SAMANTHA YURI OSHIRO BRANCO VALADAS

Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de marsupiais do gênero *Didelphis* spp. pela análise de gene mitocondrial, gene de apicoplasto, espaçador interno transcrito (*ITS-1*) e genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs)

São Paulo
2015

SAMANTHA YURI OSHIRO BRANCO VALADAS

Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de marsupiais do gênero *Didelphis* spp. pela análise de gene mitocondrial, gene de apicoplasto, espaçador interno transcrito (*ITS-1*) e genes codificadores de antígenos de superfície (*SAGs*)

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
2015

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.3120
FMVZ

Valadas, Samantha Yuri Oshiro Branco

Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de marsupiais do gênero *Didelphis* spp. pela análise de gene mitocondrial, gene de apicoplasto, espaçador interno transcrito (*ITS-1*) e genes codificadores de antígenos de superfície (*SAGs*) / Samantha Yuri Oshiro Branco Valadas. -- 2015.

112 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. *Sarcocystis neurona*. 2. *Sarcocystis falcatula*. 3. *SAG*. 4. *Barcoding* DNA. 5. Sarcocystidea. 6. Brasil. 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* spp. pela análise de genes mitocondriais, genes de apicoplasto, espaçadores internos transcritos (ITS-1) e genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs)", protocolado sob o nº 2368/2011, utilizando 50 (cinquenta) gambás, sob a responsabilidade do(a) 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 17/8/2011.

We certify that the Research "Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. isolates from marsupials of the *Didelphis* spp. gender through the analysis of mitochondrial and apicoplasto genes, internal transcribed spacers (ITS-1) and SAGs", protocol number 2368/2011, utilizing 50 (fifty) opossums, 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 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VALADAS, Samantha Yuri Oshiro Branco

Título: Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de marsupiais do gênero *Didelphis* spp. pela análise de gene mitocondrial, gene de apicoplasto, espaçador interno transcrito (*ITS-1*) e genes codificadores de antígenos de superfície (*SAGs*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia 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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por todo amor e dedicação,
Por sua capacidade de acreditar e investir em mim.
Ao meu namorado que me deu força e coragem,
Me apoiando nos momentos de dificuldades.
E a toda a minha família que, com muito carinho e apoio,
Não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela orientação, apoio e confiança.

À Profa. Dra. Solange Maria Gennari, pela amizade, ensinamentos e carinho.

À Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, por abrir as portas do Laboratório de Doenças Parasitárias, ensinamentos e amostras concedidas.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, por abrir as portas do Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia para a realização de grande parte deste trabalho.

Aos amigos que encontrei no VPS, Estela, Daniela, Juliana, Sheila, Gisele, Anáia, Juliana, Rui, Mayra pelos momentos de trabalho, convivência e confraternização.

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

Aos funcionários do VPS campus Pirassununga, em especial ao técnico de laboratório João, pela paciência, auxílio, amizade e muitas risadas.

Às bibliotecárias da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice, Neusa Kazue Habe e Elza Faquim por todo auxílio e paciência.

Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado me apoiando com muita paciência, por me criarem com tanto amor e carinho, e pelo esforço e sacrifícios para que este momento fosse possível.

Ao meu namorado, pelo amor, apoio e paciência durante toda esta caminhada, sem o qual nada disso seria possível.

À toda minha família, meus sogros, cunhado e amigos da família, por todo apoio e carinho.

À Carolina e Daniel, pela torcida e amizade incondicional.

Aos meus amigos, pela amizade, amor, apoio e por se tornarem essenciais a minha vida.

Ao Departamento de Parques e Áreas Verdes da Cidade de São Paulo, SP (DEPAVE-3 Fauna, Prefeitura Municipal de São Paulo, SP), por conceder amostras, sem os quais este trabalho não seria possível. Em especial à Ticiane Zwarg, Alice S. de Oliveira, Thaís C. Sanches e Adriana M. Joppert por todo auxílio e paciência.

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

VALADAS, S. Y. O. B. Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de marsupiais do gênero *Didelphis* spp. pela análise de gene mitocondrial, gene de apicoplasto, espaçador interno transcrito (*ITS-1*) e genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs). [Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. isolates from marsupials of the genus *Didelphis* spp. through the analysis of mitochondrial and apicoplast genes, internal transcribed spacer region (*ITS-1*) and surface antigen genes (SAGs)]. 2015. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Em um trabalho anterior, foi avaliada a variabilidade de *Sarcocystis* spp. isolados de gambás oriundos do estado do Rio Grande do Sul pesquisando sequências gênicas codificadoras de antígenos de superfície (SAGs). Os resultados indicaram haver linhagens de isolados de *Sarcocystis* (relacionadas geneticamente a *S. falcatula*) que trocam genes em prováveis processos de recombinação sexual. A proposta deste estudo foi de conhecer as variações gênicas e relações filogenéticas em *Sarcocystis* spp. isolados de gambás através da análise de loci gênicos de genoma mitocondrial (*CytB*), de genoma de apicoplasto (*ClpC*) e das regiões espaçadoras transcritas internas (*ITS-1*), comparando a diversidade encontrada nestes grupos com a observada em integrantes da sub-família Toxoplasmatinae. E também de conhecer a diversidade de genes codificadores de SAG-2, SAG-3 e SAG-4. Neste estudo foram obtidos esporocistos de *Sarcocystis* spp. através de raspado intestinal e fezes provenientes de gambás do gênero *Didelphis*, oriundos do Estado de São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio Grande do Norte. Os marcadores moleculares *CytB*, *ClpC* e *ITS-1* revelaram uma ampla variabilidade genotípica e alelos inéditos entre os isolados do Brasil. Os resultados levam a crer que é possível a existência de espécies “híbridas” de *Sarcocystis* no Brasil, com mistura de genes de ambas as espécies. Em relação aos genes codificadores de SAGs, foi encontrada uma diversidade ainda maior do que trabalho similar realizado. Os resultados sugerem uma possível ocorrência de reassortment e recombinação de alelos em sequências SAGs, contribuindo ainda mais para a geração de variabilidade e consequentemente na configuração antigênica do parasito. Estes resultados demonstram que isolados brasileiros possuem uma composição genética diferente do reportado em demais localidades, o que pode ter reflexos importantes no conhecimento da diversidade das espécies de *Sarcocystis* que infectam gambás em nosso meio e em toda a epidemiologia das infecções produzidas pelos protozoários deste grupo.

Palavras-chave: *Sarcocystis neurona*. *Sarcocystis falcatula*. SAG. Barcoding DNA. Sarcocystidea. Brasil.

ABSTRACT

VALADAS, S. Y. O. B. Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. isolates from marsupials of the genus *Didelphis* spp. through the analysis of mitochondrial and apicoplast genes, internal transcribed spacer region (ITS-1) and surface antigen genes (SAGs). [Caracterização molecular de isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de marsupiais do gênero *Didelphis* spp. pela análise de gene mitocondrial, gene de apicoplasto, espaçador interno transcrito (*ITS-1*) e genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs)]. 2015. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A great variability in surface antigens genes (SAGs) of *Sarcocystis* spp. sporocysts was found in a previous study, through the intestinal scraping technique of opossums from the south region of Brazil. The results indicated probable sexual recombination between lineages of *Sarcocystis* isolates (genetically related to *Sarcocystis falcatula*). The aim of this research is the study of genetic variability and phylogenetic relationships among *Sarcocystis* spp. isolates from captured opossums in Brazil, by the analysis of molecular markers less subjected to selective pressure, such as DNA barcode, for this purpose, genetic loci from mitochondrial (CytB) and apicoplast genome (ClpC), and internal transcribed spacer regions (ITS-1) were applied and compare the results with the diversity found within members of the Toxoplasmatinae sub-family. The diversity among the SAG-2, SAG-3 and SAG-4 genes was also studied. The *Sarcocystis* sporocysts were obtained from opossum's intestinal scraping and faeces from São Paulo State, Rio Grande do Sul State and Rio Grande do Norte State, Brazil. The molecular markers CytB, ClpC and ITS-1 revealed a vast genotypic variability and novel alleles among the Brazilian isolates. The results indicate possible existence of hybrid species of *Sarcocystis* in Brazil, with a gene mixture from both species. Regarding the SAG genes, an even greater variability was found than previously reported. The results also suggest the occurrence of reassortment and allele recombination of SAG sequences, contributing even more to the variability and thus in the parasite's antigenic configuration. In this study, the results demonstrate that isolates from Brazil have a different genetic composition than reported in other locations, which may have important impacts in the knowledge of the diversity of *Sarcocystis* species shed by opossums in our environment and in all of the epidemiology of infections of protozoa of this particular group.

Keywords: *Sarcocystis neurona*. *Sarcocystis falcatula*. SAG. DNA Barcoding. Sarcocystidea. Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado do ciclo de vida dos protozoários do gênero <i>Sarcocystis</i> spp.....	16
Figura 2 – Mapa de distribuição geográfica de <i>Didelphis albiventris</i>	25
Figura 3 – Mapa de distribuição geográfica de <i>Didelphis aurita</i>	25
Figura 4 - Reconstrução filogenética de organismos das famílias Sarcocystidae e Eimeridae através do gene <i>CytB</i>	59
Figura 5 - Reconstrução filogenética de organismos das famílias Sarcocystidae e Eimeridae através do gene <i>ClpC</i>	61
Figura 6 - Reconstrução filogenética de organismos da família Sarcocystidae através do gene <i>RpoB</i>	63
Figura 7 - Reconstrução filogenética de organismos da família Sarcocistidae através do gene <i>RpoB</i> , incluindo sequências de <i>Neospora</i> sp. detectado em leão marinho.....	64
Figura 8 - Reconstrução filogenética de organismos da subfamília Toxoplasmatinae através do gene <i>ITS-1</i>	66
Figura 9 - Reconstrução filogenética de organismos do gênero <i>Sarcocystis</i> através do gene <i>ITS-1</i>	68
Figura 10 - Alinhamento de alelos <i>Sarcocystis ITS-1</i> originárias de esporocistos de gambás	69
Figura 11 - Filogenia (árvore de consenso) inferida pelo método de máxima parcimônia para <i>SAG-2</i>	83
Figura 12 - Filogenia (árvore de consenso) inferida pelo método de máxima parcimônia para <i>SAG-3</i>	85
Figura 13 - Filogenia (árvore de consenso) inferida pelo método de máxima parcimônia para <i>SAG-4</i>	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação de animais e tratos gastrointestinais recebidos, positivos para <i>Sarcocystis spp.</i>	38
Quadro 2 - <i>Primers</i> para a primeira e segunda amplificação de locus codificador de <i>SAG</i> , Citocromo B, <i>ClpC</i> e <i>ITS-1</i>	45
Quadro 3 - Mistura de reagentes para a reação de sequenciamento automático de ácidos nucleicos	47
Quadro 4 – <i>Primers</i> para primeira e segunda amplificação de locus codificador de Citocromo B, <i>ClpC</i> e <i>ITS-1</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Positividade para a presença de esporocistos de <i>Sarcocystis</i> spp. em gambás do gênero <i>Didelphis</i>	56
Tabela 2 - Diversidade nuleotídica de fragmentos de genes de organelas de <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Hammondia heydorni</i> e <i>Neospora caninum</i>	57

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Matrizes de distância p entre os alelos de <i>CytB</i> , <i>ClpC</i> e <i>RpoB</i> de <i>Sarcocystis</i> de gambás	107
APÊNDICE B - Matrizes de distância p entre os alelos de <i>CytB</i> , <i>ClpC</i> e <i>RpoB</i> de Toxoplasmatíneos	108
APÊNDICE C - Matriz de distância p entre os alelos de <i>ITS-1</i> de Toxoplasmatíneos	109
APÊNDICE D - Matriz de distância p entre os alelos de <i>ITS-1</i> de <i>Sarcocystis</i> de gambás ...	110
APÊNDICE E - Polimorfismo de DNA entre alelos <i>SAG-2</i> de <i>Sarcocystis</i> spp. eliminados por gambás	111
APÊNDICE F - Polimorfismo de DNA entre alelos <i>SAG-3</i> de <i>Sarcocystis</i> spp. eliminados por gambás	111
APÊNDICE G - Polimorfismo de DNA entre alelos <i>SAG-4</i> de <i>Sarcocystis</i> spp. eliminados por gambás	112

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	O GÊNERO <i>SARCOCYSTIS</i> , LANKESTER, 1982	15
2.1.1	<i>Sarcocystis neurona</i>	19
2.1.2	<i>Sarcocystis falcatula</i>	21
2.2	GÊNERO <i>DIDELPHIS</i> , LINNAEUS, 1758	22
2.2.1	Distribuição geográfica	24
2.3	ESTUDOS MOLECULARES EM <i>SARCOCYSTÍDEOS</i>	26
2.3.1	Genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs)	28
2.3.2	Região espaçadora transcrita interna do rDNA (<i>ITS-1</i>)	31
2.3.3	Gene mitocondrial	32
2.3.4	Gene do apicoplasto	33
3	OBJETIVOS	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	<i>DIDELPHIS</i> SPP.	36
4.2	OBTENÇÃO DE ESPOROCISTOS	36
4.3	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	40
4.4	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	41
4.5	PRIMERS PARA AS PCRS	42
4.5.1	Primers direcionados a genes codificadores de proteínas de superfície <i>SAG-2</i>, <i>SAG-3</i> e <i>SAG-4</i>	42
4.5.2	Primers direcionados ao loci espaçador transcrito interno (<i>ITS-1</i>)	43
4.5.3	Primers direcionados a genes de genoma de organelas	43
4.6	DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO	46
4.7	SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO	46
4.7.1	Purificação dos produtos amplificados	46
4.7.2	Reação de sequenciamento	47
4.7.3	Precipitação de DNA	48
4.7.4	Eletroforese de sequenciamento	48
4.8	ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS	48
5	RESULTADOS	50
5.1	FILOGENIA COMPARATIVA ENTRE ISOLADOS DE <i>SARCOCYSTIS</i> SPP. OBTIDOS DE MARSUPIAIS DO GÊNERO <i>DIDELPHIS</i> SPP. E PROTOZOÁRIOS DA SUB-FAMÍLIA TOXOPLASMATINAE	50
5.1.1	Introdução	50
5.1.2	Materiais e Métodos	52
5.1.3	Resultados	56
5.1.4	Discussão	70
5.2	EXTENSA DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>SARCOCYSTIS</i> SPP. ISOLADOS DE GAMBÁS NO BRASIL: MAIS EVIDÊNCIAS DE RECOMBINAÇÃO GÊNICA ENTRE ALELOS ALTAMENTE DIVERSIFICADOS	78
6	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICES	107

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os coccídeos compreendem um vasto grupo de organismos dentre os protozoários do filo Apicomplexa. Fazem parte deste grupo os protozoários do gênero *Sarcocystis*, parasitos heteroxenos obrigatórios que geralmente tem 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, nestes casos chamados de hospedeiros intermediários. Os hospedeiros intermediários, por sua vez, adquirem o parasito ao ingerir esporocistos que são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos.

De grande importância para a Medicina Veterinária, o gênero *Sarcocystis* é formado por muitas espécies que podem ser diferenciadas por suas características biológicas, dentre elas a morfologia da parede dos sarcocistos. Estas estruturas correspondem ao estágio final do desenvolvimento assexuado do parasito nos hospedeiros intermediários. Pelas características morfológicas dos sarcocistos, Dubey et al. (1989) reconheceram pelo menos 24 espécies dentro deste gênero. Posteriormente, em uma ampla catalogação realizada em 1998 com base em critérios morfológicos, foram descritas 189 espécies dentro deste gênero (ODENING, 1998).

Sarcocystis neurona e *Sarcocystis falcatula* são espécies bastante similares que utilizam 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; LINDSAY, 1998, 1999) e *Sarcocystis lindsayi* (DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 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 (CHEADLE et al., 2001, 2001a; DUBEY et al., 2001h, f; MULLANEY et al., 2005). Aves de diversos grupos taxonômicos são hospedeiros intermediários de *S. falcatula*.

Sarcocystis neurona é o parasito mais frequentemente associado à Encefalomielite Equina causada por Protozoário (EPM, do Inglês, *equine protozoal myeloencephalitis*), sendo que os sinais clínicos são decorrentes da multiplicação assexuada (esquizogonia) do agente nos tecidos neurais. Inquéritos soroepidemiológicos vêm demonstrando que uma porção

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 (DUBEY et al., 2001e).

Sarcocystis falcatula pode causar doença em uma ampla diversidade de aves, entre passeriformes, columbiformes e psitaciformes. Assim, não são raros os relatos de surtos de sarcocistose pulmonar aguda em animais de parques zoológicos (JACOBSON et al., 1984; CLUBB et al., 1986; SMITH et al., 1990; HILLYER et al., 1991; CLUBB; FRENKEL, 1992; MIRANDÉ; HOWERTH; POSTON, 1992; PAGE et al., 1992; DUBEY et al., 2001f).

Em termos genotípicos, as espécies *S. neurona* e *S. falcatula* são estreitamente relacionadas (DAME et al., 1995; FENGER et al., 1995), dada à extensa similaridade que têm em seqüências gênicas codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico (18S rDNA). 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, 1997b; DUBEY; LINDSAY, 1998).

A diferenciação entre as duas espécies vem sendo estudada através de análises moleculares e estudos filogenéticos (TANHAUSER et al., 1999; ROSENTHAL; LINDSAY; DUBEY, 2001; ELSHEIKHA; SCHOTT II; MANSFIELD, 2005), porém em estudos recentes foram levantadas hipóteses para explicar a extensa variabilidade dos padrões genéticos encontrados, sugerindo a possibilidade de haver trocas gênicas de alelos distintos entre as espécies de *Sarcocystis* que realizam gametogonia em epitélio intestinal de gambás (MONTEIRO et al., 2013).

Esta pesquisa teve como objetivo realizar uma análise mais extensiva da variação gênica em isolados de *Sarcocystis* spp de marsupiais do gênero *Didelphis* spp, contemplando, além dos genes codificadores de proteínas de superfície, marcadores moleculares conservados com vistas a contribuir para a identificação das espécies de Sarcocystideos eliminados por gambás com maior acurácia.

Os resultados aqui relatados são importantes para conhecimento da diversidade das espécies de *Sarcocystis* que infectam gambás em nosso meio e da epidemiologia das infecções produzidas pelos protozoários deste grupo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O GÊNERO *SARCOCYSTIS*, LANKESTER, 1982

Os coccídios compreendem um vasto grupo de organismos dentre os protozoários do filo Apicomplexa. Fazem parte deste grupo, os protozoários do gênero *Sarcocystis*, pertencente à Classe Sporozoasida, Ordem Eucoccidiorida e família Sarcocystidae (LEVINE, 1986).

O gênero *Sarcocystis* Lankester, 1882, foi primeiramente relatado por Miescher em 1843 na Suíça, onde foram descritas “linhas branco-leitosas” na musculatura esquelética de um camundongo doméstico (*Mus musculus*), que ficaram conhecidos como túbulos de Miescher. Kühn em 1865 encontrou um parasita similar em um suíno e o nomeou *Synchytrium miescherianum*. Contudo, esse gênero foi ocupado e Lankester introduziu o gênero de nome *Sarcocystis*, termo de origem grega derivado de *sarkos* que significa músculo e *kystis* que significa vesícula ou bolsa, referindo-se à fase assexuada do estágio final do ciclo biológico do parasita que são os cistos presentes nos tecidos dos hospedeiros (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989).

Labbé em 1899 mudou o nome *Synchytrium miescherianum* para *Sarcocystis miescheriana*. Assim, o parasita *S. miescheriana* Kühn, 1865, Labbé em 1899 tornou-se a espécie-tipo do gênero. O parasita originalmente encontrado por Miescher no camundongo foi descrito por Blanchard 1885 e nomeado *Sarcocystis muris* por Railliet 1886 (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989).

Em 1972, foi descoberta a necessidade de dois hospedeiros para o ciclo biológico do parasito, que geralmente apresenta como hospedeiro definitivo um vertebrado carnívoro (heteroxenia obrigatória). 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). A figura 1 ilustra, de forma simplificada, o ciclo de vida dos organismos do gênero *Sarcocystis*.

Figura 1 - Esquema simplificado do ciclo de vida dos protozoários do gênero *Sarcocystis* spp

Fonte: (ADAMS, 2004).

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).

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). Porém, considerando as espécies de *Sarcocystis* eliminadas por gambás, em experimento conduzido por Dubey et al. (2000a), gambás começaram a eliminar oocistos de *Sarcocystis neurona* decorridos onze a treze dias após a ingestão de tecidos de gatos experimentalmente infectados; e o experimento no qual gambás ingeriram sarcocistos de *Sarcocystis 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, por sua vez, adquirem o parasito ao ingerirem água ou alimentos contaminados com os esporocistos eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos. 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).

A quantidade e distribuição de sarcocistos variam consideravelmente de hospedeiro para hospedeiro. São influenciadas por diversos fatores como a quantidade de esporocistos ingeridos, a espécie de *Sarcocystis* envolvida, a espécie e o estado imunológico do hospedeiro. A grande maioria dos sarcocistos desenvolve-se em músculos estriados e esqueléticos, porém alguns sarcocistos são encontrados em músculos lisos e no sistema nervoso central (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., 2001d).

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., 2001d).

De grande importância para a Medicina Veterinária, o gênero *Sarcocystis* é formado por muitas espécies que podem ser diferenciadas por suas características biológicas, dentre as elas a morfologia da parede dos sarcocistos. Estas estruturas correspondem ao estágio final do desenvolvimento assexuado do parasito nos hospedeiros intermediários. Pelas características morfológicas dos sarcocistos, Dubey et al. (1989) reconhecem pelo menos 24 espécies dentro deste gênero. 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 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; LINDSAY, 1998; DUBEY; LINDSAY, 1999) e *Sarcocystis lindsayi* (DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001).

As espécies que são eliminadas pelos gambás são morfologicamente similares, porém podem ser diferenciadas pela sua patogenicidade e infectividade, onde *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., 1997b; 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* (DUBEY; LINDSAY, 1999; DUBEY et al., 2000b).

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, 2001b).

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; DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001;

DUBEY et al., 2001d, e; MULLANEY et al., 2005). Aves de diversos grupos taxonômicos são hospedeiros intermediários de *S. falcatula* (BOX; MEIER; SMITH, 1984).

2.1.1 *Sarcocystis neurona*

O *S. neurona* é o parasito mais frequentemente associado à Encefalomielite Equina causada por Protozoário (EPM, do Inglês, *equine protozoal myeloencephalitis*), síndrome clínica primeiramente reconhecida nos anos 70, porém sem etiologia definida (ROONEY et al., 1970). Foi apenas em 1991 que o parasito foi isolado de tecidos neurais de equinos e nomeado por Dubey et al. (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., 2001a).

A transmissão e ciclo de vida do *S. neurona* foi apenas elucidado em 1995, quando Fenger et al. (1995) propôs que o gambá norte-americano (*Didelphis virginiana*) era o hospedeiro definitivo do parasito, baseado em comparações entre merozoítos cultivados e esporocistos obtidos de intestino de gambás, através de sequências gênicas da subunidade menor do RNA (ssuRNA). Fenger et al. (1997) induziu EPM clínico em cavalos negativos para *S. neurona* alimentados com esporocistos coletados de gambás, entendeu-se então que os equinos adquirem a infecção após ingestão de esporocistos. O ciclo de vida do parasito foi concluído quando gambás, criados em laboratório, eliminaram esporocistos de *S. neurona* após serem alimentados com tecidos musculares infectados de gatos domésticos (*Felis domesticus*) previamente alimentados com esporocitos de fezes de gambás (DUBEY et al., 2000a).

Os equinos são considerados hospedeiros acidentais de *S. neurona*, pois nunca havia sido encontrado sarcocistos maduros em seus tecidos. Em 2005, em um único relato em Michigan, uma potra de quatro meses de idade sintomática para EPM apresentou esquizontes maduros no sistema nervoso central e formação de sarcocistos maduros na língua. Através de análises genéticas, imunológicas e morfológicas foi confirmada a presença de *S. neurona*, sugerindo o papel do equino como hospedeiro intermediário para o parasito em questão (MULLANEY et al., 2005).

Em sua forma predominante, apresenta-se como uma ataxia assimétrica progressiva que pode ser acompanhada de atrofia muscular focal (ROONEY et al., 1970). A EPM afeta equinos de qualquer raça, sexo e idade, no entanto, as raças mais acometidas são Puro Sangue Inglês (FAYER et al., 1990), American Trotter (ROONEY et al., 1970) e Quarto de Milha (FAYER et al., 1990) em animais com idade entre um a seis anos (MACKAY; DAVIS; DUBEY, 1992).

A evolução dos sinais clínicos varia de aguda a crônica, com aparecimento insidioso de sinais focais ou multifocais de doença neurológica envolvendo o cérebro, tronco encefálico ou medula espinhal. Os equinos acometidos normalmente apresentam progressão gradual na gravidade e abrangência dos sinais clínicos, incluindo ataxia. Contudo, em alguns casos, o aparecimento gradual pode dar lugar a uma exacerbação súbita na severidade da doença clínica, resultando em decúbito. Os sinais clínicos variam em função da capacidade do parasita em infectar aleatoriamente as substâncias branca e cinzenta em múltiplos locais no SNC (DUBEY et al., 2001d)

De forma geral, os sinais vitais nos equinos acometidos, se mantêm dentro dos padrões de normalidade e os animais permanecem alerta e responsivos. Apesar de incomum, alguns animais com EPM podem apresentar depressão e também perda de peso. O exame neurológico normalmente revela ataxia assimétrica, fraqueza e espasticidade envolvendo os quatro membros. Áreas de hiporeflexia, hipoalgesia ou completa perda sensorial estão frequentemente presentes (MACKAY et al., 2000; DUBEY et al., 2001d).

Inquéritos soropidemiológicos 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. Estudos sorológicos realizados com *Western Blot* revelaram uma exposição em 35,6% e 35,5% dos animais estudados na América do Sul, respectivamente, no Brasil e Argentina (DUBEY et al., 1999a, b). Um estudo realizado no Brasil, baseado na presença de anticorpos sérico contra a superfície de antígenos, *SnSAG4*, revelou uma prevalência de *S. neurona* de 69,6% dos 961 equinos adultos testados (HOANE et al., 2006). Em estudo recente realizado na Argentina, através da análise de 640 equinos por *Immunoblot*, registrou uma prevalência de 26,1% (MOREÉ et al., 2014).

2.1.2 *Sarcocystis falcatula*

Sarcocystis falcatula foi encontrado e nomeado por Stiles em 1893. Anos mais tarde o ciclo biológico e algumas espécies de aves e mamíferos 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., 2001f). 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 et al., 1987).

Estudos em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) 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).

A mortalidade varia entre as diferentes espécies de aves. A doença em psittaciformes do Velho Mundo geralmente é hiperaguda, resultando em altas taxas de mortalidade devido a severas lesões pulmonares. As espécies que sobrevivem à fase pulmonar da doença são

aquelas que co-evoluíram com os hospedeiros definitivos (BOX; SMITH, 1982; HILLYER et al., 1991; PAGE et al., 1992).

A sarcosporidiose pulmonar é uma doença super-aguda e muitos dos animais não demonstram sinais clínicos antes de morte súbita. Outras aves podem demonstrar apatia, dispnéia, anormalidades neurológicas e anorexia parcial ou total. Lesões macroscópicas incluem edema, congestão e hemorragia pulmonar; esplenomegalia e hepatomegalia. Achados microscópicos incluem presença de esquizontes no endotélio pulmonar e pneumonia. A merogonia pode resultar em hepatite ativa e crônica, miocardite intersticial, miosite, esplenite, nefrite e encefalite (CLUBB et al., 1986; NEILL; SMITH; BOX, 1989; HILLYER et al., 1991; PAGE et al., 1992).

Como o *S. falcatula* pode causar doença em uma ampla diversidade de aves, entre passeriformes, columbiformes e psitacciformes, não são raros os relatos de surtos de sarcocistose pulmonar aguda em animais de parques zoológicos (JACOBSON et al., 1984; CLUBB et al., 1986; SMITH et al., 1990; HILLYER et al., 1991; CLUBB; FRENKEL, 1992; MIRANDÉ; HOWERTH; POSTON, 1992; PAGE et al., 1992; DUBEY et al., 2001f). Como ocorrido em 2009, em um parque para aves na Foz do Iguaçu, Paraná, onde de um total de 47 aves analisadas, 38 foram consideradas positivas para *S. falcatula* através de exames histopatológicos. Estas morreram em um período de 15 meses, entre elas 16 espécies de psitacciformes, sendo as espécies do Velho Mundo as mais atingidas, manifestando a forma pulmonar aguda (GODOY et al., 2009).

2.2 GÊNERO *DIDELPHIS*, LINNAEUS, 1758

Marsupialia é o grupo dos mamíferos maior e mais diverso, existindo aproximadamente 262 espécies pertencentes a 16 famílias. A Infraclasse Marsupialia está dividida em sete ordens que são Dasyuromorphia, Peramelemorphia, Diprotodontia, Notoryctemorphia, Paucituberculata, Microbiotheria e Didelphimorphia (FINNIE, 1986).

Os marsupiais da América do Sul são considerados os mamíferos terrestres mais antigos do mundo. Eles pertencem à ordem Didelphimorphia (FINNIE, 1986). A ordem Didelphimorphia compreende a grande maioria dos marsupiais americanos vivos, distribuídos do sudeste do Canadá ao sul da Argentina (NOWAK, 1999). Hershkovitz (1992)

reconheceu quatro famílias dentro desta ordem: Marmosidae, Caluromyidae, Glironiidae e Didelphidae. A família Didelphidae conta atualmente com 95 espécies reconhecidas em 19 gêneros, sendo que de todas as espécies apenas quatro não se encontram na América do Sul (GARDNER et al., 2007).

Na família Didelphidae encontra-se o gênero *Didelphis*, termo de origem grega derivado de *di* (dois) e *delphys* (útero) em referência ao trato reprodutivo da fêmea, são popularmente conhecidos como gambás. Os animais pertencentes à família Didelphidae são extremamente adaptáveis aos mais diferentes ambientes e são considerados um sucesso evolutivo (GARDNER, 2007).

As espécies do gênero *Didelphis* são onívoras e encontradas em *habitats* variados, como florestas, áreas de matas e próximos a cursos de água. São essencialmente terrestres, mas escalam obstáculos com bastante facilidade. São nômades, com hábitos solitários, sendo difícil definir seu território, pois percorrem longas distâncias e permanecem em uma área por períodos relativamente curtos, facilitando assim a disseminação de patógenos. Os predadores destes animais incluem as grandes aves de rapina e todos os carnívoros (FINNIE, 1986).

O gênero *Didelphis* é dividido em dois super-grupos: grupo *D. marsupialis* (gambás de orelha preta) consiste de duas espécies alopátricas, *D. marsupialis* Linnaeus, 1758 e *D. aurita* Wied-Neuwied, 1826; grupo *D. albiventris* (gambás de orelha branca) contem três espécies *D. albiventris* Lund, 1840, *D. pernigra* J.A. Allen, 1900 e *D. imperfecta* Mondolfi e Pérez-Hernández (1984). Foram nomeadas diversas espécies e subespécies com base em pequenas variações, porém estas são insuficientes para garantir um reconhecimento formal. A única espécie adicional reconhecida dentro deste gênero é o *D. virginiana* Kerr, 1792, que é encontrado do Canadá à Costa Rica (GARDNER, 2007).

A respeito de sua distribuição geográfica, registros de simpatria são raros e incomuns (CERQUEIRA, 1985; GARDNER, 2007). Porém a sobreposição geográfica parece ocorrer em áreas antropizadas (VAREJÃO; VALLE, 1982; GARDNER, 2007).

A distinção entre *D. aurita* e *D. albiventris* geralmente é feita com base em caracteres morfológicos, tais como a cor da orelha e os padrões de dentição observados. Recentemente foram realizados estudos moleculares, através de genes mitocondriais, para sustentar o registro de espécies simpátricas. Sousa et al. (2012) confirmaram a simpatria de *D. albiventris* e *D. aurita* em fragmentos urbanos de Mata Atlântica, assim como Cervantes et al. (2010) em relação ao *D. marsupialis* e *D. virginiana* no México.

2.2.1 Distribuição geográfica

Didelphis albiventris é também chamado de gambá, raposa, saruê, seriguê, micurê. A distribuição geográfica desta espécie inclui as porções leste e centro-oeste do Brasil, Paraguai, Uruguai, as regiões norte e central da Argentina e sul da Bolívia, ilustrado na figura 2. Habita florestas abertas e decíduais do Nordeste do Brasil para meados da Argentina, incluindo áreas de chuva baixa e irregular tal como a Caatinga e Deserto do Monte (CERQUEIRA, 1984, 1985). É substituído nas áreas mais úmidas como a Mata Atlântica e Araucária por *D. aurita*, nas florestas amazônicas por *D. marsupialis*, e nas encostas dos Andes por *D. pernigra* (GARDNER, 2007).

D. aurita é também chamado de gambá, raposa, saruê, seriguê, micurê. Distribui-se na porção leste do Brasil, do estado de Alagoas a Santa Catarina, estendendo-se a oeste até o Mato Grosso do Sul, ocupando ainda o sudeste do Paraguai e a província de Misiones, na Argentina, ilustrado na figura 3 (CERQUEIRA; LEMOS, 2000; BROWN, 2004).

D. marsupialis é também chamado de gambá-comum, saruê ou raposinha. Ocorre em Trinidad e Tobago, nas Guianas, e a grande bacia Amazônica, incluindo habitats florestais úmidos das encostas andinas do leste da Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia. Sua distribuição pela América do Sul é limitada por regiões mais secas, como a Caatinga, Cerrado e Chaco. Fora da América do Sul, também é encontrado na América Central e no México (GARDNER, 2007).

Didelphis imperfecta é conhecido a partir de populações isoladas ao sul do Orinoco, na Venezuela e adjacente ao Brasil, bem como no Suriname e Guiana Francesa (GARDNER, 2007).

Didelphis pernigra é encontrado nas encostas florestadas da Cordilheira dos Andes, através do Equador e Peru para a Bolívia (GARDNER, 2007).

Figura 2 – Mapa de distribuição geográfica de *Didelphis albiventris*

Fonte: (COSTA et al., 2008)

Figura 3 – Mapa de distribuição geográfica de *Didelphis aurita*

Fonte: (ASTUA DE MORAES; DE LA SANCHA; COSTA, 2011).

2.3 ESTUDOS MOLECULARES EM SARCOCYSTÍDEOS

Em termos genotípicos, as espécies *S. neurona* e *S. falcatula* são estreitamente relacionadas (DAME et al., 1995; FENGER et al., 1995), dada à extensa similaridade que têm em sequências gênicas codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico (18S rDNA). 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, 1997b; 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 (*rapid amplified polymorphic DNA*) e sequências internas transcritas do loci 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. Depois de sequenciados, os marcadores foram pesquisados para identificação da presença de sítios de restrição enzimática diferenciais entre espécies *S. falcatula* e *S. neurona*. Os autores mostraram, então, que de nove isolados de *Sarcocystis* obtidos de fezes de *Didelphis* spp., 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. Através de sequenciamento das regiões que apresentaram discrepância, estes dois genótipos se mostraram desiguais tanto à *S. neurona* quanto à *S. falcatula*, porém 98,8% similares entre si. A vista disso foi sugerido, que possivelmente estes isolados poderiam se tratar de uma espécie distinta, ainda não identificada. 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. (2001e) 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-australianos (*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*.

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 *S. neurona* norte-americanos (ROSENTHAL; LINDSAY; DUBEY, 2001; ELSHEIKHA; SCHOTT II; MANSFIELD, 2005).

Através de marcadores microssatélites altamente polimórficos, foram analisados 34 isolados de *Sarcocystis* spp., previamente caracterizados de diferentes regiões (25 isolados de *S. neurona* da América do Norte, dois *S. neurona* da América do Sul, dois *S. falcatula* da América do Norte e cinco *S. falcatula* da América do Sul). Com o emprego desta análise multi-lócus (análise evolutiva de vários loci gênicos simultaneamente) foi possível identificar, entre amostras de *S. falcatula* e *S. neurona*, três grupos ou clados geneticamente distintos. São eles: *S. neurona* da América do Norte, *S. falcatula* da América do Sul e *S. neurona* da América do Sul juntamente com *S. falcatula* da América do Norte.

Os resultados corroboram a distinção entre isolados norte-americanos, que compreendem uma única população genética, em relação a isolados sul-americanos, porém levantam dúvida quanto à cladística de isolados de *S. neurona* da América do Sul. Com base em dados de distância calculada a partir de polimorfismo de loci microssatélites entre amostras de *Sarcocystis* spp. pelo método de Neighbor-Joinning, foi obtido um dendrograma onde duas amostras de *S. neurona* da América do Sul mostraram possuir um ancestral comum com dois isolados de *S. falcatula*, sugerindo que as espécies de *S. neurona* sejam polifiléticas (ASMUNDSSON; DUBEY; ROSENTHAL, 2006).

É possível que os resultados de Asmundsson et al. (2006) foram 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.

Em um trabalho anterior foi demonstrado que *Sarcocystis* spp. isolados de fezes de gambás possuem grande diversidade genética em genes codificadores de proteínas de superfície. Neste estudo, 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* e uma terceira linhagem geneticamente similar a *S. neurona* (Neurona-like). A partir da análise dos três loci estudados e da reconstrução filogenética utilizando dados de aminoácidos foi demonstrado que as duas linhagens geneticamente relacionadas ao *S. falcatula* compartilham alelos entre si, o que permitiu inferir que possivelmente ocorra troca gênica entre essas duas populações (MONTEIRO et al., 2013). Porém, neste trabalho os autores sugerem o uso de marcadores moleculares mais conservados para possivelmente esclarecer as questões evolutivas levantadas.

2.3.1 Genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs)

Exceto pela caracterização em *S. neurona*, pouco se conhece a respeito da configuração nucleotídica de genes codificadores de caracteres fenotípicos, como os genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs - do inglês, surface antigen gene) 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. A vista deste fato, em trabalho recente, genes codificadores de antígenos de superfície, foram utilizados para pesquisar distinção entre *Sarcocystis* spp., demonstrando grande diversidade genética entre os isolados pesquisados (MONTEIRO et al., 2013).

Os antígenos 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; FERGUSON; BOOTHROYD, 2000). Diferentemente, *Sarcocystis falcatula* e *Sarcocystis neurona* parecem possuir um número bem menor destes marcadores em seus genomas (GAUTAN et al., 2011).

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. (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 genoma de isolados que demonstraram ser ausentes de *SnSAG1*, e vice-versa, sugerindo que a expressão concomitante destes dois antígenos reduz a aptidão ou sua viabilidade, ou alternativamente que a herança dos dois loci seja exclusiva (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.

Gautan et al. (2011) avaliando a expressão dos SnSAGs durante a endopoligénia observaram que o *SnSAG2*, *SnSAG3* e *SnSAG4* eram expressos em esporozoítos, já em bradizoítos os *SnSAG2*, *SnSAG3*, *SnSAG4* e *SnSAG5* ou eram ausentes ou possuíam uma baixa expressão, sugerindo a importância da expressão de *SnSAG* estágio-específico para o desenvolvimento do parasito e finalização do ciclo de vida.

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. (2010) 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., 2010).

2.3.2 Região espaçadora transcrita interna do rDNA (*ITS-1*)

O gene codificador do RNA ribossomal está presente em diversas cópias no genoma dos eucariotos (LONG; DAWID, 1980; HILLIS; DIXON, 1991; CONOLE et al., 2001; PRASAD et al., 2008). Este gene inclui repetições em tandem das regiões codificadoras que são as regiões 18S, 5.8S e 28S, separadas pelas regiões espaçadoras transcritas internas um e dois (*ITS-1* e *ITS-2*) (PRASAD et al., 2007; KI; KIM; LEE, 2009).

O RNA ribossomal é um componente essencial na fisiologia celular. As regiões codificadoras interagem com proteínas específicas para formar as subunidades dos ribossomos que atuam na síntese protéica. Em virtude dessa função vital, essas sequências são conservadas. Essa característica a torna atrativa para o estudo de relações filogenéticas nos grandes táxons (JEEWON; LIEW; HYDE, 2003; JORGENSEN; MURRAY; DAUGBJERG, 2004; GRANDE et al., 2004). Por outro lado, as regiões espaçadoras transcritas internas por não serem codificadoras (são transcritas, mas não traduzidas e auxiliam na formação de subunidades do rDNA), apresentam maiores probabilidades de mutação sendo portanto, mais variáveis. Essa característica é apropriada para estimar relações nos níveis taxonômicos inferiores como gêneros e espécies (VAN HERWERDEN; BLAIR; AGATSUMA, 1999; ALVAREZ; WENDEL, 2003; PRASAD et al., 2007). As variações nas regiões espaçadoras têm sido utilizadas para identificar espécies ou cepas, sendo um bom marcador em estudos de genética de populações de diversos organismos (GASSER et al., 2000; BLOUIN et al., 2002).

Marsh et al. (1999) identificaram uma diversidade genética entre seis isolados de *S. falcatula* norte-americanos através da primeira região espaçadora transcrita interna (*ITS-1*). Estas sequências, ao serem comparadas com sequência de *S. neurona*, previamente caracterizadas, revelaram doze diferenças nucleotídicas constantes. Estes resultados sugeriram que *S. falcatula* pode ser constituído por uma população heterogênea e que a região *ITS-1* poderia ser utilizado para distinção entre *S. neurona* e *S. falcatula* (MARSH et al., 1999).

Tanhauser et al. (1999) também utilizaram sequências internas transcritas, porém denominadas JNB68 e JNB70, nos quais foram pesquisados sítios de restrição enzimática

diferenciais entre as espécies *S. falcatula* e *S. neurona*. Onde foi demonstrado polimorfismo de sítios de restrição e tamanho de produtos, possibilitando a diferenciação das duas espécies (TANHAUSER et al., 1999).

Atualmente, a região ITS-1 vêm sendo muito utilizada para identificar e determinar prevalência de infecção em gambás por *S. neurona* (REJMANECK et al., 2009; REJMANECK et al., 2010), distinção entre *S. neurona* e *S. falcatula*, assim como entre outros coccídeos formadores de cisto tecidual e identificação de novos possíveis hospedeiros intermediários para *S. neurona* e *S. falcatula* (MILLER et al., 2009; MILLER et al., 2010; WENDTE et al., 2010; WÜNSCHMANN et al., 2010). O que demonstra a possibilidade de diferenciação das espécies em questão, porém devido à diversidade genética observada, muitos autores argumentam a necessidade do uso de marcadores complementares para esta finalidade.

2.3.3 Gene mitocondrial

Dentre os marcadores moleculares genéticos, o DNA mitocondrial (DNAMt) tem sido empregado extensivamente nos mais diferentes aspectos evolutivos (BERMINGHAM; MORITIZ, 1998; AVISE, 2000) nas mais diversas classes de organismos. Isso se deve ao fato desta molécula ser mais compacta, simples e apresentar um mecanismo de evolução mais rápido, quando comparado ao DNA nuclear.

Comparado com outros eucariotos, os organismos apicomplexa possuem um genoma mitocondrial relativamente pequeno, tendo tamanho aproximado de 6-8kb. O DNAMt possui genes codificadores para duas subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 RNAt, três subunidades da enzima citocromo c oxidase (Cox1, Cox2 e Cox3), citocromo B (*CytB*), subunidades 6 e 8 de ATP F0 sintase (ATP6 e ATP8) e sete subunidades da NADH desidrogenase (ND1-ND6 e ND4L).

O citocromo B é uma enzima presente na cadeia respiratória mitocondrial e na cadeia respiratória do ciclo foto-redox de muitas bactérias (MEYER, 1994), sendo necessária para a conversão de energia. Portanto, trata-se de uma proteína universal encontrada na maioria dos organismos eucariontes (ESCALANTE et al., 1998; FARIAS et al., 2001).

O gene *CytB* tem se mostrado um marcador molecular de grande valor para as filogenias moleculares pois este não é afetado por múltiplas substituições de nucleotídeos fixadas por pressões seletivas, já que muitas das substituições encontradas neste loci são sinônimas (MEYER, 1994; AVISE; WALKER; JOHNS, 1998). Além disso, pelo fato de ser um gene codificador de uma proteína universal, permite que alinhamentos de sequências homólogas possam ser realizados com confiabilidade maior que os alinhamentos de sequências de genes codificadores de RNA ribossômicos ou sequências não codificadoras (RUSSO, 2001).

Estudos recentes foram realizados para caracterizar o genoma mitocondrial completo de *Eimeria* spp. em galinhas (HIKOSAKA et al., 2011b; LIN et al., 2011; LIU et al., 2012), haemosporídeos pertencentes aos gêneros *Plasmodium* e *Leucocytozoon* (HIKOSAKA et al., 2011a) e piroplasmídeos dos gêneros *Babesia* e *Theileria* (HIKOSAKA et al., 2010). No entanto, ao se tratar de espécies de *Sarcocystis* spp. os estudos sobre genes mitocondriais são escassos.

Recentemente, foi caracterizado o genoma mitocondrial de quatro espécies próximas, *T. gondii*, *N. caninum*, *Hammondia heydorni* e *Hammondia triffittae*, contendo as porções completas dos genes *CytB* e *Cox1* (GJERDE, 2013). Esse estudo foi logo ampliado para incluir tentativas de caracterização dos genes *Cox1* e *CytB* de diversas espécies de *Sarcocystis* spp. em ruminantes, onde foram obtidos resultados insatisfatórios em relação ao gene *CytB*, em contrapartida o gene *Cox1* mostrou-se um marcador genético adicional e independente para a distinção entre espécies de *Sarcocystis* spp. estreitamente relacionadas que utilizam ruminantes como hospedeiros intermediários (GJERDE, 2013a).

2.3.4 Gene do apicoplasto

O Apicoplasto é uma organela formada por um DNA circular de 35 Kb e com a presença de quatro camadas de membranas celulares, as quais sustentam a hipótese de uma dupla endossimbiose de algas (MCFADDEN; ROSS, 1999). Essa hipótese surge devido à semelhança dessa organela com os plastídios presentes em vegetais. Delwiche (1995) acredita que em algum momento da história evolutiva dos parasitas, eles tenham hospedado uma

cianobacteria. O plastídio presente na alga teria, ao longo dos anos, se fixado à célula dos parasitas tornando-se peça fundamental no sistema celular desses procariotos.

Atualmente, o apicoplasto se tornou um alvo de estudo para potenciais drogas anti-parasitárias, devido a sua importância para a sobrevivência do parasito (MCFADDEN et al. 2000; FLEIGE; LIMENITAKIS; SOLDATI-FAVRE, 2010; SHIGEHARU, 2011). Foi demonstrado que, assim como a mitocôndria, o apicoplasto possui herança materna (FERGUSON et al., 2005), e que apresentam DNA conservado o que o torna uma importante ferramenta para escrever histórias evolutivas (FEAGIN, 1994; KOHLER et al., 1997).

O gene *ClpC* é conhecido como um dos membros da família das proteínas caseinolíticas. Ele conserva um domínio AAA de ATPases associadas com varias atividades celulares. Atualmente por ser um gene conservado ele é muito utilizado nas reconstruções filogenéticas principalmente nas dos membros do gênero *Plasmodium*, porém outros Apicomplexas como *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* e *Babesia bovis* já foram estudados com esse marcador (RATHORE et al., 2001; MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008; LAU et al., 2009; SERCUNDES, 2010).

Dubey et al. (2003) utilizou um gene codificado pelo plastideo do genoma de apicoplasto, denominado *RpoB* para diferenciação de sarcocistos teciduais encontrados em lontras-marinhas (*Enhydra lutris*). Com o uso de sequências homólogas de *S. neurona*, *S. falcatula* e *S. lindsayi* foi possível gerar uma árvore filogenética onde foram formados dois clados, um contendo as sequências de *Sarcocystis* spp. e um contendo sequências de *N. caninum* e *T. gondii* (DUBEY et al., 2003). Dentre as sequências de *Sarcocystis* foi possível observar substituições de nucleotídeos permitindo diferenciação de gênero e espécie. O mesmo gene foi utilizado por Wendte (2010), para caracterização de isolados de *S. neurona* circulantes no ambiente marinho, seus resultados revelaram polimorfismo entre isolados oriundos da América do Norte e da América do Sul, corroborando a diversidade genética encontrada em isolados geograficamente distintos (WENDTE et al., 2010).

3 OBJETIVOS

A proposta deste estudo foi de conhecer as variações gênicas e relações filogenéticas em *Sarcocystis* spp. isolados de gambás capturados no Brasil através da análise de loci gênicos de genoma mitocondrial, de genoma de apicoplasto e das regiões espaçadoras transcritas internas, comparando a diversidade encontrada nestes grupos com a observada entre integrantes da sub-família Toxoplasmatinae. Devido a sua proximidade filogenética ao gênero alvo deste estudo e o fato de que a sua sistemática filogenética é um evento amplamente estudado, a genealogia da sub-família Toxoplasmatinae servirá como referência para o estudo de organismos do gênero *Sarcocystis*.

Neste trabalho, objetivamos também conhecer a diversidade de genes codificadores de *SAG-2*, *SAG-3* e *SAG-4* de amostras de outra região do Brasil, para comparar com resultados de pesquisa de semelhante escopo já realizada em nosso meio, onde foi investigado o mesmo evento em amostras de regiões do território sul do Brasil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *DIDELPHIS* SPP.

Foram empregados animais mortos e trato gastrointestinal inferior proveniente do Departamento de Parques e Áreas Verdes da Cidade de São Paulo, SP (DEPAVE-3 Fauna, Prefeitura Municipal de São Paulo, SP), do Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba, SP) e do Parque das Dunas de Natal, Rio Grande do Norte. Os animais foram classificados quanto à espécie, sexo, origem e idade. A idade dos animais foi estimada de acordo com o peso, onde animais acima de 1kg foram considerados adultos, animais com peso entre 1kg e 900g foram considerados jovens-adultos e animais com peso abaixo de 900g jovens ou filhotes. Também foram recebidas amostras fecais do DEPAVE-3 e de animais capturados no campus USP Pirassununga, São Paulo.

4.2 OBTENÇÃO DE ESPOROCISTOS

Devido ao fato de que, após a esporulação na lâmina própria intestinal, os esporocistos de *Sarcocystis* spp. são liberados no lúmen intestinal por vários meses, recomenda-se o raspado intestinal dos hospedeiros definitivos para otimizar a recuperação de esporocistos (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989). Portanto, durante a realização da necropsia dos animais recebidos, foram feitos raspados do intestino delgado e coletadas amostras de fezes.

Para o raspado intestinal, primeiramente o intestino delgado foi disposto em três porções de comprimentos iguais (anterior, médio e posterior). Estes então foram abertos com uma tesoura romba-reta e foram retiradas fezes residuais para posterior análise. A mucosa intestinal foi então raspada com uma lâmina de vidro de 26 x 76 mm e espessura de 1 a 1,2 mm. Foi adicionado ao raspado NaClO 10% (Hipoclorito de Sódio) e este foi macerado com um mixer. O conteúdo intestinal foi centrifugado a 10.000g por 10 minutos com solução salina 0,85% não estéril (42,5g NaCl em 4960ml de água destilada) e o sobrenadante foi descartado, este processo foi repetido três vezes. O sedimento foi resuspenso em solução

salina 0,85% não estéril e as impurezas foram coadas em tamises de malhas 100, 200 e 400. O conteúdo final foi transferido para um cálice cônico para a sedimentação a 20°C por um mínimo de 12 horas. Para a leitura o sobrenadante foi descartado e com uma pipeta Pasteur foi retirada uma gota do sedimento e transferida para uma lâmina sendo, então coberta com uma lamínula e observada em microscópio composto com objetiva de 40x e ocular de 10x.

Para isolamento dos esporocistos de *Sarcocystis* spp das fezes foi realizado o método de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (OGASSAWARA; BENASSI, 1980). Foram utilizados 11 mL da solução de sacarose ($d=1,203\text{g/cm}^3$), adicionando 1g de conteúdo homogeneizado de fezes separadamente processados. Estas foram coadas em gaze e transferidas para um tubo tipo Falcon®, sendo este centrifugado a 400g durante 10 minutos. Após isso, com o uso de uma alça de platina adaptada, foi retirada uma gota da superfície do centrifugado e transferida para uma lâmina sendo, então coberta com uma lamínula de 1cm^2 e observada em microscópio composto com objetiva de 40x e ocular de 10x. Os animais que se mostraram positivos para *Sarcocystis* spp. estão representados no quadro 1.

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. Os pellets foram resuspendidos em solução de HBSS (Hank's balanced salt solution, Gibco BRL Gaithersburg, Maryland) a 4°C e armazenados para posterior extração de DNA. Foram incluídas neste estudo, 31 amostras de esporocistos de *Sarcocystis* spp., previamente caracterizadas com marcadores SAGs e cujos resultados foram publicados recentemente (MONTEIRO et al., 2013). Estas amostras provêm de gambás dos gêneros *Didelphis* oriundos do Estado do Rio Grande do Sul e foram cedidas pela Dra. Gertrud Muller do IB da Universidade Federal de Pelotas, identificadas de SRS 27 a SRS 57.

Também foram incluídas dez amostras de esporocistos de *Sarcocystis* spp., previamente caracterizadas com marcador SAG-2, utilizadas em trabalho anterior (CESAR, 2001). Estas amostras provêm de gambás dos gêneros *Didelphis* oriundos do Estado de São Paulo, cedidos pela MSc. Marina de Oliveira Cesar e Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Quadro 1 - Relação de animais e tratos gastrointestinais recebidos, positivos para *Sarcocystis spp.*

(Continua)

Identificação	Espécie	Sexo	Idade	Peso (kg)	Amostra	Coleta	Origem
DSP 01	<i>D. aurita</i>	Fêmea	...	...	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 02	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	1,415	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 03	<i>D. albiventris</i>	Macho	...	...	Fezes	Campus USP	Pirassununga, SP
DSP 04	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Jovem - Adulto	0,905	Animal	DEPAVE - 3	Bragança Paulista, SP
DSP 05	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	1,03	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 06	<i>D. aurita</i>	Macho	...	...	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 19	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	1,25	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 20	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Jovem - Adulto	0,99	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 22	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	1,3	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 23	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	2,28	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 24	<i>D. aurita</i>	Fêmea	...	...	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 25	<i>D. aurita</i>	Fêmea	...	...	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 26	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	1,42	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 27	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	2,66	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 30	<i>D. aurita</i>	Macho	...	...	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 32	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	2,2	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 33	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	2,54	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 34	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	1,3	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 37	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	2,5	Animal	DEPAVE - 3	Embu das Artes, SP
DSP 38	<i>D. aurita</i>	Macho	Jovem - Adulto	0,955	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 40	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	1,79	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 41	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	1,87	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 42	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	1,715	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 43	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	1,59	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 44	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	1,935	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP

(Conclusão)							
DSP 45	<i>D. aurita</i>	Fêmea	...	...	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 47	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	1,38	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 48	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	1,31	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 49	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	1,46	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 50	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	1,53	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 51	<i>D. aurita</i>	...	Jovem - Adulto	0,96	Animal	DEPAVE - 3	São Paulo, SP
DSP 53	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	1,37	Animal	DEPAVE - 3	Santana do Parnaíba, SP
DSP 55	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	1,29	Animal	DEPAVE - 3	Embu -Guaçu, SP
DSP 58	<i>D. albiventris</i>			...	Trato Gastro Intestinal	Parque das Dunas	Natal, RN

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

4.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Todas as amostras de esporocistos (provenientes do DEPAVE, campus USP Pirassununga, Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Patologia FMVZ-USP e Parque das Dunas) foram submetidas ao processo de lise celular seguido de extração com fenol e clorofórmio e purificação de DNA por precipitação alcoólica (SAMBROOK et al., 1989).

Para a lise celular, foi utilizado um tampão de lise composto por 380µl de água UltraPure™ (DEPC Treated Water - Invitrogen®), 50µl de SDS 10% (Invitrogen®), 40µl de TNE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0) e 10µl de proteinase K (Zymo Research, Orange, CA – Synapse Biotecnologia), resultando em um volume final de 480µl o qual foi adicionado a 50µl de sedimento de oocistos e esporocistos para cada isolado de *Sarcocystis* spp. Para auxiliar fisicamente a ruptura celular foram utilizadas pérolas de zircônia, como descrito anteriormente, porém modificado (PATEL et al., 1998; MCLAUHLIN et al., 1999; REGIDOR-CERRILLO et al., 2010). Foram adicionadas ao tampão de lise 0,2g de pérolas de zircônia de 0,1mm e 0,1g de pérolas de 1,0mm (Bio Spec Products Inc ©), após 30 minutos em banho seco a 37°C as amostras foram submetidas a três vigorosas agitações em vórtex por um minuto com intervalos de 10 minutos entre cada agitação. Após as agitações as amostras foram incubadas em banho-seco a 37°C por no mínimo seis horas ou “overnight”.

Antes de realizar a purificação das amostras, estas foram submetidas à nova agitação vigorosa em vórtex por cinco minutos e posterior centrifugação a 12.000g por um minuto a 8°C para sedimentação das pérolas de zircônia. Foram transferidos 400µl do sobrenadante para um novo microtubo, onde se adicionou 200µL de fenol e 200µL de clorofórmio, seguido por homogeneização e centrifugação a 12.000g por cinco minutos a 8°C. O sobrenadante (cerca de 300µL) foi transferido a um novo microtubo e adicionou-se o mesmo volume de propanol. Após a homogeneização por inversão, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C por no mínimo 20 minutos, ou “overnight”.

As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 30 minutos a 8°C. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 1mL de etanol a 70%. O material foi novamente homogeneizado por inversão e centrifugado a 12.000g por 30 minutos a 8°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.

4.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante da enzima *Taq DNA polimerase platinum* (Invitrogen, Carlsbad, CA), a polimerase empregada neste estudo. Em todos os casos a PCR foi feita com o protocolo descrito abaixo.

Para uma reação de 50µL foram utilizados 31,2µL de água UltraPure™ (DEPC Treated Water - Invitrogen®), 5µL de 10x PCR Buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; pH 9,0), 1µL da mistura de dNTPs (10mM de cada nucleotídeo), 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 3µL de cada primer (10 pmol/µL), 0,3µL de *Taq DNA Polimerase Platinum*, Invitrogen® (5 U/µl), 5µL de DNA extraído da amostra alvo.

O ciclo para as reações de PCR foi efetuado no termociclador Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems (ABI) com o seguinte programa:

- Desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos;
- Desnaturação a 94°C por 30 segundos;
- Hibridização dos *primers* a 52-62°C por 30 segundos (dependendo do par de primer empregado, consultar Quadros 1 a 6);
- 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.

A segunda amplificação foi feita empregando-se exatamente as mesmas condições, da primeira, exceto pela troca dos *primers* e pela amostra alvo, que no caso da segunda amplificação constituía-se de produto amplificado pela primeira reação.

4.5 PRIMERS PARA AS PCRS

Nos itens abaixo estão descritos os primers utilizados para as reações em cadeia pela polimerase (PCRs).

4.5.1 Primers direcionados a genes codificadores de proteínas de superfície *SAG-2*, *SAG-3* e *SAG-4*

Os primers para estes genes foram desenhados a partir de alinhamentos múltiplos entre sequências de *SAG* das espécies de *S. falcatula* e de *S. neurona*. Os alinhamentos foram utilizados para o desenho de *primers* consensuais potencialmente capazes de amplificar indistintamente sequências de *S. falcatula* e *S. neurona*. Após os produtos de PCR terem sido amplificados, foram selecionadas regiões internas que pudessem ser utilizadas como sítio para heminested-PCR no caso dos marcadores de *SAG-3* e *SAG-4* e nested-PCR para o marcador de *SAG-2*. Os *primers* para a segunda etapa de amplificação (*heminested-PCR* e *nested-PCR*) foram testados em reação em cadeia pela polimerase (PCR) nas combinações apresentadas no quadro 2.

As sequências utilizadas constam no banco de dados do GenBank sob os números de acesso GQ851952 – *Sarcocystis neurona* e Q851953 – *Sarcocystis falcatula* para o *SAG-2*, GQ386975 – *Sarcocystis neurona* e GQ851956 – *Sarcocystis falcatula* para o *SAG-3* e GQ851958 – *Sarcocystis neurona* e GQ851959 – *Sarcocystis falcatula* para o *SAG-4*.

4.5.2 Primers direcionados ao loci espaçador transcrito interno (*ITS-1*)

Os *primers* para este loci foram desenhados a partir de alinhamentos múltiplos entre sequências *ITS-1* das espécies de *S. falcatula* e de *S. neurona* (Quadro 2). Os alinhamentos foram utilizados para o desenho de *primers* consensuais potencialmente capazes de amplificar indistintamente sequências de *S. falcatula* e *S. neurona*. Em ambos os casos, a PCR foi realizada em duas etapas. Porém, a segunda foi feita empregando-se o mesmo *primer* senso (*hemi-nested*).

As sequências utilizadas constam no banco de dados do GenBank sob os números de acesso FJ904653, AF098245, AF252407 e AF387164, com as definições *Sarcocystis falcatula* isolate 08-060083, *Sarcocystis falcatula* strain UCD 1, *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis lindsayi*, respectivamente.

4.5.3 Primers direcionados a genes de genoma de organelas

Neste caso, foram empregados dois pares sendo um direcionado ao gene codificador de *ClpC* de genoma de apicoplasto e o outro para o gene codificador de Citocromo B, do genoma mitocondrial (Quadro 2). O primeiro gene codifica um grupo de enzimas que fazem a hidrólise de proteínas em peptídeos menores e o segundo está associado ao processo de aceitação de oxigênio para a respiração celular. *Primers* foram desenhados a partir de sequências consenso de fator *ClpC* obtidas em pesquisa de bancos de dados de sequências EST de *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* e de sequências de rRNA de *Toxoplasma gondii*. As sequências dos parasitos foram alinhadas e *primers* consensuais foram desenhados de forma a amplificar indistintamente fragmentos gênicos dos parasitos envolvidos.

As sequências utilizadas constam no banco de dados do GenBank sob os números de acesso CV193278, DV177589 e U87145 com os nomes SnESTbab28d10.y1, SFAA-aab16f10.g1 e definição *Toxoplasma gondii* apicoplast, respectivamente. No caso de sequências de citocromo B, foram pesquisadas apenas sequências de *Sarcocystis neurona* e *falcatula*, pois as sequências de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* eram demasiadamente distantes para permitir o desenho de *primers* consensuais. Em ambos os

casos, usou-se dois ensaios de amplificação, sendo tanto o primeiro quanto o segundo com o emprego do mesmo par de *primers*.

As sequências utilizadas constam no banco de dados do GenBank sob os números de acesso DV176754, BQ750208 e AF023246, com os nomes SFAA-aaa60d05.g1, SnEST4a69h02.y1 e definição *Toxoplasma gondii* cytochrome B mRNA, respectivamente.

Quadro 2 - *Primers* para a primeira e segunda amplificação de lócus codificador de *SAG*, Citocromo B, *ClpC* e *ITS-1*

<i>Primers</i>	Lócus	Amplificação	Sequências	Produto	T°
SAG-2	Proteínas de superfície <i>SAG-2</i>				
<i>SAG2-189F20</i>		Primeira	F - GCC TGC CAA CTT TCA CAC CC	291	62°C
<i>SAG2-459R21</i>			R - CAC ATT GCA AGC ASG ACA CCA		
<i>SAG2-222F20</i>		Segunda	F - SAC TGG TGC CAA TTG TCA GA	234	62°C
<i>SAG2-437R19</i>			R - GCG AST GTC CTT CAC TGA GC		
SAG-3	Proteínas de superfície <i>SAG-3</i>				
<i>SAG3-053F19</i>		Primeira	F - GAT CCA CCT GTY GCA ACT T	557	58°C
<i>SAG3-589R21</i>			R - TGG TCC TGT AGC AGT AAC ACA		
<i>SAG3-111F19</i>		Segunda	F - TGG CAW CAA TTG GGC AAG T	499	58°C
<i>SAG3-589R21</i>			R - TGG TCC TGT AGC AGT AAC ACA		
SAG-4	Proteínas de superfície <i>SAG-4</i>				
<i>SnSAG4F2</i>		Primeira	F - CCG AGG TAC AGT TCA AGG CG	348	62°C
<i>SAG4-746R24</i>			R - CCS CTG CTA CAT CGA TAA TAA CCT		
<i>SAG4-541F21</i>		Segunda	F - GGC AAC GCC GCA GCM CTG CAA	229	62°C
<i>SAG4-746R24</i>			R - CCS CTG CTA CAT CGA TAA TAA CCT		
Citocromo B	Gene Mitocondrial				
<i>CytBF</i>		Primeira e Segunda	F - TAC TTG ACT ACT GCC TGG TTA TCT G	657	52°C
<i>CytBR</i>			R - GAT ATC CAT GAG GTT ACT ACA TTT C		
ClpC	Gene Apicoplasto				
<i>ClpCF</i>		Primeira e Segunda	F - GCT GAW TTA ATT AGA TTT GAT ATG AGT G	601	52°
<i>ClpCR</i>			R - GGC GWG CWC CAT ATA AWG GAT GA		
ITS-1	Espaçador transcrito interno				
<i>ITS-234F19</i>		Primeira	F - TCA ACC ATT GAA TCC CCA A	505	56°C
<i>ITS-720R19</i>			R - TCA TTT TGA ACA TGT ACC A		
<i>ITS-234F19</i>		Segunda	F - TCA ACC ATT GAA TCC CCA A	367	52°C
<i>ITS-578R23</i>			R - AGC ACG CCT TCA TAT TAT AAA CC		

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™ 100pb DNA Ladder), foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em cuba horizontal com pentes largos para facilitar a remoção da banda de DNA do gel, imersos em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA 1mM). Foi adicionado, a todas amostras amplificadas, 20µl de corante (30% glicerol; azul de bromofenol 0,001%) e cada amostra foi transferida para dois orifícios do gel, totalizando cerca de 50µl de produto amplificado por amostra. Após a corrida eletroforética a 100V, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5µg/mL) por 20 a 30 minutos e a visualização das bandas foi realizada por meio de transiluminação com luz ultravioleta (365nm).

4.7 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO

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 tamanho esperado foram recortados do gel de agarose com lâmina de bisturi. Esses fragmentos foram eluídos do gel e a purificação do DNA foi realizada com o “kit” GE Healthcare (Illustra, GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit), conforme instruções do fabricante.

4.7.2 Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR purificados foram quantificados visualmente de acordo com a intensidade das bandas exibidas no gel de agarose 2%. Estes então foram sequenciados por meio de “kit” comercial apropriado para este fim: ABI PRISM BigDye® Terminator v3.1 (Ready Reaction Cycle Sequencing, Applied Biosystems). A mistura da reação para cada amostra foi preparada da seguinte forma (Quadro 3).

Quadro 3 - Mistura de reagentes para a reação de sequenciamento automático de ácidos nucleicos

Reagente	Amostra de DNA		
	Intensidade das bandas*		
-	Fracas	Médias	Fortes
Premix Ready Reaction (Big Dye)	4µl	4µl	4µl
Tampão de sequenciamento (5X conc.)	2µl	2µl	2µl
Molde de DNA	13µl	6µl	4µl
Primer (10pmol/µl)	1µl	1µl	1µl
Água Ultra Pura	-	7µl	9µl
Volume Total	20µl	20µl	20µl

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

* De acordo com a intensidade dos produtos de PCR, menor ou maior quantidade de amostra era empregada na reação de sequenciamento, de forma que bandas muito fracas precisavam ser sequenciadas com um maior volume de amostra e vice-versa.

O ciclo de sequenciamento foi efetuado no termociclador Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems (ABI) com o seguinte programa:

- Desnaturação inicial a 96°C por um minuto;
- Desnaturação a 96°C por 10 segundos;
- Hibridização a 50°C por 5 segundos, 25 vezes;
- Extensão a 60°C por 4 minutos;

O ciclo repete-se por mais 25 vezes a partir da desnaturação. Em seguida, as amostras foram mantidas a 4 °C embrulhadas em papel alumínio até a sua precipitação.

4.7.3 Precipitação de DNA

Após o ciclo de sequenciamento, adicionou-se 120µL de etanol a 100% e 10µl de EDTA pH 8,0 (125mM) 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 16.000g por 45 minutos.

O sobrenadante foi descartado com o auxílio de pipeta e em seguida adicionou-se 65µl de etanol a 70% (v/v em água). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 16.000 g por 15 minutos.

O etanol foi removido com a pipeta e as amostras foram colocadas em banho seco a 95°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.

4.7.4 Eletroforese de sequenciamento

A eletroforese Capilar de Sequenciamento, dos produtos de PCR, foi realizada com o sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), a partir do protocolo do manual técnico do equipamento.

4.8 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS

A qualidade dos produtos sequenciados, bem como a montagem da sequência final de cada amostra foi realizada utilizando-se os programas Phred-Phrap, contido na suíte Codoncode Aligner v. 4.2.1 (Codoncode Corp.Dedham, MA, USA).

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 6 (TAMURA et al., 2013) foi avaliado o grau de diversidade nucleotídica existente entre as sequências e árvores filogenéticas foram elaboradas empregando-se métodos de máxima parcimônia, para cada conjunto de alinhamento. As árvores de máxima parcimônia foram obtidas pelo algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting sendo a árvore inicial obtida pela adição aleatória de sequências. A porcentagem de réplicas (de um total de 1000 réplicas) nas quais os táxons se agrupam em clusters foi calculado com teste de *bootstrap*.

Análises de polimorfismos de DNA e de taxas de substituições sinônimas e não sinônimas foram realizadas com auxílio do programa DNAsp (LIBRADO; ROZAS, 2009). Com este programa estimou-se os seguintes parâmetros: diversidade nucleotídica média e desvio padrão, diversidade nucleotídica em sítios sinônimos; diversidade nucleotídica em sítios não sinônimos, número total de diferenças sinônimas e número total de diferenças não sinônimas entre alelos, par a par.

5 RESULTADOS

5.1 FILOGENIA COMPARATIVA ENTRE ISOLADOS DE *SARCOCYSTIS* SPP. OBTIDOS DE MARSUPIAIS DO GÊNERO *DIDELPHIS* SPP. E PROTOZOÁRIOS DA SUB-FAMÍLIA TOXOPLASMATINAE.

Foi estudada a variabilidade em sequências barcoding em amostras de *Sarcocystis* spp eliminados por gambás, comparando a diversidade deste grupo com aquela observada em integrantes da sub-família Toxoplasmatinae

5.1.1 Introdução

Sarcocystis neurona e *Sarcocystis falcatula* são espécies bastante similares que utilizam marsupiais do gênero *Didelphis* como hospedeiros definitivos. As espécies de *Sarcocystis* eliminadas por gambás (exceto *Sarcocystis neurona*) podem causar doença em uma ampla diversidade de aves, entre passeriformes, columbiformes e psitaciformes, sendo comumente associada a surtos de sarcocistose pulmonar aguda em animais de parques zoológicos. *Sarcocystis neurona* é o parasito mais frequentemente associado à Encefalomielite Equina causada por Protozoário, doença associada a problemas na coordenação motora decorrente da diminuição da propriocepção e fraqueza muscular (DUBEY et al., 2001d).

Em termos genotípicos, as espécies *S. neurona* e *S. falcatula* são estreitamente relacionadas (DAME et al., 1995; FENGER et al., 1995), dada à extensa similaridade que têm em sequências gênicas codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico (18S rDNA). 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, 1997b; DUBEY; LINDSAY, 1998).

Em estudo anterior, foi verificada significativa variabilidade em sequências codificadoras de antígenos de superfície (SAGs) de esporocistos de *Sarcocystis* spp. isolados de raspado intestinal de gambás oriundos da região Sul do Brasil (MONTEIRO et al., 2013). Neste trabalho os autores encontraram um grande número de alelos para cada gene, considerando *SAG-1*, *SAG-2* e *SAG-3*, sugerindo a possibilidade de haver trocas gênicas de alelos distintos entre as espécies de *Sarcocystis* que realizam gametogonia em epitélio intestinal de gambás. Por esta razão, os autores sugeriram a pesquisa de marcadores menos sujeitos à pressão seletiva positiva, como os marcadores “barcoding DNA”, para melhor entendimento das relações filogenéticas entre os isolados de *Sarcocystis* spp. eliminados por marsupiais didelídeos.

O “código de barras de DNA” ou “barcoding DNA” (HERBERT et al., 2003) é um conceito que aplica-se ao conhecimento de um ou mais segmentos de sequências gênicas padrões que permitem o reconhecimento de espécies, por serem marcadores universais. Neste estudo foram utilizados marcadores moleculares direcionados a lócus gênicos de genoma mitocondrial, de genoma de apicoplasto e da região espaçadora interna transcrita do rDNA

Os genes mitocondriais têm se mostrado marcadores de grande resolução para as reconstruções de filogenias moleculares, pois são de transmissão materna em metazoários (ESCALANTE et al., 1998) e não são afetados por múltiplas substituições de nucleotídeos fixadas por pressões seletivas, já que muitas das substituições encontradas neste loci são sinônimas (MEYER, 1994; AVISE, 1998). Além disso, pelo fato de ser um gene codificador de uma proteína universal, permite que alinhamentos de sequências homólogas possam ser realizados com confiabilidade maior que os alinhamentos de sequências de genes codificadores de RNA ribossômicos ou sequências não codificadoras (RUSSO, 2001).

Assim como a mitocôndria, o apicoplasto é uma organela de herança materna (FERGUSON et al., 2005) que contém genes conservados potencialmente úteis para escrever histórias evolutivas (FEAGIN, 1994; KOHLER et al., 1997). Entre os genes de apicoplasto, destacam-se o *ClpC* e *RpoB*. O primeiro é um gene conservado, membro da família das proteínas caseinolíticas e muito utilizado em reconstruções filogenéticas em organismos do filo Apicomplexa (RATHORE et al., 2001; MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008; LAU et al., 2009; SERCUNDES, 2010) e o segundo, gene codificador da subunidade beta de RNA polimerase DNA dependente (*RpoB*) responsável por processar a atividade da polimerase, que

também vem sendo utilizado para reconstruções filogenéticas em organismos da família Sarcocystidae (DUBEY et al., 2003; WENDTE et al., 2010; SERCUNDES, 2010).

Neste estudo, também foram utilizadas as regiões espaçadoras transcritas internas, que por não serem codificadoras apresentam maiores probabilidades de mutação sendo, portanto, mais variáveis. Essa característica é apropriada para estimar relações nos níveis taxonômicos inferiores como gêneros e espécies (VAN HERWERDEN; BLAIR; AGATSUMA, 1999; ALVAREZ; WENDEL, 2003; PRASAD et al., 2007). As variações nas regiões espaçadoras têm sido utilizadas para identificar espécies ou cepas, sendo um bom marcador em estudos de genética de populações de diversos organismos (GASSER; NEWTON, 2000; BLOUIN, 2002).

A proposta deste estudo foi de conhecer as variações gênicas e relações filogenéticas em *Sarcocystis* spp. isolados de gambás capturados no Brasil através da análise de loci gênicos de genoma mitocondrial, de genoma de apicoplasto e das regiões espaçadoras transcritas internas, comparando a diversidade encontrada nestes grupos com a observada em integrantes da sub-família Toxoplasmatinae. A genealogia da sub-família Toxoplasmatinae servirá como referência para o estudo de organismos do gênero *Sarcocystis*, porque a sistemática filogenética de Toxoplasmatinae é um evento bastante estudado (ELLIS et al., 1999; MUGRIDGE et al., 1999; MONTEIRO et al., 2007; SOARES et al., 2011) e porque este grupo de organismos é o grupo mais próximo filogeneticamente do gênero *Sarcocystis*.

5.1.2 Materiais e Métodos

Foram analisadas 50 peças completas de trato gastrointestinal provenientes de gambás do Estado de São Paulo (n=49) e Estado do Rio Grande do Norte (n=1), colhidas durante o período de Setembro de 2011 a Janeiro de 2013. Também foram analisadas 20 amostras fecais de gambás do Estado de São Paulo colhidas no mesmo período. Do total de peças completas de trato gastrointestinal, 47 eram provenientes de *D. aurita* (94%) e três de *D. albiventris* (6%), das amostras fecais 10 provenientes de *D. albiventris* (50%) e 10 de *D. aurita* (50%). Ainda, foram empregadas 22 amostras de esporocistos previamente purificados de *Sarcocystis*

spp., oriundos do Estado do Rio Grande do Sul (MONTEIRO et al., 2013), e três oriundas do Estado de São Paulo (CÉSAR, 2001).

Foram empregados DNA de taquizoitos de cepas mantidas em modelos biológicos de algumas espécies. Para *Toxoplasma gondii* foram empregadas as cepas RH, CTG e PTG mantidas em passagens de camundongos (arquétipos I, II e III, respectivamente). Para *Neospora caninum*, a cepa NC-1, mantidas em células VERO. Para *Sarcocystis neurona* a cepa 138 proveniente de raspado intestinal de gambá (*Didelphis virginiana*) previamente alimentado com tecido muscular de guaxinim (*Procyon lotor*) infectado, isolado em Ohio, Estados Unidos (LINDSAY et al., 2004) e para *Sarcocystis falcatula*, a cepa SF1, isolada in vitro em células equinas dermais, proveniente de pulmão um periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*) previamente inoculado com esporocistos de raspado intestinal de gambás (*D. virginiana*), isolado na Califórnia, Estados Unidos (MARSH et al., 1997a). Ambas as cepas de *S. neurona* e *S. falcatula* foram mantidos em células CV-1. Também empregou-se neste estudo, DNA de *Besnoitia akodonti*, um parasito toxoplasmatíneo isolado de roedor nativo do Brasil, o *Akodon montensis*. DNA destes parasitos foi obtido conforme descrito anteriormente (DUBEY et al., 2003a).

Amostras de DNA de *Neospora hughesi* isolado Oregon (DUBEY et al., 2001c), de *Hammondia hammondi* (isolado 300) e de duas linhagens geneticamente divergentes de *Hammondia heydorni* (isolados 376 e BR), foram obtidas da mesma forma como descrito anteriormente (MONTEIRO et al., 2007).

As peças de trato gastrointestinal de gambás foram escarificadas para otimizar a recuperação de esporocistos como descrito anteriormente (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989). As amostras de esporocistos previamente isoladas estavam mantidas congeladas e foram obtidas de trato intestinal completo de gambás pelo mesmo método descrito acima. Método de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (OGASSAWARA; BENASSI, 1980) foi utilizado para isolamento dos esporocistos de *Sarcocystis* spp das fezes.

Após purificados, os esporocistos foram recuperados e submetidos ao processo de lise celular com proteinase K, SDS e pérolas de zircônia, para auxiliar fisicamente a ruptura celular (PATEL et al., 1998; MCLAUCHLIN et al., 1999; REGIDOR-CERRILLO et al., 2010), seguido de extração com fenol e clorofórmio e purificação de DNA por precipitação

alcoólica (SAMBROOK et al., 1989). Estas foram armazenadas no freezer a -20°C até a sua utilização.

Os primers indicados no quadro 4 foram empregados em reação em cadeia pela polimerase (PCR) com protocolos seguindo as recomendações do fabricante da enzima Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA). A segunda amplificação foi feita empregando-se exatamente as mesmas condições, da primeira, exceto pela troca dos primers e pela amostra alvo, que no caso da segunda amplificação constituía-se de produto amplificado pela primeira reação.

Todos os primers utilizados neste estudo foram desenhados de forma a amplificar indistintamente fragmentos gênicos dos parasitos envolvidos. Os *primers* para *ITS-1* direcionados aos organismos do gênero *Sarcocystis* spp. foram desenhados a partir de alinhamentos múltiplos entre sequências *ITS-1* das espécies de *S. falcatula* e de *S. neurona*.

Os primers direcionados ao gene codificador de *ClpC* de genoma de apicoplasto para os organismos do gênero *Sarcocystis* spp. foram desenhados a partir de sequências consenso de fator *ClpC* obtidas em pesquisa de bancos de dados de sequências EST de *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* e de sequências de RNAm de *Toxoplasma gondii*.

O gene codificador de Citocromo B do genoma mitocondrial, direcionados aos organismos do gênero *Sarcocystis* spp. foram desenhados a partir de apenas sequências genômicas de *Sarcocystis neurona* e *falcatula*.

O gene codificador de Citocromo B do genoma mitocondrial, direcionados aos organismos da sub-família Toxoplasmatinae foram desenhados a partir de sequências do gene *CytB* obtidas em pesquisa de bancos de dados de sequências EST e de RNAm de *N. caninum* e de *T. gondii*, respectivamente.

Os primers do gene *RpoB* direcionados a sub-família Toxoplasmatinae foram desenhados a partir de sequências do gene *RpoB* obtidas em bancos de dados de sequências genômicas de *N. caninum*, *T. gondii*, *Besnoitia oryctofelisi*, e *Besnoitia darlingi*.

Os produtos obtidos com os ensaios de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, aqueles que apresentaram tamanho esperado foram eluídos do gel, seguido de purificação do DNA, realizada com o “kit” GE Healthcare (Illustra, GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit), conforme instruções do fabricante. Os produtos foram sequenciados por meio de “kit” comercial apropriado para este fim: ABI PRISM BigDye®

Terminator v3.1 (Ready Reaction Cycle Sequencing, Applied Biosystems). Após o ciclo de sequenciamento, foi realizada purificação do DNA por precipitação alcoólica e as amostras foram submetidas à eletroforese capilar de sequenciamento, de acordo com o manual técnico do equipamento (sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer).

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 v. 4.2.1 (Codoncode Corp.Dedham, MA, USA). As sequências de nucleotídeos de cada amostra 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 6 (TAMURA et al., 2013) e DNAsp v.5 (ROZAS; LIBRADO, 2009) foi avaliado o polimorfismo de DNA existente entre as sequências. Reconstruções filogenéticas foram elaboradas empregando-se métodos de máxima parcimônia.

As análises de sequências de *ITS-1* de toxoplasmatíneos foram obtidas com dados obtidos do GenBank, cujas sequências nucleotídicas são oriundas dos mesmos isolados usados neste experimento.

Quadro 4 – *Primers* para primeira e segunda amplificação de locus codificador de Citocromo B, *ClpC* e *ITS-1*

<i>Primers</i>	Organismo	Amplificação	Sequências	Produto	T°C
Citocromo B					
<i>CytBF</i>	<i>Sarcocystis</i> spp.	Primeira e Segunda	F - TAC TTG ACT ACT GCC TGG TTA TCT G	657	52°
<i>CytBR</i>			R - GAT ATC CAT GAG GTT ACT ACA TTT C		
<i>CytBF</i>	Sub-família	-	F - TTA CTA TAG CCA CTG CCT TCC	608	53°
<i>CytBR</i>	Toxoplasmatinae		R - CCA TCC ACT GAC TAC ATT TCG		
<i>ClpC</i>					
<i>ClpCF</i>	<i>Sarcocystis</i> spp.	Primeira e Segunda	F - GCT GAW TTA ATT AGA TTT GAT ATG AGT G	601	52°
<i>ClpCR</i>			R - GGC GWG CWC CAT ATA AWG GAT GA		
<i>RpoB</i>					
<i>RpoBF</i>	Sub-família	-	F - ATT TTT GTG GAT ATG ATT TTG AAG ATG C	517	53°
<i>RpoBR</i>	Toxoplasmatinae		R - TTT CCA TAT CTT CCA CAT AAT TTA TCT C		
<i>ITS-1</i>					
<i>ITS-234F19</i>	<i>Sarcocystis</i> spp.	Primeira	F - TCA ACC ATT GAA TCC CCA A	505	56°
<i>ITS-720R19</i>		Segunda	R - TCA TTT TGA ACA TGT ACC A		
<i>ITS-234F19</i>			F - TCA ACC ATT GAA TCC CCA A	367	52°

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

5.1.3 Resultados

Do total de 50 raspados intestinais realizados, 33 foram positivos para *Sarcocystis* spp. sendo que destes 32 eram provenientes *D. aurita* e um de *D. albiventris*. Das amostras de fezes, apenas uma se mostrou positiva, sendo esta proveniente de um gambá *D. albiventris*. Os detalhes da amostra e da positividade para a presença de esporocistos estão anotados na tabela 1.

Tabela 1 - Positividade para a presença de esporocistos de *Sarcocystis* spp. em gambás do gênero *Didelphis*.

	Raspado intestinal		Fezes	
	Positivos	Totais	Positivos	Totais
<i>D. aurita</i>	20A + 4JA + 8ND	32A + 4JA + 10 ND	-	9A + 1JA
<i>D. albiventris</i>	1ND	3A + 1ND	1A	2A + 8 ND
Total	33	50	1	20

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. Positividade para a presença de esporocistos de *Sarcocystis* spp. em gambás do gênero *Didelphis*. são mostradas, em relação ao total, a positividade para a técnica de raspado intestinal em peça de trato gastrointestinal e amostras fecais. Também é feita a distinção entre adultos (A), Jovens-Adultos (JA) e animais que a idade não pôde ser definida (ND).

Em relação a análise molecular, cada amostra de esporocistos de *Sarcocystis* sp teve suas sequências identificadas para cada alelo: *ClpC*, *CytB* e *ITS-1*. A combinação dos resultados permitiu classificar as 38 amostras de esporocistos em 12 combinações de alelos. Os diferentes alelos de cada marcador foram designados por algarismos romanos. Foram encontrados, nestas amostras, seis alelos de *ClpC*, quatro alelos de *CytB* e sete alelos de *ITS-1*. As seguintes combinações de alelos foram encontradas (*ClpC*-*CytB*-*ITS-1*): I-I-VI (*Sarcocystis neurona*); I-II-I (DSP32); II-II-VII (*Sarcocystis falcatula*); III-IV-II (DSP41); IV-IV-I (SRS55); V-II-I (DSP02, SRS47, SRS50, SRS53); V-II-V (DSP58); V-III-III (SRS56 e SRS57); V-IV-I (DSP01, DSP43, DSP45, DSP47, DSP50, G26, G37, SN10, SRS28, SRS29, SRS30, SRS31, SRS32, SRS34, SRS35, SRS39, SRS40, SRS44, SRS46, SRS48, SRS51, SRS54); V-IV-II (SRS49); V-IV-IV (SRS41) e VI-IV-I (DSP25 e DSP51).

A comparação entre as sequências de genes organelares empregando sequências obtidas dos *Toxoplasma gondii* RH, *Hammondia heydorni* 376, *Hammondia heydorni* BR, *Hammondia hammondi*, *Neospora hughesi* e *Neospora caninum* NC1 revelou que *RpoB* e *ClpC* tem valores de diversidade semelhantes entre si, e superiores ao marcador *CytB* (Tabela 2). As sequências *RpoB* são aquelas com maior diversidade em sítios não sinônimos.

Tabela 2 - Diversidade nucleotídica de fragmentos de genes de organelas de *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni* e *Neospora caninum*

Diversidade nucleotídica	Marcador		
	<i>CytB</i>	<i>ClpC</i>	<i>RpoB</i>
Pi	0,03795	0,04560	0,05000
Pi(s)	0,14941	0,17596	0,12778
Pi(a)	0,00240	0,01004	0,02987

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. Pi: diversidade nucleotídica; Pi(s): diversidade nucleotídica em sítios sinônimos; diversidade nucleotídica em sítios não sinônimos. Nesta análise foram comparadas sequências gênicas de: um isolado *Toxoplasma gondii* (cepa RH), dois isolados de *Hammondia heydorni* (isolados BR e 376) e um isolado de *Neospora caninum* (cepa NC1).

Citocromo B (CytB)

As sequências produzidas pelas PCRs direcionadas o gene codificador de *CytB*, após editadas e alinhadas, geraram uma matriz de alinhamento com 549 caracteres. O emprego destas sequências como itens de busca na ferramenta BLAST permitiu recuperar fragmentos homólogos com o mesmo número de nucleotídeos de organismos das famílias Sarcocistidae e Eimeridae. Nenhuma inserção ou deleção foi identificada na matriz de alinhamento. A reconstrução filogenética dos organismos recuperados pela busca BLAST é mostrada na figura 4, incluindo sequências produzidas neste estudo e sequências obtidas do GenBank. A filogenia de *CytB* discrimina inequivocamente os clados: sub-família Toxoplasmatinae, gênero *Sarcocystis* e família Eimeridae. O clado Toxoplasmatinae tem três sub-clados bem suportados estatisticamente, aqueles formados pelos organismos *Hammondia heydorni*, *Neospora* spp e *Hammondia hammondi*/*Toxoplasma gondii*.

Para *CytB*, foram encontradas quatro variantes genotípicas dentre os esporocistos de *Sarcocystis* sp identificados em gambás. Estas variantes foram designadas de *Sarcocystis*

CytB type I a *Sarcocystis CytB type IV*. Houve maior prevalência para o alelo *Sarcocystis CytB type IV* (28/38), que também verificou-se uma variante consideravelmente divergente das demais. *Sarcocystis CytB type I* (alelo encontrado somente na amostra de *Sarcocystis neurona* isolado 138) e *Sarcocystis CytB type II*, encontrada em seis esporocistos e na amostra de *Sarcocystis falcatula* isolado SF1, diferem em apenas um nucleotídeo. A mesma distância (Apêndice A) é verificada entre as variantes *Sarcocystis CytB II* e *Sarcocystis CytB III*. *Sarcocystis CytB type I* e *III* diferem em 2 posições. Esta última variante foi encontrada em dois esporocistos. Todas as substituições encontradas entre as variantes *Sarcocystis CytB I*, *Sarcocystis CytB II* e *Sarcocystis CytB III* foram substituições sinônimas.

No clado *Toxoplasmatinae*, as sequências dos dois isolados de *Hammondia heydorni* são idênticas entre si e entre sequências de *Hammondia triffittae* (GJERDE, 2013), assim como são idênticas entre si todas as sequências de organismos do gênero *Neospora*. Para o gênero *Toxoplasma*, apenas uma sequência (AF023246), mostrou-se divergente das demais, com duas substituições sinônimas. Os arquétipos I, II e III de *Toxoplasma gondii* (cepas RH, CTG e PTG, respectivamente) são todos idênticos no segmento estudado.

Figura 4 - Reconstrução filogenética de organismos das famílias Sarcocystidae e Eimeridae através do gene *CytB*

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. História evolutiva inferida por método de máxima parcimônia com sequências *CytB*. Árvore de consenso inferida de 10 árvores mais parcimoniosas (361 passos). O índice de consistência e de retenção da árvore são (0.847059) e (0.949367). O percentual de árvores parcimoniosas em que os táxons agruparam-se está indicado próximo aos nós. Em parêntesis estão as porcentagens de réplicas em que os táxons agrupam-se juntos pelo método de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Estes valores são anotados somente para os clados com táxons agrupados no mesmo clado em todas as árvores mais parcimoniosas. A árvore de máxima parcimônia foi obtida empregando-se o algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (NEI; KUMAR, 2000). A árvore é representada em escala e as unidades representam o número de mudanças que ocorrem em toda a sequência. A análise envolve 18 sequências. Todas as posições dos códons foram incluídas. Há um total de 549 posições. Análise realizada com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

Unidade C de proteína caseolítica (ClpC)

De forma similar à análise com *CytB*, a filogenia de *ClpC* discrimina os clados sub-família Toxoplasmatinae, gênero *Sarcocystis* e família Eimeridae e também resolve a filogenia dentro da sub-família Toxoplasmatinae, porém com menor suporte estatístico.

Em relação a *CytB*, um número maior de variantes *ClpC* foi encontrado nas amostras de esporocistos de *Sarcocystis* sp de gambás. As sequências produzidas pelas PCRs direcionadas o gene *ClpC*, após editadas e alinhadas, geraram uma matriz de alinhamento com

424 caracteres. O emprego destas sequências como item de busca na ferramenta BLAST permitiu recuperar sequências homólogas com o mesmo número de nucleotídeos para todos os grupos pesquisados, dentre Sarcocistídeos e Eimerídeos. Nenhum *gap* foi gerado na matriz de alinhamento. A reconstrução filogenética dos organismos pesquisados com este gene é mostrada na figura 5.

Este marcador revelou, para as sequências obtidas de esporocistos de gambás, a presença de seis alelos divergentes, mas relacionados filogeneticamente entre si formando um clado monofilético em relação aos grupos dos Toxoplasmatíneos e Eimerídeos. Neste clado ficaram incluídas sequências de espécies desconhecidas do gênero *Sarcocystis* detectadas em tecidos de bubalinos e bovinos naturalmente infectados (EU371499 e EU371500). Um sétimo alelo foi identificado em uma amostra de fezes de gambás onde foi encontrado oocistos de protozoário do gênero *Eimeria*. Este alelo tem relação filogenética com sequências homólogas de *Eimeria tennella* (Figura 5).

Diferentemente do que foi verificado para *CytB*, as seis variantes oriundas de *Sarcocystis sp* de gambás foram bastante divergentes entre si, com distância p (Apêndice A) variando de 0,0024 entre *Sarcocystis ClpC type I* (*Sarcocystis neurona* isolado 138) e *Sarcocystis ClpC type II* (*Sarcocystis falcatula* isolado SF1) a 0,1537 (entre *Sarcocystis ClpC type V* e *Sarcocystis ClpC type VI*). Houve maior prevalência da variante *Sarcocystis ClpC type V* entre as amostras de esporocistos detectadas neste experimento (31/38). *Sarcocystis ClpC type I* e *Sarcocystis ClpC type II* diferem em apenas um nucleotídeo no fragmento estudado, uma modificação não sinônima que leva a uma mudança conservativa na sequência de aminoácido traduzida (I→L). Já o alelo *Sarcocystis ClpC type V* difere de *Sarcocystis ClpC I* e *Sarcocystis ClpC II* em 35/36 nucleotídeos, sendo 18/19 substituições de aminoácidos. *Sarcocystis ClpC type I*, II, III, IV e VI ocorreram em 2/38, 1/38, 1/38, 1/38 e 2/38 amostras, respectivamente. No apêndice A estão as distâncias p entre os alelos de *ClpC* de *Sarcocystis sp* de gambás.

Para o grupo dos toxoplasmatíneos, as distâncias (Apêndice B) variaram de 0,0000 (entre *Toxoplasma gondii* cepa CTG e *Toxoplasma gondii* cepa PTG) até 0,0996 (entre *Besnoitia akodonii* e *Neospora caninum/hughesi*). O arquétipo I de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) difere dos arquétipos II e III (cepas CTG e PTG, respectivamente) em uma substituição sinônima. Uma única substituição sinônima existe entre sequências de *Neospora hughesi* e

Neospora caninum, enquanto os dois isolados de *Hammondia heydorni* diferem em seis caracteres de nucleotídeos, sendo uma substituição não sinônima e as demais sinônimas.

Figura 5 - Reconstrução filogenética de organismos das famílias Sarcocystidae e Eimeridae através do gene *ClpC*

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. História evolutiva inferida por método de máxima parcimônia com sequências *ClpC*. A árvore mais parcimoniosa tem 357 passos. O índice de consistência e de retenção da árvore são (0.676568) e (0.809339). A porcentagem de réplicas em que os táxons agrupam-se juntos pelo método de bootstrap são mostrados próximos aos nós. (FELSENSTEIN, 1985). A árvore de máxima parcimônia foi obtida empregando-se o algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (NEI; KUMAR, 2000). A árvore é representada em escala e as unidades representam o número de mudanças que ocorrem em toda a sequência. A análise envolve 20 sequências. Todas as posições dos códons foram incluídas. Há um total de 424 posições. Análise realizada com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

Subunidade beta de RNA polimerase (RpoB)

Para a filogenia de *RpoB*, não existem sequências de esporocistos de gambás porque este marcador não foi empregado para identificação destas amostras. Apenas sequências de oocistos da sub-família Toxoplasmatinae, de isolados em cultura celular de *Sarcocystis*

neurona 138 e *Sarcocystis falcatula* SF1 e de sequências homólogas de *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis falcatula* e *Sarcocystis lindsayi* obtidas no GenBank.

As sequências produzidas pelas PCRs direcionadas o gene codificador de *RpoB*, após editadas e alinhadas, geraram uma matriz de alinhamento com 440 caracteres. Neste caso, também como para o marcador *ClpC*, o *RpoB* permite a reconstrução de filogenias de Sarcocistídeos com menor suporte estatístico que as filogenias de *CytB*. A reconstrução filogenética dos organismos pesquisados com este gene é mostrada na figura 6. Para o clado da sub-família Toxoplasmatinae, as distâncias (Apêndice B) variaram de 0,0000 (entre as variantes RH, CTG e PTG de *Toxoplasma gondii* até 0,1182, entre *Besnoitia akodonii* e *Hammondia heydorni* isolate 376). A distância p entre os dois isolados de *Hammondia heydorni* é devido à uma substituição sinônima. Dois isolados de *Toxoplasma gondii* oriundos da China diferem do isolado RH em uma substituição não sinônima uma em cada sequência. Os isolados TgCtxz5 e Tgpkfx171 (KJ159883 e KJ159889) (dados não mostrados) foram determinados com elevada virulência. No segmento analisado, as sequências de *Neospora hughesi* e *Neospora caninum* são idênticas.

Considerando a diversidade nucleotídica entre isolados de *Sarcocystis sp* eliminados por gambás, a distância p (Apêndice A) variou entre 0,0000 e 0,0091. Isolados distintos de *Sarcocystis neurona* não foram idênticos no fragmento estudado, apresentando diferença de até três nucleotídeos sendo uma das diferenças uma substituição não sinônima.

As sequências de *RpoB*, ao contrário das demais sequências de genoma de organelas apresentaram, no segmento estudado, inserções e deleções entre organismos do clado Toxoplasmatinae.

A matriz de dados de *RpoB* contempla sequências de oocistos de leão marinho (*Zalophus californianus*) recuperadas do Genbank e que os autores identificaram como oocistos de toxoplasmatíneos, classificando-os previamente no gênero *Neospora*. A reconstrução filogenética usando este marcador revelou a filogenia ilustrada pela figura 7, onde é possível verificar que estas amostras (HM173319 e HM173318) não são evolutivamente mais relacionadas a nenhum dos toxoplasmatíneos em particular.

Figura 6 - Reconstrução filogenética de organismos da família Sarcocystidae através do gene *RpoB*

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. História evolutiva inferida por método de máxima parcimônia com sequências *RpoB*. Árvore de consenso inferida de 9 árvores mais parcimoniosas (167 passos). O índice de consistência e de retenção da árvore são (0.899371) e (0.975535). O percentual de árvores parcimoniosas em que os táxons agruparam-se está indicado próximo aos nós. Em parêntesis estão as porcentagens de réplicas em que os táxons agrupam-se juntos pelo método de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Estes valores são anotados somente para os clados com táxons agrupados no mesmo clado em todas as árvores mais parcimoniosas. A árvore de máxima parcimônia foi obtida empregando-se o algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (NEI; KUMAR, 2000). A árvore é representada em escala e as unidades representam o número de mudanças que ocorrem em toda a sequência. A análise envolve 21 sequências. Todas as posições dos códons foram incluídas. Há um total de 437 posições. Análise realizada com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

Figura 7 - Reconstrução filogenética de organismos da família Sarcocistidae através do gene *RpoB*, incluindo sequências de *Neospora* sp. detectado em leão marinho

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. História evolutiva inferida por método de máxima parcimônia com sequências *RpoB*. Árvore de consenso inferida de 8 árvores mais parcimoniosas (139 passos). O índice de consistência e de retenção da árvore são (0.870229) e (0.966068). O percentual de árvores parcimoniosas em que os táxons agruparam-se está indicado próximo aos nós. Em parêntesis estão as porcentagens de réplicas em que os táxons agrupam-se juntos pelo método de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Estes valores são anotados somente para os clados com táxons agrupados no mesmo clado em todas as árvores mais parcimoniosas. A árvore de máxima parcimônia foi obtida empregando-se o algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (NEI; KUMAR, 2000). A árvore é representada em escala e as unidades representam o número de mudanças que ocorrem em toda a sequência. A análise envolve 23 sequências. Todas as posições dos códons foram incluídas. Há um total de 286 posições. Análise realizada com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

Espaçador interno transcrito 1 (ITS-1)

Para sequências *ITS-1*, as análises foram construídas separadamente para a sub-família Toxoplasmatinae e para o gênero *Sarcocystis*. Este procedimento foi realizado assim porque o alinhamento de sequências *ITS-1* de organismos menos relacionados filogeneticamente produz resultados pouco confiáveis, em virtude do grande número de inserções e deleções que permitem várias possibilidades de alinhamento.

Para a matriz de dados da sub-família Toxoplasmatinae foram recuperadas e analisadas sequências disponíveis no Genbank. A filogenia da sub-família Toxoplasmatinae mostra 5 grupos distintos, (i) *Neospora caninum* e suas variantes; (ii) *Neospora hughesi*; (iii) *Hammondia hammondi*; (iv) *Toxoplasma gondii*; (v) *Hammondia heydornii* e suas variantes. O grupo *Hammondia heydorni* parece estar dividido em pelo menos dois grupos. A reconstrução filogenética dos organismos pesquisados com este gene é mostrada na figura 8.

Para a espécie *Neospora caninum*, é possível identificar distâncias p (Apêndice C) até o valor de 0,0115, correspondendo entre a distância entre dois alelos de *ITS-1* do isolado *Neospora caninum* NC-Bahia. Além de substituições, estes dois alelos diferem por uma inserção-deleção de um dinucleotídeo TT, nas posições 399 e 400 (tomando como base a sequência AY259042).

Diversas inserções-deleções de grandes extensões são verificadas nas sequências *ITS-1* entre as espécies de Toxoplasmatinae, fazendo com que suas dimensões não sejam idênticas. As sequências completas de *ITS* de *Neospora caninum* alelo 1, *Neospora caninum* alelo 2, *Neospora hughesi*, *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* e *Hammondia heydorni* são de, respectivamente, 421, 423, 423, 393, 394 e 400.

As duas linhagens de *Hammondia heydorni* diferem em *ITS* apenas em substituições e não em inserções-deleções. Para este complexo de espécies, foram encontradas distâncias de 0,0027 (entre DQ997605 e DQ997604) até 0,0272 (entre FJ176224 e DQ997603).

Figura 8 - Reconstrução filogenética de organismos da subfamília Toxoplasmatinae através do gene *ITS-1*

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. História evolutiva inferida por método de máxima parcimônia com sequências *ITS-1*. Árvore de consenso inferida de 10 árvores mais parcimoniosas (153 passos). O índice de consistência e de retenção da árvore são (0.937063) e (0.988204). O percentual de árvores parcimoniosas em que os táxons agruparam-se está indicado próximo aos nós. Em parêntesis estão as porcentagens de réplicas em que os táxons agrupam-se juntos pelo método de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Estes valores são anotados somente para os clados com táxons agrupados no mesmo clado em todas as árvores mais parcimoniosas. A árvore de máxima parcimônia foi obtida empregando-se o algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (NEI; KUMAR, 2000). A árvore é representada em escala e as unidades representam o número de mudanças que ocorrem em toda a sequência. A análise envolve 22 sequências. Há um total de 349 posições. Análise realizada com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

As sequências produzidas pelas PCRs direcionadas a *ITS-1* de *Sarcocystis* sp, após editadas e alinhadas, geraram uma matriz de alinhamento com 262 caracteres. O emprego destas sequências como itens de busca na ferramenta BLAST permitiu recuperar sequências homólogas de organismos estreitamente relacionados a *Sarcocystis neurona*. Inserções e deleções foram identificadas entre diversas sequências. A reconstrução filogenética dos organismos recuperados pela busca BLAST é mostrada na figura 9, incluindo sequências produzidas neste estudo e sequências obtidas do GenBank. *Sarcocystis ITS-1* I, II, III, IV, V, VI e VII foram os alelos que ocorreram em 30/38, 2/38, 2/38, 1/38, 1/38, 1/38 e 1/38 amostras, respectivamente.

A filogenia de ITS discrimina os alelos *Sarcocystis ITS-1* II, IV e V como alelos inéditos. *Sarcocystis ITS-1* IV mostra maior similaridade com *Sarcocystis lindsayi*. Entre os alelos filogeneticamente relacionados a *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis falcatula*, dois grupos bem suportados ocorrem, um deles hospedando o alelo *Sarcocystis ITS-1* VI (*Sarcocystis neurona*) e outro, o alelo *Sarcocystis ITS-1* VII (*Sarcocystis falcatula*). Entretanto, diversos alelos disponíveis no GenBank e também o alelo *Sarcocystis ITS-1* I não parecem estar relacionados a nenhum dos clados citados.

Considerando os alelos filogeneticamente relacionados a *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis falcatula* (alelos *Sarcocystis ITS-1* VI e VII, respectivamente) existem diversas mutações fixadas nos dois grupos (Figura 10). Nesses sítios, os alelos relacionados ao tipo I possuem mutações compartilhadas ora com uma ora com outra espécie. A matriz de distância p entre os alelos de *ITS-1* de *Sarcocystis* de gambás se encontra no apêndice D

Figura 9 - Reconstrução filogenética de organismos do gênero *Sarcocystis* através do gene *ITS-1*

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. História evolutiva inferida por método de máxima parcimônia com sequências *ITS-1*. Árvore de consenso inferida de 10 árvores mais parcimoniosas (48 passos). O índice de consistência e de retenção da árvore são (0.866667) e (0.969466). O percentual de árvores parcimoniosas em que os táxons agruparam-se está indicado próximo aos nós. Em parêntesis estão as porcentagens de réplicas em que os táxons agrupam-se juntos pelo método de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Estes valores são anotados somente para os clados com táxons agrupados no mesmo clado em todas as árvores mais parcimoniosas. A árvore de máxima parcimônia foi obtida empregando-se o algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (NEI; KUMAR, 2000). A árvore é representada em escala e as unidades representam o número de mudanças que ocorrem em toda a sequência. A análise envolve 42 sequências. Há um total de 262 posições. Análise realizada com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

Figura 10 - Alinhamento de alelos *Sarcocystis ITS-1* originárias de esporocistos de gambás

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda: Setas em cor cinza referem-se a mutações fixadas entre grupo de *Sarcocystis falcatula* e *Sarcocystis neurona*. Notar que em todos os casos, nas sequências de alelo I estas mutações são compartilhadas com uma ou outra espécie. Duas inserções são exclusivas de sequências relacionadas ao alelo I (setas brancas).

5.1.4 Discussão

De acordo com estudos sobre ocorrência e prevalência de *Sarcocystis* em gambás do gênero *Didelphis*, animais mais velhos possuem maior risco de infecção, devido a maior chance de contato com o parasito, sendo relatadas baixas ocorrências e prevalências em animais jovens e filhotes (CASAGRANDE et al. 2009; DUBEY et al., 2001b). O objetivo deste estudo era a máxima obtenção de esporocistos para análise molecular, portanto animais jovens ou filhotes foram excluídos deste estudo, o que provavelmente explica a alta ocorrência encontrada entre as amostras analisadas através de raspado intestinal, onde 66% (33/50) das amostras se mostraram positivas para *Sarcocystis* spp., resultado significativamente maior do que previamente relatado (DUBEY et al., 2001b; ELSHEIKHA; MANSFIELD; MURPHY, 2004, 2004a; CASAGRANDE et al., 2009).

Entre a análise de amostras fecais, apenas uma amostra (5%) se mostrou positiva para *Sarcocystis* spp. A baixa ocorrência já era esperada, pois de acordo com Dubey et al. (1989) a eliminação de esporocistos pelas fezes é baixa e intermitente, tornando o método de raspado intestinal mais eficiente para recuperação de esporocistos (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989).

Em trabalho anterior, foi verificada extensa variabilidade em fragmentos gênicos codificadores de proteína de superfície em amostras de *Sarcocystis* spp eliminados por gambás do gênero *Didelphis*, quando foram identificados seis alelos de *SAG-2*, cinco alelos de *SAG-3* e onze alelos de *SAG-4*, prováveis variantes gênicas de um número restrito de espécies (MONTEIRO et al., 2013). No trabalho presente, estudamos a variabilidade em sequências barcoding em amostras de *Sarcocystis* spp eliminados por gambás, comparando a diversidade deste grupo com aquela observada em integrantes da sub-família Toxoplasmatinae. Aqui também foi pesquisada a variabilidade de sequências *ITS-1* que possuem capacidade reconhecida para serem empregadas como marcadores de espécies em Toxoplasmatinae (HOMAN et al., 1997; ELLIS et al., 2000; GONDIM et al., 2004; GJERDE; DAHLGREN, 2011; SOARES et al., 2011) e outros grupos de protozoários, como organismos do gênero *Sarcocystis* (TANHAUSER et al., 1999; REJMANECK et al., 2010; MILLER et al., 2010; WENDTE et al., 2010; WÜNSCHMANN et al., 2010).

A análise comparativa da diversidade de genes barcoding entre organismos relacionados filogeneticamente é uma forma eficaz de validar a empregabilidade deles como marcador de estudos evolutivos (GJERDE, 2013) e no caso particular do grupo usado como

referência, a sub-família Toxoplasmatinae, o presente estudo tem o diferencial de empregar, além dos gêneros *Hammondia*, *Neospora* e *Toxoplasma*, um espécimen do gênero *Besnoitia*, também pertencente à sub-família Toxoplasmatinae, mas igualmente divergente de todos os gêneros mencionados acima. Enquanto a sub-família Toxoplasmatinae contém integrantes cuja variabilidade genética vem sendo intensamente estudada (ELLIS et al. 1999; MUGRIDGE et al., 1999; MONTEIRO et al., 2007; SOARES et al., 2011), o mesmo não acontece com o grupo formado pelo diversificado gênero *Sarcocystis*.

As amostras de *Sarcocystis* empregadas neste estudo não foram consideradas como isolados, pois esporocistos de mais de uma espécie podem co-existir em uma amostra fecal de gambá. Então, as análises das amostras de gambás foram feitas para cada marcador individualmente. De fato, devido a multiplicidade de hospedeiros intermediários ser uma característica marcante na família Sarcocystidea, os resultados de análises concatenadas devem ser observados com cautela, pois mais de uma espécie pode co-existir também em amostras de tecidos contendo merozoítos e não apenas em amostras de esporocistos. Nesta investigação, nem todas as amostras identificadas por microscopia foram identificadas por métodos moleculares, pois em alguns casos sequências com picos heterogêneos foram encontradas. Somente foram analisadas as sequências que puderam ter sítios inequivocamente determinados pelos padrões de qualidade do software PHRED (EWING et al., 1998), contido na suíte de programas Codoncode Aligner v. 4.2.1 (Codoncode Corp.Dedham, MA, USA).

As reconstruções filogenéticas com fragmento de *CytB* separam consistentemente todas as espécies da subfamília Toxoplasmatinea e indicam elevada similaridade (~100%) intra-grupo. O gênero *Neospora* tem duas espécies conhecidas, *Neospora caninum* e *Neospora hughesi* que diferem marcadamente em características de patogenicidade e antigenicidade (MARSH et al., 1998; MARSH et al., 1999). Enquanto a primeira tem reconhecida capacidade de infectar bovinos e provocar problemas de abortamentos nesta espécie, a segunda está relacionada a doença neurológica em equino. Entretanto, são muito escassos os relatos de infecções por *N. hughesi* (VARDELEON et al., 2001; BRUCE et al., 2009; PUSTERLA et al., 2014) de forma que pouco se conhece sobre este agente. Em *CytB*, ambas as espécies deste gênero são idênticas, assim como também são idênticos ambos os isolados de *Hammondia heydorni* que foram previamente discriminados em duas linhagens distintas (MONTEIRO et al., 2007). A espécie *Hammondia heydorni* pode ser separada em duas linhagens molecularmente divergentes quando comparados genes de alfa tubulina, HSP

70 e *ITS-1* (ABEL et al., 2006; MONTEIRO et al., 2007; SOARES et al., 2009; GJERDE; DAHLGREN, 2011). Uma terceira linhagem de *Hammondia heydorni* foi reclassificada como *Hammondia truffitti*, em virtude de sua divergência molecular com as duas linhagens previamente descritas e também por sua distinção em relação a capacidade de usar cães como hospedeiros definitivos, sendo, segundo os autores, apta somente a usar raposas como tal (GJERDE; DAHLGREN, 2011). Isolados classificados como *H. truffitti* tem fragmentos idênticos de *CytB* em relação às linhagens de *H. heydorni* empregadas neste estudo (GJERDE, 2013).

Em relação ao gênero *Sarcocystis*, o alelo 4 de *CytB* é bastante divergente dos demais alelos encontrados em amostras fecais de gambás. As distâncias p entre o alelo 4 e os alelos 1, 2 e 3 de *Sarcocystis* são comparáveis às distâncias p entre alelos homólogos de táxons do gênero *Neospora* e aqueles da espécie *Hammondia heydorni*. Ainda, o alelo 4 de *CytB* *Sarcocystis* possui, em relação a seus homólogos de *Sarcocystis* sp, uma diversidade em sítios não sinônimos cerca de 10 vezes superior aos valores registrados nas comparações entre os gêneros *Hammondia*, *Toxoplasma* e *Neospora* (dados não mostrados). Em se tratando de modificação não sinônima em um gene que codifica componente associado ao metabolismo celular e não uma estrutura do parasito, é possível que esta diferença seja resultado de processo adaptativo em nível intracelular, e como consequência, esta diferença possa de fato ser traduzida em termos de patogenicidade, distribuição do parasito ou espectro de hospedeiro. Ou seja, este alelo 4 deve ser proveniente de um Sarcocistídeo com características biológicas bem diferentes dos Sarcocistídeos relacionados a *Sarcocystis falcatula* e *Sarcocystis neurona*.

Alelos 1, 2 e 3 de *CytB* de *Sarcocystis* tem diferenças da mesma magnitude que variantes de *CytB* de *Toxoplasma gondii*, de forma, que para este fragmento a diferença entre *Sarcocystis neurona* 138 e *Sarcocystis falcatula* SF-1 é mínima. Entretanto, no gênero *Toxoplasma*, a amostra que difere das demais é descrita como uma cepa padrão mantida em passagens sucessivas em modelos biológicos em laboratório, o que pode favorecer o aparecimento de substituições nucleotídicas. Por outro lado os eimerídeos parasitos de lagomorfos, *Eimeria flavescens* e *Eimeria irresidua*, também possuem no locus *CytB* uma única diferença sinônima, muito embora suas sequências *ITS-1* tenham apenas 86% de identidade, além de nove gaps serem necessários para o alinhamento BLAST (quando comparadas as sequências HM768883 e HM768889). Estas espécies de eimerídeos diferem

ainda em características de ciclo de vida, morfologia de oocisto, merogonias e patogenicidade (PAKANDL; JELÍNKOVÁ, 2006; PAKANDL, 2009).

Considerando o locus *ClpC*, obteve-se uma topologia similar à reconstrução filogenética com *CytB*, em particular considerando-se a sub-família Toxoplasmatinae, porém *ClpC* revela-se menos conservado que *CytB*. Alelos 1 e 2 de *ClpC* de *Sarcocystis* (*Sarcocystis neurona* 138 e *Sarcocystis falcatula* SF-1, respectivamente) tem diferenças da mesma magnitude que variantes de *Toxoplasma gondii* e também em relação às duas espécies do gênero *Neospora*. Entretanto, as duas linhagens de *Hammondia heydorni* diferem em uma magnitude similar àquela observada entre *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi*, corroborando a divergência as duas linhagens de *Hammondia heydorni* já verificadas anteriormente (MONTEIRO et al., 2007). Os demais alelos de *ClpC* de *Sarcocystis* de gambás caracterizam-se por um longo tempo de divergência em relação aos nós ancestrais (exceção para os alelos I e II de *ClpC* de *Sarcocystis*), o que pode ser observado pelo comprimento dos ramos terminais da topologia da reconstrução com máxima parcimônia. Assim, é provável que pelo menos cinco espécies distintas tenham sido reveladas com o emprego deste marcador. A grande diversidade de alelos *ClpC* filogeneticamente relacionados ao gênero *Sarcocystis* mostra que os gambás têm grande importância na disseminação deste agente. É provável também, dada a esta extensa diversidade genética, que um número grande de hospedeiros intermediários deva fazer parte do ciclo de vida dos parasitos eliminados por gambás.

A maior diversidade de alelos *ClpC* certamente pode ser explicada porque para a pesquisa de esporocistos foram empregados *primers* que amplificam tanto sequências de toxoplasmatíneos quanto sequências de *Sarcocystis*. Já para *CytB*, os *primers* empregados para amplificar genes de esporocistos de *Sarcocystis* foram baseados em sequências consenso entre *S. falcatula* e *S. neurona*.

Para o marcador *RpoB*, não há uma topologia consistente para resolver a filogenia entre as espécies de *Sarcocystis* eliminados por gambás. Curiosamente, duas sequências de *Sarcocystis neurona* possuem três diferenças nucleotídicas, sendo uma não sinônima, diferença significativamente maior que a diferença entre as duas espécies do gênero *Neospora* e também maior que a diferença entre as duas linhagens de *Hammondia heydorni*. Também neste marcador, há divergências entre as sequências de *S. falcatula*. Uma diferença sinônima

existe entre o isolado SF1 e as demais sequências de *S. falcatula*. Também apenas uma diferença sinônima existe entre este isolado e sequência de *S. lindsay*.

Considerando a sub-família Toxoplasmatinae, a filogenia de *RpoB* mostra grande similaridade intra-clado, de forma que nenhum dos táxons dentro dos clados *Toxoplasma*, *Neospora* ou *Hammondia heydorni* tenha mais do que uma diferença nucleotídica entre si. Adicionando-se os organismos *Neospora*-like (CARLSON-BREMER et al., 2012) eliminados por mamíferos marinhos, a reconstrução filogenética por parcimônia posiciona estas sequências em clados independentes de *Neospora* spp. e de *Hammondia heydorni*. Estas duas sequências são relacionadas entre si, são táxons monofiléticos, mas possuem considerável divergência entre si, como pode ser observado pelo tamanho dos ramos que derivam de seu ancestral comum, sendo por isso, muito provável que estas sequências sejam oriundas de espécies distintas entre si e não descritas dentro da sub-família Toxoplasmatinae.

Como era esperado, as filogenias com todos os loci gênicos de organelas de Sarcocystídeos são concordantes e podem ser empregadas com grande confiabilidade. Gjerde (2013), demonstra inequivocamente a empregabilidade de sequências destes genomas para reconstruir histórias evolutivas na família Sarcocistidae.

Sequências de *cox2* de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Hammondia triffitti* e *Hammondia heydorni* relatadas naquele trabalho possuem diversidade nucleotídica de 0,06484, sendo a diversidade em sítios sinônimos e não sinônimos de 0,21371 e 0,1569, respectivamente (dados não mostrados). As sequências *RpoB* e *ClpC* tem valores de diversidade semelhantes entre si, inferiores ao de *cox2* e superiores ao marcador *CytB*. Porém, de todos estes marcadores, as sequências *RpoB* são aquelas com maior diversidade em sítios não sinônimos, o que sugere que a evolução deste marcador é mais suscetível a pressão seletiva positiva. Em outro extremo está o marcador *CytB*, com valores deste parâmetro quatro a cinco vezes menor que os demais e portanto com um padrão evolutivo sujeito a pressão purificadora. Assim como em outros estudos (GJERDE 2013. 2013a), as sequências barcoding DNA podem fornecer uma estimativa confiável sobre a diversidade de espécies de *Sarcocystis* e, no caso particular desta investigação, sobre aquelas espécies que usam gambás do gênero *Didelphis* como hospedeiro definitivo.

Em todas as reconstruções de histórias evolutivas de organismos toxoplasmatíneos o posicionamento do clado que congrega os dois isolados de *Hammondia heydorni* é basal em

relação aos demais clados. *Hammondia heydorni* e *Hammondia triffiti* são organismos que usam canídeos como hospedeiro definitivo. Os dois isolados de *Hammondia heydorni* empregados neste estudo diferem molecularmente entre si (MONTEIRO et al., 2007) e também em relação a *Hammondia triffiti* (GJERDE; DAHLGREN, 2011). Pelos resultados, seria lícito supor que as relações entre canídeos e felídeos possam ter favorecido a adaptação dos ancestrais destes parasitos, originalmente naturais de canídeos, aos felídeos, grupo de carnívoros reconhecidos como atuais hospedeiros definitivos de *Hammondia hammondi* e *Toxoplasma gondii*. Entretanto, em todas as reconstruções filogenéticas deste grupo e também em outras descritas por outros autores, o suporte estatístico para a formação de grupos irmão congregando *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii*, congregando *Hammondia heydorni* e *Toxoplasma gondii* ou congregando *Hammondia heyorni* e *Neospora* spp tem suporte estatístico moderado, inferior a 75. Outra razão para a ocorrência de suporte estatístico baixo que não fatores relacionados a inconsistência dos dados (sinal filogenético insuficiente) é a possível ocorrência de recombinação gênica em períodos remotos durante evolução destes organismos. Recombinação gênica é um evento bastante plausível nestas espécies em virtude da reprodução sexuada que ocorre em organismos do filo Apicomplexa.

Em relação aos organismos do gênero *Sarcocystis* identificados neste estudo, a reconstrução filogenética com *ITS-1* identifica pelo menos quatro espécies. Um dos alelos, mostra similaridade com *Sarcocystis lindsayi*, porém as duas sequências não são idênticas. Também identifica-se o clado *Sarcocystis neurona*/*Sarcocystis falcatula* com dois grupos muito bem suportados estatisticamente, o grupo do alelo VII e o grupo do alelo VI (*Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis falcatula*, respectivamente). Entretanto, outros ramos divergentes destes grupos e com topologia incerta parecem acontecer nesta análise.

Além da divergência em substituições de nucleotídeos, os táxons integrantes dos clados que congregam *Sarcocystis neurona*, possuem em relação aos demais táxons inserções e deleções de nucleotídeos fixadas, como uma inserção dinucleotídeo GG (posições 165 e 166 da sequência AF204230 como referência) e uma inserção de dinucleotídeo GA (posições 351 e 352). Por outro lado, os táxons relacionados ao tipo 1 possuem uma deleção de AGT e uma inserção AT em relação tanto aos táxons relacionados a *S. neurona* quanto àqueles relacionados a *S. falcatula* (posições 300 a 302 e entre 393-394, respectivamente). Ainda, substituições fixadas T→C, C→A, T→C e C→T ocorrem, respectivamente, nas posições 174, 210, 321 e 333 exclusivamente em sequências relacionadas a *S. falcatula*. Nestas

posições, as sequências relacionadas ao alelo I compartilham mutações com uma ou outra espécie, mostrando que estes alelos não podem, de fato ser agrupado nem com *S. falcatula*, nem com *S. neurona* corroborando estudos anteriores com marcadores RFLP quando isolados de *Sarcocystis* de gambás oriundos do Brasil apresentaram genótipos parecidos ora com *S. neurona* ora com *S. falcatula*, dependendo do marcador considerado (TANHAUSER et al., 1999).

As sequências *ITS-1* são adequadas para diferenciação de espécies em muitas classes de organismos, porém é possível que pequenas variações em alelos *ITS-1* possam ser devidas a divergência entre diferentes cópias existente no mesmo genoma. Então, diferentes clados podem ser resultado de análise de genes parálogos. Cópias de operon ribossomal divergentes são fartamente exemplificadas dentro do filo Apicomplexa (GONDIM et al., 2004; SANTOS et al., 2010; SEVÁ et al., 2011).

Curiosamente, nenhuma das sequências obtidas de esporocistos de gambás do Brasil revelou padrão idêntico ao de *Sarcocystis falcatula* para *ClpC*, nenhuma sequência revelou o padrão idêntico ao de *Sarcocystis neurona* para *CytB* e nenhuma sequência revelou padrão idêntico ao de *Sarcocystis neurona* ou *Sarcocystis falcatula* para *ITS-1*. Em virtude da diferença muito pequena em loci organelares entre estas duas espécies e também ao fato de que os gambás podem eliminar esporocistos por períodos muito longos, não seria refutável hipotetizar que exista no Brasil espécies “híbridas” de *Sarcocystis* com mistura de genes de ambas as espécies arquetípicas (*Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis falcatula*).

Neste trabalho, a ocorrência de esporocistos em fezes de gambás de vida livre mostra que uma parcela muito grande desta população está infectada na natureza. Soma-se a isto o fato de que hospedeiro definitivo pode manter-se infectado por períodos superiores a 200 dias (PORTER et al., 2001). Como resultado, conclui-se que a gametogonia é um evento extremamente frequente e duradouro em tecidos intestinais de gambás e portanto trocas gênicas entre organismos seria muito mais facilitada do que em organismos que tem gametogonia por períodos mais curtos, como no caso de hospedeiros definitivos de toxoplasmatíneos. E mesmo dentro deste grupo de organismos, a diversidade genética com combinação de alelos derivada de intensa recombinação sexual é uma característica distintiva, como pode ser verificado em relação ao padrão evolutivo de *Toxoplasma gondii* na América do Sul. Vale ressaltar que até o início dos anos 1990, a evolução aparentemente clonal de *Toxoplasma gondii* na Europa ocidental e América do Norte levaram pesquisadores a

considerar a hipótese de existência de especiação neste gênero, quando apenas três variantes genóticas eram conhecidas (HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002).

Já em relação à diversidade entre organismos relacionados a espécie *Hammondia heydorni*, é preciso haver certificação de que as diversas linhagens reconhecidas dentro desta espécie não tenham oportunidade de trocar genes entre si, o que, se ocorresse seria durante a fase de gametogonia no epitélio intestinal de hospedeiros definitivos. A identificação deste evento é muito difícil de demonstrar, em virtude da dificuldade para obter em laboratório expansões clonais de um único oocisto ou de um único merozoito. Somente com a identificação de recombinação gênica nestas condições é que seria válido concluir sobre a especiação nestes agentes.

Somente a diversidade morfológica não deve ser suficiente para definir especiação em várias espécies de protozoários. Aproximadamente 200 espécies de *Sarcocystis* foram descritas (LEVINE, 1986; ODENING, 1998) e a diferenciação entre elas se deu principalmente pelas características morfológicas do sarcocisto. Ainda, muitas novas espécies de Sarcocystideos foram nomeadas com base na suspeita de que cada hospedeiro intermediário abriga sua própria espécie de parasito. Existem questionamentos, por alguns autores, sobre a descrição de novas espécies de *Sarcocystis* baseado apenas na morfologia de sarcocistos, já que esta característica pode variar dependendo do estágio de desenvolvimento, localização do cisto e estágios degenerativos da célula parasitada (LEVINE, 1986; TENTER, 1995). Estudos moleculares, por outro lado, podem auxiliar na identificação e descrição de novas espécies, porém estas informações devem acontecer à luz do conhecimento da biologia do organismo, de forma a considerar os efeitos de recombinação sexual entre variantes de uma mesma espécie (TIBAYRENC, 1995, 1996, 1998, 1999; TIBAYRENC; AYALA, 2002). O conceito biológico de espécie é aplicável em organismos do filo Apicomplexa, pois em todos os seus integrantes existe atividade sexual na fase de seus ciclos de vidas que leva a formação do zigoto (oocistos). E será a compreensão do que acontece na formação deste zigoto, e portanto, no hospedeiro definitivo, que elucidará questões importantes sobre ocorrência ou não de diversidade genética e trocas gênicas entre diferentes variantes de um dado grupo de organismos.

5.2 EXTENSA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *SARCOCYSTIS* SPP. ISOLADOS DE GAMBÁS NO BRASIL: MAIS EVIDÊNCIAS DE RECOMBINAÇÃO GÊNICA ENTRE ALELOS ALTAMENTE DIVERSIFICADOS

O gênero *Sarcocystis* é formado por aproximadamente 200 espécies (LEVINE, 1986; ODENING, 1996) que podem ser diferenciadas pela diversidade de suas características biológicas e morfológicas. Porém, este critério de diferenciação é questionável porque caracteres biológicos e morfológicos podem variar dependendo, dentre outros parâmetros, do estágio de desenvolvimento do parasito, da localização do cisto no tecido ou do estágio degenerativo que se encontrará a célula parasitada (LEVINE, 1986; TENTER, 1995). Por esta razão, estudos moleculares são bastante recomendados para auxiliar o conhecimento sobre identificação destes agentes.

Sarcocystis neurona e *Sarcocystis falcatula* são espécies similares que utilizam marsupiais do gênero *Didelphis* como hospedeiros definitivos. Os mamíferos deste gênero podem participar como hospedeiros definitivos não só de *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis falcatula*, mas também de outras espécies como *Sarcocystis speeri* (DUBEY; LINDSAY, 1998; DUBEY; LINDSAY, 1999) e *Sarcocystis lindsayi* (DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001; STABENOW et al., 2012).

Grande diversidade de mamíferos podem participara como hospedeiros intermediários de *Sarcocystis neurona* como tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), guaxinim norte-americano (*Procyon lotor*), cangambá (*Mephitis mephitis*), lontra-marinha (*Enhydra lutris*) além de equinos domésticos (CHEADLE et al., 2001, 2001a; DUBEY et al., 2001g, h; MULLANEY et al., 2005). Aves de diversos grupos taxonômicos são hospedeiros intermediários de *Sarcocystis falcatula*.

O *Sarcocystis neurona* é um agente associado à Encefalomielite Equina causada por Protozoário (EPM, do Inglês, equine protozoal myeloencephalitis), enfermidade severa que acomete o sistema neurológico de equinos (DUBEY et al., 2001e). *Sarcocystis falcatula* pode causar doença em uma ampla diversidade de aves, entre passeriformes, columbiformes e psitacciformes. São comuns os relatos de surtos de sarcocistose pulmonar aguda em animais de parques zoológicos (JACOBSON et al., 1984; CLUBB et al., 1986; SMITH et al., 1990;

HILLYER et al., 1991; CLUBB; FRENKEL, 1992; MIRANDÉ; HOWERTH; POSTON, 1992; PAGE et al., 1992; DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001).

Sarcocystis spp eliminados por gambás do gênero *Didelphis* possuem extensa variabilidade em fragmentos gênicos codificadores de proteína de superfície, com descrição de seis alelos de *SAG-2*, cinco alelos de *SAG-3* e onze alelos de *SAG-4*, prováveis variantes gênicas de um número restrito de espécies (MONTEIRO et al., 2013). Recentemente, em outra pesquisa de diversidade em amostras de esporocistos empregando marcadores barcoding DNA sugere-se que pelo menos cinco espécies de organismos do gênero *Sarcocystis* podem ser eliminados por gambás Didelfídeos no Brasil (VALADAS, em fase de elaboração)¹.

Neste trabalho, objetivamos conhecer a diversidade de genes *SAG-2*, *SAG-3* e *SAG-4* de amostras de outra região do Brasil, para comparar com resultados de pesquisa de semelhante escopo realizada por Monteiro et al. (2013) que investigou este evento em amostras de regiões do território sul do Brasil.

Purificação de amostras de esporocistos, extração de DNA de esporocistos purificados, desenho de primers, amplificação de DNA e sequenciamento de produtos de PCR foram procedimentos realizados exatamente da mesma maneira como descrito anteriormente (MONTEIRO et al., 2013). Sequências gênicas homólogas aos fragmentos sequenciados neste trabalho foram obtidos do GenBank após busca BLAST por similaridade de nucleotídeos. As sequências foram então alinhadas com auxílio do software Bioedit (HALL, 1999) e os blocos de alinhamentos foram analisados com auxílio do software MEGA version 6 (TAMURA et al., 2013) e DNAsp v 5.0 (ROZAS; LIBRADO, 2009), para análise filogenética e avaliação de diversidade nucleotídica, respectivamente.

As amostras analisadas no presente artigo foram colhidas no mesmo período, entre Setembro de 2011 e Janeiro de 2013, e algumas são as mesmas daquelas reportadas por Valadas (em fase de elaboração)². Porém, estes dados não foram tratados conjuntamente porque as amostras não foram consideradas como isolados, pois esporocistos de mais de uma espécie podem supostamente co-existir em uma amostra fecal de gambá.

^{1,2} VALADAS, S. Y. O. B. V.; DA SILVA, J. I.; GALUCCI, E. L.; KEID, L. B.; ZWARG, T.; DE OLIVEIRA, A. S.; SANCHES, T. C.; JOPPERT, A. M.; PENA, H. F. J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; FERREIRA, H. L.; VITOR, R. W. A.; SOARES, R. M. Filogenia comparativa entre isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de marsupiais do gênero *Didelphis* spp. e protozoários da sub-família Toxoplasmatinae. 2015.

Então, assim como na análise de *barcoding* DNA (VALADAS, em fase de elaboração)³, as análises das amostras de esporocistos de *Sarcocystis* spp de gambás foram feitas para cada marcador SAG individualmente.

As amostras de *Sarcocystis* spp tiveram sequências gênicas parciais identificadas para cada alelo: SAG-2, SAG-3 e SAG-4. A combinação dos resultados permitiu observar 16 combinações de alelos em 28 amostras de esporocistos. Os diferentes alelos de cada marcador foram designados por algarismos arábicos. Foram encontrados 10 alelos de SAG-2, 14 alelos de SAG-3 e sete alelos de SAG-4. As seguintes combinações de alelos foram encontradas (SAG2-SAG3-SAG4): 1-1-1 (*Sarcocystis neurona* isolado 138), 2-2-2 (SRS56 e SRS57), 3-14-3 (SN15), 3-4-4 (SRS 47 e SRS48), 4-4-4 (SRS31), 3-7-4 (SN10), 3-8-4 (C3 e DSP02), 6-5-7 (SRS42), 8-11-7 (DSP40), 3-3-10 (DSP27, DSP32, DSP43, SRS37, SRS40, SRS43, SRS50), 3-4-10 (SRS39), 4-4-10 (16M, DSP26), 9-9-10 (DSP24), 11-9-10 (DSP37), 3-10-10 (C5, SN17), 10-15-12 (*Sarcocystis falcatula* isolado SF1). Também foram encontradas combinações com misturas de alelos para o locus SAG-4 em seis amostras: 4-4-(4+10) (SN12), 6-5-(7+10) (SRS53), 6-5-(7+10) (SRS54), 5-12-(7+8) (SRS27), 5-12-(7+8) (SRS49), 4-13-(7+8) (DSP58).

As amostras *Sarcocystis neurona* isolado 138 e *Sarcocystis falcatula* isolado SF1 são amostras de merozoítos mantidas em células CV-1. O isolado SF1 foi isolado *in vitro* em células equinas dermais, proveniente de pulmão de um periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*) previamente inoculado com esporocistos de raspado intestinal de gambás (*D. virginiana*), isolado na Califórnia, Estados Unidos (MARSH et al., 1997b) e o isolado 138 proveniente de raspado intestinal de gambá (*Didelphis virginiana*) previamente alimentado com tecido muscular de guaxinim (*Procyon lotor*) infectado, isolado em Ohio, Estados Unidos (LINDSAY et al., 2004).

Como era de se esperar, as sequências apresentaram uma diversidade muito elevada quando comparada com sequências *barcoding* DNA (VALADAS, em fase de elaboração)⁴, sendo as substituições não sinônimas mais frequentes que as sequências sinônimas (Apêndices E, F e G). Este evento sugere fortemente o padrão de evolução por pressão

^{3,4} VALADAS, S. Y. O. B. V.; DA SILVA, J. I.; GALUCCI, E. L.; KEID, L. B.; ZWARG, T.; DE OLIVEIRA, A. S.; SANCHES, T. C.; JOBERT, A. M.; PENA, H. F. J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; FERREIRA, H. L.; VITOR, R. W. A.; SOARES, R. M. Filogenia comparativa entre isolados de *Sarcocystis* spp. obtidos de marsupiais do gênero *Didelphis* spp. e protozoários da sub-família Toxoplasmatinae. 2015.

seletiva positiva. 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; MANSFIELD, 2004b).

Com efeito, embora a função de proteínas codificadas por SAGs não seja totalmente compreendida, há indícios de que elas participem do processo de invasão celular, modulação da resposta imune do hospedeiro e virulência do agente (MINEO; KASPER, 1994), de forma que modificações estruturais destas proteínas podem permitir adaptações importantes do parasito ao ambiente em que vive.

As sequências produzidas pelas PCRs direcionadas ao gene codificador de SAG-2, após editadas e alinhadas, geraram uma matriz de alinhamento com 214 caracteres. Dos dez alelos encontrados, quatro são inéditos (alelos 8, 9, 10 e 11). O emprego destas sequências como itens de busca na ferramenta BLAST permitiu recuperar fragmentos presumivelmente homólogos apenas entre organismos do gênero *Sarcocystis*. A reconstrução filogenética com sequências gênicas recuperadas pela busca BLAST e com as sequências produzidas neste trabalho é mostrada na figura 11 e inclui 11 alelos, 7 já descritos e 4 inéditos. Considerando todas as sequências homólogas a SAG-2 disponíveis (incluído os dados deste trabalho), dez dos onze alelos já descritos foram encontrados em amostras do Brasil, quatro a mais do que os alelos descritos anteriormente (MONTEIRO et al., 2013).

A filogenia de SAG-2 discrimina três clados principais. Os alelos SAG-2 não possuem as mesmas dimensões, pois uma inserção de aminoácido “Thr” ocorre nas sequências dos clados G1 e G2 em relação às sequências do clado G3 (inserção de um códon “ACC” referente às posições 599 – 561, tomando como base AY191006). Enquanto os grupos G1 e G2 são bem suportados estatisticamente, o mesmo não se verifica no Grupo G3.

Topologias que apresentam ramos internos curtos que se bifurcam em nós de baixo suporte estatístico podem indicar ocorrência de evolução radiada (BARTH et al., 2008), ou seja, a emergência das espécies em tempos muito próximos ou até simultâneos, resultando em uma rápida especiação, com tempo insuficiente para permitir o acúmulo de substituições de nucleotídeos. Esta é uma característica já demonstrada para explicar politomias consistentes que ocorrem em grupos de metazoários, como proposto por Poe e Chubb (2004) e Whitfield e Lockhart (2007). A politomia consistente indica um evento real de especiação praticamente simultânea de mais de dois grupos, ou seja, quando um ancestral comum dá origem a mais de dois descendentes, o que significa que qualquer relação de parentesco é possível entre os táxons envolvidos. Portanto, o baixo suporte estatístico do grupo G3 é compatível com a hipótese de ocorrência de recombinação entre os táxons que o forma, resultando em uma evolução radiada.

Apesar de filogeneticamente relacionados a outros alelos já disponíveis no Genbank, os alelos inéditos mostraram considerável divergência com eles. Todas as sequências de SAG-2 de *Sarcocystis neurona* disponíveis no Genbank (AY191006, GQ386974 e GQ 851952) e a amostra *Sarcocystis neurona* sequenciada neste estudo (*Sarcocystis neurona* 138) possuem 100% de identidade com o alelo 1.

Porém, diferentes alelos para este locus foram encontrados para a espécie *Sarcocystis falcatula*. Enquanto a sequência GQ851953 (única sequência de *Sarcocystis falcatula* disponível no GenBank) é idêntica ao alelo 4, sequência idêntica ao inédito alelo 10 foi encontrada em *Sarcocystis falcatula* isolado SF1. Quinze substituições não sinônimas e duas sinônimas diferem as sequências oriundas de *Sarcocystis falcatula* estudadas com este marcador, indicando uma divergência que muito provavelmente confere diferenças importantes nas propriedades e funções biológicas do produto traduzido. As sequências obtidas do isolado *Sarcocystis falcatula* SF1 não apresentaram posições heterogêneas e portanto muito provavelmente não existe no genoma estudado outro loci que tenha sido amplificado pelos primers de SAG-2.

Figura 11 - Filogenia (árvore de consenso) inferida pelo método de máxima parcimônia para *SAG-2*

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. História evolutiva inferida por método de máxima parcimônia com sequências *SAG-2*. Árvore de consenso inferida de 5 árvores mais parcimoniosas (37 passos). O índice de consistência e de retenção da árvore são (0.827586) e (0.910714). O percentual de árvores parcimoniosas em que os táxons agruparam-se está indicado próximo aos nós. Em parêntese estão as porcentagens de réplicas em que os táxons agrupam-se juntos pelo método de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Estes valores são anotados somente para os clados com táxons agrupados no mesmo clado em todas as árvores mais parcimoniosas. A árvore de máxima parcimônia foi obtida empregando-se o algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (NEI; KUMAR, 2000). A árvore é representada em escala e as unidades representam o número de mudanças que ocorrem em toda a sequência. A análise envolve 11 sequências. Todas as posições dos códons foram incluídas. Há um total de 211 posições. Análise realizada com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

Para *SAG-3*, dos 14 alelos encontrados, nove são inéditos (alelos 7 a 15). Considerando todos os dados disponíveis (incluindo os dados deste trabalho), 14 entre 15 alelos já descritos foram encontrados em amostras do Brasil, dez a mais do que os alelos descritos anteriormente (MONTEIRO et al., 2013). Similarmente ao que acontece em *SAG-2*, apesar de filogeneticamente relacionado a outros alelos já disponíveis no Genbank, os alelos inéditos mostraram considerável divergência com os demais.

Quatro clados são definidos com a reconstrução filogenética empregando este marcador (Figura 12). O clado G1 (alelos 1, 2, 8, 9, 10 e 16) tem sequências onde se verifica a presença de uma inserção com padrão micro satélite de repetições de AT de cerca de 90

nucleotídeos em relação às demais sequências da árvore. Esta inserção é unicamente descrita em sequências oriundas de *Sarcocystis neurona*. Em uma posição anterior a esta inserção, há outro hotspot onde se verificam indels de um a dois aminoácidos na sequência traduzida. Neste locus, os alelos 4, 14 e 15 (todos do clado G4) tem duas inserções de aminoácidos (GlyGly) em relação aos alelos 3, 5, 6, 7, 11,13 (pertencentes aos clados G2 ou G4) e uma inserção e uma substituição de aminoácido em relação aos alelos 1, 2, 8, 9, 10, 12 e 16 (Pro-) (pertencentes aos clados G1 e G3). As sequências do clado G4 tem sequências sem inserção (-) ou com inserção de dois aminoácidos (GlyGly) considerando o *hotspot* indicado. O clado G1 contém sequências unicamente com inserção de um aminoácido (Pro-), o clado G3 tem seu único representante com inserção de um aminoácido (Pro-) e o clado G2 tem todos os seus táxons sem inserção (--). Estas mutações são identificadas nas sequências traduzidas, entre as posições 419 e 424 da sequência GQ851956.

As sequências produzidas pelas PCRs direcionadas o gene codificador de *SAG-3*, após editadas e alinhadas, geraram uma matriz de alinhamento com 284 caracteres, excluindo a inserção microssatélite das sequências que as continham. A reconstrução filogenética dos organismos cujas sequências foram recuperadas pela busca BLAST e incluindo as sequências encontradas neste trabalho é mostrada na figura 12 e inclui 16 alelos, sete já descritos e nove inéditos. As sequências de *SAG-3* de *Sarcocystis neurona* disponíveis no Genbank com os números AY191007, GQ386975, GQ386978 e GQ 851954 são idênticas ao alelo 16, enquanto a amostra *Sarcocystis neurona* sequenciada neste estudo (*Sarcocystis neurona* 138) possui 100% de identidade com o alelo I e com as sequências de *Sarcocystis neurona* GQ386976, GQ386977 e GQ 851955.

Diferentes alelos para este locus foram encontrados para a espécie *Sarcocystis falcatula*. Enquanto a sequência GQ851956 (única sequência de *Sarcocystis falcatula* disponível no GenBank) é idêntica ao alelo 4, sequência idêntica ao inédito alelo 15 foi encontrada em *Sarcocystis falcatula* isolado SF1. Também neste caso, as sequências obtidas deste isolado não possuem sítios heterogêneos, e portanto não parecem existir no genoma desta amostra cópias similares deste gene que poderiam ser amplificadas com os primers empregados neste estudo. Nove substituições não sinônimas e duas sinônimas diferem as sequências oriundas de *Sarcocystis falcatula* (GQ851956 e *Sarcocystis falcatula* isolado SF1) estudadas com este marcador e suas posições na topologia de árvore não estão satisfatoriamente resolvidas, como pode ser conferido pelos baixos valores de *bootstrap*.

Entretanto, ambas as sequências posicionam-se em ramos muito divergentes dos ramos que contém sequências de *Sarcocystis neurona*.

O grupo G1 contém apenas as sequências em que foram detectadas a inserção de fragmento não codificador de cerca de 90 nucleotídeos, hipoteticamente distintiva de para *Sarcocystis neurona*. Porém existem diferenças importantes entre sequências deste clado em região codificadora. As sequências de *Sarcocystis neurona* obtidas do Genbank tem apenas uma diferença não sinônima, mas até nove diferenças deste tipo existem entre as sequências do clado G1.

Figura 12 - Filogenia (árvore de consenso) inferida pelo método de máxima parcimônia para SAG-3

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. História evolutiva inferida por método de máxima parcimônia com sequências SAG-3. Árvore de consenso inferida de 4 árvores mais parcimoniosas (110 passos). O índice de consistência e de retenção da árvore são (0.629213) e (0.827225). O percentual de árvores parcimoniosas em que os táxons agruparam-se está indicado próximo aos nós. Em parêntesis estão as porcentagens de réplicas em que os táxons agrupam-se juntos pelo método de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Estes valores são anotados somente para os clados com táxons agrupados no mesmo clado em todas as árvores mais parcimoniosas. A árvore de máxima parcimônia foi obtida empregando-se o algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (NEI; KUMAR, 2000). A árvore é representada em escala e as unidades representam o número de mudanças que ocorrem em toda a sequência. A análise envolve 16 sequências. Todas as posições dos códons foram incluídas. Há um total de 261 posições. Análise realizada com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

As sequências produzidas pelas PCRs direcionadas o gene codificador de *SAG-4*, após editadas e alinhadas, geraram uma matriz de alinhamento com 221 caracteres. O emprego destas sequências como itens de busca na ferramenta BLAST permitiu recuperar fragmentos presumivelmente homólogos apenas entre organismos do gênero *Sarcocystis*. A reconstrução filogenética com sequências de 12 organismos é mostrada na figura 13, incluindo sequências produzidas neste estudo e sequências obtidas do GenBank. A filogenia de *SAG-4* discrimina quatro clados. Dos sete alelos encontrados, apenas um foi inédito (alelo 12). Em seis amostras de esporocistos foi possível identificar cromatogramas heterogêneos, compatíveis com a ocorrência simultânea de dois alelos conhecidos. As combinações 7+8, 7+10 e 4+10 presumivelmente acontecem em 3, 2 e uma amostra, respectivamente.

As sequências de *SAG-4* de *Sarcocystis neurona* disponíveis no Genbank com os números AY191008, GQ851957 e GQ851958 são idênticas ao alelo 1, assim como a amostra *Sarcocystis neurona* sequenciada neste estudo (*Sarcocystis neurona* 138). Novamente, diferentes alelos para este locus foram encontrados para a espécie *Sarcocystis falcatula*. Enquanto a sequência GQ851959 (única sequência *SAG-4* de *Sarcocystis falcatula* disponível no GenBank) é idêntica ao alelo 4, sequência idêntica ao inédito alelo 12 foi encontrada em isolados de *Sarcocystis falcatula* isolado SF1. Os alelos *SAG-4* não possuem as mesmas dimensões, pois na sequência traduzida há inserção de um aminoácido “Pro” nas amostras dos grupos G1 e G4, de aminoácido “Ala” no grupo G3 e uma deleção no alelo 8 (G3). Estas mutações são identificadas na sequência traduzida de AY191008, entre as posições 750 e 752.

Figura 13 - Filogenia (árvore de consenso) inferida pelo método de máxima parcimônia para *SAG-4*

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

Legenda. História evolutiva inferida por método de máxima parcimônia com sequências *SAG-4*. Árvore de consenso inferida de 6 árvores mais parcimoniosas (42 passos). O índice de consistência e de retenção da árvore são (0.821429) e (0.921875). O percentual de árvores parcimoniosas em que os táxons agruparam-se está indicado próximo aos nós. Em parêntesis estão as porcentagens de réplicas em que os táxons agrupam-se juntos pelo método de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Estes valores são anotados somente para os clados com táxons agrupados no mesmo clado em todas as árvores mais parcimoniosas. A árvore de máxima parcimônia foi obtida empregando-se o algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (NEI; KUMAR, 2000). A árvore é representada em escala e as unidades representam o número de mudanças que ocorrem em toda a sequência. A análise envolve 12 sequências. Todas as posições dos códons foram incluídas. Há um total de 216 posições. Análise realizada com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

É surpreendente que nenhuma das sequências de amostras de esporocistos oriundas do Brasil tenham sido idênticas às de *Sarcocystis falcatula* SF1 e *Sarcocystis neurona* 138. Por exemplo, os alelos de *SAG-2*, *SAG-3* e *SAG-4* de amostras brasileiras mais similares aos respectivos homólogos de *Sarcocystis falcatula* SF1 possuem 2, 6 e 2 diferenças não sinônimas, valores consideráveis elevados se forem comparados aos de variações entre alelos de cepas distintas de *Toxoplasma gondii* nestes loci.

As sequências genômicas obtidas de *Sarcocystis falcatula* SF1, como era de se esperar, têm 100% de identidade com sequências EST deste mesmo isolado disponíveis no GenBank. Já as sequências de *Sarcocystis falcatula* divergentes das sequências do isolado SF1 foram obtidas por Wendte et al. (2010), mas neste artigo não há qualquer referência sobre esta

amostra de *Sarcocystis falcatula* (sequências GQ851953, GQ851956, GQ851959). A identificação de padrões moleculares recombinantes gerando confusões na caracterização molecular de *Sarcocystis falcatula* e *Sarcocystis neurona* são eventos já descritos anteriormente (TANHAUSER et al., 1999). Estudo onde, através de marcadores oriundos de RAPD (Amplificação aleatória de DNA polimórfico), foi demonstrado 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 (TANHAUSER et al., 1999).

Cromatogramas obtidos neste trabalho produziram sítios homogêneos sem ocorrência de duplicidade de bases nas posições em que os diversos alelos são diferenciados em quase todas as amostras descritas neste trabalho, incluindo as de merozoítos e as de esporocistos. Entretanto, em alguns casos, ocorreram sequências com sítios heterogêneos em que foi impossível detectar a sequência com qualidade e confiabilidade e neste caso as amostras foram descartadas. Em seis casos, entretanto, foi possível identificar duas sequências concorrentes de *SAG-4*, pois a análise do cromatograma permitiu identificar a superposição de dois alelos conhecidos. Em virtude do tipo de amostra empregado é impossível determinar se este achado é devido a heterozigose das amostras ou se é devido a ocorrência de múltiplos esporocistos cada um possuindo diferentes alelos.

Por outro lado, os isolados de merozoítos cultivados em célula (*Sarcocystis falcatula* SF1 e *Sarcocystis neurona* 138) geraram sequências sem qualquer dúvida quanto a ocorrência de sítios heterogêneos. Este evento indica, com elevada plausibilidade, que merozoítos destes agentes não possuem cópias diferentes de *SAG-2*, *SAG-3* ou *SAG-4*. Nas filogenias reconstruídas com *SAG-2* e *SAG-3* existem clados com suporte estatístico muito baixo. Embora as sequências estudadas sejam curtas, podendo acarretar diminuição do sinal filogenético do marcador, elas são por outro lado, em todos os casos, sequências com elevada variabilidade nucleotídica. Então pelas razões expostas acima, é plausível mais uma vez supor que reassortment e recombinação de alelos pode acontecer em sequências *SAGs*, contribuindo ainda mais para a geração de variabilidade e por conseguinte na configuração antigênica do parasito.

Diferentemente de seus pares filogeneticamente relacionados pertencentes à subfamília Toxoplasmatinae que possuem um vasto repertório de genes *SAGs* ou *SAGs*

relacionados, *Sarcocystis falcatula* e *Sarcocystis neurona* parecem possuir um número bem menor destes marcadores em seus genomas (GAUTAN et al., 2011). Ainda em favor da diversidade dos Toxoplasmatíneos, conta o mecanismo definido como loci expandido, fenômeno que se refere a duplicação e “disseminação” de um dado locus no genoma. Este fenômeno foi descrito nas espécies *Hammondia hammondi*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* e particularmente nesta última verificou-se elevada ocorrência de expansão de loci SAGs (ADOMAKO-ANKONA et al., 2014), mas não nas duas primeiras, nas quais verificou-se expansão em loci de funções não conhecidas. À luz de perspectivas evolutivas, este recurso para aumentar a diversidade de SAGs na espécie *Neospora caninum* parece ser um mecanismo compensatório para o fato de este agente ter uma transmissão por oocistos muito menos eficiente que *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi* e por isso muito menos sujeito a diversidade resultante de trocas gênicas durante a gametogonia.

Analogamente, é possível postular uma interpretação de natureza evolutiva para as possíveis diferenças em frequência e variabilidade de sequências SAGs entre Toxoplasmatíneos e os Sarcocistídeos estudados neste trabalho. Os Toxoplasmatíneos, em especial o exaustivamente estudado *Toxoplasma gondii*, tem evolução reconhecidamente panmítica, porque a atividade sexual com troca gênica tem um papel preponderante na formatação do padrão evolutivo nesta espécie (PENA et al., 2008; GRIGG; SUNDAR, 2009; YAI et al., 2009; SOARES et al., 2011). Entretanto, pelo fato de este evento ocorrer no hospedeiro definitivo por um período relativamente curto, as oportunidades de recombinações sexuais ficam reduzidas, se comparadas aquelas prevalentes em Sarcocistídeos, pelo longo período de gametogonia de que dispõe os Sarcocistídeos que usam gambás como hospedeiro definitivo. Se por um lado, os Sarcocistídeos perdem em repertório de genes codificadores de propriedades antigênicas por genoma quando comparados a *Toxoplasma gondii*, por outro ele ganham em trocas gênicas ainda mais frequentes e com a participação de alelos com grande taxa de substituições não sinônimas. O intrigante fato reconhecido em *Sarcocystis neurona* é a ocorrência mutuamente exclusiva entre alelos de alelos *SAG-1*, *SAG-5* e *SAG-6*, que de certa forma corrobora com esta teoria (WENDTE et al., 2010).

Então, uma única espécie ou um número reduzido de espécies poderia, graças a grande diversidade de genes SAGs e possivelmente de outros marcadores de caracteres fenotípicos, combinar genes aleatoriamente para formar indivíduos com características bastante divergentes como patogenicidade, espectro de hospedeiro, entre outras.

Os resultados mostrados neste trabalho mostram uma diversidade ainda maior em genes *SAGs* obtidos de esporocistos de gambás do que trabalho similar realizado com um número menor de amostras, indicando que esta diversidade pode mesmo ser ainda maior. Entretanto, somente com estudos de infecções experimentais e melhor ainda, com a avaliação de infecções produzidas pela expansão clonal de um único indivíduo é que será possível determinar inequivocamente o que significa esta intensa variabilidade identificada em amostras de *Sarcocistídeos* eliminados por gambás.

6 CONCLUSÕES

1. Foi verificada uma grande variabilidade genética entre isolados de *Sarcocystis* spp. eliminados por gambás, através de genes *barcode*. Nenhuma das sequências obtidas de esporocistos de gambás do Brasil revelaram padrões idênticos aos de *Sarcocystis falcatula* ou *Sarcocystis neurona*. A variabilidade encontrada permite hipotetizar sobre a existência, no Brasil, de espécies híbridadas entre ambas as espécies citadas, o que por sua vez permite sugerir que *S. neurona* e *S. falcatula* tratam-se da mesma espécie.
2. Através dos genes *SAGs* (*SAG-2*, *SAG-3* e *SAG-4*) foi demonstrado uma diversidade ainda maior do que previamente reportado, permitindo supor que reassortment e recombinação de alelos podem acontecer em sequências *SAGs*. Os alelos inéditos encontrados podem estar associados à grande diversidade antigênica intra-específica das espécies de *Sarcocystis* eliminadas por gambás, a qual contribui para a geração de variabilidade e por conseguinte na configuração antigênica do parasito

REFERÊNCIAS

- ABEL, J.; SCHARES, G.; ORZESZKO, K.; GASSER, R. B; ELLIS, J. T. *Hammondia* isolated from dogs and foxes are genetically distinct. **Parasitology**, v. 132, pt 2, p. 187–192, 2006.
- ADAMS, S. [Sem título]. Parasites and Pestilences. Stanford University, 2004. Disponível em: <<http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2004/Sarcocystis/lifecycle.htm>>. Acesso em: 17 set. 2013.
- ADOMAKO-ANKOMAH, Y.; WIER, G. M.; BORGES, A.; WAND, H. E.; BOYLE, J. P. Differential locus expansion distinguishes Toxoplasmatinae species and closely related strains of *Toxoplasma gondii*. **mBio.asm.org**, v. 5, n. 1, 2014. Disponível em: <<file:///C:/Users/Felipe/Desktop/mBio.01003-13.pdf>>. Acesso em: 25 de Jan 2015.
- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; TIBAYRENC, M.; DARDÉ, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal of Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 27-28, 2002.
- ALVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 3, p. 417-434, 2003.
- 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.
- ASTUA DE MORAES, D.; DE LA SANCH, N.; COSTA, L. [*Didelphis aurita*] 2011. In: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 01 jul. 2014.
- AVISE, J. C. Phylogeography: The history and formation of species. Cambridge, Massachusetts: **Harvard University Press**, 2000.
- AVISE, J. C.; WALKER, D.; JOHNS, G. C. Speciation and pleistocene effects on the vertebrates phylogeography. **Proceedings Research Society of London**, v. 265, p. 1707-1712, 1998.
- BARTH, D; PRZYBOS, E.; FOKIN, S.; MARTIN, S. A.; BERENDONK, T. U. Cytochrome b sequence data suggest rapid speciation within the *Paramecium aurelia* species complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 669 -673, 2008.
- BERMINGHAM, E.; MORITIZ, C. Comparative phylogeography: concepts and applications. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 367-369, 1998.
- BLOUIN, M. S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 527-532, 2002.
- 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. **Journal of Parasitology**, v. 68, n. 4, p. 668–673, 1982.

BROWN, B. E. **Atlas of new world marsupials**. Chicago, Illinois: Field Museum of Natural History, Fieldiana Zoology: New Series, 2004. v. 102.

BRUCE, K. W.; DALE, L. G.; REJMANEK, D.; DOWLING, P. Equine protozoal myeloencephalitis caused by *Neospora hughesi* in an adult horse in Saskatchewan. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 8, p. 851–853, 2009.

CARLSON-BREMER, D.; JOHNSON, C. K.; MILLER, R. H.; GULLAND, F. M.; WASMUTH, J. D.; COLEGROVE, K. M.; GRIGG, M. E. Identification of two novel coccidian species shed by California sea lions (*Zalophus californianus*). **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 2, p. 347–354, 2012.

CASAGRANDE, R. A.; CESAR, M. O.; PENA, H. F. J.; ZWARG, T.; TEIXEIRA, R. H. F.; NUNES, A. L. V.; NEVES, D. V. D. A.; GOMES, M.; QUAGGLIA NETO, F.; MILANELLO, L.; FONTENELLE, J. H.; MATUSHIMA, E. R. Occurrence of *Sarcocystis* spp. in opossums (*Didelphis aurita* and *Didelphis albiventris*) in regions of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 2, p. 101–106, 2009.

CERQUEIRA, R. The distribution of *Didelphis* in South America (*Polyprotodontia*, *Didelphidae*). **Journal of Biogeography**, v. 12, n., p. 135–145, 1985.

CERQUEIRA, R. Reproduction de *Didelphis albiventris* dans le nord-est du Brésil (*Polyprotodontia*, *Didelphidae*). **Mammalia**, v. 48, n. 1, p. 95–104, 1984.

CERQUEIRA, R.; LEMOS, B. Morphometric differentiation between Neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (*Didelphimorphia*, *Didelphidae*). **Mammalia**, v. 64, n. 3, p. 319–327, 2000.

CERVANTES, F. A.; ARCANGELI, J.; HORTELANO-MONCADA, Y.; BORISENKO, A. V. DNA barcodes effectively identify the morphologically similar Common Opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. **Mitochondrial DNA**, v. 21, p. 44–50, 2010. Supplement, 1.

CESAR, M. O. ***Sarcocystis* sp eliminados por *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (Gambás) de vida livre no Estado de São Paulo: infecção experimental em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e camundongos Balb/c nude**. 2011. 131 f. Dissertação (Mestre em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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, 2001b.

CHEADLE, M. A.; TANHAUSER, S. M.; DAME, J. B.; SELLON, D. C.; HINES, M. T.; 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, 2001.

CHEADLE, M. A.; YOWELL, C. A.; SELLON, D. C.; HINES, M. T.; GINN, P. E.; MARSH, A. E.; MACKAY, R. J.; 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, 2001a.

CLUBB, S. L.; FRENKEL, J. K. *Sarcocystis falcatula* of opossums: transmission by cockroaches with fatal pulmonary disease in Psittacine birds. **Journal of Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 16-124, 1992.

CLUBB, S. L.; FRENKEL, J. K.; GARDINER, C. H.; GRAHAM, D. L. An acute fatal illness in old world Psittacine birds associated with *Sarcocystis falcatula* of opossums. In: ANNUAL MEETING OF THE ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, 7., 1986, Miami, FL. **Proceedings...** Miami, FL: Association of Avian Veterinarians, 1986. p. 139-149.

CONOLE, J. C.; CHILTON, N. B.; JARVIS, T.; GASSER, R. B. Mutation scanning analysis of microsatellite variability in the second internal transcribed spacer (precursor ribosomal RNA) for three species of *Metastrongylus* (Strongylida: Metastrongyloidea). **Parasitology**, v. 122, p. 195-206, 2001.

COSTA, L.; ASTUA DE MORAES, D.; BRITO, D.; SORIANO, P.; LEW, D.; DELGADO, C. [*Didelphis albiventris*] 2008. In: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 01 jul. 2014.

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. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, 930–935, 1995.

DELWICHE, C. F.; KUHSEL, M.; PALMER, J. D. Phylogenetic analysis of *tufA* sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 4, n. 2, p. 110-128, 1995.

DUBEY, J. P.; BLACK, S. S.; RICKARD, L. G.; ROSENTHAL, B. M.; LINDSAY, D. S.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HURST, G.; RASHMIR-RAVEN, A. Prevalence of *Sarcocystis neurona* sporocysts in opossums (*Didelphis virginiana*) from rural Mississippi. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2/4, p. 283-293, 2001b.

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.; GARNER, M. M.; STETTER, M. D.; MARSH, A. E.; BARR, B. C. Acute *Sarcocystis falcatula*-like infection in carmine bee-eater (*Merops nubicus*) and immunohistochemical cross reactivity between *S. falcatula* and *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 87, n.4, p. 824-832, 2001f.

DUBEY, J. P.; KERBER, C. E.; GRANSTROM, D. E. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses in Brazil. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 7, p. 970–972, 1999b.

DUBEY, J. P.; LIDDELL, S.; MATTSON, D.; SPEERT, C. A.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 345–353, 2001c.

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, 2001a.

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, 1449–1453, 2001e.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ROSENTHAL, B. M.; THOMAS, N. J. Sarcocysts of an unidentified species of *Sarcocystis* in the sea otter (*Enhydra lutris*). **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 397–399, 2003.

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**, 95, n. 2–4, p. 89–131, 2001d.

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.; ROSYPAL, A. C.; ROSENTHAL, B. M.; THOMAS, N. J.; LINDSAY, D. S.; STANEK, J. F.; REED, S. M.; SAVILLE, W. J. A. *Sarcocystis neurona* infections in sea otter (*Enhydra lutris*): evidence for natural infections with sarcocysts and transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*). **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1387–1393. 2001g.

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*. **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, 2001h.

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

DUBEY, J. P.; SREEKUMAR, C.; ROSENTHAL, B. M.; LINDSAY, D. S.; GRISARD, E. C.; VITOR, R. W. Biological and molecular characterization of *Besnoitia akodon* n.sp. (Protozoa: Apicomplexa) from rodent *Akodon montensis* in Brazil. **Parassitologia**, v. 45, n. 2, p. 61-70, 2003a.

DUBEY, J. P.; VENTURINI, 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.

DUBEY, J. P.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; MCKINNEY, J.; PECORARO, M. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 86, n. 1, n. 86, p. 59–62, 1999a.

ELLIS, J. T.; HOLMDAHL, O. J.; RYCE, C.; NJENGA, J. M.; HARPER, P. A.; MORRISON, D. A. Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationship among *Besnoitia* of cattle, wildebeest and goats. **Protist**, v. 151, n. 4, p. 329-336, 2000.

ELLIS, J. T.; MORRISON, D. A.; LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; MOHAMMED, O. B.; RYCE, C.; DUBEY, J. P. The genus *Hammondia* is paraphyletic. **Parasitology**, v. 118, p. 357-362, 1999.

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, 2004b.

ELSHEIKHA, H. M.; MURPHY, A. J.; MANSFIELD, L. S. Prevalence of and risk factors associated with the presence of *Sarcocystis neurona* sporocysts in opossum (*Didelphis virginiana*) from Michigan: a retrospective study. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3/4, p. 277-286, 2004a.

ELSHEIKHA, H. M.; MURPHY, A. J.; MANSFIELD, L. S. Prevalence of *Sarcocystis* species sporocysts in Northern Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). **Parasitology Research**, v. 93, n. 5, p. 427-431, 2004.

ELSHEIKHA, H. M.; SCHOTT II, 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. **American Society for Microbiology. Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3448–3454, 2005.

ESCALANTE, A. A.; FREELAND, D. E.; COLLINS, W. E.; LAL, A. A. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. **Evolution**, v. 95, p. 8124-8129, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. V.; GREEN, P. "Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment." **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FARIAS, I.; ORTI, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; MEYER, A. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 53, n. 2, p. 89-103, 2001.

FAYER, R.; MAYHEW, I. G.; BAIRD, J. D.; DILL, S. G.; FOREMAN, J. H.; FOX, J. C.; HIGGINS, R. J.; REED, S. M.; RUOFF, W. W.; SWEENEY, R. W.; TUTTLE, P. Epidemiology of equine protozoal myeloencephalitis in North America based on histologically confirmed cases. A report. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, n. 2, p. 54-57, 1990.

FEAGIN, J. E. The extrachromosomal DNAs of apicomplexan parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 81-104, 1994.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. **The American Naturalist**, v. 125, n. 1, p. 1-15, 1985.

FENGER, C. K.; GRANSTROM, D. E.; GAJADHAR, A. A.; WILLIAMS, N. M.; MCCRILLIS, S. A.; STAMPER, S.; LANGEMEIER, J. L.; DUBEY, J. P. Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* sp. sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). **Veterinary Parasitology**, v. 68, n. 3, p. 199-213, 1997.

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*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 916-919, 1995.

FERGUSON, D. J.; HENRIQUEZ, F. L.; KIRISITS, M. J.; MUENCH, S. P.; PRIGGE, S. T.; RICE, D. W.; ROBERTS, C. W.; MCLEOD, R. L. Maternal inheritance and stage-specific variation of the apicoplast in *Toxoplasma gondii* during development in the intermediate and definitive host. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 4, p. 814-826, 2005.

FINNIE, E. P. Monotremes and marsupials (anatomy). In: FOWLER, M. E. (Ed.). **Zoo and wild animal medicine**. Estados Unidos: Saunders Company, 1986. p. 558-560.

FLEIGE, T.; LIMENITAKIS, J.; SOLDATI-FAVRE, D. Apicoplast: keep it or leave it. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 4, p. 253-262, 2010.

GARDNER, A. L. **Mammals of South America**. Chicago: The University of Chicago Press, 2007. v. 1.

- GASSER, R. B.; NEWTON, S. E. Genomic and genetic research on bursate nematodes: significance, implications and prospects. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 509-534, 2000.
- GAUTAN, A.; DUBEY, J. P.; SAVILLE, W. J.; HOWE, D. K. The SnSAG merozoite surface antigens of *Sarcocystis neurona* are expressed differentially during the bradyzoite and sporozoite life cycle stages. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 37-42, 2011.
- GJERDE, B. Characterization of full-length mitochondrial copies and partial nuclear copies (numts) of the cytochrome b and cytochrome c oxidase subunit I genes of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni* and *Hammondia triffittae* (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, p. 1493-1511, 2013.
- GJERDE, B. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 7, p. 579-591, 2013a.
- GJERDE, B.; DAHLGREN, S. S. *Hammondia triffittae* n. comb. of foxes (*Vulpes spp.*): biological and molecular characteristics and differentiation from *Hammondia heydorni* of dogs. **Parasitology**, v. 138, n. 3, p. 303-321, 2011.
- GODOY, S. N.; DE PAULA, C. D.; CUBAS, Z. S.; MATUSHIMA, E. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in captive psittacine birds in Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 1, p. 18-23, 2009.
- GONDIM, L. F.; LASKI, P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 119-122, 2004.
- GRANDE, C.; TEMPLADO, J.; CERVERA J. L.; ZARDOYA, R. Molecular phylogeny of *Euthyneura* (Mollusca: Gastropoda). **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 2, p. 303-313, 2004.
- GRIGG, M. E.; SUNDAR, N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 925-933, 2009.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids**, n. 41, p. 95-98, 1999. (Symposium Series).
- 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.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London**, n. 270, p. 313-321, 2003.
- HERSHKOVITZ, P. The South American gracile mouse opossums, genus *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989 (Marmosidae, Marsupialia): a taxonomic review with

notes on general morphology and relationships. Chicago: Field Museum of Natural History, 1992. v. 70, p. 1-56.

HIKOSAKA, K.; NAKAI, Y.; WATANABE, Y.; TACHIBANA, S.; ARISUE, N.; PALACPAC, N.M.; TOYAMA, T.; HONMA, H.; HORII, T.; KITA, K.; TANABE, K. Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. **Mitochondrion**, v. 11, n. 2, p. 273–278, 2011b.

HIKOSAKA, K.; WATANABE, Y.; KOBAYASHI, F.; WAKI, S.; KITA, K.; TANABE, K. Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 *Plasmodium* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 2, p. 175–180, 2011a.

HIKOSAKA, K.; WATANABE, Y.; TSUJI, N.; KITA, K.; KISHINE, H.; ARISUE, N.; PALACPAC, N.M.; KAWAZU, S.; SAWAI, H.; HORII, T.; IGARASHI, I.; TANABE, K. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 5, p. 1107–1116, 2010.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-53, 1991.

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**, 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.

HOMAN, W. L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEN, M.; VAN KNAPEN, F. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 83, n. 3, p. 285-289, 1997

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.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.

JACOBSON, E. R.; GARDINER, C. H.; NICHOLSON, A.; PAGE, C. D. *Sarcocystis* encephalitis in a cockatiel. **Journal of the American Veterinary 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.

JEEWON, R.; LIEW, E. C.; HYDE, K. D. Molecular systematics of the *Amphisphaeriaceae* based on cladistic analyses of partial LSU rDNA gene sequences. **Mycological Research**, v. 107, p. 1392-1402, 2003.

JORGENSEN, M. F.; MURRAY, S.; DAUGBJERG, N. *Amphidinium* revisited. I. Redefinition of *Amphidinium* (Dinophyceae) based on cladistic and molecular phylogenetic analyses. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 2, p. 351-365, 2004.

KI, J. S.; KIM, I. C.; LEE, J. S. Comparative analysis of nuclear ribosomal DNA from the moon jelly *Aurelia* sp. (Cnidaria: Scyphozoa) with characterizations of the 18S, 28S genes, and the intergenic spacer (IGS). **Hydrobiologia**, v. 616, p. 229-239, 2009.

KOHLER, S.; DELWICHE, C. F.; DENNY, P. W.; TILNEY, L. G.; WEBSTER, P.; WILSON, R. J. M.; PALMER, J. D.; ROSS, D. S. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. **Science**, v. 275, n. 5305, p. 1485-1489, 1997.

LAU, A. O. T.; MCELWAIN, T. F.; BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D. P.; ROALSON, E. H. *Babesia bovis*: a comprehensive phylogenetic analysis of plastid-encoded genes supports green algal origin of apicoplasts. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 3, p. 236-243, 2009.

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.

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.

LIN, R. Q.; QIU, L. L.; LIU, G. H.; WU, X. Y.; WENG, Y. B.; XIE, W. Q.; HOU, J.; PAN, H.; YUAN, Z. G.; ZOU, F. C.; HU, M.; ZHU, X. Q. Characterization of the complete mitochondrial genomes of five *Eimeria* species from domestic chickens. **Gene**, v. 480, n. 1-2, p. 28-33, 2011.

LINDSAY, D. S.; MITCHELL, S. M.; VIANNA, M. C.; DUBEY, J. P. *Sarcocystis neurona* (protozoa: Apicomplexa) description of oocysts, sporocysts, sporozoites, excystation, and early development. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 461-465, 2004.

LIU, G. H.; HOU, J.; WENG, Y. B.; SONG, H. Q.; LI, S.; YUAN, Z. G.; LIN, R. Q.; ZHU, X. Q. The complete mitochondrial genome sequence of *Eimeria mitis* (Apicomplexa: Coccidia). **Mitochondrial DNA**, v. 23, n. 5, p. 341-343, 2012.

LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated genes in Eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 727-764, 1980.

MACKAY, R. J.; DAVIS, S. W.; DUBEY, J. P. Equine protozoal myeloencephalitis. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 14, n. 10, p. 1359-1366, 1992.

MACKAY, R. J.; GRANSTROM, D. E.; SAVILLE, W. J. A.; REED, S. M. Equine Protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 16, n. 3, p. 405-425, 2000.

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, 1997b.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; PACHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 5, p. 983-991, 1998.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; TELL, L.; BOWMAN, P. A.; CONRAD, C.; KETCHERSIDE, C.; GREEN, T. Comparison of the internal transcriber spacer, ITS-1, from *Sarcocystis falcatula* isolates and *Sarcocystis neurona*. **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, 1997a.

MARSH, A. E.; HOWE, D. K.; WANG, G.; BARR, B. C.; CANNON, N.; CONRAD, P. A. Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. **International Journal of Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1575-1582, 1999.

MARTINSEN, E. S.; PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, p. 261-273, 2008.

MCFADDEN, D. C.; TOMAVO, S.; BERRY, E. A.; BOOTHROYD, J. C. Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Q domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 108, n. 1, p. 1-12, 2000.

MCFADDEN, G. I.; ROSS, D. S. Apicomplexan plastids as drugs targets. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 328-333, 1999.

MCLAUCHLIN, J.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; AMAR-HOETZENEDER, C.; NICHOLS, G. L. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3153-3158, 1999.

MEYER, A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 9, n. 8, p. 278-280, 1994.

- MILLER, M. A.; BARR, B. C.; NORDHAUSEN, R.; JAMES, E. R.; MAGARGAL, S. L.; MURRAY, M.; CONRAD, P. A.; TOY-CHOUTKA, S.; JESSUP, D. A.; GRIGG, M. E. Ultrastructural and molecular confirmation of the development of *Sarcocystis neurona* tissue cysts in the central nervous system of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1363-1372, 2009.
- MILLER, M. A.; CONRAD, P. A.; HARRIS, B.; LANGLOIS, G.; JESSUP, D. A.; MAGARGAL, S. L.; PACKHAM, A. E.; TOY-CHOUTKA, S.; MELLI, A. C.; MURRAY, M. A.; GULLAND, F. M.; GRIGG, M. E. A protozoal-associated epizootic impacting marine wildlife: mass-mortality of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) due to *Sarcocystis neurona* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3-4, p. 183-194, 2010.
- MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein SAG-1 (P30). **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 11-20, 1994.
- MIRANDÉ, L. A.; HOWERTH, E. W.; POSTON, R. P. Chlamydiosis in a red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, n. 2, p. 284-287, 1992.
- MONTEIRO, R. M.; KEID, L. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; VALADAS, S. Y.; MULLER, G.; SOARES, R. M. 2013. Extensively variable surface antigens of *Sarcocystis* spp. infecting Brazilian marsupials in the genus *Didelphis* occur in myriad allelic combinations, suggesting sexual recombination has aided their diversification. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 1-2, p. 64-70, 2013.
- MONTEIRO, R. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; PENA, H. F.; SOUZA, S. L. P.; FUNADA, M. R.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SCREEKUMAR, C.; KEID, L. B.; SOARES, R. M. Molecular phylogenetic analysis in *Hammondia*-like organisms based on partial Hsp 70 coding sequences. **Parasitology**, v. 134, p. 1195-1203, 2007.
- MORÉ, G.; VISSANI, A.; PARDINI, L.; MONINA, M.; MURIEL, M.; HOWE, D.; BARRANDEGUY, M.; VENTURINI, M. C. Seroprevalence of *Sarcocystis neurona* and its association with neurological disorders in Argentinean horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 9, p. 1051-1054, 2014.
- MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; HECKEROTH, A. R.; JOHNSON, A. M.; TENTER, A. M. Phylogenetic analyses based on fulllength large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1545-1556, 1999.
- 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.
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. 333p.
- NEILL, P. J. G.; SMITH, J. H.; BOX, E. D. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). IV. Ultrastructure of developing, mature and degenerating sarcocysts. **Journal of Protozoology**, v. 36, n. 4, p. 430-437, 1989.

NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world**. Baltimore: the Johns Hopkins University Press, 1999. v. 1.

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.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis* spp. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, p. 27-32, 1980.

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 psittacines. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, n. 1, p. 77-85, 1992.

PAKANDL, M. Coccidia of rabbit: a review. **Folia Parasitologica (Praha)**, v. 56, n. 3, p. 153-166, 2009.

PAKANDL, M.; JELÍNKOVÁ, A. The rabbit coccidium *Eimeria piriformis*: Selection of a precocious line and life-cycle study. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 351-354, 2006.

PATEL, S.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; MCLAUCHLIN, J.; CASEMORE, D. P. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks. **Communicable Disease and Public Health**, v. 1, n. 4, p. 231-233, 1998.

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

POE, S.; CHUBB, A. L. Birds in a bush: five genes indicate explosive evolution of avian orders. **Evolution**, v. 58, p. 404-415, 2004.

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.

PRASAD, P. K.; TANDON, V.; BISWAL, D. K.; GOSWAMI, L. M.; CHATTERJEE, A. Molecular identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda : Fasciolidae) based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. **Parasitology Research**, v. 103, n. 6, p. 1247-1255, 2008.

PRASAD, P. K.; TANDON, V.; CHATTERJEE, A.; BANDYOPADHYAY, S. PCR-based determination of internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA of giant intestinal fluke, *Fasciolopsis buski* (Lankester, 1857) Looss, 1899. **Parasitology Research**, v. 101, n. 6, p. 1581-1587, 2007.

PUSTERLA, N.; MACKIE, S.; PACKHAM, A.; CONRAD, P. A. Serological investigation of transplacental infection with *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* in broodmares. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 649-650, 2014.

- RATHORE, D.; WAHL, A. M.; SULLIVAN, M.; MCCUTCHAN, T. F. A phylogenetic comparison of gene trees constructed from plastid, mitochondrial and genomic DNA of *Plasmodium* species. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 89–94, 2001.
- REGIDOR-CERRILLO, J.; PEDRAZA-DIAZ, S.; ROJO-MONTEJO, S.; VAZQUEZ-MORENO, E.; ARNAIZ, I.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; JIMENEZ-PALACIOS, S.; ORTEGA-MORA, L. M.; COLLANTES-FERNANDEZ, E. *Neospora caninum* infection in stray and farm dogs: Seroepidemiological study and oocyst shedding. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 3-4, p. 332-335, 2010.
- REJMANEK, D.; MILLER, M. A.; GRIGG, M. E.; CROSBIE, P. R.; CONRAD, P. A. Molecular characterization of *Sarcocystis neurona* strains from opossums (*Didelphis virginiana*) and intermediate hosts from Central California. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 20-29. 2010.
- REJMANEK, D. R.; VANWORMER, E.; MILLER, M. A.; MAZE, J. K.; NICHELASON, A. E.; MELLI, A. C.; PACKHAM, A. E.; JESSUP, D. A.; CONRAD, P. A. Prevalence and risk factors associated with *Sarcocystis neurona* infections in opossums (*Didelphis virginiana*) from central California. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 8–14, 2009.
- ROONEY, J.; PRICKETT, M.; DELANEY, F.; CROWE, M. Focal myelitis-encephalitis in horses. **The Cornell Veterinarian**, v. 60, n. 3, p. 494-501, 1970.
- 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.
- ROZAS, J.; LIBRADO, P. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1542, 2009.
- RUSSO, C. A. M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 130-136.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, 1989.
- SANTOS, S. L.; DE SOUZA COSTA, K.; GONDIM, L. Q.; DA SILVA, M. S.; UZÊDA, R. S.; ABE-SANDES, K.; GONDIM, L. F. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 357, 461, 2010.
- SERCUNDES, M. K. **Filogenia molecular de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise de genes mitocondriais e de apicoplasto**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L.; GUIMARÃES, M. B.; SOUZA, S. O.; ALLEGRETTI, L.; SINHORINI, J. A.; DUARTE, V. V.; SOARES, R. M. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 27-32, 2010.

- SHIGE HARU, S. The apicomplexan plastid and its evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 8, p. 1285–1296, 2011.
- SMITH, J. H.; CRAIG, T. M.; DILLARD III, E. A.; NEILL, P. J. G.; JONES, L. P. Naturally occurring apicomplexan acute interstitial pneumonitis in thick-billed parrots (*Rhynchopsitta pachyrhyncha*). **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 2, p. 285–288, 1990.
- 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.
- SOARES, R. M.; CORTEZ, L. R.; GENNARI, S. M.; SERCUNDES, M. K.; KEID, L. B.; PENA, H. F. Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), a South American canid, as a definitive host for *Hammondia heydorni*. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1, p. 46–50, 2009.
- SOARES, R. M.; LOPES, E. G.; KEID, L. B.; SERCUNDES, M. K.; MARTINS, J.; RICHTZENHAIN, L. J. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the H. heydorni RAPD fragmente AP10. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1–2, p. 168–172, 2011.
- SOARES, R. M.; SILVEIRA, L. H.; SILVA, A. V.; RAGOZO, A.; GALLIA, S.; LOPES, E. G.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 29–34, 2011.
- SOUSA, L. C. C.; GONTIJO, C. M. F.; LACORTE, G. A.; MEIRELES, S. N.; SILVA, A. P.; FONSECA, C. G. Molecular characterization of an opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) population in an urban fragment of the Brazilian Atlantic Rainforest and support to species barcode identification. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2497–2496, 2012.
- STABENOW, C. S.; EDERLI, N. B.; LOPES, C. W. G.; DE OLIVEIRA, C. R. *Didelphis aurita* (Marsupialia: Didelphidae): A New Host for *Sarcocystis lindsayi* (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 6, p. 1262–1265, 2012.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725–2729, 2013.
- 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. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. **International Journal of Parasitology**, v. 25, p. 1311–1330, 1995.
- TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85–104, 1998.

TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Advances in Parasitology**, v. 36, p. 47-115, 1995.

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

TIBAYRENC, M. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 401-429, 1996.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 405-410, 2002.

VAN HERWERDEN, L.; BLAIR, D.; AGATSUMA, T. Intra- and interindividual variation in ITS1 of *Paragonimus westermani* (Trematoda: Digenea) and related species: Implications for phylogenetic studies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 1, p. 67-73, 1999.

VARDELEON, D.; MARSH, A. E.; THORNE, J. G.; LOCH, W.; YOUNG, R.; JOHNSON, P. J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 273-282, 2001.

VAREJÃO, J. B. M.; VALLE, C. M. C. Contribuição ao estudo da distribuição geográfica do gênero *Didelphis* (Mammalia: Marsupialia) no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 2, p. 5-55, 1982.

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, 2010.

WHITFIELD, J. B.; LOCKHART, P. J. Deciphering ancient rapid radiations. **Trends Ecology & Evolution**, v. 22, n. 5, p. 158-165, 2007.

WÜNSCHMANN, A.; REJMANEK, D.; CONRAD, P. A.; HALL, N.; CRUZ-MARTINEZ, L.; VAUGHN, S. B.; BARR, B. C. Natural fatal *Sarcocystis falcatula* infections in free-ranging eagles in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 2, p. 282-289, 2010.

YAI, L. E. O.; RAGOZOB, A. M. A.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 332-337, 2009.

YANG, Z. Q.; ZUO, Y. X.; YAO, Y. G.; CHEN, X. W.; YANG, G. C.; ZHANG, Y. P. Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organism from cattle and water buffalo should be considered the same species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, p. 283-288, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Matrizes de distância p entre os alelos de *CytB*, *ClpC* e *RpoB* de *Sarcocystis* de gambás

CytB

	1	2	3
1. <i>Sarcocystis</i> type I			
2. <i>Sarcocystis</i> type II	0.0018		
3. <i>Sarcocystis</i> type III	0.0037	0.0018	
4. <i>Sarcocystis</i> type IV	0.0480	0.0461	0.0480

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

ClpC

	1	2	3	4	5
1. <i>Sarcocystis</i> type I					
2. <i>Sarcocystis</i> type II	0.0024				
3. <i>Sarcocystis</i> type III	0.0851	0.0851			
4. <i>Sarcocystis</i> type IV	0.0780	0.0780	0.0662		
5. <i>Sarcocystis</i> type V	0.0827	0.0827	0.1182	0.1111	
6. <i>Sarcocystis</i> type VI	0.1277	0.1277	0.1229	0.1087	0.1537

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

RpoB

	1	2	3	4
1. GQ851961 <i>Sarcocystis</i> neurona				
2. AY165000 <i>Sarcocystis</i> neurona	0.0068			
3. AY165001 <i>Sarcocystis</i> falcatula	0.0091	0.0068		
4. AY164999 <i>Sarcocystis</i> falcatula	0.0091	0.0068	0.0000	
5. AY164997 <i>Sarcocystis</i> lindsayi	0.0091	0.0068	0.0045	0.0045

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

APÊNDICE B - Matrizes de distância p entre os alelos de *CytB*, *ClpC* e *RpoB* de Toxoplasmatíneos
CytB

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Toxoplasma gondii strain RH								
2. Toxoplasma gondii strain CTG	0.0000							
3. Toxoplasma gondii strain PTG	0.0000	0.0000						
4. Hammondia hammondi isolate 300	0.0091	0.0091	0.0091					
5. Hammondia heydorni isolate 376	0.0510	0.0510	0.0510	0.0492				
6. Hammondia heydorni isolate BR	0.0510	0.0510	0.0510	0.0492	0.0000			
7. Neospora caninum strain NC-1	0.0492	0.0492	0.0492	0.0492	0.0383	0.0383		
8. Neospora hughesi isolate Oregon	0.0492	0.0492	0.0492	0.0492	0.0383	0.0383	0.0000	
9. Besnoitia akodoni	0.1184	0.1184	0.1184	0.1166	0.1075	0.1075	0.1184	0.1184

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

ClpC

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Toxoplasma gondii strain RH								
2. Toxoplasma gondii strain CTG	0.0021							
3. Toxoplasma gondii strain PTG	0.0021	0.0000						
4. Hammondia hammondi isolate 300	0.0166	0.0145	0.0145					
5. Hammondia heydorni isolate 376	0.0560	0.0539	0.0539	0.0560				
6. Hammondia heydorni isolate BR	0.0539	0.0519	0.0519	0.0539	0.0124			
7. Neospora caninum strain NC-1	0.0498	0.0477	0.0477	0.0456	0.0498	0.0477		
8. Neospora hughesi isolate Oregon	0.0477	0.0456	0.0456	0.0436	0.0498	0.0477	0.0021	
9. Besnoitia akodoni	0.0913	0.0892	0.0892	0.0913	0.0871	0.851	0.0966	0.0966

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

RpoB

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Toxoplasma gondii strain RH								
2. Toxoplasma gondii strain CTG	0.0000							
3. Toxoplasma gondii strain PTG	0.0000	0.0000						
4. Hammondia hammondi isolate 300	0.0318	0.0318	0.0318					
5. Hammondia heydorni isolate 376	0.0523	0.0523	0.0523	0.0682				
6. Hammondia heydorni isolate BR	0.0545	0.0545	0.0545	0.0659	0.0023			
7. Neospora caninum strain NC-1	0.0568	0.0568	0.0568	0.0614	0.0682	0.06599		
8. Neospora hughesi isolate Oregon	0.0568	0.0568	0.0568	0.0614	0.0682	0.06599	0.0000	
9. Besnoitia akodoni	0.1091	0.1091	0.1091	0.1159	0.1182	0.1159	0.1159	0.1159

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

APÊNDICE C - Matriz de distância p entre os alelos de *ITS-1* de Toxoplasmatíneos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. DQ997604 Hammondia heydorni isolate Brazil-1																					
2. DQ997603 Hammondia heydorni isolate Arg33	0.0201																				
3. DQ997601 Hammondia heydorni isolate 376	0.0172	0.0029																			
4. AF317281 Hammondia heydorni isolate CZ-3	0.0201	0.0057	0.0029																		
5. DQ997611 Hammondia heydorni isolate 95	0.0057	0.0143	0.0115	0.0143																	
6. DQ997605 Hammondia heydorni isolate BR	0.0029	0.0172	0.0143	0.0172	0.0029																
7. FJ176223 Hammondia heydorni isolate GHYBA1	0.0086	0.0229	0.0201	0.0229	0.0086	0.0057															
8. FJ176224 Hammondia heydorni isolate GHYBA2	0.0143	0.0287	0.0258	0.0287	0.0143	0.0115	0.0115														
9. FJ176225 Hammondia heydorni isolate GHYBA3	0.0057	0.0201	0.0172	0.0201	0.0057	0.0029	0.0086	0.0143													
10. DQ997622 Hammondia hammondi isolate 300	0.2378	0.2264	0.2292	0.2321	0.2350	0.2350	0.2407	0.2464	0.2378												
11. AFQ038859 Neospora hughesi strain NC1	0.2436	0.2264	0.2493	0.2521	0.2436	0.2436	0.2493	0.2550	0.2464	0.1862											
12. DQ997621 Neospora hughesi isolate Oregon	0.2436	0.2264	0.2493	0.2521	0.2436	0.2436	0.2493	0.2550	0.2464	0.1862	0.0000										
13. EU290461 Neospora hughesi isolate Oregon	0.2436	0.2264	0.2493	0.2521	0.2436	0.2436	0.2493	0.2550	0.2464	0.1862	0.0000	0.0000									
14. GQ899205 Neospora caninum clone 2	0.2321	0.2350	0.2378	0.2407	0.2321	0.2321	0.2378	0.2378	0.2350	0.1719	0.0201	0.0201	0.0201								
15. HQ542299 Neospora caninum isolate SP 18	0.2321	0.2350	0.2378	0.2407	0.2321	0.2321	0.2378	0.2378	0.2350	0.1719	0.0201	0.0201	0.0201	0.0000							
16. AY259042 Neospora caninum strain NC-Bahia	0.2321	0.2350	0.2378	0.2407	0.2321	0.2321	0.2378	0.2378	0.2350	0.1748	0.0229	0.0229	0.0229	0.0029	0.0029						
17. AF249969 Neospora caninum strain NC-2	0.2321	0.2350	0.2378	0.2407	0.2321	0.2321	0.2378	0.2378	0.2350	0.1719	0.0201	0.0201	0.0201	0.0000	0.0000	0.0029					
18. GQ899204 Neospora caninum strain clone 1	0.2321	0.2350	0.2378	0.2407	0.2321	0.2321	0.2378	0.2378	0.2350	0.1719	0.0201	0.0201	0.0201	0.0000	0.0000	0.0029	0.0000				
19. AY259043 Neospora caninum strain NC-Bahia	0.2407	0.2436	0.2464	0.2493	0.2407	0.2407	0.2464	0.2464	0.2436	0.1805	0.0287	0.0287	0.0287	0.0086	0.0086	0.0115	0.0086	0.0086			
20. AY601347 Neospora caninum strain NcNZ 1	0.2378	0.2407	0.2436	0.2464	0.2378	0.2378	0.2436	0.2436	0.2407	0.1777	0.0258	0.0258	0.0258	0.0057	0.0057	0.0086	0.0057	0.0057	0.0057		
21. AY143137 Toxoplasma gondii strain RH	0.2464	0.2350	0.2378	0.2407	0.2436	0.2436	0.2493	0.2550	0.2464	0.0401	0.1948	0.1948	0.1948	0.1862	0.1862	0.1891	0.1862	0.1862	0.1948	0.1920	
22. X75430 Toxoplasma gondii strain Salle	0.2493	0.2378	0.2407	0.2436	0.2464	0.2464	0.2521	0.2579	0.2493	0.0430	0.1920	0.1920	0.1920	0.1834	0.1834	0.1862	0.1854	0.1834	0.1920	0.1891	0.0029

Fonte: (VALADAS, S., 2015)

APÊNDICE D - Matriz de distância p entre os alelos de *ITS-1* de *Sarcocystis* de gambás

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. Sarcocystis type I	0.0																		
2. Sarcocystis type II	534																		
	0.0	0.0																	
3. Sarcocystis type IV	611	229																	
	0.0	0.0	0.0																
4. Sarcocystis type V	573	458	534																
	0.0	0.0	0.0	0.0															
5. Sarcocystis type VI	153	611	687	649															
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0														
6. Sarcocystis type VII	229	534	611	611	305														
7. AF081944 Sarcocystis	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0													
neurona	153	611	687	649	000	305													
8. DQ084483	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0												
Sarcocystis neurona	191	649	725	687	038	344	038												
9. DQ084484	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0											
Sarcocystis neurona	191	649	725	687	038	344	038	076											
10. FJ904652	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0										
Sarcocystis falcatula	115	573	649	687	267	344	267	305	305										
11. AY082640																			
Sarcocystis sp. Clone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0									
1460-1	076	611	687	649	229	305	229	267	267	038									
12. AY082642																			
Sarcocystis sp. Clone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0								
1460-3	000	534	611	573	153	229	153	191	191	115	076								
13. AY082646																			
Sarcocystis sp. Clone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0							
1334-2	038	573	649	611	191	267	191	229	229	153	115	038							
14. AY082641																			
Sarcocystis sp. Clone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
1460-2	038	573	649	611	191	267	191	229	229	153	115	038	000						
15. AF098243	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0					
Sarcocystis falcatula	076	458	534	573	153	153	153	191	191	191	153	076	115	115					
16. AF098245	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0				
Sarcocystis falcatula	038	496	573	534	115	191	115	153	153	153	115	038	076	076	038				
17. AF098246	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
Sarcocystis falcatula	038	496	573	534	115	191	115	153	153	153	115	038	-76	076	038	000			
18. AY082638	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
Sarcocystis falcatula	305	611	687	687	82	076	382	420	420	420	382	305	344	344	229	267	267		
19. EU937517	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Sarcocystis falcatula	229	534	611	611	305	000	305	344	344	344	305	229	267	267	153	191	191	076	
20. AF387164	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sarcocystis lindsayi	725	267	191	649	802	725	802	43	840	763	802	725	763	763	649	687	687	802	725

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

APÊNDICE E - Polimorfismo de DNA entre alelos *SAG-2* de *Sarcocystis* spp. eliminados por gambás

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
I		2	3	4	13	13	13	13	14	15	4
II	1		3	4	13	12	13	13	13	14	4
III	2	1		1	12	12	10	12	13	14	1
IV	2	1	0		12	13	11	12	14	15	2
V	4	3	4	4		9	9	8	11	11	13
VI	3	2	3	3	2		2	4	4	2	13
VII	2	1	2	2	1	1		4	6	4	11
VIII	3	2	3	3	0	2	1		8	6	13
IX	3	2	3	3	1	1	0	1		2	14
X	2	1	2	2	1	1	0	1	0		15
XI	2	1	0	0	4	3	2	3	3	2	
Pi 0,05239											
Pi(s) 0,03702											
Pi(a) 0,05753											

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

Legenda. Polimorfismo de DNA entre alelos *SAG-2* de *Sarcocystis* spp. eliminados por gambás: número total de diferenças sinônimas (diagonal esquerda) e número total de diferenças não sinônimas (diagonal direita) entre alelos, par a par; diversidade nucleotídica total Pi, diversidade nucleotídica total em sítios sinônimos Pi(s) e diversidade nucleotídica total em sítios não sinônimos Pi(a)

APÊNDICE F - Polimorfismo de DNA entre alelos *SAG-3* de *Sarcocystis* spp. eliminados por gambás

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
I		3	21	20	18	20	19	9	9	8	24	19	20	22	21	1
II	0		18	17	17	19	18	8	8	7	23	18	17	21	20	2
III	7	7		11	15	17	16	20	20	15	13	21	15	12	6	20
IV	4	4	3		16	18	17	15	15	14	20	18	15	15	9	19
V	15	15	13	11		2	1	16	16	16	13	10	2	20	11	17
VI	15	15	13	11	0		1	18	18	18	15	12	4	22	13	19
VII	15	15	13	11	0	0		17	17	17	14	11	3	21	12	18
VIII	1	1	8	6	16	16	16		0	5	23	18	18	22	18	8
IX	2	2	9	7	17	17	17	1		5	23	18	18	22	18	8
X	1	1	8	5	16	16	16	3	4		18	17	18	19	15	7
XI	8,5	8,5	7	6,5	11	11	11	9,5	11	9,5		19	15	15	15	23
XII	15	15	17	13	10	10	10	16	15	16	15		12	26	15	18
XIII	15	15	13	11	0	0	0	16	17	16	11	10		22	13	19
XIV	8	8	7	4	11	11	11	9	10	9	4	15	11		14	21
XV	5	5	2	1	12	12	12	6	7	6	7,5	14	12	5		20
XVI	0	0	7	4	15	15	15	1	2	1	8,5	15	15	8	5	
Pi 0,09266																
Pi(s) 0,13185																
Pi(a) 0,07855																

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

Legenda. Polimorfismo de DNA entre alelos *SAG-3* de *Sarcocystis* spp. eliminados por gambás: número total de diferenças sinônimas (diagonal esquerda) e número total de diferenças não sinônimas (diagonal direita)

entre alelos, par a par; diversidade nucleotídica total P_i , diversidade nucleotídica total em sítios sinônimos $P_i(s)$ e diversidade nucleotídica total em sítios não sinônimos $P_i(a)$

APÊNDICE G- Polimorfismo de DNA entre alelos *SAG-4* de *Sarcocystis* spp. eliminados por gambás

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
I		1	4	4	6	6	5	8	13	11	12	13
II	0		3	3	5	5	4	7	12	10	11	12
III	2	2		0	2	2	1	6	11	9	10	11
IV	0	0	2		2	2	1	6	11	9	10	11
V	2	2	4	2		2	1	6	14	11	12	13
VI	2	2	4	2	0		1	8	13	11	12	13
VII	2	2	4	2	0	0		7	12	10	11	12
VIII	8	8	10	8	8	8	8		13	12	13	14
IX	8	8	6	8	7,5	8	8	10		2	3	4
X	8	8	6	8	8	8	8	11	2		1	2
XI	8	8	6	8	8	8	8	11	2	0		3
XII	7	7	5	7	7	7	7	9,5	1	1	1	
P_i 0,05886												
$P_i(s)$ 0,09555												
$P_i(a)$ 0,04655												

Fonte: (VALADAS, S., 2015).

Legenda. Polimorfismo de DNA entre alelos *SAG-4* de *Sarcocystis* spp. eliminados por gambás: número total de diferenças sinônimas (diagonal esquerda) e número total de diferenças não sinônimas (diagonal direita) entre alelos, par a par; diversidade nucleotídica total P_i , diversidade nucleotídica total em sítios sinônimos $P_i(s)$ e diversidade nucleotídica total em sítios não sinônimos $P_i(a)$