (PBS-TM). Após a incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T. Após esta etapa, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma Chemical Co., EUA), na diluição de 1:30.000 (anti-IgY) e 1:1000 (anti-IgG) em PBS-T 5% e incubadas por 1 hora a 37°C.

Após nova lavagem por seis vezes com PBS-T, a reação foi revelada pela adição das soluções A e B (v/v) de solução reveladora comercial contendo substrato enzimático H₂O₂ e o cromógeno 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina ácido sulfônico (ABTS) (ABTS Peroxidase Substrate System; KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA). Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente a densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitora de microplacas (Titertek Multiskan Plus spectrophotometer, Flow Laboratories, McLean, EUA). Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O limite de positividade (cut off) da reação foi determinado pela média da DO dos soros controles negativos acrescida de 3 desvios padrão. Os resultados foram expressos em índices de reatividade ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$, sendo que valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos.

3.5. Isolamento das cepas de *T. gondii*

Os cérebros das galinhas soropositivas para toxoplasma foram cortados em pedaços pequenos, após adição de 0,15 M de NaCl para processar a homogeneização do tecido. A preparação resultante foi filtrada através de duas camadas de gaze e centrifugada por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi homogeneizado com tampão (v/v) contendo gentamicina, seguida a imediata inoculação no camundongo. As amostras processadas de cérebro foram inoculadas em camundongos (BALB/c) por via intraperitoneal, em um volume de 200 µL. Os animais foram observados diariamente para verificar a mortalidade durante 15°, 30° e 60° dias após a inoculação. A outra parte dos tecidos extraídos foram testadas quanto à presença de DNA *T. gondii* utilizando PCR em tempo real, visando a 529 pb região genômica de repetição.

As amostras de soros foram coletadas para avaliação dos índices de soroconversão através do teste ELISA. Após a confirmação da soroconversão, os cérebros dos camundongos foram coletados e homogeneizados para a detecção de cistos teciduais e exudatos peritoneais foram analisados para a presença de taquizoítos livres.

Após a confirmação, as amostras de cérebro que contiverem cistos foram inoculadas em camundongos BALB/c e depois os taquizoítos obtidos das sucessivas passagens foram cultivados em cultura de células (HeLa) em RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, USA). Este cultivo de taquizoítos foi realizado para obter um grande número de parasitas para posterior caracterização genética. As células HeLa infectadas com os isolados de *T. gondii* foram armazenadas em frascos de congelamento de nitrogênio líquido contendo dimetilsulfoxido (DMSO) e 5% de soro fetal bovino.

3.6. Determinação da virulência das cepas de *T. gondii*

A virulência dos isolados foi testada em grupos de camundongos BALB/c (n=5) de 8 a 10 semanas de idade com o objetivo de observar a mortalidade e morbidade (variação na temperatura e peso corporal) durante um período de 30 dias. Os camundongos foram inoculados i.p. com 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 ou 10^5 taquizoítos dos isolados *T. gondii*. Como controle, outros animais também foram inoculados com taquizoítos das cepas RH, ME49, VEG, TgChBrUD1 e TgChBrUD2, nas mesmas condições descritas acima.

3.7. Quantificação do DNA das amostras

Para as amostras de tecido cerebral de camundongos infectados com as cepas isoladas de *T. gondii*: O DNA total das amostras foi extraído de 20 mg de tecidos através do kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Co., Madison, WI, USA) conforme recomendação do fabricante.

Para as amostras de taquizoítos cultivadas em meio de cultura: as células foram desagregadas das garrafas de cultivo pela adição de 1,5 mL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10mM, seguida da adição de 1,0 mL de meio de cultivo sem soro fetal bovino e passadas para um tubo falcon. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 400 rpm a 4° C.

O DNA do total de células obtido foi extraído através do do kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Co., Madison, WI, USA) conforme recomendação do fabricante.

A concentração de DNA foi determinada em espectrofotômetro (ND1000 Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA) a 260 nm.

PCR em Tempo Real foi realizada com o sistema StepOnePlus® Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e Go Taq® quantitative real-time PCR (qPCR) Master Mix Kit (Promega Co.), de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* de detecção (direto, 5'-CACAGAAGGGACAGAAGT-3' e reverso, 5'-TCGCCTTCATCTACAGTC-3') foram utilizados para a amplificação da região repetitiva de 529 pb (acesso Genbank: AF146527).

3.8. Sequenciamento do DNA das cepas TgChBrUD1 e TgChBRUD5

O DNA das cepas TgChBrUD1 e TgChBRUD5 foi sequenciado seguindo as intruções do fabricante Ion Torrent's protocol (Thermo Fisher Scientific Inc) utilizando o kit Ion PI™ Sequencing 200 Kit V3.

A biblioteca de DNA, incluindo as etapas de fragmentação e ligação dos específicos adaptadores nos fragmentos gerados foi realizada de acordo com as especificações do fabricante Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific Inc).

As sequencias geradas foram analisadas com a ajuda do software CLC Genomics Workbench 5.1 (Quiagen) e alinhada com o genoma de referência disponível no GenBank e Toxo.DB.org web pages pelos programas Clustal Omega e NCBI/BLAST websites.

3.9. Análises de genotipagem

As análises de genotipagem foram realizadas comparando o polimorfismo de nucleotídeos da cepa TgChBrUD5 com cepas clonais (tipo I, II e III) e com a cepas TgChBrUD1.

A genotipagem da cepa isolada TgChBrUD5 foi realizada avaliando o polimorfismo de nucleotídeos por meio de sete marcadores de microssatélites (MS), sendo que quatro (W35, B18, TgM-A, B17) já descritos na literatura e três adicionados (MS1, MS3, MS4).

A sequencia de nucleotídeos dos MS das cepas do tipo I, II, III e TgChBrUD1 foram alinhadas utilizando o programa de Alinhamento de sequencias múltiplas Clustal Omega (European Molecular Biology Laboratory).

Com o objetivo de verificar a diversidade genética entre as cepas (tipo I, II, III, TgChBRUD1 e TgCHBrUD5) foi avaliado o polimorfismo de cinco sequencias de marcadores genéticos descritos na literatura (GRA6, GRA7, SAG1, PK1 e ROP18).

A análise filogenética das cepas foi estimada pelo filograma e pela matriz de distância utilizando o programa PhyML 3.1/3.0 aLRT Program.

3.10. Análise estatística

Análise estatística e construção de gráficos foram realizadas no programa computacional *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA*). O método de Kaplan- Meyer foi utilizado para estimar a porcentagem de sobrevivência dos camundongos e as curvas de sobrevida foram comparadas usando o teste long- rank. Resultados significantes com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Levantamento sorológico das galinhas criadas de forma extensiva no município de Uberlândia.

Foi realizado o levantamento sorológico da toxoplasmose em galinhas criadas de forma extensiva em 42 residências (pontos de coleta) localizadas em 16 bairros integrados da cidade de Uberlândia (QUADRO 1 e Figura 1).

A ocorrência de anticorpos (IgY) anti- STAg em 216 amostras de soro coletadas e analisadas por ELISA foi de 89,81% de positividade (Figuras 2).

4.2. Isolamento das cepas de *T. gondii* obtidas de galinhas criadas de forma extensiva no município e Uberlândia-MG.

Foram obtidas 11 galinhas soropositivas para *T. gondii* dos proprietários, estas foram utilizadas para o isolamento das cepas por meio do bioensaio em camundongos. Três dos 11 camundongos utilizados no bioensaio apresentaram sorologia positiva do para *T. gondii* (Figura 3) bem como a detecção do DNA do parasito nas amostras de cérebro testadas por PCR em Tempo Real (Figura 4) e pela visualização dos cistos cerebrais por microscopia óptica de luz confirmando assim a infecção. As amostras de cérebro que contiverem cistos foram inoculadas em camundongos BALB/c e depois os taquizoítos obtidos das sucessivas passagens foram cultivados em cultura de células HeLa com o intuito de se obter um grande número de parasitas para posteriores ensaios. As células HeLa infectadas com os isolados de *T. gondii* (originários das galinhas 162, 193 e 211) foram armazenadas em frascos de congelamento de nitrogênio líquido contendo dimetilsulfoxido (DMSO) e 5% de soro fetal bovino. Estas cepas isoladas foram denominadas de TgChBrUD3, TgChBrUD4 e TgChBrUD5.

No mapa da figura 5 está disposta a localização das cepas isoladas deste estudo (TgChBrUD3, TgChBrUD4 e TgChBrUD5) e das duas cepas (TgChBrUD1 e TgChBrUD2) isoladas do coração de galinhas criadas de forma extensiva no Município de Uberlândia-MG anteriormente em nosso laboratório (LOPES et al., 2016).

4.3. Ensaios de virulência

Na figura 6 é mostrada a comparação da mortalidade das cepas clonais (RH Tipo I, ME49 Tipo II e VEG Tipo III) e das cepas isoladas (TgChBrUD1, TgChBrUD2, TgChBrUD3, TgChBrUD4 e TgChBrUD1-5).

A sensibilidade destes camundongos à infecção dos taquizoítos variou dependendo do inóculo e da cepa de parasito inoculado (TABELA 1). As cepas RH, TgChBrUD1 e TgChBrUD2 apresentaram a maior mortalidade, 100%, em todas as doses inoculadas. As cepas TgChBrUD3 e TgChBrUD5 também apresentaram alta mortalidade porém com doses mais altas de inóculo. Para as cepas ME49 e VEG a mortalidade foi baixa. Nenhuma morte foi verificada nos camundongos inoculados com a cepa TgChBrUD4. Em todos os inóculos de cepas, com exceção do TgChBrUD4, os camundongos apresentaram perda de peso e diminuição da temperatura corporal antes de sucumbirem a infecção (dados não mostrados).

QUADRO 1. Bairros integrados do município de Uberlândia-MG onde foram realizadas a coletas de soro de galinhas e isolamento das cepas de toxoplasma.

ZONAS URBANAS DOS BAIRROS INTEGRADOS DO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA-MG					
NORTE	SUL	LESTE	OESTE	CENTRAL	RURAL
MINAS GERAIS ^B	SARAIVA ^D	J. IPANEMA ^D	CHACARAS TUBALINA ^D	BRASIL ^B	P. ANDORINHAS ^C
MARAVILHA ^B	GRANADA ^B	R. INTEGRAÇÃO ^C	DONA ZULMIRA ^C	TABAJARAS	VILA MARIELZA ^B
SANTA ROSA ^B	SÃO JORGE	MORUMBI ^B	JARAGUÁ ^B	BOM JESUS	
PACAEMBU ^B	LAGOINHA	ALTO UMUARAMA ^B	TAIAMAN ^B	CAZECA	
MARTA HELENA ^A	SHOPPING PARK	ACLIMAÇÃO ^B	PANORAMA	CENTRO	
N. S. GRAÇAS ^B	LARANJEIRAS	CUSTÓDIO PEREIRA ^B	PLANALTO	D. FONSECA	
P. ROOSEVELT	TUBALINA	M. PÁSSAROS	J. PALMEIRAS	FUNDINHO	
SÃO JOSÉ	MORADA DA COLINA	SEGISMUNDO PEREIRA	J. EUROPA	LIDICE	
J. BRASÍLIA	VIRGILATO PEREIRA	TIBERY	LUIZOTE	MARTINS	
	NOVA UBERLÂNDIA	SANTA MÔNICA	J. HOLANDA	N. S. APARECIDA	
	PAMPULHA	UMUARAMA	TOCANTIS	O. REZENDE	
	CIDADE JARDIM		J. PATRÍCIA		
	PATRIMÔNIO		MORADA DO SOL		
	CARAJÁS		MANSOUR		
	SANTA LUZIA		J. CANAÃ		
	J. INCONFIDENCIA				
	J. KARAIBA				

A: BAIRROS VISITADOS

B: BAIRROS ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS

C: BAIRROS ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS/BIOENSAIO

D: BAIRROS ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS/BIOENSAIO/ ISOLAMENTO DA CEPA

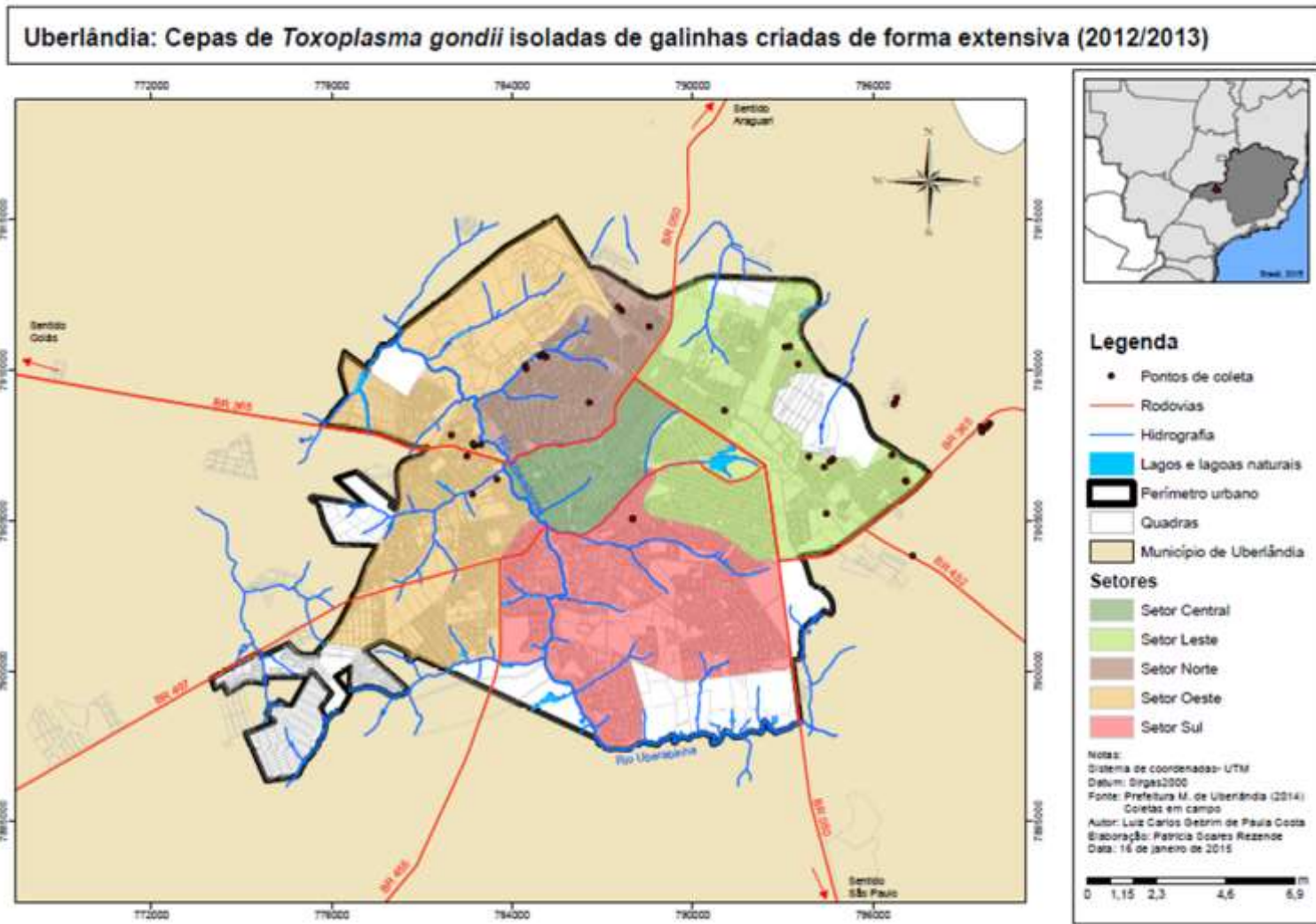


Figura 1. Mapa do município de Uberlândia-MG demonstrando as localidades onde as amostras de soro de galinhas criadas de forma extensiva foram coletadas.

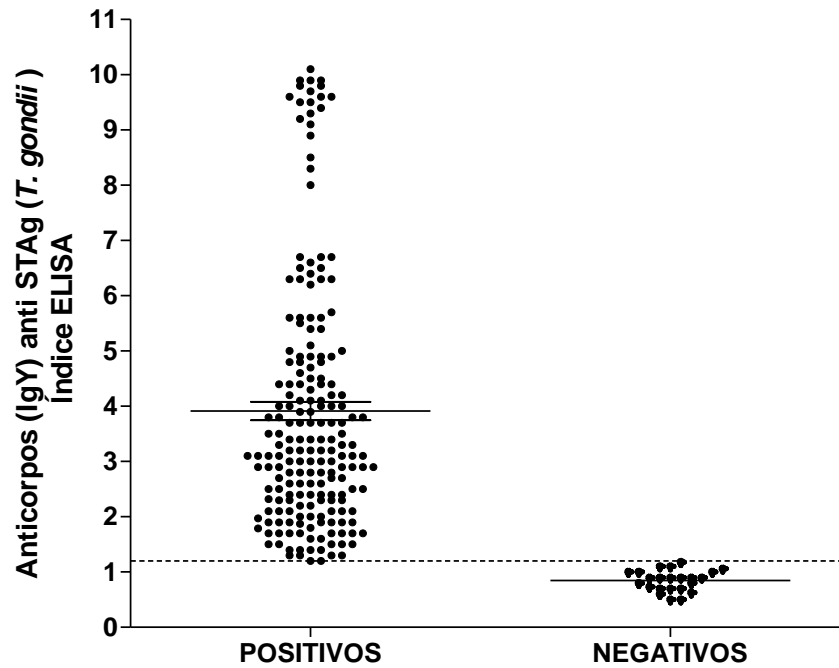


Figura 2. ELISA indireto: Valores de Índice ELISA (IE) dos níveis anticorpos IgY em soros de galinhas criadas de forma extensiva contra o antígeno solúvel de *T. gondii* (10 µg/mL STAg). Amostras com IE igual ou superior a 1,2 foram consideradas positivas. A linha tracejada representa o valor de *cut off* (IE ≥ 1,2). Dos 216 soros testados, 89,91% apresentaram resultado positivo.

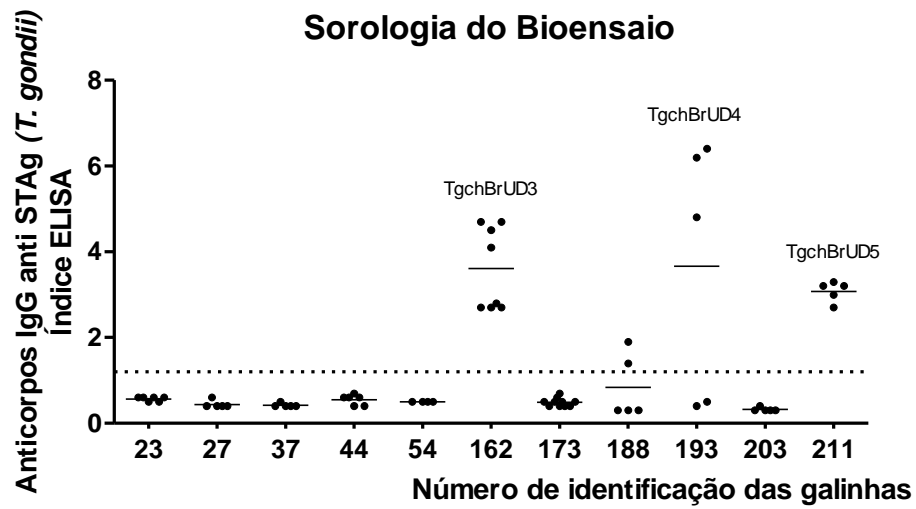


Figura 3. ELISA indireto: Valores de Índice ELISA (IE) dos níveis anticorpos IgG anti STAg (10 µg/mL) em soros de camundongos inoculados com fragmentos cerebrais de galinhas soropositivas para *T. gondii*. Amostras com IE igual ou superior a 1,2 foram consideradas positivas. A linha tracejada representa o valor de *cut off* (IE ≥ 1,2).

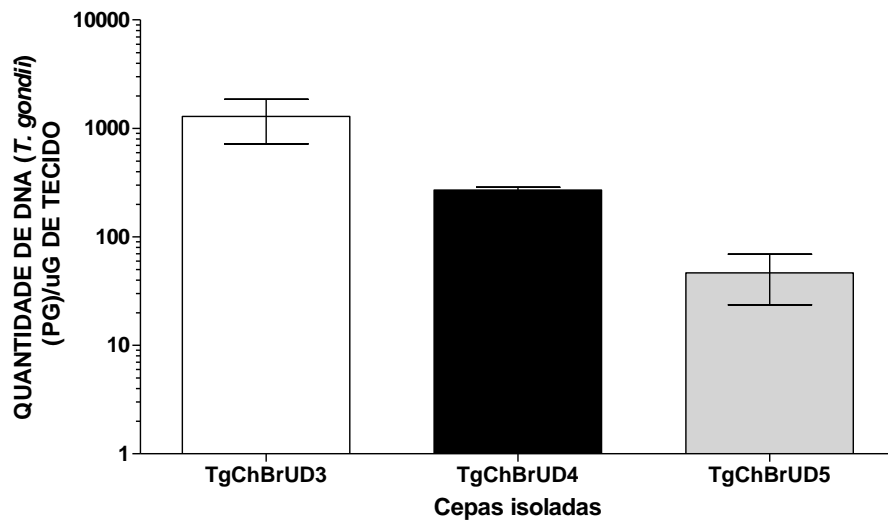


Figura 4. Quantificação do DNA do *T. gondii* em amostras de cérebro de camundongos do bioensaio analisados por PCR em Tempo Real.

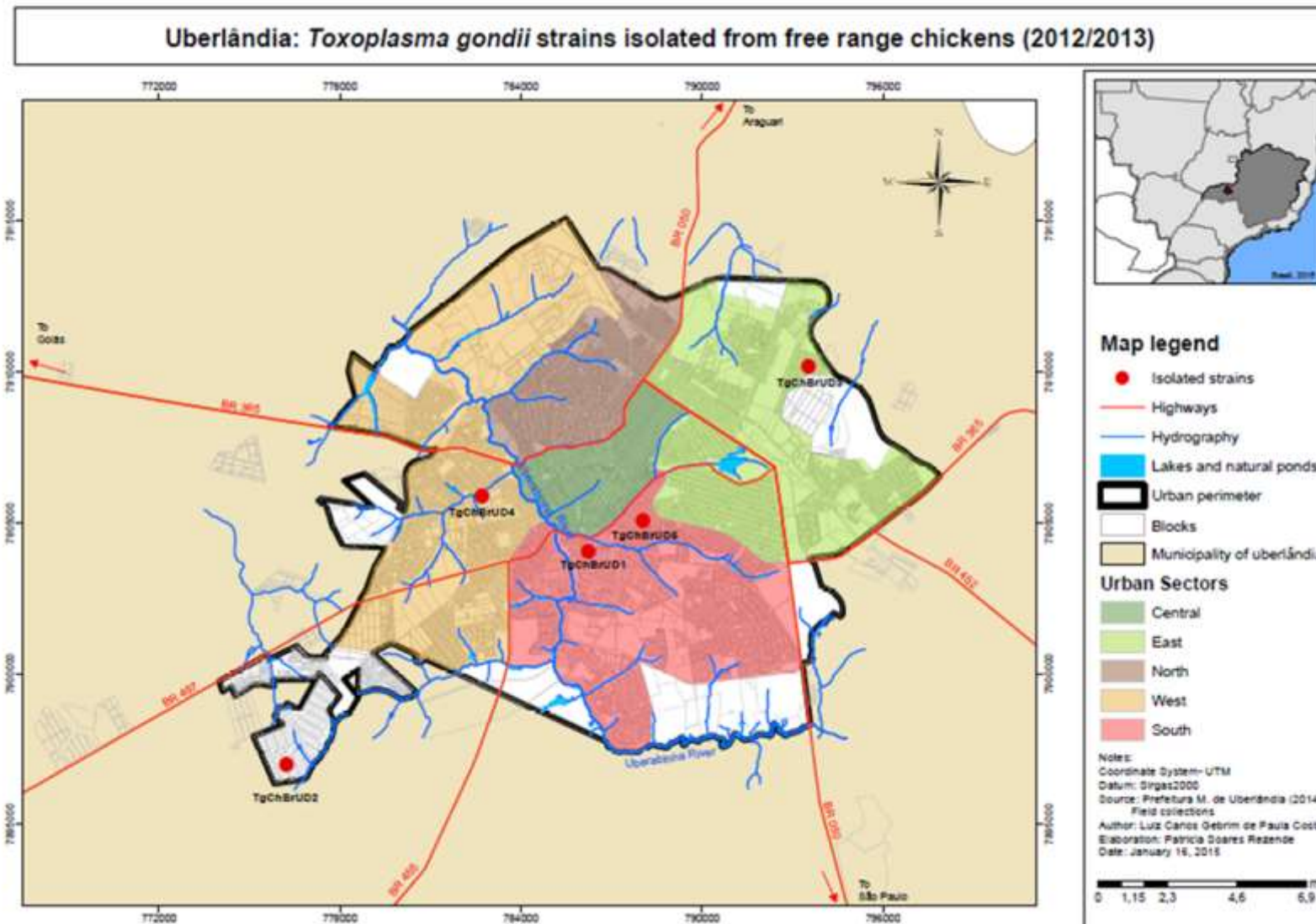


Figura 5. Mapa do município de Uberlândia-MG demonstrando os pontos onde as cepas de *T. gondii* foram isoladas.

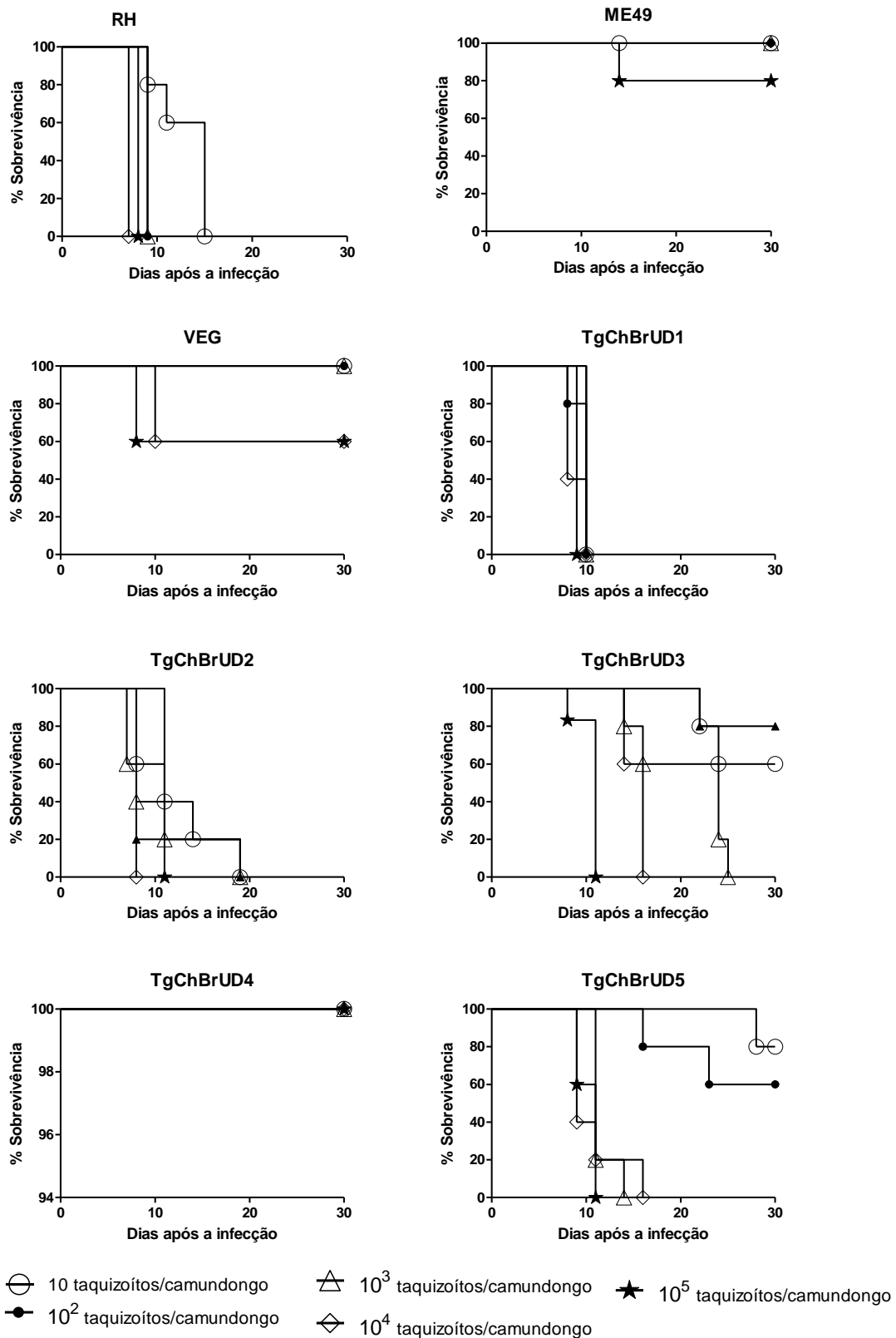


Figure 6. Mortalidade de camundongos BALB/c. Camundongos receberam entre 10 a 10^5 taquizoítos por via intraperitoneal (IP) das cepas de *T. gondii* e foram observados num período de 30 dias. Em cada grupo 5 camundongos foram usados.

TABELA I. Comparação da virulência de camundongos BALB/c inoculados (IP) com taquizoítos de diferentes cepas de *T. gondii*.

Escala de virulência:

(AV) Altamente virulenta: $DL50 < 10^3$, perda de peso corporal e diminuição da temperatura corporal antes da morte;

(VI) Virulência intermediária: $DL50 \geq 10^3$ e $< 10^4$, perda de peso corporal e diminuição da temperatura corporal antes da morte;

(NV) Não virulenta: $DL50 \geq 10^4$, sem de peso corporal e diminuição da temperatura corporal antes da morte (quando ocorrer).

Cepa/ Escala de virulência	Número de taquizoítos inoculados IP em camundongos BALB/c				
	10	10²	10³	10⁴	10⁵
	% mortalidade (número de camundongos/número de camundongos sobreviventes)				
RH/AV	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)
ME49/NV	0(5/5)	0(5/5)	0(5/5)	0(5/5)	20(5/4)
VEG/VI	0(5/5)	0(5/5)	0(5/5)	40(5/3)	40(5/3)
TgChBrUD1/AV	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)
TgChBrUD2/AV	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)
TgChBrUD3/AV	60(5/2)	80(5/1)	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)
TgChBrUD4/NV	0(5/5)	0(5/5)	0(5/5)	0(5/5)	0(5/5)
TgChBrUD5/AV	20(5/4)	40(5/3)	100(5/0)	100(5/0)	100(5/0)

4.4. Caracterização genotípica das cepas TgChBrUD1 e TgChBrUD5

As cepas TgChBrUD1 e TgChBRUD5 tiveram seus DNA sequenciados gerando 6.459.952 e 6.103.033 de fragmentos (*reads*) mapeados respectivamente. Estas sequencias geradas foram alinhadas com o genoma de referência, ME49, depositado no ToxoDB, com a finalidade de se localizar as posições gênicas nos cromossomas e realizar os estudos de polimorfismo dos nucleotídeos presentes nos marcadores de microsatélites e marcadores genéticos.

A base de dados ToxoDB fornece acesso às sequências do genoma das cepas de *T. gondii*, ME49, GT1, VEG e RH (somente os cromossomos Chr Ia e Chr Ib).

Assim, as sequencias de interesse, nas regiões avaliadas, foram alinhadas com sequencias depositadas nos bancos de dados genômicos: GenBank e ToxoDB.

A comparação das sequencias de microsatélites (TABELA II) entre as cepas de *T. gondii* indicam que TgChBrUDI e TgChBrUD5 são provavelmente resultantes de recombinações gênicas entre as cepas clonais (Tipo I, II e III), porém mais relacionadas com o tipo II. TgChBrUD5 introduz nesta análise novos alelos polimórficos que a diferem geneticamente da cepa TgChBrUD1.

TABELA II: Comparação das sequencias de microssatélites entre as sequencias das cepas de *T. gondii*.

TIPO	SEQUENCIA DO MICROSSATÉLITE/NÚMERO DE CROMOSSOMO																				
	MS1/Ib			MS2/II			MS3/II			MS4/IV			MS5/VII			MS6/X			MS7/XII		
	GA	TC	TG	GA	AGA	GGA	CA	TG	TC	ALELO											
I	5	10	2	8	2	3	10	9	10	I											
II	10	7	2	10	2	3	9	8	7	II											
III	9	6	3	8	1	2	10	7	7	III											
TgChBrUD1	10	7	2	8	2	3	9	7	10	U _{II}											
TgChBrUD5	3	7	2	10	1	4	9	8	9	U _{II}											

MS1- ToxoDB: GT1 (TGGT1_chrIb) 1.069.176 até 1.069.233; ME49 (TGME49_chrIb) 1.052.755 até 1.052.814; VEG (TGVEG_chrIb) 1.051.779 até 1.051.836.

MS2(W35)- GenBank accession numbers: BK1 (AY572621); ME49(AY572631); NED (AY572632).

MS3- ToxoDB: GT1 (TGGT1_chrII) 1.262.878 até 1.263.027; ME49 (TGME49_chrII) 1.244.436 até 1.244.581; VEG (TGVEG_chrIb) 1.268.114 até 1.268.257.

MS4- ToxoDB: GT1 (TGGT1_chrIV) 2.245.773 até 2.245.892; ME49 (TGME49_chrIV) 2.359870 até 2.359.989; VEG (TGVEG_chrIV) 2.393.492 até 2.393.639.

MS5 (B18)- GenBank accession numbers: BK1 (AY572714); ME49(AY572710); NED (AY572726).

MS6 (TgM-A)- GenBank accession numbers: BK1 (AY572650); ME49(AY572661); NED (AY572662).

MS7 (B17)- GenBank accession numbers: BK1 (AY572751); ME49(AY572759); NED (AY572760).

U_{II}: Novo alelo relacionado com a cepa do tipo II.

A análise filogenética das sequências dos genes (ANEXO 2) GRA6, GRA7, PK1, SAG1 e ROP18 revelam sítios polimórficos entre as 5 linhagens analisadas (tipo I, II, III, TgchBrUD1 e TgChBrUD5) (Figura 7). A comparação dos polimorfismos dos nucleotídeos também indicam que TgChBrUD1 e TgChBrUD5 são resultados de recombinação gênica dos três tipos clonais, no entanto, esta análise indicou que as cepas estão mais relacionadas com as cepas do tipo I, quando se realiza o alinhamento de todos os marcadores genéticos juntos (Figura 7 e TABELA III).

TgChBrUD1 apresenta o haplótipo do tipo I para 3 genes (GRA6, SAG1 e ROP18) e nos genes GRA6 e GRA7 mostrou um padrão do tipo III.

Para a linhagem TgChBrUD5 foi observado um haplótipo do tipo I para todos os genes com exceção de GRA6 mostrando um padrão do tipo III.

TABELA III: Matriz de Identidade, em porcentagem, entre as linhagens de *T. gondii*. Criado por Clustal2.1.

Nº	Cepa	GRA6					GRA7					SAG1				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	TIPO I															
2	TIPO II	98.13					98.71					98.12				
3	TIPO III	98.79	97.66				97.12	97.84				98.12	100			
4	TgChBrUD1	98.45	97.94	98.76			97.26	97.98	99.57			99.06	97.17	97.17		
5	TgChBrUD5	98.76	98.26	99.07	99.07		97.83	96.53	94.94	95.09		100	98.11	98.11	99.24	
Nº	Strain	PK1					ROP18					Todos os marcadores alinhados				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	TIPO I															
2	TIPO II	98.88					98.20					98.32				
3	TIPO III	98.71	98.87				93.87	94.41				96.31	96.68			
4	TgChBrUD1	98.88	100	98.87			99.64	98.02	93.63			98.85	98.32	96.31		
5	TgChBrUD5	98.55	97.43	97.26	97.43		99.16	97.48	93.15	99.40		98.96	97.58	95.50	98.41	

As caixas destacadas em cinza indicam as linhagens mais próximas

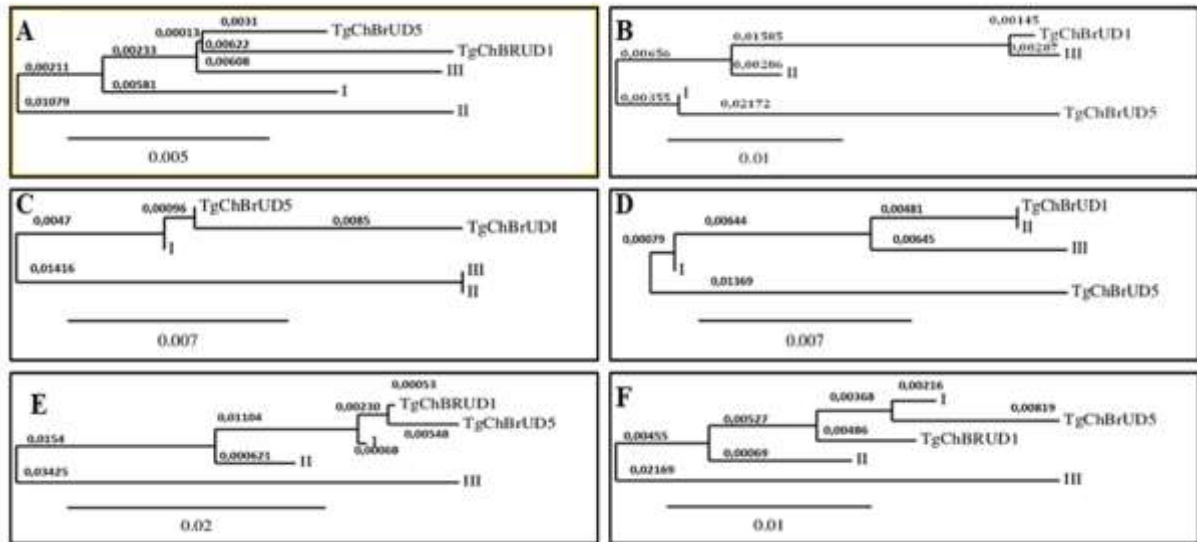


Figura 7. Análise filogenética dos sítios polimórficos foi construída pelo método da aproximação de vizinhos (*neighbor-joining method*) utilizando as sequencias de nucleotídeos dos loci GRA6 (5A), GRA7(5B), SAG1 (5C), PK1(5D) e ROP18(5E). A sequencia das cepas clonais (GT1, ME49 e VEG) foram comparadas com sequencias obtidas de 2 isolados (TgChBrUD1 e TgChBrUD5). A posição dos nucleotídeos foi determinada baseando-se nas sequencias publicadas no ToxoDB para as linhagens de *T. gondii* (GT1, ME49 e VEG) (ANEXO 2). O número acima dos ramos indica a posterior probabilidade. A barra de escala indica a porcentagem de diferença entre os nucleotídeos.

5. DISCUSSÃO

A ampla dispersão do *T. gondii* nos diversos territórios (rural, peri-urbano e urbano) pode ser explicada por diversos fatores, como clima, condições sócio-econômicas, deficiência do saneamento básico, íntimo contato com animais domésticos (gato), consumo de carne crua ou mal cozida, falta de informação em saúde, falta de higiene, e principalmente pela condição de como esta doença é tratada pelo serviço de saúde do Brasil (PETNEY, 2001).

Os seres humanos podem se infectarem pela ingestão de oocistos, que se encontram no solo, areia, latas de lixo ou em qualquer local onde os gatos defecam, disseminando-se através do ambiente, por lixiviação, por meio de vetores, transportadores como moscas e baratas (DABRITZ et al., 2007; TORREY; YOLKEN, 2013).

Em nosso país a toxoplasmose não é considerada uma doença de notificação compulsória, sendo classificada pelos órgãos internacionais de saúde (Organização Mundial da Saúde) como uma doença negligenciada. O Centro de Prevenção e Controle de Doenças Norte-Americano (*Centers for Disease Control and Prevention-CDC*) também inclui a toxoplasmose dentre as infecções negligenciadas da pobreza (KIJLSTRA; JONGERT, 2008; YOSHIDA et al., 2011). Diversos estudos tem demonstrado a importância da infecção humana por oocistos de *T. gondii* devido também à resistência e viabilidade desta forma de infecção no ambiente. O risco desta infecção em crianças é alto, um estudo brasileiro demonstrou a presença de oocistos a partir da areia de 32% dos parques recreativos escolares analisados em uma região do estado de São Paulo (DOS SANTOS et al., 2010).

No Estado de São Paulo, em 237 gatos capturados em 15 municípios 35,4% apresentaram sorologia positiva para toxoplasmose. Em 66,2% destes gatos, os pesquisadores conseguiram isolar por meio do bioensaio em camundongos, o parasito. (PENA et al., 2006).

Um estudo realizado em Campos dos Goytacases no Estado do Rio de Janeiro demonstrou a relação do risco do consumo de água não filtrada pela população com casos de uveíte em indivíduos soropositivos para toxoplasmose (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

O uso de galinhas como indicadores ou sentinelas de contaminação do solo por oocistos devido ao seu hábito de ciscar o chão, tem sido muito relatado em diversos estudos relacionando com a infecção em humanos. (CASARTELLI-ALVES et al., 2015; MORE et al., 2012; SILVA, L. A. et al., 2014). Desta forma, estas galinhas criadas de forma extensiva além de servirem como sentinelas de contaminação ambiental agem adicionalmente como indicadoras de qual cepa esta presente no ambiente, uma vez que este hospedeiro é capaz de

portar, em si, cepas altamente virulentas sem apresentar sintomas e sinais clínicos da toxoplasmose (DUBEY, 2010).

Outro sentinela também utilizado para indicar a contaminação ambiental em ambientes urbanos é o pombo avoante (*Zenaida auriculata*) devido ao hábito de vida deste animal, um levantamento realizado em Londrina no Estado do Paraná demonstrou uma alta prevalência do *T. gondii* nestas aves (BARROS et al., 2014).

A análise de uma gama mais ampla de isolados de *T. gondii* provenientes de diferentes regiões geográficas tem revelado um número maior de haplogrupos do que tinha sido anteriormente reconhecido.

Em nosso estudo encontramos amostras positivas para toxoplasma em todos os bairros do município de Uberlândia onde foram realizadas as coletas de sangue de galinhas criadas de forma extensiva mostrando uma alta habilidade de dispersão deste parasito nos ambientes urbanos. A maioria das amostras foi obtida de regiões com elevada densidade populacional. Também foi demonstrado que as cepas isoladas do município de Uberlândia apresentam grande variabilidade fenotípica em relação à virulência em camundongos.

A virulência das linhagens de *T. gondii* é avaliada principalmente pela comparação da habilidade do parasito em matar um camundongo com diferente quantidade de inóculo. As cepas de *T. gondii* do tipo I apresentam a DL100=1. Por outro lado, para as cepas dos tipos II e III a DL100 é somente obtida com inóculos maiores que 10^3 taquizoítos, permitindo que estas linhagens estabeleçam uma infecção crônica nos camundongos e, portanto, levando à formação de cistos teciduais, preferencialmente no cérebro (GRIGG et al., 2001).

TgChBrUD1 e TgChBRUD5 são linhagens geneticamente relacionadas que apresentam diferenças na virulência sugerindo uma grande diversidade genética entre as cepas circulantes no município de Uberlândia-MG, apesar de serem isoladas de regiões geográficas bem próximas (cerca de 2,2 km de distância).

Estudos de genotipagem utilizando o polimorfismo de nucleotídeos de moléculas (grânulos densos-GRA, antígenos de superfície-SAG, roptrias-ROP entre outras), em substituição aos marcadores de RFLP, têm sido realizados em amostras isoladas de cepas brasileiras. A partir destas análises mais detalhadas do polimorfismo dos nucleotídeos, é possível se observar a ocorrência de linhagens atípicas ou recombinantes apresentando múltiplos genótipos (MINOT et al., 2012; MIRANDA et al., 2015). Esta ferramenta possibilita um melhor detalhamento no alcance de variação de nucleotídeos entre as cepas, permitindo conhecer melhor a real complexidade dos genótipos de *T. gondii*.

A metodologia por polimorfismo de nucleotídeos também explica a diferença encontrada na classificação das cepas isoladas quando utilizamos o polimorfismo de microssatélites e a variação dos genes polimórficos (SAG1, GRA6, GRA7, PK1 e ROP18). Assim, no nosso estudo as cepas TgChBrUD1 e 5 se aproximaram geneticamente das cepas do tipo II pela análise de microssatélites e das cepas do tipo I pela análise do polimorfismo poligênico.

A análise de microssatélites revela mutações mais recentes em isolados geneticamente próximos dentro de uma linhagem uma vez que a taxa de mutação nestas regiões é mais alta quando comparada com outros pontos de mutação, como os marcadores de RFLP (AJZENBERG et al., 2004; AJZENBERG; BANULS; et al., 2002; AJZENBERG; COGNE; et al., 2002; DELHAES et al., 2010; MERCIER et al., 2010; XIAO; YOLKEN, 2015)

Por meio das análises genéticas dos genes através dos polimorfismos identificados nos microssatélites e nos marcadores genéticos avaliados foi possível isolar uma nova cepa de *T. gondii*, TgChBrUD5. Esta cepa provavelmente é resultado da recombinação gênica dos tipos clonais I, II e III porém, se aproximando geneticamente da cepa do tipo I.

Em adição, as cepas clonais do tipo I de *T. gondii* são mais relacionadas geneticamente com as cepas brasileiras do tipo BrI, que apresentam alta virulência, concordando com o nosso achado (PENA et al., 2008; PENA et al., 2006).

A alta virulência das cepas do tipo I e BrI pode ser explicada pelo tipo de resposta imune induzido. Estudos recentes tem demonstrado que estas linhagens estimulam uma liberação de citocinas específicas do perfil Th2 que permite a multiplicação e a disseminação do parasito nos hospedeiros, devido a uma menor estimulação da resposta mediada por fagócitos (XIAO; YOLKEN, 2015; DE-LA-TORRE et al., 2014; TORRES-MORALES et al., 2014)

As cepas TgChBrUD1 e TgChBrUD5 são geneticamente próximas apresentando 98,41% de similaridade nos polimorfismos avaliados, entretanto a primeira cepa é mais virulenta, como demonstrado por Franco et al, (2014), que encontrou uma virulência em *Calomys callosus* de 100% com o inóculo de 10^2 taquizoítos. Esta diferença entre as linhagens estudadas podem ser explicadas pelo polimorfismo dos marcadores GRA6, GRA7 e PK1.

GRA6 e GRA7 constituem-se nos principais marcadores de polimorfismos utilizados para genotipagem. Estas moléculas são secretadas no vacúolo parasitóforo e estão também envolvidas com a resposta imune adaptativa do hospedeiro (MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW, 2015). Para o marcador GRA7 a cepa TgChBrUD5 está mais próxima geneticamente com a linhagem clonal do tipo III.

ROP18 é um dos principais fatores envolvidos na virulência do *T. gondii*, uma vez que esta proteína inativa as IRGs (fosforilação). Assim, acontece o bloqueio destas IRGs, induzidas

pelo IFN- γ , e desta forma não acontece acúmulo de IRGs no vacúolo parasitóforo, que levaria à desestruturação de sua membrana, à sua ruptura e à eliminação do parasita pela degradação mediada por lisossomos. A análise da expressão gênica mostrou que as cepas do tipo III expressam consideravelmente menos ROP18 quando comparada com as do tipo I ou II (BEHNKE et al., 2015; DU TOIT, 2014; JENSEN et al., 2015). Para este marcador gênico, TgChBrUD1 e TgChBrUD5 mostraram um padrão do tipo I.

Estudos com identificação de cepas de pacientes do município de Erechim e região sugerem que o aumento do risco de doença ocular é devido à maior prevalência de uma cepa atípica, que pode ser encontrada em fontes de água no Brasil. Essa cepa é diferente das cepas clonais I, II e III, que causam a maioria das infecções na América do Norte e Europa (JONES et al., 2006; XIAO; YOLKEN, 2015). No Brasil, cepa BrI é mais frequente em pacientes com toxoplasmose ocular e em casos de abortamentos (GILBERT et al., 2008; KHAN et al., 2006; SAADATNIA; GOLKAR, 2012; SAKAMOTO et al., 2009; VALLOCHI et al., 2005).

Eventos de recombinação gênica entre as cepas de *T. gondii* na natureza geram novas propriedades biológicas, como o aumento da virulência para os seres humanos e adaptações os hospedeiros (LORENZI et al., 2016).

Os resultados do presente estudo indicam que os genótipos de *T. gondii* circulam no ambiente urbano e a diversidade de cepas encontradas em regiões geograficamente próximas. Em nossa análise de genes detectamos um alto grau de polimorfismo, assim a utilização dos marcadores SAG1, PK1, GRA6, GRA7 e ROP18 podem ser candidatos fortes para a caracterização gênica de novas cepas isoladas, quando comparado com os alelos presentes nas cepas clonais.

6. CONCLUSÕES

As conclusões deste trabalho foram:

- O levantamento sorológico do *T. gondii* em galinhas criadas de forma extensiva no município de Uberlândia-MG demonstrou uma alta prevalência do protozoário no ambiente urbano;
- A técnica de isolamento do *T. gondii* no cérebro de galinhas demonstrou ser útil para o isolamento de novos genótipos;
- Pela análise do polimorfismo dos marcadores SAG1, GRA6, GRA6, PK1 e ROP18 a cepa TgChBrUD1 foi caracterizada pertencente a linhagem BrI, discordando da classificação por RFLP;
- A cepa TgChBrUD5 foi caracterizada por meio do polimorfismo dos marcadores SAG1, GRA6, GRA6, PK1 e ROP18 como pertencente a linhagem BrI;
- As cepas TgChBrUD1 e TgChBrUD5, isoladas em regiões geograficamente próximas porém, em períodos distintos, foram caracterizadas como pertencentes a mesma linhagem;
- Os marcadores de virulência, GRA6, GRA7 e ROP18, foram úteis em correlacionar a virulência de uma nova cepa de *T. gondii* com os dados de genotipagem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMÈTRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185-1196, 2004.

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; TIBAYRENC, M.; DARDÉ, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 27-38, 2002.

AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÉRES, M. H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 5, p. 684-689, 2002.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; ESTRADA-MARTINEZ, S.; LIESENFELD, O. *Toxoplasma gondii* infection in workers occupationally exposed to unwashed raw fruits and vegetables: a case control seroprevalence study. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 235, 2011.

ARRIBADA, A.; ESCOBAR, E. Cardiomyopathies produced by *Toxoplasma gondii*. **American Heart Journal**, v. 76, n. 3, p. 329-339, 1968.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; OREFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55-62, 2003.

BAKER, J. R. The *Toxoplasma* tangle. **Parasitology Today**, v. 3, n. 4, p. 103-105, 1987.

BARROS, L. D.; TARODA, A.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I.; SAMMI, A. S.; CARDIM, S. T.; MIURA, A. C.; SU, C.; MACHADO, R. Z.; VIDOTTON, O.; GARCIA, J. L. Genetic

characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaida auriculata*) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 443-8, 2014.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426-430, 2003.

BEHNKE, M. S.; KHAN, A.; LAURON, E. J.; JIMAH, J. R.; WANG, Q.; TOLIA, N. H.; SIBLEY, L. D. Rhoptry Proteins ROP5 and ROP18 Are Major Murine Virulence Factors in Genetically Divergent South American Strains of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 8, p. e1005434, 2015.

BESTEIRO, S.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 797-805, 2011.

BHOPALE, G. M. Pathogenesis of toxoplasmosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, p. 213-222, 2003.

BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 935-946, 2009.

BOUGHATTAS, S. ABDALLAH, R. B.; SIALA, E.; AOUN, K.; BOURATBINE, A. An atypical strain associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia. **The New Microbiologica**, v. 34, n. 4, p. 413-416, 2011.

BREINICH, M. S.; FERGUSON, D. J.; FOTH, B. J.; VAN DOOREN, G. G.; LEBRUN, N.; QUON, D. V.; STRIEPEN, B.; BRADLEY, P. J.; FRISCHKNECHT, F.; CARRUTHERS, V. B.; MEISSNER, M. A Dynamin Is Required for the Biogenesis of Secretory Organelles in *Toxoplasma gondii*. **Current Biology**, v. 19, n. 4, p. 277-286, 2009.

BRENIER-PINCHART, M. P.; CAPDEROU, E.; BERTINI, R. L.; BAILLY, S.; FRICKER-HIDALGO, H.; VARLET-MARIE, E.; MURAT, J. B.; STERKERS, Y.; TOUAFEK, F.; BASTIEN, P.; PELLOUX, H. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: value of the buffy coat for the detection of circulating *Toxoplasma gondii*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 4, p. 289-291, 2015.

BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 448-452, 2006.

CAMEJO, A.; GOLD, D. A.; LU, D.; MCFETRIDGE, K.; JULIEN, L.; YANG, N.; JENSEN, K.; D.; SAEIJ, J. P. Identification of three novel *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 147-160, 2014.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012.

CASARTELLI-ALVES, L.; AMENDOEIRA, M. R.; BOECHAT, V. C.; FERREIRA, L. C.; CARREIRA, J. C.; NICOLAU, J. L.; DE FREITAS TRINDADE, E. P.; DE BARROS PEIXOTO, J. N.; MAGALHÃES, M. DE A.; DE OLIVEIRA, R. DE. V.; SCHUBACH, T. M.; MENEZES, R. C. Mapping of the environmental contamination of *Toxoplasma gondii* by georeferencing isolates from chickens in an endemic area in Southeast Rio de Janeiro State, Brazil. **Geospatial Health**, v. 10, n. 1, p. 311, 2015.

CEREDE, O.; DUBREMETZ, J. F.; SOETE, M.; DESLÉE, D.; VIAL, H.; BOUT, D.; LEBRUN, M. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 3, p. 453-63, 2005.

CHAPARAS, S. D.; SCHLESINGER, R. W. Plaque assay of *Toxoplasma* on monolayers of chick embryo fibroblasts. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 102, p. 431-437, 1959.

CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. Pt 15, p. 3049-3059, 2002.

CHOUDHURY, H.; JINDAL, A.; PATHENGAY, A.; BAWDEKAR, A.; ALBINI, T.; FLYNN HW, JR. The role of intravitreal trimethoprim/sulfamethoxazole in the treatment of toxoplasma retinochoroiditis. **Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging Retina**, v. 46, n. 1, p. 137-140, 2015.

CLEMENTINO ANDRADE, M. M.; PINHEIRO, B. V.; CUNHA, M. M.; CARNEIRO, A. C.; ANDRADE NETO, V. F.; VITOR, R. W. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 587-589, 2013.

COHEN, C.; TRAPUCKD, S. Toxoplasma cyst with toxoplasmic lymphadenitis. **Human Pathology**, v. 15, n. 4, p. 396-397, 1984.

DABRITZ, H. A.; MILLER, M. A.; ATWILL, E. R.; GARDNER, I. A.; LEUTENEGGER, C. M.; MELLI, A. C.; CONRAD, P. A. Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 11, p. 1676-1684, 2007.

DE-LA-TORRE, A.; PFAFF, A. W.; GRIGG, M. E.; VILLARD, O.; CANDOLFI, E.; GOMEZ-MARIN, J. E.; Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. **Cytokine**, v. 68, n. 1, p. 23-31, 2014.

DE OLIVEIRA, L. N.; COSTA JUNIOR, L. M.; DE MELO, C. F.; RAMOS SILVA, J. C.; BEVILAQUA, C. M.; AZEVEDO, S. S.; MURADIAN, V.; ARAÚJO D. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the northeast region of Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 235-237, 2009.

DE SAINT-BASILE, G.; LISOWSKA-GROSPIERRE, B.; GRISCELLI, C. Immune response to *Toxoplasma gondii* in man. I. Common idiotypic determinants of toxoplasma-specific human antibodies. **Annales d'immunologie**, v. 132C, n. 3, p. 351-363, 1981.

DELHAES, L.; AJZENBERG, D.; SICOT, B.; BOURGEOT, P.; DARDÉ, M. L.; DEI-CAS, E.; HOUFFLIN-DEBARGE, V. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. **Prenatal Diagnosis**, v. 30, n. 9, p. 902-905, 2010.

DENKERS, E. Y. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 1, n. 9, p. 699-708, 1999.

DENKERS, E. Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p. 737125, 2010.

DIAB, M. R.; EL-BAHY, M. M. *Toxoplasma gondii*: virulence of tachyzoites in serum free media at different temperatures. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 75-79, 2008.

DOS SANTOS, T. R.; NUNES, C. M.; LUVIZOTTO, M. C.; DE MOURA, A. B.; LOPES, W. D.; DA COSTA, A. J.; BRESCIANI, K. D. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 1-2, p. 53-57, 2010.

DU TOIT, A. Parasite biology: A tripartite virulence complex in *Toxoplasma*. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 463, 2014.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 60-73, 2010.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUMETRE, A.; DUBEY, J. P.; FERGUSON, D. J.; BONGRAND, P.; AZAS, N.; PUECH, P. H. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 28, p. 11535-11540, 2013.

DYBAS, J. M. MADRID-ALISTE, C. J.; CHE, F. Y.; NIEVES, E.; RYKUNOV, D.; ANGELETTI, R. H.; WEISS, L. M.; KIM, K.; FISER, A. Computational analysis and experimental validation of gene predictions in *Toxoplasma gondii*. **PloS One**, v. 3, n. 12, p. e3899, 2008.

ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190-196, 2010.

FALLAHI, S.; SEYYED TABAEI, S. J.; POURNIA, Y.; ZEBARDAST, N.; KAZEMI, B. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and nested-PCR assay targeting the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* in blood samples of children with leukaemia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 3, p. 347-354, 2014.

FENTRESS, S. J.; STEINFELDT, T.; HOWARD, J. C.; SIBLEY, L. D. The arginine-rich N-terminal domain of ROP18 is necessary for vacuole targeting and virulence of *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 12, p. 1921-1933, 2012.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133-148, 2009.

FERREIRA A, M.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 1, p. 22-31, 2006.

FERREIRA, I. M.; VIDAL, J. E.; COSTA-SILVA, T. A.; MEIRA, C. S.; HIRAMOTO R. M.; PENALVA DE OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 221-227, 2008.

FRENKEL, J. K. Breaking the transmission chain of *Toxoplasma*: a program for the prevention of human toxoplasmosis. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 50, n. 2, p. 228-235, 1974a.

FRENKEL, J. K. Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 50, n. 2, p. 182-191, 1974b.

FRENKEL, J. K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitology Today**, v. 4, n. 10, p. 273-278, 1988.

FREYRE, A. et al. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 750-755, 1989.

FUJITA, K.; KAMEI, K.; SHIOIRI-NAKANO, K. Toxoplasma: seroreactions with antibody fragments. **Experimental Parasitology**, v. 27, n. 3, p. 395-402, 1970.

GADDI, P. J.; YAP, G. S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 155-159, 2007.

GALLAS-LINDEMANN, C.; SOTIRIADOU, I.; MAHMOODI, M. R.; KARANIS, P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). **Acta Tropica**, v. 125, n. 2, p. 231-236, 2013.

GILBERT, R. E.; FREEMAN, K.; LAGO, E. G.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; TAN, H. K.; WALLON, M.; BUFFOLANO, W.; STANFORD, M. R.; PETERSEN, E.; EUROPEAN MULTICENTRE STUDY ON CONGENITAL TOXOPLASMOSIS (EMSCOT). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, p. e277, 2008.

GLASNER, P. D.; SILVEIRA, C.; KRUSZON-MORAN, D.; MARTINS, M. C.; BURNIER JÚNIOR, M.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M. E.; NUSSENBLATT, R. B.; KASLOW, R. A.; BELFORT JÚNIOR, R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, n. 2, p. 136-144, 1992.

GOLDSZMID, R. S. LEV, A.; CASPAR, P.; MELLMAN, I.; SHER, A. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in

Toxoplasma gondii-infected dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 2, p. 399-410, 2009.

GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, n. 5540, p. 161-165, 2001.

HAUSER, W. E., JR.; SHARMA, S. D.; REMINGTON, J. S. Natural killer cells induced by acute and chronic toxoplasma infection. **Cellular Immunology**, v. 69, n. 2, p. 330-346, 1982.

HILL, R. D.; SU, C. High tissue burden of *Toxoplasma gondii* is the hallmark of acute virulence in mice. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 36-43, 2012.

HUFFMAN, E. M.; KIRK, J. H.; WINWARD, L.; GORHAM, J. R.. Relationship of neonatal mortality in lambs to serologic status of the ewe for *Toxoplasma gondii*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 178, n. 7, p. 679-682, 1981.

HUTCHINSON, W. M. Recent observations on the biology of *Toxoplasma gondii*. **Transactions of the Pphthalmological Societies of the United Kingdom**, v. 86, p. 185-189, 1966.

JACOBS, D.; VERCAMMEN, M.; SAMAN, E. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 1, p. 24-29, 1999.

JENSEN, K. D. CAMEJO, A.; MELO, M. B.; CORDEIRO, C.; JULIEN, L.; GROTENBREG, G. M.; FRICKEL, E. PLOEGH, H. L.; YOUNG, L.; SAEIJ, J. P. J. *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. **Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. e02280, 2015.

JONES, J. L.; BONETTI, V.; HOLLAND, G. N.; PRESS, C.; SANISLO, S. R.; KHURANA, R, N.; MONTOYA, J. G. Ocular toxoplasmosis in the United States: recent and remote infections. **Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 60, n. 2, p. 271-273, 2015.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10-25, 2010.

JONES, J. L.; MUCCILOLO, C.; BELFORT, R.; HOLLAND, G. N.; ROBERTS, J. M.; SILVEIRA, C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 582-587, 2006.

JUNG, C.; LEE, C. Y. F.; GRIGG, M. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 285-296, 2004.

KAMERKAR, S.; DAVIS, P. H. *Toxoplasma* on the brain: understanding host-pathogen interactions in chronic CNS infection. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 589295, 2012.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, n. 1, p. 1-38, 2007.

KASPER, L. H. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 3, p. 668-672, 1989.

KHAN, A. et al. Geographic separation of domestic and wild strains of *Toxoplasma gondii* in French Guiana correlates with a monomorphic version of chromosome1a. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3182, 2014.

KHAN, A.; AJZENBERG, D.; MERCIER, A.; DEMAR, M.; SIMON, S.; DARDÉ, M. L.; WANG, Q.; VERMA, S. K.; ROSENTHAL, B. M.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 12, p. 1359-1370, 2008.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 423-432, 2004.

KIM, K.; WEISS, L. M. Toxoplasma: the next 100years. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 10, n. 9, p. 978-984, 2008.

KOURENTI, C.; KARANIS, P. Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma* oocysts in water. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 475-481, 2006.

LACHENMAIER, S. M.; DELI, M. A.; MEISSNER, M.; LIESENFELD, O. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. **Journal of Neuroimmunology**, v. 232, n. 1-2, p. 119-130, 2011.

LAGO, E. G.; OLIVEIRA, A. P.; BENDER, A. L. Presence and duration of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M in infants with congenital toxoplasmosis. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 4, p. 363-369, 2014.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J.; GRIGG, M. E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J. C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1285-1292, 2001.

LI, H.; CHILD, M. A.; BOGYO, M. Proteases as regulators of pathogenesis: examples from the Apicomplexa. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1824, n. 1, p. 177-185, 2012.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 4, p. 309-313, 2002.

LOPES, C. S.; FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; SILVA, D. A. O.; FERRO, E. A. V.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. N.; MINEO, J. R. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlandia, Brazil. **Epidemiological and Infection**, p. 1-11, Jan 8 2016.

LORENZI, H., KHAN, A.; BEHNLE, M. S. et al. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. **Nature Communications**, v. 7, p. 10147, 2016.

LOURIDO, S.; TANG, K.; SIBLEY, L. D. Distinct signalling pathways control *Toxoplasma* egress and host-cell invasion. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 24, p. 4524-4534, 2012.

LUDER, C. G.; BOHNE, W.; SOLDATI, D. Toxoplasmosis: a persisting challenge. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 10, p. 460-463, 2001.

LUDER, C. G.; SEEBER, F. *Toxoplasma gondii* and MHC-restricted antigen presentation: on degradation, transport and modulation. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1355-1369, 2001.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 198-201, 2002.

MACDONALD, A. Serological diagnosis of human toxoplasmosis. **Lancet**, v. 1, n. 6562, p. 950-953, 1949.

MAUBON, D.; AJZENBERG, D.; BRENIER-PINCHART, M. P.; DARDÉ, M. L.; PELLOUX, H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 299-303, 2008.

MERCIER, A.; DEVILLARD, S.; NGOUBANGOYE, B.; BONNABAU, H.; BAÑULS, A. L.; DURAND, P.; SALLE, B.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. e876, 2010.

MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW, M. F. Toxoplasma secretory granules: one population or more? **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 60-71, 2015.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 23-39, 2009.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 27, n. 2, p. 283-287, 1980.

MINOT, S.; MELO, M. B.; LI, F.; LU, D.; NIEDELMAN, W.; LEVINE, S. S.; SAEIJ, J. P. Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 33, p. 13458-13463, 2012.

MIRANDA, F. J.; SOUZA, D. B.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F. C.; MELO, J. C.; MARIANO, C. M.; ALBERNAZ, A. P.; CARVALHO, E. C.; OLIVEIRA, F. C.;

SOUZA, W. D.; DAMATTA, R. A. Experimental infection with the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain in the Brazilian BR-1 mini pig is a suitable animal model for human toxoplasmosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 0, p. 0, 2015.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185 Suppl 1, p. S73-82, 2002.

MORE, G.; MAKSIMOV, P.; PARDINI, L.; HERRMANN, D. C.; BACIGALUPE, D.; MAKSIMOV, A.; BASSO, W.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G.; VENTURINI, M. C. *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2-4, p. 116-121, 2012.

MORENO, S. N.; AYONG, L.; PACE, D. A. Calcium storage and function in apicomplexan parasites. **Essays in Biochemistry**, v. 51, p. 97-110, 2011.

NICHOLS, B. A.; CHIAPPINO, M. L.; O'CONNOR, G. R. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 83, n. 1, p. 85-98, 1983.

PAYNE, T. M.; LUND, P. J.; KNOLL, L. J. A transmembrane domain containing pellicle protein of *Toxoplasma gondii* enhances virulence and invasion after extracellular stress. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 179, n. 2, p. 107-110, 2011.

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding,

isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 58-67, 2006.

PETERSEN, E.; POLLAK, A.; REITER-OWONA, I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 115-144, 2001.

PETNEY, T. N. Environmental, cultural and social changes and their influence on parasite infections. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 9, p. 919-932, 2001.

PFAFF, A. W.; DE-LA-TORRE, A.; ROCHET, E.; BRUNET, J.; SABOU, M.; SAUER, A.; BOURCIER, T.; GOMEZ-MARIN, J. E.; CANDOLFI, E. New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 99-107, 2014.

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **The Journal of Infection**, v. 68 Suppl 1, p. S125-133, 2014.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

ROBIBARO, B.; HOPPE, H. C.; YANG, M.; COPPENS, I.; NGÔ, H. M.; STEDMAN, T. T.; PAPROTKA, K.; JOINER, K. A. Endocytosis in different lifestyles of protozoan parasitism: role in nutrient uptake with special reference to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1343-1353, 2001.

SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 805-814, 2012.

SAKAMOTO, C. A.; DA COSTA, A. J.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F.; TONIOLLO, G. H.; LOPES, W. D.; BICHUETTE, M. A.; BETINI, C. M.; AMARANTE, A. F.;

BRESCIANI, K. D. Experimental infection of pregnant queens with two major Brazilian clonal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 105, n. 5, p. 1311-1316, 2009.

SALIBA, K. J.; KIRK, K. Nutrient acquisition by intracellular apicomplexan parasites: staying in for dinner. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1321-1330, 2001.

SANTANA, S. S.; SILVA D. A.; VAZ, L. D.; PIROVANI, C. P.; BARROS, G. B.; LEMOS, E. M.; DIETZE, R.; MINEO, J. R.; CUNHA-JUNIOR, J. P.. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. **Immunology Letters**, v. 143, n. 2, p. 193-201, 2012.

SCHLUTER, D.; DÄUBENER, W.; SCHARES, G.; GROß, U.; PLEYER, U.; LÜDER, C. Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology : IJMM**, v. 304, n. 7, p. 917-929, 2014.

SILVA, L. A.; ANDRADE, R. O.; CARNEIRO, A. C.; VITOR, R. W. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e90237, 2014.

SILVA, N. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, D. A.; FERRO, E. A.; KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Expression of *Toxoplasma gondii*-specific heat shock protein 70 during In vivo conversion of bradyzoites to tachyzoites. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3959-3963, 1998.

SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1293-1302, 2001.

SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 414-416, 2003.

SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 2010.

SUN, X. F.; WANG, Z.; LI, J.; WEI, F.; LIU, Q. Evaluation of an indirect ELISA using recombinant granule antigen GRA1, GRA7 and soluble antigens for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 161-164, 2015.

SWIERZY, I. J.; MUHAMMAD, M.; KROLL, J.; ABELMANN, A.; TENTER, A. M. LÜDER CG3.. *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-borne parasite transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 91-98, 2014.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

THOMPSON, R. C. Parasites and food: ripe for exploitation. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 1-3, 2014.

TOMAVO, S. Evolutionary repurposing of endosomal systems for apical organelle biogenesis in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 133-138, 2014.

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 91, n. 7, p. 501-508, 2013.

TORRES-MORALES, E.; TABORDA, L.; CARDONA, N.; DE-LA-TORRE, A.; SEPULVEDA-ARIAS, J. C.; PATARROYO, M. A.; GOMEZ-MARIN, J. E. Th1 and Th2 immune response to P30 and ROP18 peptides in human toxoplasmosis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, n. 5, p. 315-322, 2014.

TORREY, E. F.; YOLKEN, R. H. Toxoplasma oocysts as a public health problem. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 380-4, 2013.

VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R. JR.; RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 2, p. 350-351, 2005.

VANWORMER, E.; FRITZ, H.; SHAPIRO, K.; MAZET, J. A.; CONRAD, P. A. Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human-animal-environment interface. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 3, p. 217-231, 2013.

VAUDAUX, J. D.; MUCCIOLI, C.; JAMES, E. R.; SILVEIRA, C.; MAGARGAL, S. L.; JUNG, C.; DUBEY, J. P.; JONES, J. L.; DOYMAZ, M. Z.; BRUCKNER, D. A.; BELFORT, R. JR.; HOLLAND, G. N.; GRIGG, M. E. Identification of an atypical strain of *toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 8, p. 1226-1233, 2010.

WALLER, R. F.; MCFADDEN, G. I. The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 57-79, 2005.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895-901, 2009.

WEISS, L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 5, p. D391-405, 2000.

WITOLA, W. H.; BAUMAN, B.; MCHUGH, M.; MATTHEWS, K.;. Silencing of GRA10 protein expression inhibits *Toxoplasma gondii* intracellular growth and development. **Parasitology International**, v. 63, n. 5, p. 651-658, 2014.

WOODCROFT, B. J.; MCMILLAN, P. J.; DEKIWADIA, C.; TILLEY, L.; RALPH, S. A. Determination of protein subcellular localization in apicomplexan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 546-554, 2012.

XAVIER, G. A.; CADEMARTORI, B. G.; DUNHA FILHO, N. A.; FARIAS, N. et al. Evaluation of seroepidemiological toxoplasmosis in HIV/AIDS patients in the south of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 55, n. 1, p. 25-30, 2013.

XIAO, J.; YOLKEN, R. H. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. **Acta Physiologica**, v. 213, n. 4, p. 828-845, 2015a.

YOSHIDA, N.; TYLER, K. M.; LLEWELLYN, M. S. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 459-466, 2011.

ZEMENE, E.; YEWHALAW, D.; ABERA, S.; BELAY, T.; SAMUEL, A.; ZEYNUDIN, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors among pregnant women in Jimma town, Southwestern Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 337, 2012.

ZHANG, Y. W.; KIM, K.; MA, Y. F.; WITTNER, M.; TANOWITZ, H. B.; WEISS, L. M. Disruption of the *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific gene BAG1 decreases in vivo cyst formation. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 691-701, 1999.

ZULPO, D. L.; HEADLEY, S. A.; BIAZZONO, L.; DA CUNHA, I. A.; IGARASHI, M.; DE BARROS, L. D.; TARODA, A.; CARDIM, S. T.; BOGADO, A. L.; NAVARRO, I. T.; GARCIA, J. L. Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude

rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 223-230, 2012.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 223/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 054/11

Projeto Pesquisa: "Genotipagem e fenotipagem de *Toxoplasma gondii* isolados de amostras de água de consumo urbano e em frangos de corte criados de forma intensiva e extensiva no Municípios de Santa Helena e Rio Verde - Goiás".

Pesquisador Responsável: José Roberto Mineo

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE À CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 20 de dezembro de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU

Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA - Comissão de Ética na Utilização de Animais
Avenida João Naves de Ávila R. N.º 2160/1009

ANEXO 2

GRA6 GENE MARKER

>TYPE I

TTAATAATCAAACACATTTCACACGTTCCGGGTGCAACGGGCGCCTGTCATCCTCGCTCCTCCTTCACCTCTGCCTCCGTAACCTCTGCCTTCA
 TTCCCACCGTTCCCAGCATATTGCTGCATCATTTCACCACCATCCCCAGATGGTTCTTGGGGAGAGCGTCGTCACAGTCCCTTCGAAGAAAGA
 AAGCGGTAAGCATTGCCACAGATACTGCCAACACCACAGCACCAATGAGTCTGTGGCGTTTCTGTGTTTCGTTTGGCTAGGCACCTTCGCTTGTGG
 TTCTTGAACAGAGGAGTAACGTCGCTTGTGCCCTGTTCTTCGATTCCTTTCCTCGAGCGACGGGCCACGCGCTCCGACTTCCCCTCATTTCGCC
 AGCACGGGAAAAGGGTCAACGTCGCCCTCCGCCGCTTCGGAGGTTGTATCATCTTCAGCTAACGAGTCGCCTTGGCCACCGCCCATCGCCGAAG
 AGTTGACATAGTCTTCAGTGGTCCCCTACTGCTTCTTGCTGTCCACCGCTCGAACCGGTTTCCGAAGGGGTCTGCTTAACACCACCGCTGTCTGC
 TGCACAGCGACTCCACCCAACGAATTGACGAGTACCCCATGAAGACTACAAAGACCACAGCAACTGTGGAGACAGTTACAGGACAGAAGTTA
 C

>TYPE II

TTAAAAATCAAACACTCATTTCACACTTCCCGGTGCAACGGGCGCCTGTCATCCTCGCTCCTCCTTCACCTCTGCCTTCATTCCCACCGTTCCCAGCA
 TTATTGCCTGCATCATTTCACCACCACCCCCAGATGGTTCTTGGGGAGAGCGTCGTCACAGTCCCTTCGAAGAAAGAAAGCGGTAAGCATTGCCA
 CAGATACTGCCAACACCACAGCACCAATGAGTCTGTGGCGTTTCTGTGTTTCGTTTGGCTAGGCACCTTCGCTTGTGGTTCTTGAACAGAGGAGTA
 ACGTCGCTTGTGCCCTGTTCTTCGATTCTTTCCTCGAGCGACGGGCCACGCGCTCCGACTTCCCCTCATTTCGCCAGCGGGGAAAAGGGTCA
 ACGTCGCCCTCCGCCGATCGGAGGTTGTATCATCTTCAGCTAACGAGTCGCCTTGGCCACCGCCCATCGCCGAAGAGTTGACATAGTCTTCAG
 TGGTCCCCTACTGCTTCTTGCTGTCCACCGCTCGAACCGGTTTCCGAAGGGGTCTGCCTAACACCACCGCTGTCTGCTGCGACAGCGACTCCACC
 CAACGAATTGACGAGTACCCCATGAAGACTACAAAGACCACAGCAACTGTGGAGACAGTTAAAGGACAGAAGTTAC

>TYPE III

TTAATAATCAAACACATTTCACACGTTCCGGGTGCAACGGGCGCCTGTCATCCTCGCTCCTCCTTCACCTCTGCCTCCGTAACCTCTGCCTTCA
 TTCCCACGGTTCCCAGCATATTGCTGCATCATTTCACCACCATCCCCAGATGGTTCTTGGGGAGAGCGTCGTCACAGTCCCTTCGAAGAAAGA
 AAGCGGTAAGCATTGCCACAGATACTGCCAACACCACAGCACCAATGAGTCTGTGGCGTTTCTGTGTTTCGTTTGGCTAGGCACCTTCGCTTGTGG
 TTCTTGAACAGAGGAGTAACGTCGCTTGTGCCCTGTTCTTCGATTCCTTTCCTCGAGCGACGGGCCACGCGCTCCGACTTCCCCTCATTTCGCC
 AGCACGGGAAAAGGGTCAACGTCGCCCTCCGCCGATCGGAGGTTGTATCATCTTCAGCTAACGAGTCGCCTTGGCCACCGCCCATCGCCGAAG
 AGTTGACATAGTCTTCAGTGGTCCCCTACTGCTTCTTGCTGTCCACCGCTCGAACCGGTTTCCGAAGGGGTCTGCTTAACACCATCGCTGTCTGC
 TGCACAGCGACTCCACCCAACGAATTGACGAGTACCCCATGAAAACACTACAAAGACCACAGCAACTGTGGAGACAGTTAAAGGACAGAAGTTA
 C

>TgChBRUD1

TTAATAATCAAACACATTTCACATGTTCCGGGTGCAACGGGCGCCTGTCATCCTCGCTCCTCCTTCACCTCTGCCTTCATTCCCACCGTTCCCA
 GCATTATTGCTGCATCATTTCACCATCATCCCCAGATGGTTCTTGGGGAGAGCGTCGTCACAGTCCCTTCGAAGAAAGAAAGCGGTAAGCATTG
 CCACAGATACTGCCAACACCACAGCACCAATGAGTCTGTGGCGTTTCTGTGTTTCGTTTGGCTAGGCACCTTCGCTTGTGGTTCTTGAACAGAGGA
 GTAACGCCGCTTGTACCCTGTTCTTCGATTCCTTTCCTCGAGCGACGGGCCACGCGCTCCGACTTCCCCTCATTTCGCCAGCACGGGAAAAGGG
 TCAACGTCGCCCTCCGCCGATCGGAGGTTGTATCATCTTCAGCTAACGAGTCGCCTTGGCCACCGCCCATCGCCGAAGAGTTGACATAGTCTT
 CAGTGGTCCCCTACTGCTTCTTGCTGTCCACCGCTCGAACCGGTTTCCGAAGGGGTCTGCTTAACACCACCGCTGTCTGCTGCGACAGCGACTCC
 ACCCAACGAATTGACGAGTACCCCATGAAGACTACAAAGACCACAGCAACTGTGGAGACAGTTAAAGGACAGAAGTTAC

>TgChBrUD5

TTAATAATCAAACACATTACACAGTTCCGGGTGCAACGCGGCCCGTCATCTCGCTCCTCCTTACCTCTGCCTTCATTCCCACGTTCCCA
 GCATTATTGCCTGCATCATTTCACCACCATCCCCAGATGGTTCTGGGGGAGAGCGTCGTCCAGTCCCTTCGAAGAAAGAAAGCGGTAAGCATTG
 CCACAGATACTGCCAACACCACAGCACCAATGAGTCTGTGGCGTTTCTGTGTTCGTTTGCTAGGCACCTTCGCTTGTGGTCTTGAACAGAGGA
 GTAACGTCGTCTTGTGCCCTGTCTTCGATCTTTCTCGAGCGACGGGCCACGCGCCTCCGACTTCCCCTCATTCGCCAGCACGGGAAAAGGG
 TCAACGTCGCCCTCCGCCGATCGGAGGTTGTATCATCTTACGTAACGAGTTCGCTTGGCCACCGCCCATCGCGAAGAGTTGACATAGTCTT
 CAGTGGTCCCCACTGCTTCTTGCTGTCCACCGCTCGAACCGGTTTCCGAAGGGGGTCTGCTGAACACCACCGCTGTCTGCTGCGACAGCGACTC
 CACCCAACGAATTGACGAGTACCCCATGAAGACTACAAAGACCACAGCAACTGTGGAGACAGTTAAAGGACAGAAGTTAC

GRA6 GENE MARKER ALIGNMENT

	10	20	30	40	50	60
	=====+=====+=====+=====+=====+=====+					
	#####					
I	TTAATAATCAAACACATTACACAGTTCCGGGTGCAACGCGCGCCTGCATCTCCTCGCTCC					
II	TTAATAATCAAACACATTACACAGTTCCGGGTGCAACGCGCGCCTGCATCTCCTCGCTCC					
III	TTAATAATCAAACACATTACACAGTTCCGGGTGCAACGCGCGCCTGCATCTCCTCGCTCC					
TgChBRUD1	TTAATAATCAAACACATTACACAATTCCGGGTGCAACGCGCGCCTGCATCTCCTCGCTCC					
TgChBrUD5	TTAATAATCAAACACATTACACAGTTCCGGGTGCAACGCGCGCCCGTCATCTCCTCGCTCC					
	70	80	90	100	110	120
	=====+=====+=====+=====+=====+=====+					
	###	#####				
I	TCCCTTCACCTCTGCCTCCGTAACCTCTGCCTTCATTCCCACCGTTCCCAGCATTATTGCC					
II	TTC-----ACCTCTGCCTTCATTCCCACCGTTCCCAGCATTATTGCC					
III	TCCCTTCACCTCTGCCTCCGTAACCTCTGCCTTCATTCCCACCGTTCCCAGCATTATTGCC					
TgChBRUD1	TCCCTTC-----ACCTCTGCCTTCATTCCCACCGTTCCCAGCATTATTGCC					
TgChBrUD5	TCCCTTC-----ACCTCTGCCTTCATTCCCACCGTTCCCAGCATTATTGCC					
	130	140	150	160	170	180
	=====+=====+=====+=====+=====+=====+					
	#####					
I	TGCATCATTCCACCACCATCCCCAGATGGTTCTGGGGAGAGCGTCGTCCAGTCCCTCC					
II	TGCATCATTCCACCACCATCCCCAGATGGTTCTGGGGAGAGCGTCGTCCAGTCCCTCC					
III	TGCATCATTCCACCACCATCCCCAGATGGTTCTGGGGAGAGCGTCGTCCAGTCCCTCC					
TgChBRUD1	TGCATCATTCCACCACCATCCCCAGATGGTTCTGGGGAGAGCGTCGTCCAGTCCCTCC					
TgChBrUD5	TGCATCATTCCACCACCATCCCCAGATGGTTCTGGGGAGAGCGTCGTCCAGTCCCTCC					
	190	200	210	220	230	240
	=====+=====+=====+=====+=====+=====+					
	#####					

I **AAGAAAGAAAGCGGTAAGCATTGCCACAGATACTGCCAACACCACAGCACCAATGAGTCT**

II **AAGAAAGAAAGCGGTAAGCATTGCCACAGATACTGCCAACACCACAGCACCAATGAGTCT**

III **AAGAAAGAAAGCGGTAAGCATTGCCACAGATACTGCCAACACCACAGCACCAATGAGTCT**

TgChBRUD1 **AAGAAAGAAAGCGGTAAGCATTGCCACAGATACTGCCAACACCACAGCACCAATGAGTCT**

TgChBrUD5 **AAGAAAGAAAGCGGTAAGCATTGCCACAGATACTGCCAACACCACAGCACCAATGAGTCT**

250 260 270 280 290 300

====#+====#+====#+====#+====#+====#+====#+

#####

I **GTGGCGTTTCTGTGTTTCGTTTGCTAGGCACCTTCGCTTGTGGTTCTTGAACAGAGGAGTA**

II **GTGGCGTTTCTGTGTTTCGTTTGCTAGGCACCTTCGCTTGTGGTTCTTGAACAGAGGAGTA**

III **GTGGCGTTTCTGTGTTTCGTTTGCTAGGCACCTTCGCTTGTGGTTCTTGAACAGAGGAGTA**

TgChBRUD1 **GTGGCGTTTCTGTGTTTCGTTTGCTAGGCACCTTCGCTTGTGGTTCTTGAACAGAGGAGTA**

TgChBrUD5 **GTGGCGTTTCTGTGTTTCGTTTGCTAGGCACCTTCGCTTGTGGTTCTTGAACAGAGGAGTA**

310 320 330 340 350 360

====#+====#+====#+====#+====#+====#+====#+

#####

I **ACGTCGTCTTGTGCCCTGTCTTCGATTCTTCCCTCGAGCGACGGGCCACGCGCTCCGA**

II **ACGTCGTCTTGTGCCCTGTCTTCGATTCTTCCCTCGAGCGACGGGCCACGCGCTCCGA**

III **ACGTCGTCTTGTGCCCTGTCTTCGATTCTTCCCTCGAGCGACGGGCCACGCGCTCCGA**

TgChBRUD1 **ACGTCGTCTTGTGCCCTGTCTTCGATTCTTCCCTCGAGCGACGGGCCACGCGCTCCGA**

TgChBrUD5 **ACGTCGTCTTGTGCCCTGTCTTCGATTCTTCCCTCGAGCGACGGGCCACGCGCTCCGA**

370 380 390 400 410 420

====#+====#+====#+====#+====#+====#+====#+

#####

I **CTTCCCCTCATTGCGCCAGCACGGGAAAAGGGTCAACGTCGCCCTCCGCCGCTTCGGAGGT**

II **CTTCCCCTCATTGCGCCAGCACGGGAAAAGGGTCAACGTCGCCCTCCGCCGATCGGAGGT**

III **CTTCCCCTCATTGCGCCAGCACGGGAAAAGGGTCAACGTCGCCCTCCGCCGATCGGAGGT**

TgChBRUD1 **CTTCCCCTCATTGCGCCAGCACGGGAAAAGGGTCAACGTCGCCCTCCGCCGATCGGAGGT**

TgChBrUD5 **CTTCCCCTCATTGCGCCAGCACGGGAAAAGGGTCAACGTCGCCCTCCGCCGATCGGAGGT**

430 440 450 460 470 480

====#+====#+====#+====#+====#+====#+====#+

#####

I **TGTATCATCTCAGCTAACGAGTCGCCTTGGCCACCGCCCATCGCCGAAGAGTTGACATA**

II **TGTATCATCTCAGCTAACGAGTCGCCTTGGCCACCGCCCATCGCCGAAGAGTTGACATA**

III **TGTATCATCTCAGCTAACGAGTCGCCTTGGCCACCGCCCATCGCCGAAGAGTTGACATA**

TgChBRUD1 **TGTATCATCTTCAGCTAACGAGTCGCCTTGGCCACCGCCCATCGCCGAAGAGTTGACATA**
 TgChBrUD5 **TGTATCATCTTCAGCTAACGAGTCGCCTTGGCCACCGCCCATCGCCGAAGAGTTGACATA**

490 500 510 520 530 540

====#+====#+====#+====#+====#+====#+====#+
 #####

I **GTCTTCAGTGGTCCCCACTGCTTCTTGCTGTCCACCGCTCGAACCGGTTTCCGAA-**GGGG****
 II **GTCTTCAGTGGTCCCCACTGCTTCTTGCTGTCCACCGCTCGAACCGGTTTCCGAA-**GGGG****
 III **GTCTTCAGTGGTCCCCACTGCTTCTTGCTGTCCACCGCTCGAACCGGTTTCCGAA-**GGGG****
 TgChBRUD1 **GTCTTCAGTGGTCCCCACTGCTTCTTGCTGTCCACCGCTCGAACCGGTTTCCGAA-**GGGG****
 TgChBrUD5 **GTCTTCAGTGGTCCCCACTGCTTCTTGCTGTCCACCGCTCGAACCGGTTTCCGAA**G****GGGG****

550 560 570 580 590 600

====#+====#+====#+====#+====#+====#+
 #####

I **TCTGCTTAACACCACCGCTGTCTGCTGCGACAGCGACTCCACCCAACGAATTGACGAGTA**
 II **TCTGCTTAACACCACCGCTGTCTGCTGCGACAGCGACTCCACCCAACGAATTGACGAGTA**
 III **TCTGCTTAACACCA**T**CGCTGTCTGCTGCGACAGCGACTCCACCCAACGAATTGACGAGTA**
 TgChBRUD1 **TCTGCTTAACACCACCGCTGTCTGCTGCGACAGCGACTCCACCCAACGAATTGACGAGTA**
 TgChBrUD5 **TCTGCT**G**AACACCACCGCTGTCTGCTGCGACAGCGACTCCACCCAACGAATTGACGAGTA**

610 620 630 640 650 660

====#+====#+====#+====#+====#+====#+
 #####

I **CACCCATGAAGACTACAAAGACCACAGCAACTGTGGAGACAGTTA**C**AGGACAGAAGTTAC**
 II **CACCCATGAAGACTACAAAGACCACAGCAACTGTGGAGACAGTTAAAGGACAGAAGTTAC**
 III **CACCCATGA**A**AACTACAAAGACCACAGCAACTGTGGAGACAGTTAAAGGACAGAAGTTAC**
 TgChBRUD1 **CACCCATGAAGACTACAAAGACCACAGCAACTGTGGAGACAGTTAAAGGACAGAAGTTAC**
 TgChBrUD5 **CACCCATGAAGACTACAAAGACCACAGCAACTGTGGAGACAGTTAAAGGACAGAAGTTAC**

GRA7 GENE MARKER

>TYPE I

TTTTTCCGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGGCGCTTTGCCCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCTCAGATGACGAACTGATGAGTCCG
 AATCCGAAATTTCTGACTTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGACGAACGCCGTTGTCGACTCGAAAGGACCGACGATCAC
 CTCACCACAGCATGGATAAGGCATCTGTAGAGAGTCAGCTTCCGAGAAGAGAGCCATTGGAGACGGAGCCAGATGAACAAGAAGAAGTTCATT
 TCAGGAAGCGAGGCGTCCGTTCCGACGCTGAAGTACTGACGACAACATCTACGAGGAGCACACTGATCGTAAGGTGGTTCCGAGGAAGTCGGA
 GGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCCGGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGACTTGTGCCG
 GAACTAACAGAGGCAACAGAGAGGCGACGAACCCCTAACCCACCGCCAGAATGTGGGCACTGTGTTAGGCTTCGCAGCGCTTGCTGCTGCCG

CAGCGTTCCTTGGCATGGGTCTCACGAGGACGTACCGACATTTTTCCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACTCGAGCAAGAGGTGCC
TGAATCAGGCGAAGATGGGGAGGATGCCCCCAGTAG

>TYPE II

TTTTTTTCGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGGCGCTTTGCCCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCGTCAGATGACGAACTGATGAGTCG
AATCCGAAATTTCTGACTTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGACGAACGCCGGTGTGACTCGAAAGGGACCGACGATCAC
CTCACCACCAGCATGGATAAGGCATCTGTAGAGAGTCAGCTTCCGAGAAGAGAGCCATTGGAGACGGAGCCAGATGAACAAGAAGAAGTTCATT
TCAGGAAGCGAGGCGTCCGTTCCGACGCTGAAGTGACTGACGACAACATCTACGAGGAGCACACTGATCGTAAAGTGGTCCGAGGAAGTCGGA
GGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCCGGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTCCGCTGATAGAATTTGCCG
GAACTAACAGAGCAGCAACAGACAGGGCGAAGAACCCTAACCCCGGCCAGAATGTGAGCACTGTGTTAGGCTTCGACGCGCTTGCTGCTGCCG
CAGCGTTCCTTGGCATGGGTCTCACGAGGACGTACCGACATTTTTCCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACTCGAGCAAGAGGTGCC
TGAATCAGGCGAAGATGGGGAGGATGCCCCCAGTAG

>TYPE III

TTTTTTTCGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGGCGCTTTGCCCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCGTCGGATGACGAACTGATGAGTCG
AATCCGAAATTTCTGACTTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGACGAACGCCGGTGTGACTCGAAAGGGACCGACGATCAC
CTCACCACCAGCATGGATAAGGCATCTGTAGAGAGTCAGCTTCCGAGAAGAGAGCCATTGGAGACGGAGCCAGATGAACAAGAAGAAGTTCATT
TCAGGAAGCGAGGCGTCCGTTCCGACGCTGAAGTGACTGACGACCACATCTACGAGGAGAACACTGATCGTAAAGTGGTCCGAGGAAGTCGGA
GGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCCGGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTCCGCTGATAGAATTTGCCG
GAACTAACAGAGCAGCAACAGACAGGGCGACGAACCCTATCCACCGGCCAGAATGTGAGCACTGTGATAGGCTTCGACGCGCTTGCTGCTGCCG
TAGCGTTCCTTGGCTGGGTATCAAGAGGACGTACCGACATTTTTCCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACCCGAGCACGAGGTGCC
TGAATCAGGCGAAGATAGGGAGGATGCCCCCAGTAG

>TgChBrUD1

TTTTTTTCGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGGCGCTTTGCCCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCGTCAGATGACGAACTGATGAGTCG
AATCCGAAATTTCTGACTTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGGCAGTCTCAGACCGACGAACGCCGGTGTGACTCGAAAGGGACCGACGATCAC
CTCACCACCAGCATGGATAAGGCATCTGTAGAGAGTCAGCTTCCGAGAAGAGAGCCATTGGAGACGGAGCCAGATGAACAAGAAGAAGTTCATT
TCAGGAAGCGAGGCGTCCGTTCCGACGCTGAAGTGACTGACGACCACATCTACGAGGAGCACACTGATCGTAAAGTGGTCCGAGGAAGTCGGA
GGGCAAGCGAAGCTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCCGGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTCCGCTGATAGAATTTGCCG
AACTAACAGAGCAGCAACAGACAGGGCGACGAACCCTATCCACCGGCCAGAATGTGAGCACTGTGATAGGCTTCGACGCGCTTGCTGCTGCCG
AGCGTTCCTTGGCTGGGTGATCAAGAGGACGTACCGACATTTTTCCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACCCGAGCACGAGGTGCC
TGAATCAGGCGAAGATAGGGAGGATGCCCCCAGTAG

>TgChBrUD5

TTTTTTCCGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGGCGCTTTGCCCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCGTCAGATGACGAACTGATTGAGTCG
AATCCGAAATTTCTGACTTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGACGAACGCCGGTGTGACTCGAAAGGGACCGACGATCA
CCTCACCACCAGCATGGATAAGGCATCTGTAGAGAGTCAGCTTCCGAGAAGAGAGCCATTGGAGACGGAGCCAGATGAACAAGAAGAAGTTCAT
TTCAGGAAGCGAGGCGTCCGTTCCGACGCTGAAGTGACTGACGACAACATCTACGAGGAGCACACTGATCGTAAAGTGGTCCGAGGAAGTCGGA
GGGCAAGCGAAGCTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCCGGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTCCGCTGATAGACTTGTGCC
GAACTAACAGAGGAGCAACAGAGAGGGCGACGAACCCTAACCCCGGCCAGAATGTGGGCACTGTGTTAGGCTTCGACGCGCTTGCTGCTGCC
GCAGCGTTTCCTTGGCATGGGTCTCACGAGGACGTACCGACATTTTTCCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACTCGAGCAAGAGGTGC
CTGAATCAGGCGAAGATGGGGAGGATGCCCCCAGTAG

GRA7 GENE MARKER ALIGNMENT

```

          10          20          30          40          50          60
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      TTTTTTTCGCGCTTTGTGTTT TAGGCCTGGTGGCGGCGGCTTTGC CCCAGTTCGCTACCG
TgChBrUD1 TTTTTTTCGCGCTTTGTGTTT TAGGCCTGGTGGCGGCGGCTTTGC CCCAGTTCGCTACCG
II       TTTTTTTCGCGCTTTGTGTTT TAGGCCTGGTGGCGGCGGCTTTGC CCCAGTTCGCTACCG
I        TTTTTTTCGCGCTTTGTGTTT TAGGCCTGGTGGCGGCGGCTTTGC CCCAGTTCGCTACCG
TgChBrUD5 TTTTTTTCGCGCTTTGTGTTT TAGGCCTGGTGGCGGCGGCTTTGC CCCAGTTCGCTACCG
#####
          70          80          90          100         110         120
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      CGGCCACCGCGTCGATGACGAACTGA-TGAGTCGAATCCGAAATTCTGAC-TTTTTCGA
TgChBrUD1 CGGCCACCGCGTCAGATGACGAACTGA-TGAGTCGAATCCGAAATTCTGAC-TTTTTCGA
II       CGGCCACCGCGTCAGATGACGAACTGA-TGAGTCGAATCCGAAATTCTGAC-TTTTTCGA
I        CGGCCACCGCGTCAGATGACGAACTGA-TGAGTCGAATCCGAAATTCTGAC-TTTTTCGA
TgChBrUD5 CGGCCACCGCGTCAGATGACGAACTGA-TGAGTCGAATCCGAAATTCTGAC-TTTTTCGA
#####
          130         140         150         160         170         180
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      TGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGACGAACGCCGGTGTGCGACTCGAAAGGGAC
TgChBrUD1 TGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGACGAACGCCGGTGTGCGACTCGAAAGGGAC
II       TGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGACGAACGCCGGTGTGCGACTCGAAAGGGAC
I        TGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGACGAACGCCGGTGTGCGACTCGAAAGGGAC
TgChBrUD5 TGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGACGAACGCCGGTGTGCGACTCGAAAGGGAC
#####
          190         200         210         220         230         240
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      CGACGATCACCTCACCACCAGCATGGATAAAGGCATCTGTAGAGAGTCAGCTTCCGAGAAG
TgChBrUD1 CGACGATCACCTCACCACCAGCATGGATAAAGGCATCTGTAGAGAGTCAGCTTCCGAGAAG
II       CGACGATCACCTCACCACCAGCATGGATAAAGGCATCTGTAGAGAGTCAGCTTCCGAGAAG
I        CGACGATCACCTCACCACCAGCATGGATAAAGGCATCTGTAGAGAGTCAGCTTCCGAGAAG
TgChBrUD5 CGACGATCACCTCACCACCAGCATGGATAAAGGCATCTGTAGAGAGTCAGCTTCCGAGAAG
#####
          250         260         270         280         290         300
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

```

III AGAGCCATTGGAGACGGAGCCAGATGAACAAGAAGAAGTTCATTTTCAGGAAGCGAGGCGT
 TgChBrUD1 AGAGCCATTGGAGACGGAGCCAGATGAACAAGAAGAAGTTCATTTTCAGGAAGCGAGGCGT
 II AGAGCCATTGGAGACGGAGCCAGATGAACAAGAAGAAGTTCATTTTCAGGAAGCGAGGCGT
 I AGAGCCATTGGAGACGGAGCCAGATGAACAAGAAGAAGTTCATTTTCAGGAAGCGAGGCGT
 TgChBrUD5 AGAGCCATTGGAGACGGAGCCAGATGAACAAGAAGAAGTTCATTTTCAGGAAGCGAGGCGT
 #####

310 320 330 340 350 360

=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III CGTTCCGACGCTGAAGTGAAGTACTGACGACCAACATCTACGAGGAGCAACTGATCGTAAAGT
 TgChBrUD1 CGTTCCGACGCTGAAGTGAAGTACTGACGACCAACATCTACGAGGAGCAACTGATCGTAAAGT
 II CCGTTCCGACGCTGAAGTGAAGTACTGACGACCAACATCTACGAGGAGCAACTGATCGTAAAGT
 I CCGTTCCGACGCTGAAGTGAAGTACTGACGACCAACATCTACGAGGAGCAACTGATCGTAAAGT
 TgChBrUD5 CCGTTCCGACGCTGAAGTGAAGTACTGACGACCAACATCTACGAGGAGCAACTGATCGTAAAGT
 #####

370 380 390 400 410 420

=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III GGTTCGGAGGAAGTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCT
 TgChBrUD1 GGTTCGGAGGAAGTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCT
 II GGTTCGGAGGAAGTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCT
 I GGTTCGGAGGAAGTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCT
 TgChBrUD5 GG-TCCGAGGAAGTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCT
 ## #####

430 440 450 460 470 480

=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III GCC--GGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGAATTCGCCGGAACCTA
 TgChBrUD1 GCC--GGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGAATTCGCCGGAACCTA
 II GCC--GGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGAATTCGCCGGAACCTA
 I GCC--GGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGACTTCGTCGCCGGAACCTA
 TgChBrUD5 GCCCGGGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGACTTCGTCGCCGGAACCTA
 ## #####

490 500 510 520 530 540

=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III ACAGAGCAGCAACAGACAGGCGACGAACCCCTATCCACCGCCAGAATGTGAGCACTGTG
 TgChBrUD1 ACAGAGCAGCAACAGACAGGCGACGAACCCCTATCCACCGCCAGAATGTGAGCACTGTG
 II ACAGAGCAGCAACAGACAGGCGAAACCCCTAACCCCGCCAGAATGTGAGCACTGTG

I ACAGAGCAGCAACAGAGAGGGCGACGAACCCCTAACACCACGGCCAGAATGTGGGCACTGTG
 TgChBrUD5 ACAGAGCAGCAACAGAGAGGGCGACGAACCCCTAACACCACGGCCAGAATGTGGGCACTGTG
 #####

550 560 570 580 590 600

=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III ATAGGCTTCGCAGCGCTTGCTGCTGCCGTAGCGTTCCTTGGCCTGGGT-ATCAAAGAGGAC
 TgChBrUD1 ATAGGCTTCGCAGCGCTTGCTGCTGCCGTAGCGTTCCTTGGCCTGGGTGATCAAAGAGGAC

II TTAGGCTTCGCAGCGCTTGCTGCTGCCCGAGCGTTCCTTGGCATGGGT-CTCAGAGGAC
 I TTAGGCTTCGCAGCGCTTGCTGCTGCCCGAGCGTTCCTTGGCATGGGT-CTCAGAGGAC

TgChBrUD5 TTAGGCTTCGCAGCGCTTGCTGCTGCCCGAGCGTTCCTTGGCATGGGT-CTCAGAGGAC
 #####

610 620 630 640 650 660

=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III GTACCGACATTTTTCCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACCGAGCAAGAGGT
 TgChBrUD1 GTACCGACATTTTTCCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACCGAGCAAGAGGT

II GTACCGACATTTTTCCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACTCGAGCAAGAGGT
 I GTACCGACATTTTTCCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACTCGAGCAAGAGGT

TgChBrUD5 GTACCGACATTTTTCCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACTCGAGCAAGAGGT
 #####

670 680 690 700

=====+=====+=====+=====+

III GCCTGAATCAGGCGAAGATAAGGAGGATGCCCGCCAGTAG
 TgChBrUD1 GCCTGAATCAGGCGAAGATAAGGAGGATGCCCGCCAGTAG

II GCCTGAATCAGGCAAGATAGGAGGATGCCCGCCAGTAG
 I GCCTGAATCAGGCGAAGATAGGAGGATGCCCGCCAGTAG

TgChBrUD5 GCCTGAATCAGGCGAAGATAGGAGGATGCCCGCCAGTAG
 #####

SAG1 GENE MARKER

>TYPE I

ATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGACGAGTATGTTTCCGAAGGCAGTGAGACGCGCCGTACGGCAGGGGTGT
 TTGCCGCGCCACACTGATGTCGTCTTTCGATGTGGCGTTATGGCATCGGATCCCCCTCTTGTTGCCAATCAAGTTGTACCTGCTCATCGGT
 CGTCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGCAGACAGCACTCTTGGTCCGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAACCCG
 TGGCAGGGTAACGCTTCGAGTGATAAGGGTGCCACGCTAACGATCAAGAAGGAAGCATTTCCAGCCGAGTCAAAAAGCGTCATTATTGGATGCA
 CAGGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTGAAACTGGAGTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAAATCGGCTGCGGGAACAGCCAGTCA
 CGTTTCCATTTTTGCCATGGTGATCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTCGCGTGA

>TYPE II

ATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGGCGAGTATGTTTCCGAAGGCAGTGAGACGCGCCGTCACGGCAGGGGTGT
 TTGCCGCGCCCACTGATGTCGTTCTTGGCATGTGGCGTATGGCATCGGATCCCCCTCTGTTGCCAATCAAGTTGTACCTGCTCATCGGT
 CGTCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGCAAACAGCACTCTTGGTCCGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCG
 TGGCAGGGTAACGCTTCGAGTGATAATGGTGCCACGCTAACGATCAACAAGGAAGCATTCCAGCCGAGTCAAAAAGCGTCATTATTGGATGCA
 CAGGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTGCAACTGGAGTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGTCTGCGGGAACAGCCAGTCA
 CGTTTCCATTTTCGCCATGGTGACCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTCGCGTGA

>TYPE III

ATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGGCGAGTATGTTTCCGAAGGCAGTGAGACGCGCCGTCACGGCAGGGGTGT
 TTGCCGCGCCCACTGATGTCGTTCTTGGCATGTGGCGTATGGCATCGGATCCCCCTCTGTTGCCAATCAAGTTGTACCTGCTCATCGGT
 CGTCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGCAAACAGCACTCTTGGTCCGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCG
 TGGCAGGGTAACGCTTCGAGTGATAATGGTGCCACGCTAACGATCAACAAGGAAGCATTCCAGCCGAGTCAAAAAGCGTCATTATTGGATGCA
 CAGGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTGCAACTGGAGTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGTCTGCGGGAACAGCCAGTCA
 CGTTTCCATTTTCGCCATGGTGACCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTCGCGTGA

>TgChBrUDI

ATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGACGAGTATGTTTCCGAGGCAGTGAGACGCGCCGTCACGGCAGGGGTGTT
 TGCCGCGCCCACTGATGTCGTTCTTGGCATGTGGCGTATGGCATCGGATCCCCCTCTGTTGCCAATCAAGTTGTACCTGCTCATCGGT
 CGTCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGACAGCAGCACTCTTGGTCCGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCG
 TGGCAGGGTAACGCTTCGAGTGATAAAGGGTGCCACGCTAACGATCAAGAAGGAAGCATTCCAGCCGAGTCAAAAAGCGTCATTATTGGATGCA
 CAGGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTGAAACTGGAGTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGGCTGCGGGAACAGCCAGTCA
 CGTTTCCATTTTGCCATGGTGATCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTCGCGTGA

>TgChBrUD5

ATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGACGAGTATGTTTCCGGGCAGTGAGACGCGCCGTCACGGCAGGGGTGTTT
 GCCGCGCCCACTGATGTCGTTCTTGGCATGTGGCGTATGGCATCGGATCCCCCTCTGTTGCCAATCAAGTTGTACCTGCTCATCGGTGCG
 TCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGACAGCAGCACTCTTGGTCCGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTG
 GCAGGGTAACGCTTCGAGTGATAAAGGGTGCCACGCTAACGATCAAGAAGGAAGCATTCCAGCCGAGTCAAAAAGCGTCATTATTGGATGCACA
 GGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTGAAACTGGAGTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGGCTGCGGGAACAGCCAGTCAAG
 TTCCATTTTGCCATGGTGATCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTCGCGTGA

SAG1 ALIGNMENT

	10	20	30	40	50	60
II	=====+=====+=====+=====+=====+=====+					
II	ATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGGCGAGTATGTTTCCG					
III	ATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGGCGAGTATGTTTCCG					
TgChBrUDI	ATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGACGAGTATGTTTCCG					
I	ATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGACGAGTATGTTTCCG					
TgChBrUD5	ATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGACGAGTATGTTTCCG					
	#####					

```

          70          80          90          100         110         120
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
II      AAGGCAGTGAGACGCGCCGTCACGGCAGGGGTGTTGCCGCG-CCCACACTGATGTCGTT
III     AAGGCAGTGAGACGCGCCGTCACGGCAGGGGTGTTGCCGCG-CCCACACTGATGTCGTT
TgChBrUDI -AGGCAGTGAGACGCGCCGTCACGGCAGGGGTGTTGCCGCGCCCCACACTGATGTCGTT
I       AAGGCAGTGAGACGCGCCGTCACGGCAGGGGTGTTGCCGCG-CCCACACTGATGTCGTT
TgChBrUD5 --GGCAGTGAGACGCGCCGTCACGGCAGGGGTGTTGCCGCG-CCCACACTGATGTCGTT
#####
          130         140         150         160         170         180
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
II      CTTGCGATGTGGCGCTATGGCATCGGATCCCCCTCTGTTGCCAATCAAGTTGTCACCTG
III     CTTGCGATGTGGCGCTATGGCATCGGATCCCCCTCTGTTGCCAATCAAGTTGTCACCTG
TgChBrUDI CTTGCGATGTGGCGTTTATGGCATCGGATCCCCCTCTGTTGCCAATCAAGTTGTCACCTG
I       CTTGCGATGTGGCGTTTATGGCATCGGATCCCCCTCTGTTGCCAATCAAGTTGTCACCTG
TgChBrUD5 CTTGCGATGTGGCGTTTATGGCATCGGATCCCCCTCTGTTGCCAATCAAGTTGTCACCTG
#####
          190         200         210         220         230         240
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
II      CTCATCGGTCGTCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGCAAAACAGCACTCTTGGTCC
III     CTCATCGGTCGTCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGCAAAACAGCACTCTTGGTCC
TgChBrUDI CTCATCGGTCGTCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGCACAGACAGCACTCTTGGTCC
I       CTCATCGGTCGTCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGCACAGACAGCACTCTTGGTCC
TgChBrUD5 CTCATCGGTCGTCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGCACAGACAGCACTCTTGGTCC
#####
          250         260         270         280         290         300
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
II      GAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGCTTC
III     GAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGCTTC
TgChBrUDI GAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGCTTC
I       GAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGCTTC
TgChBrUD5 GAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGCTTC
#####
          310         320         330         340         350         360
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

```

```

II      GAGTGATAATGGTGCCACGCTAACGATCAACAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAAAAG
III     GAGTGATAATGGTGCCACGCTAACGATCAACAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAAAAG
TgChBrUDI GAGTGATAAGGGTGCCACGCTAACGATCAAGAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAAAAG
I       GAGTGATAAGGGTGCCACGCTAACGATCAAGAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAAAAG
TgChBrUD5 GAGTGATAAGGGTGCCACGCTAACGATCAAGAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAAAAG

#####

          370      380      390      400      410      420
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
II      CGTCATTATTGGATGCACAGGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTGC AACTGGA
III     CGTCATTATTGGATGCACAGGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTGC AACTGGA
TgChBrUDI CGTCATTATTGGATGCACAGGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTGC AACTGGA
I       CGTCATTATTGGATGCACAGGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTGC AACTGGA
TgChBrUD5 CGTCATTATTGGATGCACAGGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTGC AACTGGA

#####

          430      440      450      460      470      480
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
II      GTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGTCTGCGGGAACAGCCAGTCACGTTTCCAT
III     GTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGTCTGCGGGAACAGCCAGTCACGTTTCCAT
TgChBrUDI GTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGGCTGCGGGAACAGCCAGTCACGTTTCCAT
I       GTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGGCTGCGGGAACAGCCAGTCACGTTTCCAT
TgChBrUD5 GTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGGCTGCGGGAACAGCCAGTCACGTTTCCAT

#####

          490      500      510      520      530
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
II      TTTGCCATGGTGATCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTCGCGTGA
III     TTTGCCATGGTGATCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTCGCGTGA
TgChBrUDI TTTGCCATGGTGATCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTCGCGTGA
I       TTTGCCATGGTGATCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTCGCGTGA
TgChBrUD5 TTTGCCATGGTGATCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTCGCGTGA

#####

```

PK1 GENE MARKER

>TYPE I

GCGAGAGTGTTACTCCGATGCGAGTGGCAACATGTTCCGAGCGCAATACCTTATGTGTAGACTGCGCAACATAATCCAACAGTGTACATGCT
GACCCGCGTATCAGGGGCTTTTTGTTGCCATATGCTTTTCATAAGCAGTAGGGCACAATGGAAGACGATTTTGTCCAGACTGTTTCCGCACC

TGAATTTGCCACGTGCAGGTCATGCACAATTTTCTCTAGTGTAACCAAAGTACACCTGTATTAGGTCTGAAAGAGAGAGTTTTGCTAGTTGAG
 ATCTATAGCCAACTTGTAGTTTGGTGGCCTGGTACCAGTTTCGCGTTCGTTGGGCACACGTTTTTCGCCGTGATGCAAAGTGCACGTTGTCACCA
 CCAGGAGAGATCGTTGCAATCAAGCTTATAAACAAAAGATCATTCACAGAGATCACCGATGCTGACCGCGTTTTTCGTCGAGATCCAGGTAACGT
 ATTGACCACTCTACGAGACAGCTTGTCTGGAGAACGGTTCTTCACGACTGATGAACATACGTCACATGCATTTCGTTATTTCGCCATTTGGCAG
 CAGATGATTAGAGTCGCTGCTGACACATTCCAAACAGTTTTTTACTCCATGAAGAAGAG

>TYPE II

GCGAGAGTGTACTGCGATGCGAGTGGCAACGTGTTTCGGAGCGCAATACCTTATGTGTAGACTGCGCAACATAATCCCAACAGTGTACATGCT
 GACCCGAGTATCAGGGGCTTTTTTGTGCCCATATGCTTTTCATAAGCAGTAGGGCACAATGGAAGACGATTTTGTCCAGACTGTTTCCGCACC
 TGAATTTGCCACGTGCAGGTCATGCACAATTTTCTCTAGTGTAACCAAAGTACACCTGTATTAGGTCTGAAAGAGAGAGTTTTGCTAGTTGAG
 ATCTATAGCCAACTTGTAGTTTGGTGGCCTGGTACCAGTTTCGCGTTCGTTGGGCACACGTTTTTCGCCGTGATGCAAAGTGCACGTTTGTACCA
 CCAGGAGAGATCGTTGCAATCAAGCTTATAAACAAAAGATCATTCACAGAGATCACCGATGCTGACCGCGTTTTTCGTCGAGATCCAGGTAACGT
 ACTGACCACTCTACGAGACAGCTTGTCTGGAGAACGGTTCTTCACGACTGATGAACATACGTCACATGCACGTTATTTCGCCATTTGGCAG
 CAGATGATTAGAGTCGCTGCCGACACATTCCAAACAGTTTTTTACTCCATGAAGAAGAG

>TYPE III

GCGAGAGTGTACTCCGATGCGAGTGGCAACGTGTTTCGGAGCGCAATACCTTATGTGTAGACTGCGCAACATAATCCCAACAGTGTACATGCT
 GACCCGCGTATCAGGGGCTTTTTTGTGCCCATATGCTTTTCATAAGCAGTAGGCACAATGGAAGACGATTTTGTCCAGACTGTTTCCGCACCT
 GAATTTGCCACGTGCAGGTCATGCACAATTTTCTCTAGTGTAACCAAAGTACACCTGTATTAGGTCTGAAAGAGAGAGTTTTGCTAGTTGAGA
 TCTATAGCCAACTTGAAGTTTGGTGGCCTGGTACCAGTTTCGTTTCGTTGGGCACACGTTTTTCGCCATGATGCAAAGTGCACGTTTGTACCCAC
 CAGGAGAGATCGTTGCAATCAAGCTTATAAACAAAAGATCATTCACAGAGATCACCGATGCTGACCGCGTTTTTCGTCGAGATCCAGGTAACGTA
 CTGACCACTCTACGAGACAGCTTGTCTGGAGAACGGTTCTTCACGACTGATGAACATACGTCACATGCATTTCGTTATTTCGCCATTTGCAGC
 AGATGATTAGAGTCGCTGCCGACACATTCCAAACAGTTTTTTACTCCATGAAGAAGAG

>TgChBrUD1

GCGAGAGTGTACTGCGATGCGAGTGGCAACGTGTTTCGGAGCGCAATACCTTATGTGTAGACTGCGCAACATAATCCCAACAGTGTACATGCT
 GACCCGAGTATCAGGGGCTTTTTTGTGCCCATATGCTTTTCATAAGCAGTAGGGCACAATGGAAGACGATTTTGTCCAGACTGTTTCCGCACC
 TGAATTTGCCACGTGCAGGTCATGCACAATTTTCTCTAGTGTAACCAAAGTACACCTGTATTAGGTCTGAAAGAGAGAGTTTTGCTAGTTGAG
 ATCTATAGCCAACTTGTAGTTTGGTGGCCTGGTACCAGTTTCGCGTTCGTTGGGCACACGTTTTTCGCCGTGATGCAAAGTGCACGTTTGTACCA
 CCAGGAGAGATCGTTGCAATCAAGCTTATAAACAAAAGATCATTCACAGAGATCACCGATGCTGACCGCGTTTTTCGTCGAGATCCAGGTAACGT
 ACTGACCACTCTACGAGACAGCTTGTCTGGAGAACGGTTCTTCACGACTGATGAACATACGTCACATGCACGTTATTTCGCCATTTGGCAG
 CAGATGATTAGAGTCGCTGCCGACACATTCCAAACAGTTTTTTACTCCATGAAGAAGAG

>TgChBrUD5

GCGAGAGTGTACTCCGATGCGAGTGGCAACATGTTTCGGAGCGCAATACCTTATGTGTAGACTGCGCAACATAATCCCAACAGTGTACATGCT
 GACCCGCGTATCAGGGGCTTTTTTGTGCCCATATGCTTTTCATAAGCAGTAGGGCACAATGGAAGACGATTTTGTCCAGACTGTTTCCGCACCT
 GAATTTGCCACGTGCATGACCTGCACAATTTTCTCTAGTGTAACCAAAGTACACCTGTATTAGGTCTGAAAGAGAGAGTTTTGCTAGTTGAGA
 TCTATAGCCAACTTGTAGTTTGGTGGCCTGGTACCAGTTTCGCGTTCGTTGGGCACACGTTTTTCGCCGTGATGCAAAGTGCACGTTGTCACCAC
 CAGGAGAGATCGTTGCAATCAAGACTTATAAACAAAAGATCATTCACAGAGATCACCGATGCTGACCGCGTTTTTCGTCGAGATCCAGGTAACGT
 ATTGACCACTCTACGAGACAGCTTGTCTGGAGAACGGTTCTTCACGACTGATGAACATACGTCACATGCATTTCGTTATTTCGCCATTTGGCA
 GCAGATGATTAGAGTCGCTGCTGACACATTCCAAACAGTTTTTTACTCCATGAAGAAGAG

PK1 GENE ALIGNMENT

```

10      20      30      40      50      60
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III     GCGAGAGTGTACTCCGATGCGAGTGGCAACGTGTTCCGAGCGCAATACCTTATGTGTAG
II      GCGAGAGTGTACTCGATGCGAGTGGCAACGTGTTCCGAGCGCAATACCTTATGTGTAG
TgChBrUD1 GCGAGAGTGTACTCGATGCGAGTGGCAACGTGTTCCGAGCGCAATACCTTATGTGTAG
I       GCGAGAGTGTACTCCGATGCGAGTGGCAACA TGTTCGGAGCGCAATACCTTATGTGTAG
TgChBrUD5 GCGAGAGTGTACTCCGATGCGAGTGGCAACA TGTTCGGAGCGCAATACCTTATGTGTAG
#####

70      80      90      100     110     120
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III     ACTGCGCAACATAATCCCAACAGTGTACATGCTGACCCGCGTATCAGGGGCTTTTTTGT
II      ACTGCGCAACATAATCCCAACAGTGTACATGCTGACCCGA GTATCAGGGGCTTTTTTGT
TgChBrUD1 ACTGCGCAACATAATCCCAACAGTGTACATGCTGACCCGA GTATCAGGGGCTTTTTTGT
I       ACTGCGCAACATAATCCCAACAGTGTACATGCTGACCCGCGTATCAGGGGCTTTTTTGT
TgChBrUD5 ACTGCGCAACATAATCCCAACAGTGTACATGCTGACCCGCGTATCAGGGGCTTTTTTGT
#####

130     140     150     160     170     180
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III     TGCCCATATGCTTTCATAAGCAGTA GGCACAATGGAAGACGATTTTGTCCAGACTGTT
II      TGCCCATATGCTTTCATAAGCAGTAG GGCACAATGGAAGACGATTTTGTCCAGACTGTT
TgChBrUD1 TGCCCATATGCTTTCATAAGCAGTAG GGCACAATGGAAGACGATTTTGTCCAGACTGTT
I       TGCCCATATGCTTTCATAAGCAGTAG GGCACAATGGAAGACGATTTTGTCCAGACTGTT
TgChBrUD5 TGCCCATATGCTTTCATAAGCAGTAG GGCACAATGGAAGACGATTTTGTCCAGACTGTT
#####

190     200     210     220     230     240
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III     TCCGCACCTGAATTGCCACGTGCAGGTCATGCACAATTTTCTCTAGTGTAACCAAAGT
II      TCCGCACCTGAATTGCCACGTGCAGGTCATGCACAATTTTCTCTAGTGTAACCAAAGT
TgChBrUD1 TCCGCACCTGAATTGCCACGTGCAGGTCATGCACAATTTTCTCTAGTGTAACCAAAGT
I       TCCGCACCTGAATTGCCACGTGCAGGTCATGCACAATTTTCTCTAGTGTAACCAAAGT
TgChBrUD5 TCCGCACCTGAATTGCCACGTGCATGACCTGCACAATTTTCTCTAGTGTAACCAAAGT
#####

```

```

                250      260      270      280      290      300
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      ACACCTGTATTAGGTCTGAAAGAGAGAGTTTTGCTAGTTGAGATCTATAGCCAACTTGA
II       ACACCTGTATTAGGTCTGAAAGAGAGAGTTTTGCTAGTTGAGATCTATAGCCAACTTGT
TgChBrUD1 ACACCTGTATTAGGTCTGAAAGAGAGAGTTTTGCTAGTTGAGATCTATAGCCAACTTGT
I        ACACCTGTATTAGGTCTGAAAGAGAGAGTTTTGCTAGTTGAGATCTATAGCCAACTTGT
TgChBrUD5 ACACCTGTATTAGGTCTGAAAGAGAGAGTTTTGCTAGTTGAGATCTATAGCCAACTTGT
#####

                310      320      330      340      350      360
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      GTTTGGTGGCCTGGTACCAGTTTCGTTGTCGTTGGGCACACGTTTTCGCCATGATGCAAA
II       GTTTGGTGGCCTGGTACCAGTTTCGCGTTCGTTGGGCACACGTTTTCGCCGTGATGCAAA
TgChBrUD1 GTTTGGTGGCCTGGTACCAGTTTCGCGTTCGTTGGGCACACGTTTTCGCCGTGATGCAAA
I        GTTTGGTGGCCTGGTACCAGTTTCGCGTTCGTTGGGCACACGTTTTCGCCGTGATGCAAA
TgChBrUD5 GTTTGGTGGCCTGGTACCAGTTTCGCGTTCGTTGGGCACACGTTTTCGCCGTGATGCAAA
#####

                370      380      390      400      410      420
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      GTGCACCTTGTCAACCACCAGGAGAGATCGTTGCAATCAAGCTTATAAACAAAAGATCAT
II       GTGCACCTTGTCAACCACCAGGAGAGATCGTTGCAATCAAGCTTATAAACAAAAGATCAT
TgChBrUD1 GTGCACCTTGTCAACCACCAGGAGAGATCGTTGCAATCAAGCTTATAAACAAAAGATCAT
I        GTGCACCTTGTCAACCACCAGGAGAGATCGTTGCAATCAAGCTTATAAACAAAAGATCAT
TgChBrUD5 GTGCACCTTGTCAACCACCAGGAGAGATCGTTGCAATCAAGCTTATAAACAAAAGATCAT
#####

                430      440      450      460      470      480
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      TCAACGAGATCACCGATGCTGACCGCGTTTTTCGTCGAGATCCAGGTAACGTAAGTACTGACCAC
II       TCAACGAGATCACCGATGCTGACCGCGTTTTTCGTCGAGATCCAGGTAACGTAAGTACTGACCAC
TgChBrUD1 TCAACGAGATCACCGATGCTGACCGCGTTTTTCGTCGAGATCCAGGTAACGTAAGTACTGACCAC
I        TCAACGAGATCACCGATGCTGACCGCGTTTTTCGTCGAGATCCAGGTAACGTAAGTACTGACCAC
TgChBrUD5 TCAACGAGATCACCGATGCTGACCGCGTTTTTCGTCGAGATCCAGGTAACGTAAGTACTGACCAC
#####

                490      500      510      520      530      540
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      TCTACGAGACAGCTTGTCTGGAGAACGGTCTTCACGTAAGTACTGATGAACATACGTCACA

```

```

II      TCTACGAGACAGCTTGTTCCTGGAGAACGGTTCTTCACGTA  

TgChBrUD1 TCTACGAGACAGCTTGTTCCTGGAGAACGGTTCTTCACGTA  

I      TCTACGAGACAGCTTGTTCCTGGAGAACGGTTCTTCACGTA  

TgChBrUD5 TCTACGAGACAGCTTGTTCCTGGAGAACGGTTCTTCACGTA  

#####  

          550      560      570      580      590      600  

=====+=====+=====+=====+=====+=====+  

III     TGCATTTCGTTATTCGCCATTTGCAGCAGATGATTAGAGTCGCTGCCGACACATTCCAAA  

II      TGCATTCGTTATTCGCCATTTGGCAGCAGATGATTAGAGTCGCTGCCGACACATTCCAAA  

TgChBrUD1 TGCATTCGTTATTCGCCATTTGGCAGCAGATGATTAGAGTCGCTGCCGACACATTCCAAA  

I      TGCATTTCGTTATTCGCCATTTGGCAGCAGATGATTAGAGTCGCTGCTGACACATTCCAAA  

TgChBrUD5 TGCATTTCGTTATTCGCCATTTGGCAGCAGATGATTAGAGTCGCTGCTGACACATTCCAAA  

#####  

          610      620  

=====+=====+=====+  

III     CAG-TTTTTTACTCCATGAAGAAGAG  

II      CAG-TTTTTTACTCCATGAAGAAGAG  

TgChBrUD1 CAG-TTTTTTACTCCATGAAGAAGAG  

I      CAG-TTTTTTACTCCATGAAGAAGAG  

TgChBrUD5 CAGT-TTTTTTACTCCATGAAGAAGAG  

#####

```

ROP18 GENE MARKER

>TYPE I

```

TTATTCTGTGTGGAGATGTTCTCTGCTGTTTCGAAGTTTTCGCGGGCGCCTTTTACTACTGAATCCATCTCTTTAAACGCTGTCTCCAAGGCT
TGTAGCGGGAGCATCCGTTTCTGAGGATCTCGATTCAAGAGGCTTCGGATGAGGTCTTGAACCAGCTCAGGCGTGAAGGACAATCTGCGAAGT
GTAAGTAGTCCCAGATGCCGTCGGCCGGAGTTGGACGTTCTTGCACCAGATGCAGTACAAAAGTTATACCGAGTTGCCACGCGTCAGTGGGGAA
TGTATAGGTGATGCCTGTAGCCTGAAACGGTCGCTCCGGAGGCTCGTAACCGGGAGTACCTATCGCGCTCAACCGAATTATTGATTCTATAC
GTTCCGAAGTCGCCGAGAAACAGGCGACCGTCTTTCAAGAGGAGGAAATTCGCCGTTTGATATCCGTATGCACAATTCCCTGAGCTTGAACAT
TGGCCACTAGTTTGATTGCCTGACTGGATAGGTACATTCAACGACCAGGCCAAATTCACCTTTTATTGACAGACGCATCTCCAAATACCCATGA
AATGACTTTGCTCATGTCCGTTCTGCCCCGATCATGAGAAGAAAATAGTTTGGTACCCACCGAGTCGTCAAACCAATCACGACCTCTGTGGAT
GCTGGCTGTCCCTCTAACATCAACAATCACTAGGAACCTGAATCTACAGCTTTCTGGGCATCCTTCGCCGCTCTGGCTAGACTAAAGTTCC
TGTAGCAGGACGACTCCCTCTGCAAGTCAAGCATAGTCTCATCGGTGGGCTCCTTTTCTGACATGAAAACCTTAACAGCCAACCTCTTCATTCGT
CTCCACGCTGTAGCCTCATATACAGTGGCGAATCCACCAGAGCCAAGGGGTGCACCTCTCACCAGCGTCCGGGTTTACCAGGTTAGTCACAGAA
ACAAATCTTTTGGAACGTCGGAGGCCAGGCGGCAGTCAGAAATCTATCCAGTCGTTCACTATTTTCTAGCGCTTGAGGCTGCCCGATTT
GTTCTTGATGTGCCAGGATGCGTTTGGCGATGACGCATCCAGAATCCGCCTTCTCAAAAACCAATTCAGATCGCCGCTTTGTGCCCGCAA

```


ACTTCGCTGTCGGTTACGCCCTTGAGGAAAGTACCTCCGGATTCCGCGTTTGAATAACGATTCGCTCTACGCCAAAGTTGAGCAAGCCTCTGT
 CGTACGGACAGACGGGGTCTCGAGGAGCTATCAGCTGCGGAACCCGAGACTTCACCATCTCTTTCTCTCCGTCTCAAGAGATTCAGAAGCCTCT
 GAAAAATCGTGCGCCGTTGGTTTGTCTTCTGCGCATTTACCCGGTGTGAGCCCTTCTCCAGCAATGAAACGTCTCGAGTGCTTTCTGTGCG
 TCCTGCTAAATGTTTGTAGTGGCCAACTGTAGCAAGCCACCGCTTGTGAGCAACGTGCTGTTGCGAATCCAAACTTGTCCGGTTTGGAGTCGAGT
 TTTGAAGGACCAAGTGTGATTCGGTCCCATCCTGGACTTGAAGAGCAGGAAGACAAGCGCTACATTTAACCCCGAAGACAGGCTGTCTTCG
 GGAGAAGAGTCGCTAAACCCATTCCGGACGACGGTACGCGTAAGAGGTGGCCGCTGTACCGAAAACAT

>II

TTATTCTGTGTGGAGATGTTCTCTGCTGTTTCAAGTTTTGCGCGGCGCGTTTTACTACTGAATCCATCTCGTTAAACGCTGCGGTCTCCAAGGCT
 TGTAGCGGGAGCATCCGTTTCTGAGGCTCTCGATTCAAGAGGTTTCCGGATGAGGCTTGAACCAGCTCAGGCGTGAAGGACAATCTGCGAAGT
 GTAAGTAGTCCCAGATGCCGTCCGCCGGAGTTGGACGTTCTTGCACCAGATGCAGTACAAAAGTTATACCGAGTTGCCACGCGTCAGTGGTGAA
 TGTATAGGTGATGCTGTAGTCTGAAACGGTTCGCTCCGGAGGCTCGTAACCGGGAGTACCTATCGCGGGTCCAACCGAATTTATTGATTCTATAC
 GTTCCGAAGTCGCCGAGAAACAGGCGACCGTCTTTCAAGAGGAGGAAATTCGCCGGTTTGATATCCGTATGCACAATTCCTTGAGCTTGAACAT
 TGGCCACTAGTCTGATTGCCTGACTGGATAGGTACATTGAACGACCCAGGCTAATTCACTGTTATTGACAGACGCATCTCCAAATACCCATGA
 AATGACTTTGCTCATGTCCGTTTCTGCCCCGCATCATGAGAAGAAAATAGTTTGGTACCCACCGAGTCGTCAAACCAATCACGACCTCTGTGGAT
 GCTGGCTGTCCCTCTAACATCACAACATCACTAGGAACCATGAATCTACAGCGTCTTGGGCATCCTTCGCCGCTTGGCTAGACTAAAGTTCC
 TGTAGCAGAACGACTCCCTCTGCAAGTCACGCATAGTCTCATCGGTGGGCTCCTTTCTGACATGAAAACCTTAACAGCCAATCTTCATTCGT
 CTCACGCTCTGTAGCCTCATATACAGTGGCGAATCCACCAGAGCCAAGGGGTGCACCTCTCACCAGCGTCCGGGTTTACCAGGTAGTCACAGAA
 ACAAATCTTTCTGGAACGTCCGGAGGCCAGGCGAGCAGTCAGAATTTATCCAGTCGTTCACTATTTCTAGCGCTTGAGGCTGCCCGATTT
 GTTCTGTCATGTGCCCAGGATGCGTTTGGCGATGACGCATCCAGAATCCGCCTTCTCAAAAAACAATTCAGATCGCCGCTTTGTGCCCGCAA
 ACTTCGCAGTCGGTTACGCCCTTGAGAAAAGTACCTCCGGATTCCGCGTGTGAAGAACGATTTCCGCTTACGCCAAAGTTGAGCAAGCCTCTGT
 CGTACGGACAGACGGGGTCTCGAGGAGCTATCAGCTGCGGAACCCGAGACTTCACCATCTCTTTCTCTCCGTCTCAAGAGATTCAGAAGCCTCT
 GAAAAATCGTGCGCCGTTGGTTTGTCTTCTGCGCATTTACCCGGTGTGAGCCCTTCTCCAGCAATGAAACGTCTCGAGTGCTTTCTGTGCG
 TCCTGCTAAATATTTGTAGTGGCCAACTGTAGCAGGCCACCGCTTGTGAGCAACGTGCTGTTGCGAATCCAAACTTGTCCGGTTTGGAGTCGAGT
 TTTGAAGGATCAAGTGTGATTCGGTCCCATCCTGGACTTGAAGAGCAGGAAGACAAGCGCTACATTTAACCCCGAAGACAGGCTGTCTTCG
 GGAGAAGAGTCGCTAAACCCATTCCGGACGACGGTACGCGTAAGAGGTGGCCGCTGTACCGAAAACAT

>TYPE III

TTATTCTGTTTGTAGATGTTCTCTGCTGTTTCAAGTTTTGCGCGGCGCGTTTTACTACTGAATCCATCTCGTTAAACGCTGCTGTCTTCAAGGCT
 TGTAGCGGGAGCATCCGTTTCTGAGGCTCTCGATTCAAGAGGTTTCCGGATGAGGCTTGAACCAGCTCAGGCGTGAAGAACAAATCTGCGAAGT
 GTAATAGTCCCAGATGCCGTCCGCCGGAGTTGGACTTTCTTGCACCAGATGCAGTACAAAAGTTATACCGAGTTGCCAGGCGTCAGTGGCGAA
 TGTATAGGTGACGCCATAACTGTGAAACGGTGTCTCCGGAGGCTCGTAACCGGGAGTACCTATCGCGGGTCCAACCGAATTTATTGGTTTTATAC
 GTTCCGAAGTCGCCGAGAAACAGGCGACCGTCTTTCAAGAGGAGGAAATTCGCCGGTTTGATATCCGTATGCACAATTCCTTGAGCTTGAACAT
 TGGCCACTAGTCTTATTGCCTGACTGGATAGGTGCATTGAACGACTAGGCCTAATTCACTGTTATTGACAGACGCATCTCCAAATAACCATGA
 AATGACTTTGCTCATGTCCGTTTCTGCCCCGCATCATGAGAAGAAAATAGTTTGGTACCCACTTAGTCGCCGAACCAATCACGACCTCTGTGGTT
 GCTGGCTGTCCCTCTAGCGTCACAACATCACTAGCAACCATGAATCTCCAGTTTTCTGGGCATCCTTTGCCGCTTGGCTAGACTAAAGTTCT
 TGTAGCAGAACGACTCCCTCTCAAGTCACGCATAGTCTCATCGGTGGGCTTCTTTCTGATATGATAACCTTAACAGCCAATCTTCATTCGT
 CTCGACGCTGTAACTGATATACAGCGGCAATCCACCAGATCCAAGGGGTGCACCTCTCACCAGCGTCCGGGTTTACCAGGTAGTCAGAGAA
 ACAAATTTTGTGGAACGTCCGGAGGCCAGGCGCGGCGAGTCAGAATTCATCCAGTCGTTGACTACTTTCTAGCGCTTGGGCTGCTGATTT
 GTTCTGTCATGTGCCCAGGATGCGTTTGGCGATGACGCATCCAGAATCCGCCTTCTCAAAAAACAATCCAGATCGTCGCTTTGTGCCACCA
 ACTTCGCAGTCGGTTACGCCCTTGAGAATAGTACCTCCGGATTCCGTTGTGAAGAACGATTTCCGCTCTACGCCAAAGTTGAGCAAGCCTCTGT

CGTACGGACAGACGGGGTCTCGAGGGGCTATCTGCTGCGAAACCCGAGACTGCTCCATCTCTTTCTCTCCGTCTCAAGCGATTACAAAGCCTCT
 GAAAAGTCGTGCGCCGTTGGTTTGTCTTGCATATTTACCCCGTGTGAGCCCTTCTCCAGCAATGAAACGCTCTCGAGTGCTTTCTGTGCG
 TCCTGCTAGAGAATATTTGTAGTGGCCAACTGTAGCAGACCCCGCTGTGTAGCAACGTGCTGCTGCGAATCCAAACTTATAGTCGGTTTGGAG
 TCGAGCTTTGAAGGACGAAGTGTGATTCCGGTCCCATCTGGACTTGAAGAGCAGAAAGACAAGCGCTACAGTTAACCCCGCAAGACAGGCTG
 TCTCCGGAGAAGAGTCGCTAAACCCATTTCGGACGACGGTACACGTAAGAGATGGCCGCTGTACCGAAAACAT

>TgChBRUD1

TTATTCTGTGTGGAGATGTTCTCTGCTGTTTGAAGTTTTGCGCGGCGCCTTTACTACTGAATCCATCTCTTTAAACGCTGCTGTCTCCAAGGCT
 TGTAGCGGGAGCATCCGTTTCTGAGGATCTCGATTCAAGAGGCTTCGGATGAGGTCTTGAACCAGCTCAGGCGTGAAGGACAATCTGCGAAGT
 GTAAGTAGTCCCAGATGCCGTGCGCCGGAGTTGGACGTTCTTGCACCAGATGCAGTACAAAGTTATACCGAGTTGCCACGCGTCAGTGGGGAA
 TGTATAGGTGATGCCTGTAGCCTGAAACGGTGCCTCCGGAGGCTCGTAACCGGGAGTAGCTATCGCGCGTCCAACCGAATTATTGATTCTATAC
 GTTCCGAAGTCGCCGAGAAACAGGCGACCGTCTTTCAAAGGAGGAAATTCGCCGGTTTGATATCCGTATGCACAATTCCTGAGCTTGAACAT
 TGGCCACTAGTTTGATTGCCTGACTGGATAGGTACATTCGAACGACCAGGCCAAATTCACTTTTTATTGACAGACGCATCTCCAAATACCCATG
 AAATGACTTTGCTCATGTCCGTTCTGCCCGCATCATGAGAAGAAAATAGTTTGGTACCCACCGAGTCGTCAAACCAATCACGACCTCTGTGGA
 TGCTGGCTGTCCCTCTAACATCACAACTACTAGGAACCATGAATCTACAGCTTTCCTGGGCATCCTTCGCCGCTTTGACTAGACTAAAGTTC
 CTGTAGCAGGACGACTCCCTCTGCAAGTCAAGCATAGTCTCATCGGTGGGCTCCTTTTCTGACATGAAAACCTTAACAGCCAACCTTTCATTTCG
 TCTCCACGTCGTAGCCTCATATACAGTGGCGAATCCACCAGAGCCAAGGGGTGCACCTCTCACCAGCGTCCGGGTTTACCAGGTAGTCACAGA
 AACAAATCTTTTTGGAACGTCGGGAGGCCAGGCGGCGACAGTCAAGAAATCTATCCAGTTCGTTCACTATTTGCTAGCGCTTGAGGCTGCCCGATT
 TGTCTTGCATGTGCCCAGGATGCGTTTGCCTGATGACGCATCCAGAATCCGCTTCTCAAAAACCAATTCAGATCGCCGCTTTGTGCCCGCA
 AACTTCGCTGTCCGTTACGCCCTTGAGAAAAGTACCTCCGGATTCCGCGTTTGAATAACGATTTGCTCTACGCCAAAGTTGAGCAAGCCTCTG
 TCGTACGGACAGACGGGGTCTCGAGGAGCTATCAGCTGCGGAACCCGAGACTTCACCATCTCTTTCTCTCCGTCTCAAGAGATTGAGAAGCCTC
 TGAAAAATCGTGCCCGTTGGTTTGTCTTGCATTTTACCCGGTGTGAGCCCTTTCCTCCAGCAATGAAACGCTCTCGAGTGCTTTCTGTGCG
 CTCCTGCTAAATGTTTGTAGTGGCCAACTGTAGCAAGCCACCGCTTGTGCAACGTGCTGTTGCGAAACCAACTTGTCCGTTTGGAGTCGAG
 TTTTGAAGGACCAAGTGTGATTCCGGTCCCATCTGGACTTGAAGAGCAGGAAGACAAGCGCTACATTTAACCCCGCAAGACAGGCTGTCTTC
 GGGAGAAGAGTCGCTAAACCCATTTCGGACGACGGTACGCGTAAGAGGTGGCCGCTGTACCGAAAACAT

>TgChBrUD5

TTATTCTGTGTGGAGATGTTCTCTGCTGTTTGAAGTTTTGCGCGGCGCCTTTACTACTGAATCCATCTCTTTAAACGCTGCTGTCTCCAAGGCT
 TGTAGCGGGAGCATCCGTTTCTGAGGATCTCGATTCAAGAGGCTTCGGATGAGGTCTTGAACCAGCTCAGGCGTGAAGGACAATCTGCGAAGT
 GTAAGTAGTCCCAGATGCCGTGCGCCGGAGTTGGACGTTCTTGCACCAGATGCAGTACAAAGTTATACCGAGTTGCCACGCGTCAGTGGGGAA
 TGTATAGGTGATGCCTGTAGCCTGAAACGGTGCCTCCGGAGGCTCGTAACCGGGAGTAGCTATCGCGCGTCCAACCGAATTATTGATTCTATAC
 GTTCCGAAGTCGCCGAGAAACAGGCGACCGTCTTTCAAAGGAGGAAATTCGCCGGTTTGATATCCGTATGCACAATTCCTGAGCTTGAACAT
 TGGCCACTAGTTTGATTGCCTGACTGGATAGGTACATTCGAACGACCAGGCCAAATTCACTTTTTATTGACAGACGCATCTCCAAATACCCATGA
 AATGACTTTGCTCATGTCCGTTCTGCCCGCATCATGAGAAGAAAATAGTTTGGTACCCACCGAGTCGTCAAACCAATCACGACCTCTGTGGAT
 GCTGGCTGTCCCTCTAACATCAACAACATCCAACCTAGGAACCATGAATCTACAGCTTTCCTGGGCATCCTTCGCCGCTTTGACTAGACTAAAGT
 TCCTGTAGCAGGACGACTCCCTCTGCAAGTCAAGCATAGTCTCATCGGTGGGCTCCTTTTCTGACATGAAAACCTTAACAGCCAACCTTTCATT
 CGTCTCCCAGTCTGTAGCCTCATATACAGTGGCGAATCCACCAGACGCCAAGGGGTGCACCTCTCACCAGCGTCCGGGTTTACCAGGTAGTCA
 CAGAAACAAATCTTTTTGGAACGTCGGGAGGCCAGGCGGCAACAGTCAAGAAATCTATCCAGTTCGTTCACTATTTTGTAGCGCTTGAGGCTGCC
 GATTTGTTCTTGCATGTGCCCAGGATGCGTTTGCCTGATGGACGCATCCAGAATCCGCTTCTCAAAAACCAATTCAGATCGCCGCTTTGTGTC
 CCGCAAACCTTCGCTGTCCGTTACGCCCTTGAGAAAAGTACCTCCGGATTCCGCGTTTGAATAACGATTTGCTCTACGCCAAAGTTGAGCAAGC
 CTCTGTGCTACGGACAGACGGGGTCTCGAGGAGCTATCAGCTGCGGAACCCGAGACTTCACCATCTCTTTCTCTCCGTCTCAAGAGATTAGAA

GCCTCTGAAAAATCGTGCGCCGTTGGTTTGTTCCTTGCGCATTACCCGGTGTAGCCCTTTCCTCCAGCAATGAAACGTCTCGAGTGCTTTC
 TGTGCTCCTGCTAAATGTTTGTAGTGGCCAACTGTAGCAAGCCACCCTGTGTCAGCAACGTGCTGTTGCGAAACCAAATTGTCGGTTTGGAG
 TCGAGTTTGAAGGACCAAGTGTGATTCCGGTCCCATCCTGGACTTGAAGAGCAGGAAGACAAGCGCTACATTTAACCCCGCACGACAGGCTG
 TCTTCGGGAGAAGAGTCGCTAAACCCATTTCGGACGACGGTACGCGTAAGAGGTGGCCGCTGTACCGAAAACAT

ROP18 ALIGMENT

	10	20	30	40	50	60	
	=====+=====+=====+=====+=====+=====+						
III	TTATTCTGCTTGTAGATGTTCTGCTGTTTTCGAAGTTTTGCGCGGCGCTTTTACTACTGA						
II	TTATTCTGCTGTGGAGATGTTCTGCTGTTTTCGAAGTTTTGCGCGGCGCTTTTACTACTGA						
I	TTATTCTGCTGTGGAGATGTTCTGCTGTTTTCGAAGTTTTGCGCGGCGCTTTTACTACTGA						
TgChBrUD5	TTATTCTGCTGTGGAGATGTTCTGCTGTTTTCGAAGTTTTGCGCGGCGCTTTTACTACTGA						
TgChBRUD1	TTATTCTGCTGTGGAGATGTTCTGCTGTTTTCGAAGTTTTGCGCGGCGCTTTTACTACTGA						
	#####						
		70	80	90	100	110	120
	=====+=====+=====+=====+=====+=====+						
III	ATCCATCTGTTTAAACGCTGCTGTCTTCAAGGCTTGTAGCGGGAGCATCCGTTTCTGAGC						
II	ATCCATCTGTTTAAACGCTGCTGTTTCAAGGCTTGTAGCGGGAGCATCCGTTTCTGAGC						
I	ATCCATCTCTTTTAAACGCTGCTGTCTTCAAGGCTTGTAGCGGGAGCATCCGTTTCTGAGC						
TgChBrUD5	ATCCATCTCTTTTAAACGCTGCTGTCTTCAAGGCTTGTAGCGGGAGCATCCGTTTCTGAGC						
TgChBRUD1	ATCCATCTCTTTTAAACGCTGCTGTCTTCAAGGCTTGTAGCGGGAGCATCCGTTTCTGAGC						
	#####						
		130	140	150	160	170	180
	=====+=====+=====+=====+=====+=====+						
III	CTCTCGATTCAAGAGGTTTCGGATGAGGTCTTGAACCAGCTCAGGCGTGAAGACAATC						
II	CTCTCGATTCAAGAGGTTTCGGATGAGGTCTTGAACCAGCTCAGGCGTGAAGGACAATC						
I	ATCTCGATTCAAGAGGCTTCGGATGAGGTCTTGAACCAGCTCAGGCGTGAAGGACAATC						
TgChBrUD5	ATCTCGATTCAAGAGGCTTCGGATGAGGTCTTGAACCAGCTCAGGCGTGAAGGACAATC						
TgChBRUD1	ATCTCGATTCAAGAGGCTTCGGATGAGGTCTTGAACCAGCTCAGGCGTGAAGGACAATC						
	#####						
		190	200	210	220	230	240
	=====+=====+=====+=====+=====+=====+						
III	TGCGAAGTGTAAGTAGTCCCAGATGCCGTCGGCCGGAGTTGGACTTTCCTTGCACCAGAT						
II	TGCGAAGTGTAAGTAGTCCCAGATGCCGTCGGCCGGAGTTGGACGTTTCCTTGCACCAGAT						
I	TGCGAAGTGTAAGTAGTCCCAGATGCCGTCGGCCGGAGTTGGACGTTTCCTTGCACCAGAT						
TgChBrUD5	TGCGAAGTGTAAGTAGTCCCAGATGCCGTCGGCCGGAGTTGGACGTTTCCTTGCACCAGAT						

TgChBRUD1 TGCGAAGTGTAACTAGTCCAGATGCCGTCGGCCGGAGTTGGACGTTCCCTGCACCAGAT
#####

250 260 270 280 290 300
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III GCAGTACAAAGTTATACCGAGTTGCCA GCGTCAGTGG C GAATGTATAGGTGA GCCATA
II GCAGTACAAAGTTATACCGAGTTGCCACGCGTCAGTGG T GAATGTATAGGTGATG T CTGT
I GCAGTACAAAGTTATACCGAGTTGCCACGCGTCAGTGGGAATGTATAGGTGATGCCTGT
TgChBrUD5 GCAGTACAAAGTTATACCGAGTTGCCACGCGTCAGTGGGAATGTATAGGTGATGCCTGT
TgChBRUD1 GCAGTACAAAGTTATACCGAGTTGCCACGCGTCAGTGGGAATGTATAGGTGATGCCTGT
#####

310 320 330 340 350 360
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III ACTG TGAACGGT T CCTCCGAGGCTCGTAACCGGGAGTACCTATCGCG C GTCCAACCGA
II AG TCTGAACGGT CGCTCCGAGGCTCGTAACCGGGAGTACCTATCGCG C GTCCAACCGA
I AGCCTGAAACGGTCGCTCCGAGGCTCGTAACCGGGAGTACCTATCGCGCGTCCAACCGA
TgChBrUD5 AGCCTGAAACGGTCGCTCCGAGGCTCGTAACCGGGAGT G CTATCGCGCGTCCAACCGA
TgChBRUD1 AGCCTGAAACGGTCGCTCCGAGGCTCGTAACCGGGAGT G CTATCGCGCGTCCAACCGA
#####

370 380 390 400 410 420
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III ATTATTG C T T TATACGTTCCGAAGTCGCCGAGAAACAGGCGACCGTCTTTCAAGAGGAC
II ATTATTGATTCTATACGTTCCGAAGTCGCCGAGAAACAGGCGACCGTCTTTCAAGAGGAC
I ATTATTGATTCTATACGTTCCGAAGTCGCCGAGAAACAGGCGACCGTCTTTCAAGAGGAC
TgChBrUD5 ATTATTGATTCTATACGTTCCGAAGTCGCCGAGAAACAGGCGACCGTCTTTCA A AAGGAC
TgChBRUD1 ATTATTGATTCTATACGTTCCGAAGTCGCCGAGAAACAGGCGACCGTCTTTCA A AAGGAC
#####

430 440 450 460 470 480
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III GAAATTCG C CCGTTTGATATCCGTATGCACAATTCCTGAGCTTGAACATTGGCCACTAG
II GAAATTCGCCGGTTTGATATCCGTATGCACAATTCCTGAGCTTGAACATTGGCCACTAG
I GAAATTCGCCGGTTTGATATCCGTATGCACAATTCCTGAGCTTGAACATTGGCCACTAG
TgChBrUD5 GAAATTCGCCGGTTTGATATCCGTATGCACAATTCCTGAGCTTGAACATTGGCCACTAG
TgChBRUD1 GAAATTCGCCGGTTTGATATCCGTATGCACAATTCCTGAGCTTGAACATTGGCCACTAG
#####

```

          490      500      510      520      530      540
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      TCTTATTGCCTGACTGGATAGGTCGATTGCAACGACTAGGCCTAATTCAC-TGTTATTGA
II       TCTGATTGCCTGACTGGATAGGTACATTGCAACGACCAGGCCTAATTCAC-TGTTATTGA
I        TTTGATTGCCTGACTGGATAGGTACATTGCAACGACCAGGCCAAATTCAC-TTTTATTGA
TgChBrUD5  TTTGATTGCCTGACTGGATAGGTACATTGCAACGACCAGGCCAAATTCAC-TTTTATTGA
TgChBRUD1  TTTGATTGCCTGACTGGATAGGTACATTGCAACGACCAGGCCAAATTCAC-TTTTATTGA
          #####

          550      560      570      580      590      600
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      CAGACGCATCTCCAAATAACCATGAAATGACTTTGCTCATGTCCGT-TTCTGCCCGCATCA
II       CAGACGCATCTCCAAATACCCATGAAATGACTTTGCTCATGTCCGT-TTCTGCCCGCATCA
I        CAGACGCATCTCCAAATACCCATGAAATGACTTTGCTCATGTCCGTTCTGCCCGCATCA
TgChBrUD5  CAGACGCATCTCCAAATACCCATGAAATGACTTTGCTCATGTCCGTTCTGCCCGCATCA
TgChBRUD1  CAGACGCATCTCCAAATACCCATGAAATGACTTTGCTCATGTCCGTTCTGCCCGCATCA
          #####

          610      620      630      640      650      660
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      TGAGAAGAAAATAGTTTGGTACCCACTTAGTCGCCTGAACCAATCACGACCTCTGTGGTTC
II       TGAGAAGAAAATAGTTTGGTACCCACCGAGTCGTCAAACCAATCACGACCTCTGTGGATC
I        TGAGAAGAAAATAGTTTGGTACCCACCGAGTCGTCAAACCAATCACGACCTCTGTGGATC
TgChBrUD5  TGAGAAGAAAATAGTTTGGTACCCACCGAGTCGTCAAACCAATCACGACCTCTGTGGATC
TgChBRUD1  TGAGAAGAAAATAGTTTGGTACCCACCGAGTCGTCAAACCAATCACGACCTCTGTGGATC
          #####

          670      680      690      700      710      720
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      CTGGCTGTCCCTCTAGCCTC-ACAACATC--ACTAGCAACCATGAATCTCCAGTTTCCCT
II       CTGGCTGTCCCTCTAACATC-ACAACATC--ACTAGGAACCATGAATCTACAGCCTTCCCT
I        CTGGCTGTCCCTCTAACATC-ACAACATC--ACTAGGAACCATGAATCTACAGCTTCCCT
TgChBrUD5  CTGGCTGTCCCTCTAACATCAACAACATCAACTAGGAACCATGAATCTACAGCTTCCCT
TgChBRUD1  CTGGCTGTCCCTCTAACATC-ACAACATC--ACTAGGAACCATGAATCTACAGCTTCCCT
          #####

          730      740      750      760      770      780
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III      GGGCATCCTTGGCCGTCTGGCTAGACTAAAGTTC-TGTAGCAGAACGACTCCCTCTCCA

```

```

II      GGGCATCCTTCGCCGTCTTGGCTAGACTAAAGTTCCTGTAGCAGAACCGACTCCCTCTGCA
I       GGGCATCCTTCGCCGTCTTGGCTAGACTAAAGTTCCTGTAGCAGGACCGACTCCCTCTGCA
TgChBrUD5 GGGCATCCTTCGCCGTCTTGACTAGACTAAAGTTCCTGTAGCAGGACCGACTCCCTCTGCA
TgChBRUD1 GGGCATCCTTCGCCGTCTTGACTAGACTAAAGTTCCTGTAGCAGGACCGACTCCCTCTGCA
#####

          790          800          810          820          830          840
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III     AGTCACGCATAGTCTCATCGGTGGGCTTCTTTTCTGATATGATAACCTTAACAGCCAAC
II      AGTCACGCATAGTCTCATCGGTGGGCTCCTTTTCTGACATGAAAACCTTAACAGCCAAC
I       AGTCAAGCATAGTCTCATCGGTGGGCTCCTTTTCTGACATGAAAACCTTAACAGCCAAC
TgChBrUD5 AGTCAAGCATAGTCTCATCGGTGGGCTCCTTTTCTGACATGAAAACCTTAACAGCCAAC
TgChBRUD1 AGTCAAGCATAGTCTCATCGGTGGGCTCCTTTTCTGACATGAAAACCTTAACAGCCAAC
#####

          850          860          870          880          890          900
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III     CTTCATTCGTCTCCGACGTCTGTAACTCATATACAGCGGAATCCACCAGA-TCCAAG
II      CTTCATTCGTCTCCACGTCTGTAGCCTCATATACAGTGGCGAATCCACCAGA-GCCAAG
I       CTTCATTCGTCTCCACGTCTGTAGCCTCATATACAGTGGCGAATCCACCAGA-GCCAAG
TgChBrUD5 CTTCATTCGTCTCCACGTCTGTAGCCTCATATACAGTGGCGAATCCACCAGAGCCAAG
TgChBRUD1 CTTCATTCGTCTCCACGTCTGTAGCCTCATATACAGTGGCGAATCCACCAGA-GCCAAG
#####

          910          920          930          940          950          960
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III     GGGTGCACCTCTCACCAGCGTCCGGGTTTACCAGGTAGTCAAGAAAACAAATTTTCTG
II      GGGTGCACCTCTCACCAGCGTCCGGGTTTACCAGGTAGTCAAGAAAACAAATCTTTCTG
I       GGGTGCACCTCTCACCAGCGTCCGGGTTTACCAGGTAGTCAAGAAAACAAATCTTTTGG
TgChBrUD5 GGGTGCACCTCTCACCAGCGTCCGGGTTTACCAGGTAGTCAAGAAAACAAATCTTTTGG
TgChBRUD1 GGGTGCACCTCTCACCAGCGTCCGGGTTTACCAGGTAGTCAAGAAAACAAATCTTTTGG
#####

          970          980          990          1000          1010          1020
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
III     AACGTCCGGAGGCCAGGCGGCGCAGTCAGAATTCATCCAGTCGTTACTACTTTCTAG
II      AACGTCCGGAGGCCAGGCAAGCAGTCAGAATTCATCCAGTCGTTACTATTTCTAG
I       AACGTCCGGAGGCCAGGCGGCGACAGTCAGAATTCATCCAGTCGTTACTATTTCTAG
TgChBrUD5 AACGTCCGGAGGCCAGGCGGCAAGCAGTCAGAATTCATCCAGTCGTTACTATTTCTAG

```

TgChBRUD1 AACGTCCGGAGGCCAGGCGGCGACAGTCAGAATTCTATCCAGTCGTTCACTATTTGCTAG
#####

1030 1040 1050 1060 1070 1080
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III CGCTTGAGGCTGCCGATTGTTCTCGCATGTGCGCCAGGATGCGTTTGCCGATGACGC
II CGCTTGAGGCTGCCCGATTTGTTCTTGCATGTGCGCCAGGATGCGTTTGCCGATGACGC
I CGCTTGAGGCTGCCCGATTTGTTCTTGCATGTGCGCCAGGATGCGTTTGCCGATGACGC
TgChBrUD5 CGCTTGAGGCTGCCCGATTTGTTCTTGCATGTGCGCCAGGATGCGTTTGCCGATGACGC
TgChBRUD1 CGCTTGAGGCTGCCCGATTTGTTCTTGCATGTGCGCCAGGATGCGTTTGCCGATGACGC
#####

1090 1100 1110 1120 1130 1140
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III ATCCAGAATCCGCCTTCTCAAAAACCAATCCAGATCGTCGTCTTTGTGCCACCAACTTC
II ATCCAGAATCCGCCTTCTCAAAAACAATTCAGATCGCCGTCTTTGTGCCCGCAACTTC
I ATCCAGAATCCGCCTTCTCAAAAACCAATTCAGATCGCCGTCTTTGTGCCCGCAACTTC
TgChBrUD5 ATCCAGAATCCGCCTTCTCAAAAACCAATTCAGATCGCCGTCTTTGTGCCCGCAACTTC
TgChBRUD1 ATCCAGAATCCGCCTTCTCAAAAACCAATTCAGATCGCCGTCTTTGTGCCCGCAACTTC
#####

1150 1160 1170 1180 1190 1200
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III GCACTCGGTTACGCCCTTGAGAAATAGTACCTCCGGATTCCGTGTGTGAACAACGATTTCG
II GCACTCGGTTACGCCCTTGAGAAAAGTACCTCCGGATTCCGCGTGTGAACAACGATTTCG
I GCTGTTCGGTTACGCCCTTGAGCAAAAGTACCTCCGGATTCCGCGTTTGAATAACGATTTCG
TgChBrUD5 GCTGTTCGGTTACGCCCTTGAGAAAAGTACCTCCGGATTCCGCGTTTGAATAACGATTTCG
TgChBRUD1 GCTGTTCGGTTACGCCCTTGAGAAAAGTACCTCCGGATTCCGCGTTTGAATAACGATTTCG
#####

1210 1220 1230 1240 1250 1260
=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III CTCTACGCCAAAAGTTGAGCAAGCCTCTGTGTCGTACGGACAGACGGGGTCTCGAGGCTAT
II CTCTACGCCAAAAGTTGAGCAAGCCTCTGTGTCGTACGGACAGACGGGGTCTCGAGGAGCTAT
I CTCTACGCCAAAAGTTGAGCAAGCCTCTGTGTCGTACGGACAGACGGGGTCTCGAGGAGCTAT
TgChBrUD5 CTCTACGCCAAAAGTTGAGCAAGCCTCTGTGTCGTACGGACAGACGGGGTCTCGAGGAGCTAT
TgChBRUD1 CTCTACGCCAAAAGTTGAGCAAGCCTCTGTGTCGTACGGACAGACGGGGTCTCGAGGAGCTAT
#####

1270 1280 1290 1300 1310 1320
====+====+====+====+====+====+====+
III CTGCTGCCAACCAGAGACTGCTCCATCTCTTTCTCTCCGTCTCAAGCGATTCAAGGC
II CAGCTGCCGAACCCGAGACTTCACCATCTCTTTCTCTCCGTCTCAAGAGATTCAAGGC
I CAGCTGCCGAACCCGAGACTTCACCATCTCTTTCTCTCCGTCTCAAGAGATTCAAGGC
TgChBrUD5 CAGCTGCCGAACCCGAGACTTCACCATCTCTTTCTCTCCGTCTCAAGAGATTCAAGGC
TgChBRUD1 CAGCTGCCGAACCCGAGACTTCACCATCTCTTTCTCTCCGTCTCAAGAGATTCAAGGC
#####

1330 1340 1350 1360 1370 1380
====+====+====+====+====+====+====+
III TCTGAAAACGTCGCGCCGTGGTTTGTCTTCTGCGTATTTACCCCGTGTGAGCCCTTT
II TCTGAAAATCGTCGCGCCGTGGTTTGTCTTCTGCGCATTTACCCGGTGTGAGCCCTTT
I TCTGAAAATCGTCGCGCCGTGGTTTGTCTTCTGCGCATTTACCCGGTGTGAGCCCTTT
TgChBrUD5 TCTGAAAATCGTCGCGCCGTGGTTTGTCTTCTGCGCATTTACCCGGTGTGAGCCCTTT
TgChBRUD1 TCTGAAAATCGTCGCGCCGTGGTTTGTCTTCTGCGCATTTACCCGGTGTGAGCCCTTT
#####

1390 1400 1410 1420 1430 1440
====+====+====+====+====+====+====+
III CCTCCAGCAATGAAACGTCTCGAGTGCTTTCTGTGCTCCTGCTAGAGAAATTGTAGT
II CCTCCAGCAATGAAACGTCTCGAGTGCTTTCTGTGCTCCTGCTA---AATAATTGTAGT
I CCTCCAGCAATGAAACGTCTCGAGTGCTTTCTGTGCTCCTGCTA---AATGTTGTAGT
TgChBrUD5 CCTCCAGCAATGAAACGTCTCGAGTGCTTTCTGTGCTCCTGCTA---AATGTTGTAGT
TgChBRUD1 CCTCCAGCAATGAAACGTCTCGAGTGCTTTCTGTGCTCCTGCTA---AATGTTGTAGT
#####

1450 1460 1470 1480 1490 1500
====+====+====+====+====+====+====+
III GGCCAACGTAGCAGCCCGCTGTAGCAACGTGCTGTGCGAATCCAAACTTATAG
II GGCCAACGTAGCAGCCCGCTGTAGCAACGTGCTGTGCGAATCCAAACTT---G
I GGCCAACGTAGCAAGCCACCGCTGTAGCAACGTGCTGTGCGAATCCAAACTT---G
TgChBrUD5 GGCCAACGTAGCAAGCCACCGCTGTAGCAACGTGCTGTGCGAATCCAAACTT---G
TgChBRUD1 GGCCAACGTAGCAAGCCACCGCTGTAGCAACGTGCTGTGCGAATCCAAACTT---G
#####

1510 1520 1530 1540 1550 1560
====+====+====+====+====+====+====+
III TCGGTTTGGAGTCGAGCTTTGAAGGACAAAGTGTGATTCCGGTCCCATCCTGGACTTGG

II **TCGGTTTGGAGTCGAGTTTGAAGGATCAAGTGTGATTCCGGTCCCATCCTGGACTTGGAA**
 I **TCGGTTTGGAGTCGAGTTTGAAGGACCAAGTGTGATTCCGGTCCCATCCTGGACTTGGAA**
 TgChBrUD5 **TCGGTTTGGAGTCGAGTTTGAAGGACCAAGTGTGATTCCGGTCCCATCCTGGACTTGGAA**
 TgChBRUD1 **TCGGTTTGGAGTCGAGTTTGAAGGACCAAGTGTGATTCCGGTCCCATCCTGGACTTGGAA**

1570 1580 1590 1600 1610 1620

=====+=====+=====+=====+=====+=====+

III **AGAGCAGAAAGACAAGCGCTACAGTTAACCCCGCAAGACAGGCTGTCTTCCGGAGAAGAG**
 II **AGAGCAGGAAGACAAGCGCTACATTTAACAGCCGCAAGACAGGCTGTCTTCGGGAGAAGAG**
 I **AGAGCAGGAAGACAAGCGCTACATTTAACCCCGCAAGACAGGCTGTCTTCGGGAGAAGAG**
 TgChBrUD5 **AGAGCAGGAAGACAAGCGCTACATTTAACCCCGCAAGACAGGCTGTCTTCGGGAGAAGAG**
 TgChBRUD1 **AGAGCAGGAAGACAAGCGCTACATTTAACCCCGCAAGACAGGCTGTCTTCGGGAGAAGAG**

1630 1640 1650 1660 1670

=====+=====+=====+=====+=====+=====

III **TCGCTAAACCCATTCGGACGACGGTACAGCTAAGAGATGGCCGCTGTACCGAAAAACAT**
 II **TCGCTAAACCCATTCGGACGACGGTACGCGTAAGAGGTGGCCGCTGTACCGAAAAACAT**
 I **TCGCTAAACCCATTCGGACGACGGTACGCGTAAGAGGTGGCCGCTGTACCGAAAAACAT**
 TgChBrUD5 **TCGCTAAACCCATTCGGACGACGGTACGCGTAAGAGGTGGCCGCTGTACCGAAAAACAT**
 TgChBRUD1 **TCGCTAAACCCATTCGGACGACGGTACGCGTAAGAGGTGGCCGCTGTACCGAAAAACAT**

#####