RENATA MOLINA MONTEIRO

**Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp.
obtidos de fezes de marsupiais do gênero *Didelphis* pela análise
de fragmentos gênicos de sequências codificadoras de
antígenos de superfície dos parasitos**

**São Paulo
2011**

RENATA MOLINA MONTEIRO

**Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos
de fezes de marsupiais do gênero *Didelphis* pela análise de
fragmentos gênicos de sequências codificadoras de antígenos de
superfície dos parasitos**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Epidemiologia
Experimental Aplicada às Zoonoses
da Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e
Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada
às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

**São Paulo
2011**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2472
FMVZ

Monteiro, Renata Molina

Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de fezes de marsupiais do gênero *Didelphis* pela análise de fragmentos gênicos de sequências codificadoras de antígenos de superfície dos parasitos / Renata Molina Monteiro. -- 2011.

65 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. Gambás. 2. Fezes. 3. Genótipos. 4. Filogenia. 5. *Sarcocystis* spp
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de fezes de marsupiais do gênero *Didelphis* pela análise de fragmentos gênicos de sequências codificadoras de antígenos de superfície dos parasitos", protocolado sob o nº 2069/2010, utilizando amostras fecais de 30 (trinta) gambás, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 27/10/2010.

We certify that the Research "Molecular characterization of isolates of *Sarcocystis* spp. obtained from feces of opossums of the genus *Didelphis* by analysis of genes coding for surface antigens", protocol number 2069/2010, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/27/2010.

São Paulo, 22 de novembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MONTEIRO, Renata Molina

Título: Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de fezes de marsupiais do gênero *Didelphis* pela análise de fragmentos gênicos de sequências codificadoras de antígenos de superfície dos parasitos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por todo amor, incentivo e dedicação.

Pelo auxílio nos momentos mais difíceis.

Pelas mãos que sempre me seguraram,

E me apoiaram para eu reerguer.

Enfim, por tudo que passamos juntos nesses últimos anos,

Dedico esse trabalho a vocês do fundo do meu coração.

AGRADECIMENTOS

Especial agradecimento ao professor e amigo Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela orientação e confiança depositadas em mim durante todo esse tempo, sempre me incentivando a seguir em frente mesmo nos momentos de dificuldades.

À Profa. Dra. Solange Maria Gennari, pela amizade, ensinamentos, apoio e carinho com que trata a todos seus alunos.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain e Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, que disponibilizaram seus laboratórios de Biologia Molecular e Sorologia para a realização de grande parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos por todos os ensinamentos concedidos durante esses anos.

À Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena e ao Dr. Sílvio Luís Pereira de Souza pelas valiosas sugestões feitas durante a banca de qualificação do doutorado.

Às amigas Profa. Dra. Vera Lettície A. Ruiz e Profa. Dra. Lara B. Keid pela amizade e convívio.

À amiga e companheira de convívio Tatiana Evelyn H. Ueno. Mais uma vez, obrigada pela amizade e por ceder um espaço na sua casa sempre que me foi necessário.

Aos amigos que encontrei no Laboratório de Doenças Parasitárias e no VPS, Iara, Guacyara, Estela, Michelle, Eliana, Daniela Chiebao, Maria, Vanessa, Juliana, Thaísa, Amane e Sibeles, pelos momentos de trabalho, convivência e confraternização.

À Dra. Josete Garcia Bersano por ter me concedido uma oportunidade logo após o término da graduação no Laboratório de Doença de Suínos do Instituto Biológico.

Aos funcionários da Secretaria do VPS, Danival, Cristina e Virgínia por toda ajuda e amizade.

Aos técnicos dos laboratórios do VPS, Sandra, Alexandre, Bispo, Carol, Sheila, Gisele e Pedrinho.

Às minhas tias e primos que mesmo estando distante, sempre torceram por mim.

Ao meu diretor Dr. Paulo Fernando de Brito por todo seu apoio, confiança e incentivo desde o meu ingresso na Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

A todos os amigos técnicos, médicos veterinários e engenheiros agrônomos do Escritório de Defesa Agropecuária pelos momentos de trabalho, convívio e confraternização. Agradecimento especial ao médico veterinário Flávio, pelo auxílio, carinho e apoio concedido durante o encerramento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado e financiamento dos gastos do projeto de pesquisa.

E por fim, a todos aqueles que de alguma forma participaram e auxiliaram-me no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

MONTEIRO, R. M. **Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de fezes de marsupiais do gênero *Didelphis* pela análise de fragmentos gênicos de sequências codificadoras de antígenos de superfície dos parasitos.** [Molecular characterization of isolates of *Sarcocystis* spp. obtained from feces of opossums of the genus *Didelphis* by analysis of genes coding for surface antigens]. 2011. 65f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O objetivo deste trabalho foi desenhar *primers*, amplificar fragmentos de três *loci* que codificam antígenos de superfície de protozoários do gênero *Sarcocystis* spp. isolados do intestino de marsupiais do gênero *Didelphis* spp., sequenciar os fragmentos gênicos de todos isolados e compará-los entre si e com fragmentos de sequências homólogas disponíveis no GenBank. Trinta e duas amostras de *Sarcocystis* spp. de gambás do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, tiveram o DNA extraído e amplificado utilizando marcadores moleculares em genes codificadores de antígeno de superfície (SAG-2, SAG-3, e SAG-4). Entre essas amostras, 28 tiveram pelo menos um dos fragmentos gênicos sequenciados. Foi possível sequenciar os 3 fragmentos gênicos de 20 amostras. As análises das sequências dos genes renderam os seguintes resultados: SAG-2: 275 nucleotídeos e sete alelos para 26 amostras; SAG-3: 353 nucleotídeos e seis alelos para 21 amostras; SAG-4: 278 nucleotídeos e onze alelos para 25 amostras. Para cada marcador, análises filogenéticas foram realizadas empregando métodos de distância. As reconstruções filogenéticas permitiram verificar as relações de ancestralidade entre os diferentes alelos, que foram nomeados de acordo com o critério de evolução inferido na topologia das árvores. Para os três *loci*, diferentes alelos foram agrupados em três grupos ou genótipos, que foram nomeados com caracteres em números romanos I, II, III e IV. Diferenças intra-genótipo (sub-genótipos) foram representados por letras minúsculas (Ia, Ib, Ic, etc.). Cada alelo foi nomeado com numeração arábica (Ia1, Ia2, Ia3, etc.). Nas análises filogenéticas concatenadas baseada em dados de aminoácidos foi possível dividir as amostras dentro de três grupos. A filogenia baseada nas sequências de aminoácidos indica que três grupos de organismos devem existir dentro do complexo de indivíduos da população estudada (*Sarcocystis*-RS, *Falcatula*-like e *Neurona*-like). Embora o grupo designado como *Sarcocystis*-RS tenha um único alelo para o *locus* gênico SAG-3 (configuração do

tipo III), táxons deste grupo compartilham alelos com indivíduos do grupo *Falcatula*-like. Assim, seria plausível assumir que exista uma troca gênica entre as duas populações. No que diz respeito ao grupo *Neurona*-like, nenhum dos indivíduos deste grupo compartilham alelos com indivíduos de outros grupos. No entanto, esta observação precisa ser confirmada, pois as análises foram baseadas em poucas sequências *Neurona*-like (duas sequências). Este relato revela uma notável diversidade genética entre os isolados de *Sarcocystis* spp de gambás do Brasil.

Palavras-chave: Gambás. Fezes. Genótipos. Filogenia. *Sarcocystis* spp..

ABSTRACT

MONTEIRO, R. M. **Molecular characterization of isolates of *Sarcocystis* spp. obtained from feces of opossums of the genus *Didelphis* by analysis of genes coding for surface antigens.** [Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de fezes de marsupiais do gênero *Didelphis* pela análise de fragmentos gênicos de sequências codificadoras de antígenos de superfície dos parasitos]. 2011. 65f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The present work aimed to design primers and amplify fragments of three *loci* that code for surface antigens of the protozoan genus *Sarcocystis* spp. isolated from intestine of marsupials of the genus *Didelphis* spp and to sequence the gene fragments of all isolates and compare them with each other and with fragments of homologous sequences available in GenBank. Thirty two samples of *Sarcocystis* spp. from opossums from the State of Rio Grande do Sul, had the nuclear DNA extracted and amplified using the molecular markers targeted to genes encoding surface antigens (SAG-2, SAG-3, and SAG-4). Among these samples, 28 had at least one of the gene fragments sequenced. It was possible to sequence the three gene fragments from 20 samples. The analysis of gene sequences yielded the following results: SAG-2: 275 nucleotides and seven alleles for 26 samples; SAG-3: 353 nucleotides and six alleles for 21 samples; SAG-4: 278 nucleotides and eleven alleles for 25 samples. For each marker phylogenetic analysis was performed employing distance methods. The phylogenetic reconstructions allowed us to verify the ancestry relationships between different alleles, which were named according to the criteria of evolution inferred from the tree topology. For the three *loci*, different alleles were grouped into three groups or genotypes, which were named with characters in Roman numerals I, II, III and IV. Intra-genotype differences (sub-genotypes) were represented by lowercase letters (Ia, Ib, Ic, etc.). Each allele was named with Arabic numerals (Ia1, Ia2, Ia3, etc.). With concatenated phylogenetic analysis based on amino acid dataset it was possible to divide the samples into three groups. The amino acid based phylogeny indicates that three groups of organisms must exist within the complex of individuals in the population studied (*Sarcocystis*-RS, *Falcatula*-like, and *Neurona*-like). Although the group designated as *Sarcocystis*-RS has a unique allele for the genetic locus SAG-3 (configuration type III), the taxa of this group share alleles with individuals in the *Falcatula*-like. Thus, it is plausible to

assume that gene exchange occurs between these two populations. Regarding the *Neurona*-like group, none of the individuals in this group share alleles with individuals of the other groups. However, this observation remains to be confirmed, because this analysis was based on very few *Neurona*-like sequences (two sequences). This report reveals a striking genetic diversity among *Sarcocystis* spp isolated from opossums from Brazil.

Key-words: Opossum. Feces. Genotypes. Phylogeny. *Sarcocystis* spp..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Árvore baseada em distância com o método de <i>neighbour-joining</i> entre isolados de <i>S. neurona</i> e <i>S. falcatula</i> originários da América do Norte e da América do Sul. Dados oriundos de análise de polimorfismos de <i>loci</i> microssatélites.....	24
Figura 2 -	Reconstruções filogenéticas do grupo <i>Sarcocystis</i> , inferida por método de distância <i>neighbor-joining</i> com teste <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros, utilizando 275 nucleotídeos da região codificadora de SAG-2. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4.....	42
Figura 3-	Reconstruções filogenéticas do grupo <i>Sarcocystis</i> , inferida por método de distância <i>neighbor-joining</i> com teste <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros, utilizando 353 nucleotídeos da região codificadora de SAG-3. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4.....	43
Figura 4 -	Reconstruções filogenéticas do grupo <i>Sarcocystis</i> , inferida por método de distância <i>neighbor-joining</i> com teste <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros, utilizando 278 nucleotídeos da região codificadora de SAG-4. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4.....	44
Figura 5 -	Reconstrução filogenética do grupo <i>Sarcocystis</i> , inferida por método de distância <i>neighbor-joining</i> com teste <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas, modelo de substituição de aminoácidos pelo método de correção de Poisson utilizando 300 aminoácidos das regiões codificadoras de SAG-2, SAG-3 e SAG-4. Análise concatenada. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4.....	46
Figura 6 -	Alinhamento de sequências de nucleotídeos da região codificadora de SAG-3: as sequências relacionadas à <i>S. neurona</i> possuem uma inserção de cerca de 90 pares de bases em relação àquelas relacionadas a <i>S. falcatula</i>	47
Figura 7 -	Alinhamento de sequências de nucleotídeos da região codificadora de SAG-3: <i>indels</i> que ocorrem entre sequências de <i>S. neurona</i> , <i>S. falcatula</i> e as sequências determinadas neste estudo.....	48

Figura 8 -	Alinhamento de sequências de nucleotídeos da região codificadora de SAG-2 (superior) e SAG-4 (inferior): <i>indels</i> que ocorrem entre sequências de <i>S. neurona</i> , <i>S. falcatula</i> e as sequências determinadas neste estudo.....	49
Figura 9 -	Cromatograma obtido após sequenciamento automático de produto de PCR amplificado a partir da amostra G24 para o <i>locus</i> SAG-2. Notar as posições 131, 136 e 137, onde ocorrem picos de fluorescência duplos, indicativos de misturas de alelos em uma mesma amostra.....	50

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Diversidade nucleotídica de genes SAG-2, SAG-3 e SAG-4 entre os 20 isolados de <i>Sarcocystis</i> spp deste estudo para os quais os três <i>loci</i> foram sequenciados. Dados de dois isolados padrão de <i>S. falcatula</i> e <i>S. neurona</i> foram incluídos.....	51
------------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR, seus respectivos tamanhos em pares de bases e os produtos que amplificam.33
Quadro 2 -	Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de <i>heminested-PCR</i> , seus respectivos tamanhos em pares de bases e os produtos que amplificam.....35
Quadro 3 -	Identificação das amostras de <i>Sarcocystis</i> spp. obtidas de fezes de marsupiais do gênero <i>Didelphis</i> spp, segundo os genótipos encontrados a partir dos genes SAG-2, SAG-3 e SAG-4.....41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 JUSTIFICATIVAS	29
3 OBJETIVOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Isolados de <i>Sarcocystis</i> spp.....	31
4.2 Extração de DNA dos Esporocistos e Oocistos	32
4.3 Desenho dos primers	32
4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	33
4.4.1 Ciclo da Reação em Cadeia pela Polimerase.....	34
4.5 Heminested-PCR	34
4.5.1 Ciclo da heminested-PCR.....	35
4.6 Detecção do Produto Amplificado.....	36
4.7 Sequenciamento	36
4.7.1 Purificação dos Produtos Amplificados.....	36
4.7.2 Quantificação dos Produtos de PCR Purificados.....	37
4.7.3 Reação de Sequenciamento.....	37
4.7.4 Precipitação do DNA.....	38
4.7.5 Eletroforese de Sequenciamento.....	38
4.7.6 Análise das Sequências.....	38
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Análise das Sequências.....	40
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Os coccídios compreendem um vasto grupo de organismos dentre os protozoários do filo Apicomplexa. Tais organismos são caracterizados por apresentarem uma estrutura denominada complexo apical. Tal estrutura está relacionada à invasão do parasito na célula hospedeira (TENTER; BAVERSTOCK; JOHNSON, 1992). Fazem parte deste grupo, os protozoários do gênero *Sarcocystis*, pertencente à Classe Sporozoasida, Ordem Eucoccidiorida e família Sarcocystidae (LEVINE, 1986).

Sarcocystis, termo de origem grega derivado de *sarkos* que significa músculo e *kystis* que significa vesícula ou bolsa, se refere à fase assexuada do estágio final do ciclo biológico do parasita que são os cistos presentes nos tecidos dos hospedeiros. Os coccídios deste gênero são parasitos heteroxenos obrigatórios que geralmente apresentam como hospedeiro definitivo um vertebrado carnívoro. O hospedeiro definitivo normalmente se infecta pela ingestão de cistos teciduais (sarcocistos) presentes nos tecidos musculares de hospedeiros vertebrados herbívoros ou onívoros, nestes casos chamados de hospedeiros intermediários. Esses hospedeiros intermediários, por sua vez, adquirem o parasito ao ingerirem esporocistos que são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989).

De grande importância para a Medicina Veterinária, o gênero *Sarcocystis* é formado por muitas espécies que podem ser diferenciadas por suas características biológicas, como a morfologia da parede dos sarcocistos e especificidade de hospedeiro. Pelas características morfológicas dos sarcocistos, Dubey Speer e Fayer (1989) reconheceram pelo menos 24 espécies. Posteriormente, em uma ampla catalogação realizada em 1998, foram descritas 189 espécies dentro deste gênero (ODENING, 1998).

Sarcocystis neurona e *Sarcocystis falcatula* são espécies bastante similares que utilizam os marsupiais do gênero *Didelphis* como hospedeiros definitivos. Os mamíferos deste gênero podem participar como hospedeiros definitivos não só de *S. neurona* e *S. falcatula*, mas também de outras espécies de *Sarcocystis* como *Sarcocystis speeri* (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989; DUBEY; LINDSAY, 1999) e *Sarcocystis lindsayi* (DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001).

De maneira geral, no hospedeiro definitivo após a ingestão dos sarcocistos, as enzimas proteolíticas liberam os bradizoítos no estômago e intestino delgado. Esses bradizoítos movem-se ativamente penetrando na lâmina própria do intestino delgado, onde ocorre a reprodução sexuada, havendo a formação dos gametócitos. Após a maturação, esses gametócitos transformam-se em gametas masculinos móveis e flagelados (microgametas) e em gametas femininos que são maiores e imóveis (macrogametas), dando início ao processo de gametogonia. O zigoto resultante da gametogonia evolui dentro do epitélio e oocistos não esporulados são produzidos na lâmina própria do intestino. Esses oocistos esporulam na lâmina própria, resultando no seu interior dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada um. A parede do oocisto que circunda os esporocistos é frágil e delgada, e frequentemente rompe-se, liberando os esporocistos na lâmina própria. Dessa forma, esporocistos são liberados no lúmen intestinal e posteriormente eliminados pelas fezes (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989).

Considerando as espécies de *Sarcocystis* eliminadas por gambás, o período pré-patente é variável, geralmente ocorrendo entre o sétimo e o décimo quarto dia após a ingestão de sarcocistos (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989). Em experimento conduzido por Dubey et al. (2000a), gambás começaram a eliminar oocistos de *S. neurona* decorridos onze a treze dias após a ingestão de tecidos de gatos experimentalmente infectados; e o experimento no qual gambás ingeriram sarcocistos de *S. falcatula* em tecidos de chupim-cabeça-castanha (*Molothrus ater*), o período pré-patente foi de sete a dezesseis dias (PORTER et al., 2001). Neste último experimento, os gambás eliminaram esporocistos até serem eutanasiados, ou seja, eliminaram esporocistos por até duzentos dias após infecção.

Os hospedeiros intermediários são infectados pela ingestão de alimento ou água contaminada. Os esporozoítos excistam dos esporocistos no intestino delgado, penetram na mucosa intestinal e migram para as células endoteliais dos linfonodos mesentéricos e artérias. As gerações iniciais de multiplicação assexuada, chamada de esquizogonia ou merogonia, começam nessas células endoteliais e as demais gerações podem ocasionar doença severa, devido à disseminação nos diferentes órgãos, causando ruptura das células infectadas, com inflamação, edema e produção de toxinas (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989).

O desenvolvimento intracelular ocorre por um complexo processo de divisão celular denominado endopoligenia. Os merozoítos no interior das células iniciam este processo que seria uma forma de esquizogonia, no qual os merozoítos aumentam em tamanho e o núcleo torna-se lobulado ocorrendo a formação de esquizontes. O material nuclear, eventualmente, se divide em simultâneo com a citocinese, resultando na formação de múltiplos merozoítos. Alguns merozoítos escapam de suas células hospedeiras, penetram em outras células e sofrem gerações adicionais de esquizogonia. Em outros casos, os merozoítos permanecem dentro da célula hospedeira onde elas se desenvolveram e iniciam outra geração de esquizogonia (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989; DUBEY et al., 2001a).

Merozoítos liberados da esquizogonia podem ser observados na corrente sanguínea, em células mononucleadas, como macrófagos e em tecidos dos animais infectados formando os sarcocistos. A formação e maturação dos sarcocistos são iniciadas quando o merozoíto é cercado pelo vacúolo parasitóforo, que são os metrócitos imaturos. Esses metrócitos sofrem divisão por endodiogenia produzindo muitos bradizoítos dentro dos sarcocistos. Esses sarcocistos são a fase final da reprodução assexuada, sendo o estágio infectante para o hospedeiro definitivo (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989; DUBEY et al., 2001b).

Dentre as espécies que são eliminadas pelos gambás, *S. neurona* e *S. speeri* são infectantes para camundongos imunodeficientes, mas não para aves. *Sarcocystis falcatula* é infectante para aves, porém não para camundongos imunodeficientes (MARSH et al., 1997; DUBEY; LINDSAY, 1998). *Sarcocystis speeri* forma sarcocistos nos tecidos de camundongos imunodeficientes infectados, o que não parece ocorrer com os camundongos infectados com *S. neurona*. Além disso, os sarcocistos de *S. speeri* parecem ser estruturalmente distintos das espécies de *Sarcocystis* spp. conhecidas (DUBEY; LINDSAY, 1999; DUBEY et al., 2000b).

Para o caso de *S. lindsayi* e *S. speeri*, nada se conhece sobre hospedeiros intermediários naturais, pois a reprodução de seus ciclos de vida foi verificada apenas em experimentos com animais de laboratório (DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 1998; DUBEY; LINDSAY, 1999).

Os esporocistos de *S. neurona*, *S. falcatula*, *S. lindsayi* e *S. speeri* não são morfologicamente diferenciáveis por exames coproparasitológicos convencionais. A avaliação dessas estruturas pela microscopia de luz mostrou que apenas

esporocistos de *S. speeri* foram ligeiramente maiores que os demais, porém entre *S. neurona* e *S. falcatula*, as diferenças não foram suficientes para serem utilizadas na diferenciação entre as espécies (CHEADLE; DAME; GREINER, 2001).

Os hospedeiros intermediários conhecidos de *S. neurona* são os felinos domésticos, o tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), guaxinim norte-americano (*Procyon lotor*), cangambá (*Mephitis mephitis*), lontra-marinha (*Enhydra lutris*), além dos próprios equinos domésticos (DUBEY et al., 2000; CHEADLE et al., 2001a,b; DUBEY et al., 2001b,c; MULLANEY et al., 2005). Aves de diversos grupos taxonômicos são hospedeiros intermediários de *S. falcatula* (BOX; MEIER; SMITH, 1984).

Sarcocystis neurona é o parasito mais frequentemente associado à Encefalomielite Equina causada por Protozoário (EPM, do Inglês significa equine protozoal myeloencephalitis), o qual foi isolado e descrito pela primeira vez em tecidos neurais de equinos por Dubey et al. em 1991. No Brasil, *S. neurona* foi isolado pela primeira vez do intestino de dois gambás da espécie *D. albiventris* oriundos do estado de São Paulo, em 2001 (DUBEY et al., 2001).

Os equinos adquirem a infecção após ingestão de esporocistos eliminados pelos hospedeiros definitivos, os gambás. Os sinais clínicos nos equinos são decorrentes da multiplicação assexuada (esquizogonia) do agente nos tecidos neurais. Em alguns hospedeiros intermediários como guaxinins e tatu galinha, os parasitos emergentes dos esquizontes desenvolvem-se em cistos teciduais, preferencialmente em tecidos musculares onde formam os sarcocistos (CHEADLE et al., 2001a; DUBEY et al., 2001c; TANHAUSER et al., 2001). Nestes animais, foi possível observar o ciclo completo de desenvolvimento assexuado dos protozoários do gênero *Sarcocystis*.

Os equinos foram considerados até pouco tempo como hospedeiros acidentais de *S. neurona*, pois nunca havia sido encontrado sarcocistos maduros em seus tecidos. Apenas recentemente e em um único relato, a formação de sarcocistos em equinos infectados por *S. neurona* foi demonstrada (MULLANEY et al., 2005).

Inquéritos soroepidemiológicos vêm demonstrando que uma proporção significativa de equinos é soropositiva para a infecção por *S. neurona* em todo o mundo, muito embora a manifestação clínica de EPM ocorra em níveis muito menos significantes. No Brasil, a prevalência de *S. neurona* baseado na presença de

anticorpos sérico contra a superfície de antígenos, SnSAG4, foi de 69,6% nos equinos adultos testados (HOANE et al., 2006).

Sarcocystis falcatula foi encontrado e nomeado por Stiles em 1893. Anos mais tarde o ciclo biológico e algumas espécies de aves e animais foram estudados para determinar os hospedeiros intermediários do parasito (BOX; SMITH, 1982; BOX; MEIER; SMITH, 1984). *Sarcocystis falcatula* pode causar doença em uma ampla diversidade de aves, entre passeriformes, columbiformes e psittaciformes, não sendo raros os relatos de surtos de sarcocistose pulmonar aguda em animais de parques zoológicos (JACOBSON et al., 1984; SMITH et al., 1990; HILLYER et al., 1991; CLUBB, FRENKEL, 1992; PAGE et al., 1992; DUBEY et al., 2001a). O primeiro relato no Brasil da ocorrência de *S. falcatula* no estado de São Paulo foi em 2000, quando esporocistos foram obtidos de gambás da espécie *D. albiventris* na cidade de Jaboticabal (DUBEY et al., 2000).

As aves muitas vezes são infectadas por *S. falcatula* devido ao contato direto com fezes contaminadas contendo esporocistos eliminados por gambás ou pela ingestão de hospedeiros paratênicos, como baratas, que tenham ingerido esporocistos da espécie em questão (CLUBB; FRENKEL, 1992). Os esporocistos ingeridos são rompidos e esporozoítos são liberados no intestino delgado das aves chegando à corrente sanguínea havendo a invasão de tecidos. Esquizontes passam por duas gerações assexuadas no endotélio, sendo que a primeira fase reprodutiva ocorre nas células endoteliais das arteríolas e a segunda fase, em células endoteliais dos capilares e vênulas na maioria dos órgãos do hospedeiro. Os pulmões são os principais órgãos afetados, mas alterações patológicas também podem ser observadas no fígado, baço, rins, intestinos e em músculos esqueléticos e cardíacos (SMITH; NEILL; BOX, 1989).

Estudos em periquitos inoculados experimentalmente com esporocistos de *S. falcatula* demonstraram que com o crescimento dos esquizontes, as células endoteliais do revestimento de capilares pulmonares, veias e vênulas hipertrofiam e ocorre o estreitamento do lúmen, provocando obstrução do sangue nas áreas afetadas do pulmão. Os esquizontes são rompidos e merozoítos são encontrados livres nos capilares, penetrando em outras células endoteliais, produzindo mais esquizontes, ou migram para células musculares formando os cistos (SMITH et al., 1987).

Em termos genotípicos, *S. neurona* e *S. falcatula* são espécies estreitamente relacionadas (DAME et al., 1995; FENGER et al., 1995), devido a extensa similaridade que estas espécies têm em sequências gênicas codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico. Todavia, a despeito desta similaridade, a diferenciação entre *S. neurona* e *S. falcatula* pode ser feita por meio de ensaios biológicos (MARSH et al., 1997a,b; DUBEY; LINDSAY, 1998), pois algumas espécies de aves são suscetíveis e adoecem apenas quando infectados por *S. falcatula*, mas não quando infectadas por *S. neurona*.

Por outro lado, *S. lindsayi* é geneticamente bastante divergente das espécies *S. falcatula* e *S. neurona*, como pode ser verificado pela análise de sequências codificadoras de 18S rDNA e espaçadores internos transcritos 1 (ITS-1) (DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001). Embora tenha sido descrita como nova espécie, curiosamente não há qualquer informação molecular disponível em bancos de dados de acesso público acerca de *S. speeri*.

Os primeiros resultados de diferenciação molecular entre as espécies *S. neurona* e *S. falcatula* foram obtidos com o uso de marcadores moleculares gerados por RAPD (Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico) e sequências internas transcritas do *locus* codificador de RNA ribossômico (ITS) (TANHAUSER et al., 1999). Os marcadores oriundos de RAPD foram denominados 25/396, 33/54, 63/65 e 48/50, sendo que nenhum deles codifica produto de função conhecida. Após sequenciados, esses marcadores de RAPD foram pesquisados para identificação da presença de sítios de restrição enzimática diferenciais entre espécies *S. falcatula* e *S. neurona*. Os autores mostraram que de nove isolados de *Sarcocystis* obtidos de fezes de *Didelphis virginiana*, cinco apresentaram perfil de restrição compatível com *S. neurona* e dois com *S. falcatula*. Os outros dois isolados apresentaram genótipos parecidos ora com *S. neurona* ora com *S. falcatula*, dependendo do marcador considerado. Vale ressaltar que os isolados deste trabalho não foram caracterizados biologicamente, ou seja, não se sabe se eram patogênicos para aves ou para equinos.

Dubey et al. (2001a) ao utilizar um dos marcadores moleculares descritos por Tanhauser et al. (1999) para genotipar isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de fezes de gambás (marcador 33/54), encontraram isolados com perfil misto entre *S. falcatula* e *S. neurona*. Entretanto, neste caso os isolados (n=9) foram todos

patogênicos para periquitos (*Melopsittacus undulatus*), sendo assim identificados como organismos *S. falcatula*-like. Destes nove isolados, quatro foram genotipados revelando perfil idêntico ao perfil de *S. falcatula* oriundo de *D. albiventris* da Argentina, mas distinto dos isolados de *S. falcatula* cepa Cornell 1 e de um isolado *S. falcatula*-like de *D. albiventris* originário de Jaboticabal, estado de São Paulo (isolado B100). Pela análise do marcador 33/54, o isolado B100 tem um perfil idêntico ao perfil de *S. neurona*, embora se trate de uma variante oriunda de periquito inoculado com esporocistos de *D. albiventris*.

Ainda com a utilização de um dos marcadores descritos por Tanhauser et al., (1999), os estudos de filogenia molecular com o marcador 25/396 demonstram que esporocistos de *S. neurona* de *D. albiventris* do Brasil são evolutivamente relacionados entre si, mas distintos dos esporocistos de *S. neurona* norte-americanos (ROSENTHAL; LINDSAY; DUBEY, 2001; ELSHEIKHA; MURPHY; MANSFIELD, 2005).

O emprego de análise multi-locus (análise evolutiva de vários *loci* gênicos simultaneamente) permite identificar, entre amostras de *S. falcatula* e *S. neurona*, grupos ou clados geneticamente distintos (ASMUNDSSON et al., 2006). A figura 1 mostra um dendrograma obtido a partir de dados de distância calculada a partir de polimorfismo de *loci* microssatélites entre amostras de *Sarcocystis* spp. isoladas na América do Sul e América do Norte. Os ramos azuis representam *S. neurona* da América do Norte, os ramos verdes *S. falcatula* da América do Norte e os ramos vermelhos identificam *S. falcatula* da América do Norte (Sarco57batch99-4 e Opossum8083) e *S. neurona* da América do Sul (Opossum3 e Opossum7).

Pela observação da figura 1, nota-se claramente que as análises evolutivas de *S. falcatula* e *S. neurona*, mesmo com o uso de marcadores moleculares de alta resolução como os marcadores microssatélites, produzem reconstruções de difícil interpretação: aparentemente, as espécies de *S. neurona* são polifiléticas, pois as amostras de *S. neurona* da América do Sul (Opossum 3 e Opossum7) têm um ancestral comum com isolados de *S. falcatula* (B200 e Opossum2) anterior ao nó que organiza os isolados de *S. neurona* norte-americanos. É possível que os resultados de Asmundsson et al. (2006) possam estar sendo afetados por um viés de amostragem, visto que apenas dois isolados de *S. neurona* da América do Sul foram incluídos em seu estudo, contra mais de 20 isolados de *S. neurona* norte-

americanos. Asmundsson et al. (2006) reconhecem que os caracteres de microssatélites podem estar sujeitos a efeitos de homoplasia e assim ser responsáveis pela baixa resolução filogenética obtida em seus estudos.

FONTE: (ilustração retirada de ASMUNDSSON et al., 2006)

Figura 1 - Árvore baseada em distância com o método de *neighbour-joining* entre isolados de *S. neurona* e *S. falcatula* originários da América do Norte e da América do Sul. Dados oriundos de análise de polimorfismos de *loci* microssatélites.

Genes codificadores de caracteres fenotípicos, como os genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs - do inglês, surface antigen gene), até hoje não foram pesquisados para a distinção entre *S. neurona* e *S. falcatula*. O emprego destes marcadores poderia ser útil na medida em que diferenças estruturais importantes devem acontecer na configuração antigênica de *Sarcocystis* eliminados em fezes de mamíferos do gênero *Didelphis*, pois estas espécies de *Sarcocystis* apresentam tropismos por diferentes hospedeiros intermediários e por isso podem ter configurações estruturais e funcionais distintas.

As moléculas de superfície de *Toxoplasma gondii*, um protozoário do filo Apicomplexa, com extenso espectro de hospedeiros intermediários, são importantes fatores de virulência responsáveis pela interação inicial do patógeno com a célula hospedeira. Nesta espécie, os antígenos de superfície participam da interação parasito-hospedeiro por meio de ligações com proteoglicanos celulares e

provavelmente estão implicados na modulação da resposta imune do hospedeiro (JACQUET et al., 2001; HE et al., 2002). Mais de vinte antígenos de superfície são expressos por *T. gondii* e, provavelmente, é em decorrência desta multiplicidade de antígenos que esta espécie tenha um repertório de hospedeiros intermediário tão amplo (LEKUTIS et al., 2001).

Assim como ocorre nas espécies *T. gondii* e *Neospora caninum* (TOMAVO; SCWARTZ; DUBREMETZ, 1989; HOWE et al., 1998), essas moléculas codificadas pelos SAGs parecem estar associadas a membrana de superfície e estar ancoradas à membrana celular pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (HOWE et al., 2005). Inicialmente essas moléculas foram identificadas levando-se em conta apenas seu peso molecular, por meio da técnica SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Eletrophoresis), posteriormente com o surgimento e avanço de técnicas moleculares foi adotado um sistema para a nomenclatura baseado em três letras, vigorando este até o momento.

Em *Toxoplasma gondii*, os SAGs expressam antígenos dependendo do desenvolvimento biológico do parasito. Estudos realizados demonstraram SAG1 e SAG2A sendo expressos apenas em taquizoítos. SAG3, SAG5B e SAG5C foram moléculas observadas sendo expressas tanto por taquizoítos, como por bradizoítos e, por fim, SAG2C, SAG2D, SAG4 e SAG5A foram antígenos observados sendo expressos nos bradizoítos (BURG, et al., 1988; PRINCE et al., 1990; CESBRON-DELAUW et al., 1994; ODBERG-FERRAGUT et al., 1996; LEKUTIS; FERGUSON; BOOTHROYD, 2000; SPANO et al., 2002).

Em estudo realizado com cepas virulentas e avirulentas de *Toxoplasma gondii*, foi demonstrado que todos os membros de SAG5 são transcritos em bradizoítos e taquizoítos. No entanto, na análise realizada com *Immunoblotting* da cepa virulenta, revelou que a síntese de SAG5A não ocorre em taquizoítos, sendo controlado possivelmente na fase pós-transcricional, diferentemente de SAG5B e SAG5C que foram detectados em lisados de taquizoítos (SPANIO et al., 2002).

O antígeno SAG1 parece estar envolvido na adesão com a célula hospedeira, além de ser responsável por desencadear forte resposta imune contra os taquizoítos de *T. gondii*. Desta forma, esse antígeno parece estar ausente na fase de bradizoítos, no intuito de facilitar a persistência do parasito no organismo do hospedeiro (HE et al., 2002).

Sequências homólogas aos SAGs de *T. gondii* foram descritas em *S. neurona*. Análises de sequências EST (*expressed sequence tags*) de *S. neurona* permitiram que Howe et al. em 2005, encontrassem quatro sequências SAG-relacionadas com similaridade considerável com sequências SAG de *T. gondii*.

As quatro moléculas expressas por estes genes foram confirmadas como sendo antígenos de superfície e, analogamente às sequências de *T. gondii*, os genes codificadores destas moléculas foram designadas SnSAG1, SnSAG2, SnSAG3 e SnSAG4. Tal denominação foi baseada na cronologia de identificação e pela sua abundância no banco de dados EST, não atribuindo as denominações numéricas do SnSAGs em homologia direta com os correspondentes aos SAGs de *Toxoplasma gondii* (HOWE et al., 2005).

Resultados obtidos no estudo acima revelaram que os produtos de expressão de SnSAGs de *S. neurona* estimulam intensa resposta imune do hospedeiro em animais experimentalmente infectados, e que alguns de seus domínios conservados parecem tratar-se de adesinas responsáveis pela associação entre o parasito e a célula-alvo, exatamente como seus homólogos em *T. gondii* (HOWE et al., 2005).

Posteriormente, em avaliação da conservação antigênica dos SnSAGs em diferentes isolados de *S. neurona*, foi demonstrado que existe polimorfismo, principalmente em SnSAG4, e que determinadas amostras apresentaram ausência de SnSAG1. Os resultados indicaram uma heterogeneidade na composição de antígenos de superfícies desse parasito (HOWE et al., 2008). No mesmo ano, a sequência de um novo e distinto parálogo de SnSAG (SnSAG5) foi encontrado apenas em isolados que demonstraram ser ausentes de SnSAG1 (CROWDUS et al., 2008).

Para detalhamento das informações obtidas com os estudos descritos acima, *primers* foram desenhados para ancorar tanto em SnSAG1, como em SnSAG5, porém as sequências desses genes apresentaram identidade de apenas 71% e 83%, respectivamente, o que os autores presumivelmente caracterizaram como uma nova molécula de antígeno de superfície, denominado-a de SnSAG6 (WENDTE et al., 2010). Baseado nesses fatos é possível afirmar que ainda há muito a ser descoberto em relação à coleção de antígenos de superfície expressos pelos *Sarcocystis* spp.

Estudos que avaliem os antígenos expressos pelos SAGs em diferentes fases ciclo biológico no gênero *Sarcocystis* ainda não foram descritos, porém Howe et al. (2005) avaliando a expressão dos SnSAGs durante a endopoligenia observaram que os quatro SnSAGs estiveram presentes em todas fases do desenvolvimento intracelular, porém foram diferencialmente distribuídos no amadurecimento dos esquizontes. Os autores acreditam que essas moléculas provavelmente desempenhem funções principalmente durante as fases extracelulares dos merozoítos. De fato, um papel na invasão das células do hospedeiro tem sido proposto anteriormente para o antígeno de superfície SN16 (identificado por Howe et al., 2005 como SnSAG2) dos merozoítos de *S. neurona* (LIANG et al., 1998).

Pelo exposto, os genes codificadores de proteínas de superfície parecem conter regiões que codifiquem domínios distintos aos dos protozoários coccídios. Nesse sentido, diferenças fenotípicas importantes neste marcador podem provavelmente ser encontradas em espécies estreitamente relacionadas, como é o caso das diversas espécies de *Sarcocystis* spp.. Via de regra, as diferenças fenotípicas em antígenos de superfície são necessariamente precedidas por mutações nos genes que os codificam, que por sua vez podem ser pesquisadas por métodos moleculares, capazes de revelar diferenças em ácidos nucleicos.

Na tentativa de uma melhor caracterização molecular de *S. neurona* de diversos hospedeiros, Wendte et al. (2010a) sequenciaram isolados de *S. neurona* utilizando os genes SnSAG2, SnSAG3 e SnSAG4. Os resultados encontrados foram que todas as sequências obtidas com SnSAG2 foram idênticas entre si. Nas sequências de SnSAG3 e SnSAG4 foram identificados dois alelos em cada, apresentando baixo polimorfismo, sendo que as diferenças encontradas entre os alelos foram a substituição de poucos nucleotídeos e apenas uma substituição não-sinônima em SnSAG3. No mesmo estudo e utilizando o mesmo conjunto de *primers*, ortólogos altamente conservados para os genes SnSAG2, SnSAG3 e SnSAG4 foram identificados em *S. falcatula*. Sequências de nucleotídeos de *S. falcatula* de SnSAG2 e SnSAG4 compartilharam cerca de 95% de identidade com *S. neurona*, enquanto a sequência SnSAG3 de *S. falcatula*, com um *indel* de 90 pares de base na região do *intron*, compartilha 95% de identidade na região codificadora do gene de *S. neurona* (WENDTE et al., 2010a).

Com o mesmo objetivo do estudo anterior, foram analisadas amostras de *S. neurona* que foram caracterizadas utilizando *primers* para os genes SnSAG2, SnSAG3 e SnSAG4 e dez diferentes marcadores microssatélites. As sequências analisadas do gene SnSAG2, compartilharam sequências idênticas entre todas as amostras de *S. neurona* e os demais marcadores apresentaram níveis variáveis de polimorfismo, sendo em SnSAG3 identificados quatro alelos e em SnSAG4 dois alelos com a substituição de um único nucleotídeo. Os resultados das sequências microssatélites revelaram significativa diversidade genotípica entre as amostras, sendo que o número de alelos observados para cada *locus* microssatélite variou de 2 a 9 alelos por *locus*, com média de 4 alelos por *locus* (REJMANEK et al., 2010).

2 JUSTIFICATIVAS

O estudo aqui apresentado justifica-se pela carência de conhecimentos sobre marcadores moleculares para diferenciação entre *S. neurona*, *S. falcatula* e outras espécies de *Sarcocystis* eliminados por gambás do gênero *Didelphis* no Brasil. Os padrões obtidos têm gerado confusões e nem sempre revelam a espécie de maneira inequívoca sendo que não há até o momento, estudos utilizando marcadores relacionados a caracteres antigênicos com reconhecida capacidade para a discriminação entre as espécies deste grupo de parasitos.

Exceto pela caracterização em *S. neurona*, pouco se conhece a respeito da configuração nucleotídica de genes codificadores de antígenos de superfície de *Sarcocystis* spp. isolados de animais do gênero *Didelphis*. A análise comparativa destas sequências revela diferenças importantes entre parasitos deste grupo, visto tratar-se de genes que codificam caracteres morfológicos potencialmente distintivos.

Nesse sentido, este trabalho experimental faz vista ao conhecimento de variações gênicas de organismos do gênero *Sarcocystis* e cujos objetivos são descritos na seção seguinte.

3 OBJETIVOS

1. Desenhar *primers* e amplificar, pela reação em cadeia pela polimerase, fragmentos de três *loci* gênicos responsáveis pela codificação de antígenos de superfície de protozoários do gênero *Sarcocystis* spp. isolados de conteúdo intestinal de marsupiais do gênero *Didelphis* spp.
2. Sequenciar os fragmentos gênicos de todos os isolados e compará-los entre si e com fragmentos de sequências homologas disponíveis no GenBank.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos conduzidos neste estudo foram realizados nos Laboratórios de Doenças Parasitárias e Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ - USP).

4.1 Isolados de *Sarcocystis* spp.

Vinte e oito amostras de esporocistos e oocistos de *Sarcocystis* spp. isolados de marsupiais sul-americanos do gênero *Didelphis* (*Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*) foram obtidas de gambás oriundos do Estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil, cedidas gentilmente pela Dra. Gertrud Muller do IB da Universidade Federal de Pelotas. Essas amostras foram diretamente submetidas à extração do DNA.

Estas amostras já haviam sido purificadas com o seguinte procedimento: Foram utilizados 11ml da solução de sacarose ($d=1,203\text{g/cm}^3$), adicionando 1g de conteúdo homogeneizado do intestino delgado e fezes da cloaca separadamente processados. O material foi transferido para tubos tipo Falcon® e centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos. Os esporocistos e oocistos presentes na superfície da suspensão foram recuperados com o auxílio de uma alça de platina e depositados entre lâmina e lamínula 1cm^2 para visualização ao microscópio óptico composto com objetiva de 40x.

A recuperação dos esporocistos e oocistos foi realizada com a lavagem da lâmina e lamínula com 1,5mL de tampão TE (10mM Tris HCl ph 8,0; 1mM EDTA ph 8,0) em placa de Petri. O lavado foi transferido para microtubos de 1,5mL e centrifugado a 12.000g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e foi repetido o mesmo processo. O sedimento contendo oocistos foi submetido à extração do DNA.

4.2 Extração de DNA dos Esporocistos e Oocistos

Adicionou-se ao sedimento de oocistos um tampão de extração (Tris-HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1%) até a obtenção de um volume final de 590µL. Realizou-se o congelamento e descongelamento das amostras três vezes consecutivas para melhor rompimento dos oocistos em nitrogênio líquido. Adicionou-se 5µl de proteinase K (10µg/µL) e procedeu-se uma incubação em banho-seco por 4 horas a 37°C ou 2 horas a 56°C. O volume final obtido foi de 600µL.

Para a purificação das amostras adicionou-se 300µL de fenol e 300µL de clorofórmio, seguido por homogeneização e centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (cerca de 400µL) foi transferido a um novo microtubo e adicionou-se 10% deste volume recolhido, que neste caso foi 40µL, de acetato de sódio (3M pH 5,3) para precipitação do DNA. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C por no mínimo 2 horas, ou “overnight”.

As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 30 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 1mL de etanol a 70%. O material foi novamente centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo deixado em posição invertida até estarem completamente secos.

Por fim, adicionou-se 30µL de TE (10mM Tris HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) nas amostras e essas foram homogeneizadas e incubadas em banho-seco a 56°C por 30 minutos. Após uma nova homogeneização as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até a sua utilização.

4.3 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram desenhados a partir de alinhamentos múltiplos entre todas as sequências EST (sequências SAG-like) disponíveis das espécies de *S. falcatula* e sequências de mRNA codificadoras de SAG-2, SAG-3 e SAG-4 de *S. neurona*.

Estas sequências SAGs oriundas de *S. neurona* já foram determinadas e caracterizadas, estando disponíveis em bancos de dados de acesso público.

Os *contigs* formados com sequências heterólogas (aqueles formados por alinhamentos entre sequências EST de *S. falcatula* e sequências mRNA de *S. neurona*) foram utilizados para o desenho de *primers* consensuais potencialmente capazes de amplificar indistintamente sequências de *S. falcatula* e *S. neurona*.

4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Os *primers* desenhados de acordo com os critérios definidos no item anterior foram testados em reação em cadeia pela polimerase (PCR) nas seguintes combinações: 4/3, 6/5 e 8/7 para amplificação do SAG-2, SAG-3 e SAG-4, respectivamente (Quadro 1).

As combinações de *primers* foram sintetizadas e utilizadas para amplificar as amostras disponíveis neste estudo.

Primers PCR	Sequências	Tamanho do produto*
SAG-2 (4) (senso) SAG-2 (3) (anti-senso)	CAA CAA TTG CGT GCA CAC AA ACA ACA CTG TGA GAG ATG CGA	411
SAG-3 (6) (senso) SAG-3 (5) (anti-senso)	CTC GCA GTT GCC TGC CTT G CGT TAC CTC GCT TCC ACC A	761
SAG-4 (8) (senso) SAG-4 (7) (anti-senso)	GCC TCC TTT GGG ACC GAA TG CGA CGA CGA TAC CCA ATG CC	386

Quadro 1 - Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR, seus respectivos tamanhos em pares de bases e os produtos que amplificam. *As dimensões são estimadas, pois são baseadas em sequências *contig* de sequências heterólogas formados por alinhamentos entre sequências EST de *S. falcatula* e sequências mRNA de *S. neurona*

Após os produtos de PCR terem sido amplificados, foram selecionadas regiões internas que pudessem ser utilizadas como sítio para *heminested-PCR*.

4.4.1 Ciclo da Reação em Cadeia pela Polimerase

O protocolo a seguir foi adotado para a amplificação das amostras com qualquer um dos *primers* desenhados neste estudo.

Para uma reação de 50µL foram utilizados:

- 25,2µL de água ultrapura autoclavada
- 5µL de 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM; pH 9,0)
- 8µL da mistura de dNTPs (1,25mM)
- 1,5µL de MgCl₂ (50mM)
- 2,5µL de cada *primer* (10 pmol/ µL)
- 0,3µL de *Taq DNA Polimerase Platinum* – Invitrogen (5 U/ul)
- 5µL de DNA extraído da amostra alvo

Foi utilizado o seguinte ciclo:

- Desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos
- Desnaturação a 94°C por 30 segundos
- Hibridização dos *primers* a 55°C por 30 segundos
- Extensão a 72°C por 50 segundos
- 40 ciclos de repetição a partir da desnaturação por 30 segundos
- Extensão final a 72°C por 5 minutos

4.5 *Heminested-PCR*

Os *primers* para a segunda etapa de amplificação (*heminested-PCR*) foram testados em reação em cadeia pela polimerase (PCR) nas seguintes combinações: 11/3, 6/9 e 12/7 para amplificação do SAG-2 SAG-3 e SAG-4, respectivamente (Quadro 2).

Primers <i>hnPCR</i>	Sequências	Tamanho do produto*
SAG-2 (11) (senso) SAG-2 (3) (anti-senso)	GGT CAG AGC TTT GTG CTG AA ACA ACA CTG TGA GAG ATG CGA	360
SAG-3 (6) (senso) SAG-3 (9) (anti-senso)	CTC GCA GTT GCC TGC CTT G ATC CCA CGG ACC CGT TCC C	450
SAG-4 (12) (senso) SAG-4 (7) (anti-senso)	CCG AGG TAC AGT TCA AGG CG CGA CGA CGA TAC CCA ATG CC	348

Quadro 2 - Sequências dos *primers* utilizados nas reações de *heminested-PCR*, seus respectivos tamanhos em pares de bases e os produtos que amplificam. * As dimensões são estimadas, pois são baseadas em sequências *contig* de sequências heterólogas formados por alinhamentos entre sequências EST de *S. falcatula* e sequências mRNA de *S. neurona*

4.5.1 Ciclo da *heminested-PCR*

O protocolo a seguir foi adotado para a amplificação das amostras com qualquer um dos pares de *primers* desenhados neste estudo.

Para uma reação de 50µL foram utilizados:

- 29,2µL de água ultrapura autoclavada
- 5µL de 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM; pH 9,0)
- 8µL da mistura de dNTPs (1,25mM)
- 1,5µL de MgCl₂ (50mM)
- 2,5µL de cada *primer* (10 pmol/ µL)
- 0,3µL de Taq DNA polimerase
- 1µL de DNA extraído

Foi utilizado o seguinte ciclo:

- Desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos
- Desnaturação a 94°C por 30 segundos

- Hibridização dos *primers* a 55°C por 30 segundos
- Extensão a 72°C por 50 segundos
- 40 ciclos de repetição a partir da desnaturação por 30 segundos
- Extensão final a 72°C por 5 minutos

4.6 Detecção do Produto Amplificado

Os produtos obtidos com os ensaios de amplificação mais o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder), foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em cuba horizontal, imersos em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA 1mM). Em cada orifício do gel foram depositados 10µL de cada amostra misturado a 2µL de corante de amostra (30% de glicerol; 0,25% de azul de bromofenol).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5µg/mL) por 15 a 20 minutos e a visualização das bandas foi realizada por meio de transiluminação com luz ultravioleta.

4.7 Sequenciamento

Nos itens abaixo estão descritas as metodologias realizadas para a obtenção das sequências de nucleotídeos de cada produto.

4.7.1 Purificação dos Produtos Amplificados

Os produtos de *heminested*-PCR de tamanho esperado foram recortados do gel de agarose a 1,5% com lâmina de bisturi. Esses fragmentos foram eluídos do gel e a purificação do DNA foi realizada com o “kit” GFX™ (Amersham Biosciences), conforme instruções do fabricante.

4.7.2 Quantificação dos Produtos de PCR Purificados

Alíquotas dos produtos de PCR purificados (5 μ L) foram quantificadas com o auxílio do marcador de peso molecular Gene Ruler TM 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas) em gel de agarose 1,5% imerso em Tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M). As intensidades luminosas das bandas adquiridas após purificação do DNA foram visualmente comparadas com as do marcador. A concentração em nanogramas de DNA das amostras foi determinada seguindo a tabela fornecida pelo fabricante do marcador de peso molecular.

4.7.3 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o “kit” ABI PRISM™ Big Dye Terminator™ (Applied Biosystems). Misturou-se de 6ng de DNA purificado, 2 μ L de Big Dye™, 1 μ L de Tampão SaveMoney 5x (Tris-HCl 400mM; MgCl₂ 10mM, pH 9,0), 2 pmol de cada um dos *primers* (senso ou anti senso) e água q.s.p. 10 μ L.

O ciclo de sequenciamento foi efetuado no termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf com o seguinte programa:

- Desnaturação inicial: 96°C por 1 minuto
- Desnaturação: 96°C por 15 segundos
Rampa: 1,0°C/ s
- Hibridização: 50°C por 15 segundos
Rampa: 1,0°C/ s
- Extensão: 60°C por 4 minutos
Rampa: 1,0°C/ s

O ciclo repete-se por mais 39 vezes a partir da desnaturação. Em seguida, as amostras foram mantidas a 4 °C embrulhadas em papel alumínio até a sua precipitação.

4.7.4 Precipitação do DNA

Após o ciclo de sequenciamento, adicionou-se 40µL de isopropanol a 65% (v/v em água) nas amostras. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente e local escuro. Em seguida, foram centrifugadas a 14.000 g por 25 minutos.

O sobrenadante foi descartado com o auxílio de pipeta e em seguida adicionou-se 300µl de etanol a 60% (v/v em água). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 14.000 g por 10 minutos.

O etanol foi removido com a pipeta e as amostras foram colocadas em banho seco a 80°C por cerca de 2 minutos até a secagem completa dos microtubos.

As amostras foram mantidas em local escuro a -20°C até o sequenciamento.

4.7.5 Eletroforese de Sequenciamento

As amostras foram homogeneizadas com formamida, colocadas em banho-seco por 3 minutos a 95°C, mantidas em gelo por cerca de 2 minutos e aplicadas para o sequenciamento. Este foi realizado a partir do protocolo do manual técnico do equipamento ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

4.7.6 Análise das Sequências

A qualidade dos produtos sequenciados, bem como a montagem da sequência final de cada amostra foi realizada utilizando-se o programa Phred-Phrap, contido na suíte Codoncode Aligner.

Determinadas as sequências de nucleotídeos de cada amostra, as mesmas foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W, contido na suíte BioEdit

Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no GenBank.

Com o auxílio do programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) foi avaliado o grau de diversidade nucleotídica existente entre as sequências e árvores filogenéticas foram elaboradas empregando-se métodos de distância. Análises de polimorfismos de DNA e de taxas de substituições sinônimas e não sinônimas foram realizadas com auxílio do programa DNAsp (LIBRADO; ROZAS, 2009).

A história evolutiva foi inferida empregando-se método Neighbor-joining e o modelo de substituição de nucleotídeos K2P (Kimura dois parâmetros). A porcentagem de réplicas nas quais os táxons se agrupam em clusters, calculado com teste de *bootstrap*, é mostrada junto aos ramos das árvores. As árvores são representadas em escala e sem raiz.

As análises de polimorfismo de nucleotídeos a partir de dados de sequências alinhadas foram feitos com a ajuda do programa DnaSP v5 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Com o programa DnaSP estimou-se os seguintes parâmetros: diversidade nucleotídica média ($P(i)$) e desvio padrão de $P(i)$ ($SD P(i)$), número total de sítios, número de sítios variáveis, número de substituições não sinônimas, número de substituições sinônimas.

5 RESULTADOS

Neste capítulo estão sendo abordados os resultados obtidos neste experimento.

5.1 Análise das Sequências

Foram analisadas sequências de 28 amostras de esporocistos de *Sarcocystis* spp. que tiveram o DNA nuclear extraído e amplificado com os marcadores moleculares direcionados aos genes codificadores de antígenos de superfície SAG-2, SAG-3 e SAG-4. Dentre estas amostras, 20 tiveram os três fragmentos gênicos sequenciados.

A análise das sequências gênicas obtidas gerou os seguintes resultados:

SAG-2: 275 nucleotídeos e 7 alelos para 26 amostras

SAG-3: 353 nucleotídeos e 6 alelos para 21 amostras

SAG-4: 278 nucleotídeos e 11 alelos para 25 amostras

Para cada marcador foi realizada análise filogenética empregando-se método de distância. As reconstruções obtidas permitiram verificar as relações de ancestralidade entre os diversos alelos, que foram nomeados de acordo com os critérios evolutivos inferidos a partir do posicionamento dos táxons nas árvores geradas.

Para os três *loci*, os diversos alelos foram agrupados em grupos ou genótipos, que foram nomeados com caracteres de numeração romana (I, II e III e IV). Divergências intra-genótipos (sub-genótipos) foram representadas por letras minúsculas (Ia, Ib, Ic, etc.). Cada alelo foi nomeado com numeração arábica (Ia1, Ia2, Ia3, etc.). As reconstruções filogenéticas para os *loci* SAG-2, SAG-3 e SAG-4 podem ser encontradas nas figuras 2, 3 e 4, respectivamente, enquanto o quadro 3 reúne os resultados das genotipagens para as diferentes amostras.

ISOLADOS	ALELOS		
	SAG-2	SAG-3	SAG-4
<i>não classificados</i>			
G03	IIIa	IIIa	...
G07	Ia	...	IIa
G11	Ia	...	IIb
G13	IIIa	...	...
G18	...	...	IIa
G26	Ib	...	Ia2
G36	IIIa	...	Ib1
<i>falcatula-like</i>			
G16	Ia	Ia	IIb
G17	Ib	Ib	IIa
G23	Ib	Ib	IIa
G25	Ib	Ib	IIa
G27	Ib	Ia	Ib1
G30	Ib	Ib	IIa
Sfa	Ia	Ia	Ia1
<i>sarcocystis-RS</i>			
G02	Ib	IIIa	Ib3
G04	IIIa	IIIa	Ib1
G10	Ib	IIIa	Id
G19	Ia	IIIb	IIb
G21	IIIa	IIIa	Ib2
G22	IIIa	IIIa	III
G28	Ib	IIIa	Ia1
G29	IV	IIIa	IIa
G31	IIIb	IIIa	IIc
G32	IIIa	IIIa	Ib1
G33	IIIa	IIIa	Ib1
G34	IIIa	IIIa	Ib1
<i>neurona-like</i>			
G37	IIb	IIc	Ic2
G38	IIb	IIc	Ic2
Sne	IIa	IIb	Ic1

...: alelo não determinado

Sne: *Sarcocystis neurona*; AY191006 (SAG-2); AY191007 (SAG-3); AY191008 (SAG-4).

Sfa: *Sarcocystis falcatula*; GQ851953 (SAG-2); GQ851956 (SAG-3); GQ851959 (SAG-4).

Quadro 3 - Identificação das amostras de *Sarcocystis* spp. obtidas de fezes de marsupiais do gênero *Didelphis* spp, segundo os genótipos encontrados a partir dos genes SAG-2, SAG-3 e SAG-4

Figura 2 - Reconstruções filogenéticas do grupo *Sarcocystis*, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros, utilizando 275 nucleotídeos da região codificadora de SAG-2. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

Figura 3 - Reconstruções filogenéticas do grupo *Sarcocystis*, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros, utilizando 353 nucleotídeos da região codificadora de SAG-3. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

Figura 4 - Reconstruções filogenéticas do grupo *Sarcocystis*, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros, utilizando 278 nucleotídeos da região codificadora de SAG-4. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

Finalmente, os alelos SAG-2, SAG-3 e SAG-4 de cada amostra foram concatenados para uma análise filogenética com o conjunto dos dados. Depois de concatenadas, as sequências foram traduzidas e as sequências de aminoácidos resultantes foram empregadas para a reconstrução que é apresentada na figura 5.

Na reconstrução com os dados de aminoácidos é possível verificar que as amostras podem ser subdivididas em três grupos. O primeiro grupo é formado por sequências estreitamente relacionadas à *S. neurona*. Dentre as vinte amostras do Rio Grande do Sul, apenas duas foram classificadas como *S. neurona*, os isolados de números 37 e 38.

Figura 5 - Reconstrução filogenética do grupo *Sarcocystis*, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de aminoácidos pelo método de correção de Poisson utilizando 300 aminoácidos das regiões codificadoras de SAG-2, SAG-3 e SAG-4. Análise concatenada. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

As amostras que tiveram apenas um ou dois dos fragmentos gênicos sequenciados, foram excluídas da análise concatenada, pois não seria possível a realização das demais análises. As informações obtidas com as sequências dos três fragmentos foram utilizadas para a determinação dos grupos e para a comparação entre os *loci* estudados.

Em relação às amostras relacionadas ao *S. neurona* é interessante mostrar a divergência encontrada em sequências gênicas do *locus* SAG-3. Nas análises filogenéticas, como comentadas acima, empregamos 353 nucleotídeos deste gene, ou seja, empregamos apenas sítios relacionados à região codificadora (*exons*). Isto porque uma região *downstream* a este fragmento foi retirada da análise por constituir-se uma região de *intron*. E nesta região de *intron* é possível observar que as amostras estreitamente relacionadas à *S. neurona* tem uma composição nucleotídica bastante divergente das demais, com a presença de uma inserção bastante evidente. A figura 6 esclarece esta condição mais apropriadamente. Nesta figura, é possível notar que as amostras relacionadas à *S. neurona* possuem inserção de cerca de 90 nucleotídeos, onde é possível perceber também a presença de sequências tipo microssatélites com repetições de dinucleotídeos AT.

Figura 6 - Alinhamento de sequências de nucleotídeos da região codificadora de SAG-3: as sequências relacionadas à *S. neurona* possuem uma inserção de cerca de 90 pares de bases em relação àquelas relacionadas a *S. falcatula*

Ainda em relação à SAG-3, algumas inserções/deleções (*indels*) podem ser observadas entre as posições 380 e 390. Estes *indels*, que podem ser visualizados na figura 7, ocorrem em trincas de nucleotídeos e representam remoções completas de um ou dois códons que podem representar alterações importantes que devem ocorrer em proteína de superfície do parasito que é codificada neste *locus*.

Figura 7 - Alinhamento de sequências de nucleotídeos da região codificadora de SAG-3: *indels* que ocorrem entre sequências de *S. neurona*, *S. falciparum* e as sequências determinadas neste estudo

Indels também podem ser observados nos alinhamentos de SAG-2 e de SAG-4, nas posições 386/387/388 (SAG-2) e nas posições 655/656/657 (SAG-4) (Figura 8).

Figura 8 - Alinhamento de sequências de nucleotídeos da região codificadora de SAG-2 (superior) e SAG-4 (inferior): *indels* que ocorrem entre sequências de *S. neurona*, *S. falcata* e as sequências determinadas neste estudo

Pela análise conjunta dos alelos SAG-2, SAG-3 e SAG-4, é possível afirmar que as diversas configurações alélicas não devem estar sempre “ligadas”, visto que

as amostras que tem uma configuração nucleotídica para SAG-2 similar à de *S. neurona* tem, para SAG-4, uma configuração mais próxima à de *S. falcatula*.

Neste trabalho não foram encontrados cromatogramas com mistura de sequências, exceto em uma amostra. Cromatogramas com mistura de amostras podem ser indicativos de infecções mistas ou heterozigose de sequência alélica. O único cromatograma onde este evento foi detectado foi na amostra G24, mostrada na Figura 9.

Figura 9 - Cromatograma obtido após sequenciamento automático de produto de PCR amplificado a partir da amostra G24 para o *locus* SAG-2. Notar as posições 131, 136 e 137, onde ocorrem picos de fluorescência duplos, indicativos de misturas de alelos em uma mesma amostra

Pelos resultados da análise de diversidade nucleotídica percebe-se que o número de substituições não sinônimas é superior ao número de substituições sinônimas, em todos os *loci*. A diversidade nucleotídica entre as sequências excluindo o grupo *Neurona*-like é tão elevada quanto aquela em que todas as sequências são analisadas.

Os dados de diversidade nucleotídica podem ser encontrados na tabela 1 apresentada abaixo:

Tabela 1 - Diversidade nucleotídica de genes SAG-2, SAG-3 e SAG-4 entre os 20 isolados de *Sarcocystis* spp. deste estudo para os quais os três *loci* foram sequenciados. Dados de dois isolados padrão de *S. falcatula* e *S. neurona* foram incluídos

Gene	Dados	P(i)	SD P(i)	Nº total de sítios (S)	Nº de sítios variáveis (VS)	Substituições não sinônimas (RC)	Substituições sinônimas (SC)	VS/S	RC/VS	RC/SC
SAG-2	excluindo Neurona-like todos	0,03591	0,0044	276	24	19	5	8,70%	79,17%	3,80
		0,03592	0,00441	276	28	22	7	10,14%	78,57%	3,14
SAG-3	excluindo Neurona-like todos	0,06938	0,01082	351	58	40	19	16,52%	68,97%	2,11
		0,08107	0,0083	351	71	47	22	20,23%	66,20%	2,14
SAG-4	excluindo Neurona-like todos	0,04816	0,00485	276	38	15	19	13,77%	39,47%	0,79
		0,0476	0,00473	276	40	17	19	14,49%	42,50%	0,89

6 DISCUSSÃO

Por muito tempo os critérios utilizados para a distinção de integrantes do gênero *Sarcocystis* a partir das estruturas de sarcocistos e esporocistos não se mostraram eficientes (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989; CHEADLE; DAME; GREINER, 2001). Com o conhecimento de que duas espécies muito parecidas deste gênero (*S. neurona* e *S. falcatula*) utilizavam os marsupiais do gênero *Didelphis* como hospedeiro definitivo e a partir das similaridades encontradas entre suas sequências codificadoras de subunidade menor de RNA ribossômico (SSU-RNA), autores propuseram equivocadamente que *S. neurona* e *S. falcatula* fossem organismos sinônimos (DAME et al., 1995).

Estudo com marcadores oriundos de RAPD denominados 25/396, 33/54, 63/65 e 48/50 revelaram que determinadas amostras de *Sarcocystis* eliminados por gambás possuíam perfis mistos entre *S. falcatula* e *S. neurona* (TANHAUSER et al., 1999). Por fim, variação intra-específica nos genes codificadores de antígenos, SAGs de isolados de *S. neurona* foi recentemente reportada em estudos de caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. (CROWDUS et al., 2008; HOWE et al., 2008)

Estes resultados motivaram o presente estudo no qual foi explorada a variabilidade de marcadores que expressem características fenotípicas dos parasitos, que é o caso dos SAGs, para de amostras *Sarcocystis* spp obtidas de fezes de gambás.

Baseado na completa ausência do gene SAG-1 em alguns isolados de *S. neurona* (HOWE et al., 2008) e com a descoberta de que determinados isolados deste protozoário possuem ou gene SAG-1 ou o gene SAG-5 e não os dois simultaneamente (CROWDUS et al., 2008), o presente estudo foi conduzido comparando amostras apenas com *primers* desenhados para ancorarem-se em regiões dos genes SAGs que parecem ser conservadas em todos isolados, como é o caso dos genes SAG-2, SAG-3 e SAG-4. De fato, os genes SAG-1 ou SAG-5 parecem não funcionar para diferenciação ou caracterização das duas espécies analisadas, uma vez que *primers* desenhados em regiões conservadas de sequências dos genes que amplificassem tanto SAG-1 como SAG-5, mostraram-se

específico apenas para *S. neurona*, diferentemente dos demais SAGs que amplificaram DNA tanto de *S. neurona*, como de *S. falcatula* (WENDTE et al., 2010a).

Com o mesmo intuito, porém visando o conhecimento apenas em amostras de *S. neurona*, Wendte et al. (2010a) e Rejmannek et al. (2010) na expectativa de explorar um marcador que fosse altamente informativo, aplicaram *primers* desenhados para genes SAGs, para avaliar as diferenças genotípicas entre esses isolados. Diferentemente, o presente estudo, apresenta a análise de sequências obtidas a partir de *primers* que ancoram tanto em *S. neurona* como em *S. falcatula*.

A caracterização molecular de isolados de *S. neurona* de gambás da espécie *Didelphis virginiana* e de diferentes hospedeiros intermediários da Califórnia Central, revelaram uma extensa similaridade em SAG-2, SAG-3 e SAG-4. Mesmo assim, os autores demonstraram pela análise tanto dos SAGs como de outros *loci*, que tais isolados podem ser separados em três grupos geneticamente distintos (REJMANEK et al., 2010). Diversidade genética limitada entre isolados de mamíferos marinhos infectados por *S. neurona* nos três SAGs, também foi descrita em outro local (WENDT et al., 2010a).

A partir dos *primers* desenhados neste trabalho, foi avaliada a variabilidade de isolados de *Sarcocystis* spp. oriundos de gambás do estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil, pelo sequenciamento de genes SAGs. Resultados inesperados foram encontrados e três linhagens foram observadas. Duas linhagens diferentes entre si e geneticamente relacionadas ao *S. falcatula* (*Sarcocystis*-RS e *Falcatula*-like) foram identificadas entre os isolados de *Sarcocystis*. Estas linhagens parecem trocar genes em eventuais processos de recombinação. Além disso, uma terceira linhagem de *Sarcocystis*, geneticamente similar, mas não idêntica a *S. neurona*, foi detectada (*Neurona*-like).

Estudos de genética populacional demonstraram que alguns isolados de *S. neurona* parecem fazer parte de uma população com estrutura genética que possui características tanto de população panmítica quanto clonal. Além disso, os resultados obtidos a partir da análise de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) e de marcadores microssatélites, demonstraram que existe um limitado, porém considerável, polimorfismo em *loci* gênicos de *S. neurona*

(ASMUNDSSON et al., 2006; ELSHEIKHA; SCHOTT; MANSFIELD, 2006; SUNDAR et al., 2008).

Pelos resultados apresentados acima, a variação alélica e diversidade genotípica encontradas parecem ser típicas de que houve cruzamento entre as populações de *S. neurona*, no entanto, pelo fato de um genótipo ter ocorrido com alta frequência, esse dado é sugestivo de que linhagens clonais de *S. neurona* podem naturalmente acontecer (ASMUNDSSON et al., 2006). Conclusões idênticas foram tecidas por outros autores. Wendte et al. (2010) analisaram a estrutura populacional de isolados de *S. neurona* obtidos de um surto de mortalidade em massa em lontras-marinha no Sul da Califórnia com sintomas de doença neurológica e/ou sistêmica. Os autores observaram que um único clone geneticamente definido foi encontrado infectando os indivíduos expostos ao surto. Os autores explicam estes dados da forma como segue. A diversidade genética e biológica para este tipo de parasito é garantida durante o processo de recombinação sexual que ocorre durante a replicação do mesmo no hospedeiro definitivo. Esta recombinação propicia o aparecimento de linhagens genéticas altamente adaptadas e que podem se propagar com muita eficiência em um determinado ambiente. Como o *S. neurona* tem ciclo heteróximo obrigatório, esta linhagem teve de se replicar em hospedeiros definitivos e reproduzir-se sexualmente trocando genes com indivíduos geneticamente iguais, gerando clones idênticos ao longo de gerações. Este fenômeno é conhecido como auto-fecundação (do Inglês, *self-mating*) e mostra a importância da recombinação genética na propagação de linhagens de parasitos. Neste caso, a recombinação foi um evento que permitiu em um dado momento a geração de uma linhagem muito bem sucedida que teve maior chance de se propagar entre a população suscetível. Esta propagação aconteceu via hospedeiro definitivo que albergava sempre a mesma linhagem que trocava genes entre si, o que conferiu uma estrutura clonal para a população estudada (WENDTE et al., 2010).

Neste estudo, pela análise conjunta dos alelos SAG-2, SAG-3 e SAG-4, foi possível inferir que as diversas configurações alélicas encontradas não devem estar sempre associadas. Para exemplificar, as amostras que tem uma configuração nucleotídica para SAG-2 similar à de *S. neurona* tem, para SAG-4, uma configuração mais próxima à de *S. falcatula*. Esta condição de configuração alélica desassociada

é indicativa de uma ausência de desequilíbrio de ligação (do inglês, *linkage disequilibrium* - LD), ou seja, uma associação não aleatória entre alelos distintos em indivíduos de uma população. A ocorrência de LD em grupos dentro de uma população pode indicar a ausência de troca gênica e, portanto, o isolamento sexual dos indivíduos desse grupo em particular (TIBAYRENC, 1999).

A reconstrução filogenética utilizando dados de aminoácidos indica que três grupos de organismos podem existir dentro do complexo de indivíduos na população estudada e que o grupo designado como *Sarcocystis*-RS compartilha alelos com os indivíduos do grupo *Falcatula*-like. Assim, é plausível supor que ocorra troca gênica entre essas duas populações. Se os *Sarcocystis* eliminados pelos gambás trocam genes por recombinação sexual, possivelmente está havendo troca entre alelos altamente divergentes entre si, o que pode conferir variabilidade com importantes consequências na adaptabilidade do parasita bem como na epidemiologia da infecção.

Em relação ao grupo *Neurona*-like, nenhum dos indivíduos desse grupo compartilha alelos com indivíduos de outros grupos. No entanto, esta observação ainda precisa ser confirmada, pois esta análise foi baseada em um número pequeno de seqüências pertencentes a este grupo.

A variação alélica de SAG entre as cepas de *S. neurona* da América do Norte foi baixa (REJMANEK et al., 2010; WENDTE et al., 2010a.), com apenas três sítios polimórficos detectados em SAG-3 e SAG-4. Comparando os isolados G37 e G38 do grupo *Neurona*-like e os isolados norte-americanos de *S. neurona*, 4 polimorfismos foram identificados em SAG-3, 5 em SAG-2 e 3 em SAG-4. A sequência de SAG-3 de *S. neurona* possui, em relação à sequência homóloga de *S. falcatula*, uma inserção de aproximadamente 100pb na região do *intron* como já foi anteriormente relatado (WENDT et al., 2010a). No alinhamento entre os isolados de *S. neurona* norte-americano e os isolados G37 e G38, é possível observar que existe uma deleção de 8 nucleotídeos dentro deste *intron*. Esses resultados indicam que os isolados de *S. neurona* da América do Sul são bastante divergentes dos isolados da América do Norte.

A variabilidade de nucleotídeos nos genes codificadores de superfície estudados foi alta em todos os casos. Estes genes, de fato como é esperado, devem estar submetidos à intensa pressão de seleção positiva, como observado em SAG-1

de *S. neurona* no qual a presença de pressão seletiva positiva em regiões codificadoras de antígenos foi descrita por Elsheikha e Mansfield (2004). Esta inferência é feita a partir da observação das taxas entre substituições não sinônimas e sinônimas. De maneira geral, as taxas entre substituições não sinônimas e sinônimas em um dado gene tendem a ser baixas, porque na maioria das vezes as mutações são desvantajosas para o organismo. Como consequência, os indivíduos mutantes tendem a ser eliminados da população ou mesmo nem chegam a ter viabilidade. Por outro lado, quando as substituições não sinônimas ocorrem com maior frequência, é indicativo que a modificação do produto gênico seja um efeito favorável ao indivíduo. Por isso, uma razão elevada entre substituições não sinônimas/sinônimas pode ser verificada quando a seleção natural favorece a troca de aminoácido em uma determinada proteína. Tal fato pode ser resultado tanto de diferenças na resposta imune do hospedeiro à infecção, bem como de diferenças encontradas nos diferentes ambientes físicos dos hospedeiros (ELSHEIKHA; MANSFIEL, 2004).

Mesmo quando os dados obtidos com as linhagens que pertencem ao grupo *Neurona*-like foram removidos da análise da diversidade de nucleotídeos, a variabilidade de nucleotídeos dentro *Sarcocystis*-RS e *Falcatula*-like ainda continuou sendo alta. Estes resultados enfatizam a impressionante diversidade de SAGs que existe entre este grupo de organismos.

É preciso salientar que mistura de amostras podem ocorrer em alguns casos, visto que um determinado hospedeiro definitivo pode estar infectado e eliminando simultaneamente duas variantes de um mesmo gênero de *Sarcocystis*. Nas amostras analisadas, as quais todas foram sequenciadas diretamente dos produtos de PCR, foi observado cromatograma com picos duplos de fluorescência em apenas uma delas. Este fenômeno pode indicar a ocorrência de heterozigose, ou a presença de mais de um organismo havendo a mistura de alelos em uma única amostra. A ausência de cromatograma duplo na maioria das amostras reforça a hipótese de que a ocorrência de amostras mistas foi um evento raro.

Com os resultados obtidos até o momento, observa-se que uma grande variabilidade em sequências de codificação antígenos de superfície ocorre entre *Sarcocystis* eliminados pelos mamíferos do gênero *Didelphis* spp. Os resultados também sugerem que diferentes isolados de *Sarcocystis* podem trocar genes e,

portanto, têm um padrão de evolução panmítica. Por esta razão, seria interessante a pesquisa de genes localizados em genoma extra nuclear, como é o caso de genes mitocondriais, uma vez que tais genes têm se mostrado marcadores moleculares de grande valor para as filogenias moleculares, pois tem permitido a reconstrução de histórias evolutivas nas mais diversas classes de organismos (FAIVOVICH et al., 2005; MARTINEZ et al., 2006; JING et al., 2007; MATSUI et al., 2007). O uso de outros marcadores poderia esclarecer questões evolutivas levantadas nesta investigação, ou seja, o estudo das relações filogenéticas entre grupos de amostras *Sarcocystis*-RS, *Falcatula*-like e *Neurona*-like.

7 CONCLUSÕES

1. Foi possível identificar entre as amostras de *Sarcocystis* spp. oriundas de gambás do estado do Rio Grande do Sul, três diferentes linhagens a partir do sequenciamento de genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs). Duas linhagens geneticamente relacionadas ao *S. falcatula* (*Sarcocystis*-RS e *Falcatula*-like) e uma terceira linhagem geneticamente similar a *S. neurona* (*Neurona*-like).
2. A partir da análise dos três *loci* estudados e da reconstrução filogenética utilizando dados de aminoácidos foi possível observar que as duas linhagens geneticamente relacionadas ao *S. falcatula* compartilham alelos entre si, permitindo inferir que ocorra troca gênica entre essas duas populações.

REFERÊNCIAS

- ASMUNDSSON, I.M.; DUBEY, J.P.; ROSENTHAL, B.M. A genetically diverse but distinct North American population of *Sarcocystis neurona* includes an overrepresented clone described by 12 microsatellite alleles. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 5, p. 352-360, 2006.
- BOX, E. D.; MEIER, J. L.; SMITH, J. H. Description of *Sarcocystis falcatula* Stiles, 1893, a parasite of birds and opossums. **Journal of Protozoology**, v.31, n. 14, p. 31521-31524, 1984.
- BOX, E. D.; SMITH, J. H. The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds. **The Journal of Parasitology**, v. 68, n. 4, p. 668-673, 1982.
- BURG, J. L.; PERELMAN, D.; KASPER, L. H.; WARE, P. L.; BOOTHROYD, J. C. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 10, p. 3584-3591, 1988.
- CESBRON-DELAUW, M. F.; TOMAVO, S.; BEAUCHAMPS, P.; FOURMAUX, M. P.; CAMUS, D.; CAPRON, A.; DUBREMETZ, J. F. Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 23, p.16217-16222, 1994.
- CHEADLE, M. A.; DAME, J. B.; GREINER, E. C. Sporocyst size of isolates of *Sarcocystis* shed by the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 305-311, 2001.
- CHEADLE, M. A.; TANHAUSER, S. M.; DAME, J. B.; SELLON, D. C.; HINES, M.; GINN, P. E.; MACKAY, R. J.; GREINER, E. C. The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 330-335, 2001a.
- CHEADLE, M. A.; YOWELL, C. A.; SELLON, D. C.; HINES, M.; GINN, P. E.; MARSH, A. E.; DAME, J. B.; GREINER, E. C. The striped skunk (*Mephitis mephitis*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 843-849, 2001b.
- CLUBB, S. L.; FRENKEL, J. K. *Sarcocystis falcatula* of opossums: transmission by cockroaches with fatal pulmonary disease in psittacine birds. **The Journal of Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 116-124, 1992.
- CROWDUS, A. C.; MARSH, A. E.; SAVILLE, W. J.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; GRANSTROM, D. E.; HOWE, D. K. SnSAG5 is an alternative surface antigen of *Sarcocystis neurona* strain that is mutually exclusive to SnSAG1. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 1-2, p. 36-43, 2008.
- DAME, J. B.; MACKAY, R. J.; YOWELL, C. A.; CUTLER T. J.; MARSH, A.; GREINER, E. C. *Sarcocystis falcatula* from passerine and psittacine birds: synonymy

with *Sarcocystis neurona*, Agent of Equine Protozoal Myeloencephalitis. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 930-935, 1995.

DUBEY, J. P.; DAVIS, S. W.; SPEER, C. A.; BROWMAN, D. D.; de LAHUNTA, A.; GRANSTROM, D. E.; TOPPER, M. J.; HAMIR, A. N. CUMMINGS, J. F.; SUTER, M. M. *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. **The Journal of Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 212-218, 1991.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Isolation in immunodeficient mice of *Sarcocystis neurona* from opossum (*Didelphis virginiana*) faeces, and its differentiation from *Sarcocystis falcatula*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 1823-1828, 1998.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S., *Sarcocystis speeri* n.sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the opossum (*Didelphis virginiana*). **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 903-909, 1999.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; KERBER, C. E.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; ROSENTHAL, B. M. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 295-304, 2001.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; REZENDE, P. C. B.; COSTA A. J. Characterization of an unidentified *Sarcocystis falcatula*-like parasite from the south american opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 538-544, 2000.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ROSENTHAL, B. M.; KERBER, C. E.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; GENNARI, S. M.. Isolates of *Sarcocystis falcatula*-like organisms from South American opossums *Didelphis marsupialis* and *Didelphis albiventris* from São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1449-1453, 2001a.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SAVILLE, W. J. A.; REED, S. M.; GRANSTROM, D. E.; SPEER, C. A. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 89-131, 2001b.

DUBEY, J. P.; ROSENTHAL, B. M.; SPEER, C. A. *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 595-603, 2001.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R., *Sarcocystosis of animals and man*, Boca Raton, FL: CRC Press, 1989, p. 215.

DUBEY, J.P.; SAVILLE, W. J. A.; LINDSAY, D. S.; STICH, R. W.; STANEK, J. F.; SPEER, C. A.; ROSENTHAL, B. M.; NJOKU, C. J.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; REED, S. M. Completion of the life cycle of *Sarcocystis neurona*. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 6, p. 1276-1280, 2000a.

DUBEY, J. P.; SAVILLE, W. J. A.; STANEK, J. F.; LINDSAY, D. S.; ROSENTHAL, B. M.; OGLESBEE, M. J.; ROSYPAL, A. C.; NJOKU, C. J.; STICH, R. W.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; HAMIR, A. N.; REED, S. M. *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with sarcocysts, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. **Veterinary Parasitology**, v. 100, n. 3-4, p. 119-129, 2001c.

DUBEY, J. P.; VENURINI, L.; VENTURINI, M. C.; SPEER, C. A. Isolation of *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999 Parasite from the South American Opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 1, p. 160-163, 2000b.

ELSHEIKHA, H. M.; MANSFIELD, L. S. *Sarcocystis neurona* major surface antigen gene 1 (SAG1) shows evidence of having evolved under positive selection pressure. **Parasitology Research**, v. 94, n. 6, p. 452-459, 2004.

ELSHEIKHA, H. M.; MURPHY, A. J.; MANSFIELD, L. S. Phylogenetic congruence of *Sarcocystis neurona* Dubey et al., 1991 (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the United States based on sequence analysis and restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Systematic Parasitology**, v. 61, n. 3, p. 191-202, 2005.

ELSHEIKHA, H. M.; SCHOTT, H. C.; MANSFIELD, L. S. Genetic variation among isolates of *Sarcocystis neurona*, the agent of protozoal myeloencephalitis, as revealed by amplified fragment length polymorphism markers. **Infection Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3448-3454, 2006.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 294, p. 1-240, 2005.

FENGER, C. K.; GRANSTROM, D. E.; LANGEMEIER, J. L.; STAMPER, S.; DONAHUE, J. M.; PATTERSON, J. S.; GAJADHAR, A. A.; MARTENIUK, J. V.; XIAOMIN, Z.; DUBEY, J. P. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 916-919, 1995.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids. Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HE, X. L.; GRIGG, M. E.; BOOTHROYD, J. C.; GARCIA, K. C. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily, **Natural Structural Biology**, v. 9, n. 8, p. 606-611, 2002.

HILLYER, E. V.; ANDERSON, M. P.; GREINER, E. C.; ATKINSON, C. T.; FRENKEL, J. K. An outbreak of *Sarcocystis* in a collection of psittacines. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 4, p. 434-445, 1991.

HOANE, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; RIBEIRO, M. G.; BORGES, A. S.; YAI, L. E. O.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; BONESI, G. L.; HOWE, D. K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. Infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 155-159, 2006.

HOWE, D. K.; CRAWFORD, A.C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L.D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5322-5328, 1998.

HOWE, D.K.; GAJI, R.Y.; MARSH, A.E.; PATIL, B.A.; SAVILLE, W.J.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; GRANSTROM, D.E. Strains of *Sarcocystis neurona* exhibit differences in their surface antigens, including the absence of the major surface antigen SnSAG1. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 6, p. 623-631, 2008.

HOWE, D. K.; GAJI, R. Y.; MROZ-BARRETT, M.; GUBBELS, M-J.; STRIEPEN, B.; STAMPER, S. *Sarcocystis neurona* merozoites express a family of immunogenic surface antigens that are orthologues of the *Toxoplasma gondii* surface antigens (SAGs) and SAG-Related sequences. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1023-1033, 2005.

JACOBSON, E. R.; GARDINER, C. H.; NICHOLSON, A.; PAGE, C. D. Sarcocystis encephalitis in a cockatiel. **Journal of the American Medical Association**, v. 185, n. 8, p. 904-906, 1984.

JACQUET, A.; COULON, L.; DE NEVE, J.; DAMINET, V.; HAUMONT, M.; GARCIA, L.; BOLLEN, A.; JURADO, M.; BIEMANS, R. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 35-44, 2001.

JING, M.; YU, H.; WU, S.; WANG, W.; ZHENG, X. Phylogenetic relationships in genus *Niviventer* (Rodentia: Muridae) in China inferred from complete mitochondrial cytochrome b gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 2, p. 521-529, 2007.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. **Experimental Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 89-96, 2000.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; 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.

LEVINE, N. D. The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. **The Journal of Parasitology**, v.72, n.3, p. 372-382, 1986.

LIANG, F. T.; GRANSTROM, D. E.; ZHAO X. M.; TIMONEY, J. F. Evidence that surface proteins Sn14 and Sn16 of *Sarcocystis neurona* merozoites are involved in infection and immunity. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 1834-1838, 1998.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187. Disponível em: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/25/11/1451.full.pdf+html>>. Acesso em: 17/10/2010.

LINDSAY, D. S., DUBEY, J. P., HORTON, K. M., BOWMAN, D. D. Development of *Sarcocystis falcatula* in cell cultures demonstrates that it is different from *Sarcocystis neurona*. **Parasitology**, v. 118, n. 3, p. 227-233, 1999.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; LAKRITZ, J.; NORDHAUSEN, R.; MADIGAN, J. E.; CONRAD, P. A. Experimental infection of nude mice as a model for *Sarcocystis neurona*-associated encephalitis. **Parasitology Research**, v. 83, n. 7, p. 706-711, 1997a.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; TELL, L.; BOWMAN, D. D.; CONRAD, P.; KETCHERSIDE, C.; GREEN, T. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS-1, from *Sarcocystis falcatula* isolates and *Sarcocystis neurona*. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 4, p. 750-757, 1999.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; TELL, L.; KOSKI, M.; GREINER, E.; DAME, J.; CONRAD, P. A. In vitro cultivation and experimental inoculation of *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona* merozoites into budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 6, p. 1189-1192, 1997b.

MARTINEZ, F. H.; VILLALOBOS, G. C.; CEVALHOS, A. M.; DE LA TORRE, P.; LACLETTE, J. P.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; ESPINOZA, B. Taxonomic study of the *Phyllosoma complex* and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 41, n. 2, p. 279-287, 2006.

MATSUI, M.; TOMINAGA, A.; HAYASHI, T.; MISAWA, Y.; TANABE, S. Phylogenetic relationships and phylogeography of *Hynobius tokyoensis* (Amphibia: Caudata) using complete sequences of cytochrome b and control region genes of mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 204-216, 2007.

MULLANEY, T.; MURPHY, A. J.; KIUPEL, M.; BELL, J. A.; ROSSANO, M. G.; MANSFIELD, L. S. Evidence to support horses as natural intermediate hosts for *Sarcocystis neurona*. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 27-36, 2005.

ÖDBERG-FERRAGUT, C.; SOËTE, M.; ENGELS, A. ; SAMYN, B.; LOYENS, A.; BEEUMEN, J. V.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* SAG4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 237-244, 1996.

ODENING, K. The present state of species systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). **Systematic Parasitology**, v. 41, n. 3, p. 209-233. 1998.

PAGE, C. D.; SCHMIDT, R. E.; ENGLISH, J. H.; GARDINER, C. H.; HUBBARD, G. B.; SMITH, G. C. Antemortem diagnosis and treatment of sarcocystosis in two species of psittacines. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v. 23, n. 1, p. 77-85, 1992.

PORTER, R. A.; GINN, P. E.; DAME, J. B.; GREINER, E. C. Evaluation of the shedding of *Sarcocystis falcatula* sporocysts in experimentally infected Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 313-319, 2001.

ROSENTHAL, B. M.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Relationships among *Sarcocystis* species transmitted by New World opossums (*Didelphis* spp.). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 133-142, 2001.

SMITH, J. H.; MEIER, J. L.; NEILL, P. J. G.; BOX, E. D. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* in the budgerigar. II. Pulmonary Pathology. **Laboratory Investigation**, v. 56, n. 1, p. 72-84, 1987.

SMITH, J. H.; NEILL, P. J. G.; BOX, E. D. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). III. Pathologic and quantitative parasitologic analysis of extrapulmonary disease. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 2, p. 270-287, 1989.

SMITH, J. H.; NEILL, P. J. G.; DILLARD, E. A.; BOX, E. D. Pathology of Experimental *Sarcocystis falcatula* Infections of Canaries (*Serinus canarius*) and Pigeons (*Columba livia*). **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 1, p. 59-68, 1990.

SPANIO, F.; RICCI, I.; DI CRISTINA, M.; POSSENTI, A.; TINTI, M.; DENDOUGA, N.; TOMAVO, S.; CRISANTI, A. The SAG5 locus of *Toxoplasma gondii* encodes three novel proteins belonging to the SAG1 family of surface antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 121-31, 2002.

SUNDAR, N.; ASMUNDSSON, I. M.; THOMAS, N. J.; SAMUEL, M. D.; DUBEY, J. P.; ROSENTHAL B. M. Modest genetic differentiation among North American populations of *Sarcocystis neurona* may reflect expansion in its geographic range. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1-2, p. 8-15, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TANHAUSER, S.M.; MASSEY, E.T.; SCHROEDTER, D.E.; MAYER, B.A.; CHEADLE, M.A.; DAME, J.B.; MACKAY, R.J.; GREINER, E.C. The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is naturally infected with *Sarcocystis neurona*. **International Journal of Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 325-329, 2001.

TANHAUSER, S. M.; YOWELL, C. A.; CUTLER, T. J.; GREINER, E. C.; MACKAY, R. J.; DAME, J. B. Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 221-228, 1999.

TENTER, A. M.; BAVERSTOCK, P.; JOHNSON, A. Phylogenetic relationship of *Sarcocystis* species from sheeps, goats, cattle and mice based on ribosomal RNA sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 503-513, 1992.

TIBAYRENC, M. Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens. **Annual Review of Genetics**, v. 33, p. 449-477, 1999.

TOMAVO, S.; SCWARTZ, R. T.; DUBREMETZ, J. F. Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 10, p. 4576-4580, 1989.

TOMAVO, S.; FORTIER, B.; SOETE, M.; ANSEL, C.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 10, p. 3750-3753, 1991.

WENDTE, J. M.; MILLER, M. A.; LAMBOURN, D. M.; MAGARGAL, S. L.; JESSUP, D. A.; GRIGG, M. E. Self-mating in the definitive host potentiates clonal outbreaks of the apicomplexan parasites *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii*. **Plos Genetics**, v. 6, n. 12, e1001261. 2010. doi:10.1371/journal.pgen.1001261.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3009688/pdf/pgen.1001261.pdf>>. Acesso em: 17/02/2011.

WENDTE, J.M.; MILLER, M.A.; NANDRA, A.K.; PEAT, S.M.; CROSBIE, P.R. Limited genetic diversity among *Sarcocystis neurona* strains infecting southern sea otters precludes distinction between marine and terrestrial isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1-2, p. 37-44, 2010a.