MICHELLE KLEIN SERCUNDES

Filogenia molecular de protozoários pertencentes à sub-família
Toxoplasmatinae pela análise de genes mitocondriais e de apicoplasto

Dissertação 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 Mestre 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

2010

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.2239
FMVZ

Sercundes, Michelle Klein

Filogenia molecular de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise de genes mitocondriais e de apicoplasto / Michelle Klein Sercundes. – 2010.
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. Apicoplasto. 2. Toxoplasmatinae. 3. Filogenia. 4. Mitocondrial. 5. Extracromossomal I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização de oocistos de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae eliminados em fezes de cães e gatos pela análise molecular do gene codificador de citocromo B. do genoma mitocondrial do parasito", protocolado sob o nº1241/2007, no qual não serão utilizados animais, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/11/07.

We certify that the Research "Characterization of oocysts of Toxoplasmatinae by sequence analysis of Cytochrome B coding sequences from mitochondrial genome", protocol number 1241/2007, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/21/07.

São Paulo, 22 de novembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SERCUNDES, Michelle Klein

Título: Filogenia molecular de protozoários pertencentes à sub-família
Toxoplasmatinae pela análise de genes mitocondriais e de apicoplasto

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais

Ricardo e Marie, pelo seu imensurável amor, apoio e carinho, sempre me incentivando a alcançar meu sonhos.

Dedico também aos meu avós Sebastião, Cacilda e

Elisabeth (*in memorian*) por seu amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Rodrigo Martins Soares, pela amizade, pela paciência em passar seus ensinamentos, pelo carinho e confiança em mim depositados.

A Prof Dr^a Solange Maria Gennari, pela oportunidade a mim dada, pelos ensinamentos, apoio e confiança em mim depositada.

Ao Prof Dr Ricardo Vitor da Universidade Federal de Minas Gerais pela amostra de *Besnoitia akodoni*, cedida gentilmente e por se disponibilizar a ajudar no trabalho executado.

Ao Prof Dr Paulo Eduardo Brandão, pela paciência, ensinamentos e por me abrir as portas do Laboratório de Biologia Molecular.

A Prof^a MS Vanda Gavino de Castro, por me abrir o mundo acadêmico, pela sua amizade, carinho, companheirismo e pelos seus ensinamentos.

Ao Prof Dr Pedro Luiz Silva Pinto, pelos ensinamentos em parasitologia, pelo carinho e amizade.

Aos funcionários, Sheila, Renato, João e Pedro pelos pela disponibilidade em ajudar no trabalho, pelos ensinamentos e amizade

Aos funcionários da secretaria do VPS, Danival, Cristina e Virginia por toda a ajuda dada nesses anos de pós graduação.

As amigas Cecília e Priscila, pelo carinho, amizade, conselhos e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos.

As amigas Beatriz e Paula pelos momentos de risadas, alegrias, carinho e amizade

A amiga Flavia Calais pela sua amizade, paciência, carinho e atenção.

A todos os amigos que fiz no VPS, pelas risadas na sala de pós, pelo companherismo nos momentos de dificuldade, pelos ensinamentos, pela amizade e companherismo.

As amigas Juliana, Camila, Estela, Thaisa, Renata, Luciane, Aline e Adriana pela amizade e companherismo.

Aos amigos Malheiros, Valdir, Sergio, Guilherme pela amizade.

Ao amigo Fabricio Rassy, pela amizade, carinho e ensinamentos

Ao meu namorado Aurélio, pelo carinho, companherismo e paciência

A FAPESP pela bolsa de mestrado fornecida e por colaborar com a pesquisa.

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda arte e ciência verdadeira.”

Albert Einstein

*“Primeiro aprenda a ser um artesão.
Isso não impedirá você de ser um gênio.”*

Eugene Delacroix

RESUMO

SERCUNDES, M. K. Filogenia molecular de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise de genes mitocondriais e de apicoplasto. 2010, 92f Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os membros da sub-família *Toxoplasmatinae* conhecidos são *Hammondia hammondi*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora hughesi*, *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni* e *Besnoitia* spp. Os cães (e provavelmente outras espécies de canídeos) são hospedeiros definitivos de *N. caninum* e *H. heydorni*. Os oocistos destas espécies de coccídios são morfologicamente indistinguíveis de forma que o diagnóstico coprológico diferencial entre os dois agentes é virtualmente impossível, se utilizadas metodologias convencionais de diagnóstico. Situação análoga é verificada com os gatos (e outras espécies de felídeos) com relação à infecção por *T. gondii* e *H. hammondi*. O objetivo deste trabalho foi propor a reconstrução filogenética de protozoários pertencentes à sub-família *Toxoplasmatinae* pela análise de seqüências de nucleotídeos de genes mitocondriais e de apicoplasto. Foram empregadas seqüências gênicas de CytB mitocondrial e de dois genes de apicoplasto, o gene codificador da subunidade beta de RNA polimerase DNA dependente (RpoB) e o gene codificador de proteína caseinolítica (ClpC). Pelas análises filogenéticas e de variabilidade nucleotídica e de aminoácidos, verifica-se que a espécie *H. heydorni* é equidistante de todas as outras espécies de toxoplasmatíneos. Os posicionamentos relativos dos gêneros *Toxoplasma*, *Neospora* e *Hammondia* nas árvores filogenéticas não foram congruentes em todas as reconstruções, pois dependendo dos táxons que são empregados como grupos externos, as topologias das reconstruções variam e os clados formados são estatisticamente pouco suportados. Assim, a reconstrução de topologias produzindo com ramos curtos que derivam nós de baixo suporte estatístico, somado à equidistância evolutiva entre os táxons avaliados (*Neospora* spp., *H. heydorni* e *T. gondii*) permite supor que uma politomia consistente explicaria a evolução para estes organismos, ou seja, a resolução para o posicionamento relativo entre estes táxons poderia ser resultado de evolução radiada. Os genes de organelas mostraram-se mais conservados em relação aos genes

nucleares. Embora os genes de apicoplasto possam ser mais conservados que genes nucleares, eles parecem ter relações entre substituições não sinônimas e substituições sinônimas consideravelmente superiores às daquelas de genes nucleares e mitocondriais, o que pode indicar que os produtos gênicos estejam sendo submetidos a pressão seletiva positiva. No caso dos genes mitocondriais e nucleares, é possível supor que os mesmos estejam submetidos à pressão seletiva negativa, indicando que as substituições tendem a ser deletérias aos organismos e por isso as mudanças nos produtos gênicos devam ser menos freqüentemente registradas. Ainda, a variabilidade em sítios não sinônimos é consideravelmente superior para seqüências de apicoplasto em relação às demais, particularmente no caso das seqüências RpoB. Também em termos de variabilidade em sítios não sinônimos, percebe-se que as seqüências de genes de apicoplasto de *H. heydorni* são tão distintas das de *T. gondii* quanto de *N. caninum*. Nas análises realizadas com genes de apicoplasto, é marcante a divergência entre as duas linhagens de *H. heydorni*. Vale ressaltar que as diferenças genotípicas entre as duas linhagens de *H. heydorni* são maiores que as diferenças entre as duas espécies reconhecidas de *Neospora*, indicando que as duas linhagens de *H. heydorni* poderiam ser classificadas como duas espécies distintas, se apenas critérios de evolução molecular fossem considerados.

ABSTRACT

SERCUNDES, M. K. Molecular phylogeny in protozoan of the subfamily toxoplasmatinae based on genes of mitocôndria and apicoplasto. 2010, 92f
Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The known members of the sub-family Toxoplasmatinae are *Hammondia hammondi*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora hughesi*, *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni* and *Besnoitia* spp. Dogs (and probably other species of dogs) are definitive hosts of *N. caninum* and *H. heydorni*. The oocysts of coccidia of these species are morphologically indistinguishable and the coprological differential diagnosis between the two agents is virtually impossible if used conventional methods of diagnosis. Similar situation is observed with the cats (and other species of felids) with respect to *T. gondii* and *H. hammondi*. The objective of this study was to propose a phylogenetic reconstruction of protozoa belonging to the subfamily Toxoplasmatinae by analyzing nucleotide sequences of mitochondrial genes and apicoplast. We used gene sequences of cytochrome b and two apicoplast genes, the gene encoding the beta subunit of DNA dependent RNA polymerase (RpoB) and the gene encoding caseinolytic protein (ClpC). From the phylogenetic analysis and the analysis of nucleotide and amino acids variability, was shown that the species *H. heydorni* is equidistant from all other species of toxoplasmatineos. The relative positions of the genera *Toxoplasma*, *Neospora* and *Hammondia* in the phylogenetic trees were not congruent in all reconstructions, because the topologies of the reconstructions varies according to the taxons that are used as outgroups and clades are poorly supported statistically. Thus, reconstructions of topologies with short branches that derive to poorly statistical supported nodes, coupled with the evolutionary equidistance between taxa the assessed (*Neospora* spp. *H. heydorni*. and *T. gondii*) suggests that a consistent polytomous evolution would explain the evolution within this group of organisms, namely the the relative placement of these taxa could be the result of a radiated evolution. The genes of organelles were more conserved than nuclear genes. Although the apicoplast genes may be more conserved than nuclear genes, they have the ratio between non-synonymous substitutions and synonymous substitutions

considerably higher than those of nuclear and mitochondrial genes, which may indicate that the gene products are being subjected to positive selective pressure. In the case of nuclear and mitochondrial genes, it is possible to assume that they are subject to negative selective pressure, indicating that the substitutions are likely to be harmful to organisms and therefore changes in gene products to be less frequently recorded. Still, the variability in non-synonymous sites is considerably higher for sequences of apicoplast in relation to others loci, particularly in the case of RpoB sequences. Also in terms of variability in non-synonymous sites, it is observed that the sequences of apicoplast genes of *H. heydorni* are as different from those of *T. gondii* as the *N. caninum*. The analyzes of apicoplast genes revealed a striking divergence between the two strains of *H. heydorni*. It is noteworthy that the genotypic differences between the two strains of *H. heydorni* are greater than the differences between the two species of *Neospora*, indicating that the two strains of *H. heydorni* could be classified as two distinct species; if solely criteria of molecular evolution were considered.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados de gene codificador de citocromo B.....50
- Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados de gene codificador citocromo B e purificado com Kit GFX.....51
- Figura 3 - Cromatograma obtido após sequenciamento automático de produto de PCR amplificado a partir da amostra HheV5. Padrões similares a este foram observados em cromatogramas de todas as amostras. Notar a sobreposição de picos de fluorescência o que impediu que a sequência gênica fosse determinada com precisão.....52
- Figura 4 - Gel de Agarose mostrando o resultado de PCR para o gene CytB sobre amostras de plasmídeos transformados.....53
- Figura 5 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 8 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 549 nucleotídeos da região codificadora de citocromo B. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodonti* e **Sne EST**: *Sarcocystis neurona*. Outgroup: **Sne EST**.....55
- Figura 6 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 7 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 549 nucleotídeos da região codificadora de citocromo B. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**:

Neospora caninum; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*. Outgroup: Bak.....55

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados de gene codificador da subunidade B da RNA polimerase dependente.....56

Figura 8 - Cromatograma obtido após sequenciamento automático de produto de PCR amplificado a partir da amostra Bak para o gene RpoB.....57

Figura 9 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 12 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 449 nucleotídeos da região codificadora de RpoB. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*; **Bda 27884026**: *Besnoitia darlingi*; **Bor 27884028**: *Besnoitia oryctofelisi*; **Sne 27469347**: *Sarcocystis neurona*; **Sfa 27469345**: *Sarcocystis falcatula*; **Sly 27469341**: *Sarcocystis lindsayi*.. Outgroup: Sne, Sfa e Sly.....58

Figura 10 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 12 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 449 nucleotídeos da região codificadora de RpoB. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*); **Bda 27884026**: *Besnoitia darlingi*; **Bor 27884028**: *Besnoitia oryctofelisi*. Outgroup: Bak, Bda e Bor.....58

Figura 11 - Cromatograma obtido após sequenciamento automático de produto de PCR amplificado a partir da amostra Bak para o gene ClpC.....59

Figura 12 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 8 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 482 nucleotídeos da região codificadora de ClpC. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*). Outgroup: Bak.....60

Figura 13 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 10 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 482 nucleotídeos da região codificadora de ClpC. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*; **Ssp 165880123**: *Sarcocystis sp* **Ssp2 165880121**: *Sarcocystis sp*. Outgroup: Ssp 165880123 e Ssp2 165880121.....60

Figura 14 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 12 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 482 nucleotídeos da região codificadora de ClpC. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*; **Ssp 165880123**: *Sarcocystis sp* **Ssp2 165880121**: *Sarcocystis sp*; **Sfa 77051640**: *Sarcocystis falcatula*; **Sne 52122115**: *Sarcocystis neurona*. Outgroup: Sfa, Sne, Ssp e Ssp2.....61

Figura 15 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 13 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 482 nucleotídeos da região codificadora de ClpC. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni*

linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*; **Ssp 165880123**: *Sarcocystis sp* **Ssp2 165880121**: *Sarcocystis sp*; **Sfa 77051640**: *Sarcocystis falcatula*; **Sne 52122115**: *Sarcocystis neurona*; **Ete 31322455**: *Eimeria tennela*. Outgroup:Ete.....61

Figura 16 - Reconstruções filogenéticas do grupo dos Toxoplasmatineos, inferida por método de máxima parcimônia com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, utilizando 549 nucleotídeos da região codificadora de citocromo B. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*;.....62

Figura 17 - Reconstruções filogenéticas do grupo dos Toxoplasmatineos, inferida por método de máxima parcimônia com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 449 nucleotídeos da região codificadora de RpoB. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*; **Bda 27884026**: *Besnoitia darlingi*; **Bor 27884028**: *Besnoitia oryctofelisi*; **Sne 27469347**: *Sarcocystis neurona*; **Sfa 27469345**: *Sarcocystis falcatula*; **Sly 27469341**: *Sarcocystis lindsayi*.....62

Figura 18 - Reconstruções filogenéticas do grupo dos Toxoplasmatineos, inferida por método de máxima parcimônia com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, utilizando 482 nucleotídeos da região codificadora de ClpC. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*; **Ssp 165880123**: *Sarcocystis sp* **Ssp2 165880121**: *Sarcocystis sp*; **Sfa 77051640**: *Sarcocystis falcatula*; **Sne 52122115**: *Sarcocystis neurona*.....63

Figura 19 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 7 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando as três seqüências de organelas em análise concatenada. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*. Outgroup: Bak.....64

Figura 20 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 7 taxons, inferida por método de parcimônia com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, utilizando as três seqüências de organelas em análise concatenada. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*. Outgroup: Bak.....64

Figura 21 - Alinhamento de seqüências de nucleotídeos da região codificadora de citocromo B. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi* e **Sne EST**: *Sarcocystis neurona*.....85

Figura 22 - Alinhamento de seqüências de nucleotídeos da região codificadora de ClpC. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*; **Ssp 165880123**: *Sarcocystis* sp **Ssp2 165880121**: *Sarcocystis* sp; **Sfa 77051640**: *Sarcocystis falcatula*; **Sne 52122115**: *Sarcocystis neurona*; **Ete 31322455**: *Eimeria tennela*.....86

Figura 23 - Alinhamento de seqüências de nucleotídeos da região codificadora RpoB. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*; **Bda 27884026**: *Besnoitia darlingi*; **Bor 27884028**: *Besnoitia oryctofelisi*; **Sne**

27469347: *Sarcocystis neurona*; **Sfa 27469345:** *Sarcocystis*
falcatula; **Sly 27469341:** *Sarcocystis lindsayi*.....87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Conteúdo de GC (%) e identificação para os diferentes táxons empregados nas análises filogenéticas.....	65
------------	---	----

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 -	Número de diferenças de nucleotídeos entre seqüências de genes codificadores de CytB.....	88
Quadro 2 -	Número de diferenças de aminoácidos entre seqüências de CytB.....	89
Quadro 3 -	Número de diferenças de nucleotídeos entre seqüências de genes codificadores de RpoB.....	90
Quadro4-	Número de diferenças de aminoácidos entre seqüências de RpoB.....	91
Quadro 5 -	Número de diferenças de nucleotídeos entre seqüências de genes codificadores de ClpC.....	92
Quadro 6 -	Número de diferenças de aminoácidos entre seqüências de ClpC.....	93

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	<i>TOXOPLASMA GONDII</i>	27
2.2	<i>NEOSPORA CANINUM</i> E <i>NEOSPORA HUGHESI</i>	30
2.3	<i>HAMMONDIA HAMMONDI</i>	33
2.4	<i>HAMMONDIA HEYDORNI</i>	35
2.5	BESNOITIA.....	36
2.6	FILOGENIA DOS TOXOPLASMATINAE.....	39
3	OBJETIVOS.....	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	AMOSTRAS.....	43
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA E PCR.....	44
4.3	DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	45
4.4	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE.....	46
4.5	PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	46
4.6	SEQUENCIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	47
4.7	PRECIPITAÇÃO DE DNA.....	48
4.8	ELETROFORESE DE SEQUENCIAMENTO.....	48
4.9	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	48
4.10	CLONAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS (SOMENTE PARA CITOCROMO B).....	49
5	RESULTADOS.....	50
5.1	CITOCROMO B (CytB).....	50
5.2	SUBUNIDADE B DA RNA POLIMERASE (RpoB).....	56

5.3	ClpC.....	59
5.4	ANÁLISE CONCATENADA.....	63
6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	APENDICE.....	85

1 INTRODUÇÃO

O filo Apicomplexa é composto por parasitas intracelulares obrigatórios que se caracterizam por possuir, em determinadas fases da vida, uma estrutura chamada complexo apical (TENTER et al., 1992). Dentro deste grupo se destacam duas famílias de protozoários de interesse médico e veterinário, as famílias *Eimeriidae* e *Sarcocystidae*.

A Família *Sarcocystidae* (sub-ordem *Eimeriorina*, Ordem *Eucoccidiorida*, sub-classe *Coccidiasina*, segundo Levine (1988) compreende cerca de 200 espécies de coccídios heteroxenos que formam cistos teciduais em hospedeiros intermediários. Dois clados são reconhecidos dentro deste grupo de organismos, um deles formado por organismos dos gêneros *Sarcocystis* e *Frenkelia* e outro formado por organismos de diversos outros gêneros como *Cystoisospora*, *Besnoitia*, *Hammondia*, *Neospora*, *Toxoplasma* e *Hyaloklossia*. (MORRISON et al., 2004). Os gêneros *Besnoitia*, *Hammondia*, *Neospora* e *Toxoplasma* são comumente arrolados em um nível hierárquico denominado sub-família *Toxoplasmatinae*.

Os coccídios dos gêneros *Sarcocystis* e *Frenkelia* são 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 ou onívoros, 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 (DUBEY et al., 1989).

Os membros do grupo *Toxoplasmatinae* conhecidos são *Hammondia hammondi*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora hughesi*, *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni* e *Besnoitia* spp. Este último gênero é raro no Brasil (DUBEY et al., 2003a), tendo sido descritas nove espécies em outras partes do mundo, principalmente Europa Mediterrânea e África. Integrantes do grupo *Toxoplasmatinae* podem ser heteroxenos obrigatórios ou facultativos.

Os protozoários da sub-família *Toxoplasmatinae* desenvolvem-se assexuadamente nos tecidos dos hospedeiros intermediários em duas fases. Na primeira fase, taquizoitos multiplicam-se aceleradamente em diversas células

enquanto na segunda, as células parasitárias se dividem lentamente, encerradas no interior de cistos teciduais. Nesta fase, as células parasitárias (denominadas bradizoitos), são as únicas formas de multiplicação do agente nos cistos teciduais e correspondem ao estágio de desenvolvimento final do parasito no hospedeiro intermediário (DUBEY, 1993).

Se ingeridos por um hospedeiro definitivo, os bradizoitos iniciam uma fase proliferativa nas células epiteliais dos intestinos. Gamogonia e formação de oocistos não esporulados ocorrem neste local. Após liberação no lúmen intestinal, os oocistos esporulam no ambiente originando oocistos com dois esporocistos contendo quatro esporozoitos cada (DUBEY, 1993).

Os cães (e provavelmente outras espécies de canídeos) são hospedeiros definitivos de dois membros da sub-família *Toxoplasmatinae*, *Neospora caninum* e *Hammondia heydorni* (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999, 2001; GONDIM et al., 2004). Os oocistos destas espécies de coccídios são morfologicamente indistinguíveis de forma que o diagnóstico coprológico diferencial entre os dois agentes é virtualmente impossível, se utilizadas metodologias convencionais de diagnóstico. Situação análoga é verificada com os gatos (e outras espécies de felídeos) com relação à infecção por *T. gondii* e *H. hammondi* (FRENKEL DUBEY, 1975; DUBEY, 1993). O ciclo biológico de *N. hughesi* é pouco conhecido.

Descrição de gêneros dentro da sub-família *Toxoplasmatinae* vem sendo feita com base em dados fenotípicos como especificidade de hospedeiro, padrões de ciclo de vida, grau de heteroxenia (heteroxenia facultativa ou obrigatória), modo de transmissão dos estágios infecciosos, categoria de células parasitadas bem como morfologia e localização dos cistos teciduais. Porém, inferências filogenéticas baseadas em caracteres fenotípicos podem ser problemáticas para análises dos gêneros *Toxoplasma*, *Hammondia* e *Neospora*, visto que nem todos os integrantes desse grupo tem seus ciclos de vida conhecidos. (TENTER et al., 2002).

Por outro lado, dados moleculares podem ser obtidos sem necessariamente o conhecimento de características de ciclo de vida, pois muitas vezes podem ser recuperados de qualquer forma de vida do parasito. Ainda, este tipo de informação fornece maior número de dados filogeneticamente informativos para inferências evolutivas, em especial para o caso de organismos estreitamente relacionados. De fato, caracteres moleculares atendem a premissa evolutiva de homologia, bem como

possuem suficiente variabilidade para fornecer diferentes estados de caractere (RUSSO, 2001).

Reconstruções filogenéticas baseadas nas informações do gene codificador da unidade 28S do RNA ribossomal oferecem informações suficientes para que seja sugerido que os membros da sub-família *Toxoplasmatinae* sejam organizados em um clado estatisticamente bem suportado, separando-os dos demais gêneros da Família *Sarcocistidae* (ELLIS et al., 1999; MURGRIDGE et al., 1999). Todavia, nestas análises o gênero *Hammondia* é parafilético, pois *H. heydorni* e *N. caninum* formam *clusters* distintos do grupo formado por *H. hammondi*, *T. gondii*.

Os primeiros estudos filogenéticos de *Toxoplasmatineos* em que foram utilizados genes codificadores de proteína como marcadores moleculares demonstraram que os táxons *H. hammondi* e *T. gondii* são monofiléticos e geneticamente muito próximos, mas contrariando os resultados de outros autores, não foi demonstrada a monofilia entre os táxons *H. heydorni* e *N. caninum*. (MONTEIRO et al., 2007). De fato, a análise de diversidade nucleotídica de gene codificador de proteína de choque térmico mostra que a distância entre *H. heydorni* e *N. caninum* é tão grande quanto a distância de cada uma destas espécies com *T. gondii*. Em adição, foi possível identificar, dentre as amostras de oocistos, duas linhagens divergentes de *H. heydorni*. Os resultados de Monteiro et al. (2007) mostram que as espécies *H. heydorni* e *N. caninum* são espécies bastante divergentes do ponto de vista filogenético.

No trabalho que se apresenta, novos marcadores moleculares foram pesquisados com vistas a contribuir para a resolução de questões filogenéticas para os organismos da sub-família *Toxoplasmatinae*. Este trabalho foi similar ao realizado por Monteiro et al.(2007), mas neste caso foram analisados outros marcadores moleculares com reconhecidos potenciais para serem empregados como marcadores filogenéticos, sendo esses o gene codificador de citocromo B (CytB), situado no genoma mitocondrial do parasito, o gene codificador da subunidade beta de RNA polimerase DNA dependente (RpoB) localizado no genoma do apicoplasto e o gene codificador de proteína caseinolítica (ClpC), também pertencente ao genoma do apicoplasto.

O gene CytB tem se mostrado um marcador molecular de grande valor para as filogenias moleculares, pois tem permitido a reconstrução de histórias evolutivas nas mais diversas classes de organismos, desde salamandras, rãs, roedores até

insetos como os triatomídeos (FAIVOVICH et al., 2004; MARTINEZ et al., 2006; JING et al., 2007; MATSUI et al., 2007). Entretanto, a despeito de sua aplicabilidade para diversos modelos biológicos, em estudos com protozoários do filo Apicomplexa apenas reconstruções filogenéticas para o gênero *Plasmodium* tem sido descritas (PERKINS; 2000; RICKLEFS, FALLON; 2002; PERKINS, SCHALL; 2002; SCHRENZEL et al., 2003; RICKLEFS et al., 2004; BEADELL et al., 2006).

Os genes mitocondriais são de transmissão materna em metazoários, pois está presente no DNA mitocondrial e, assim como o gene codificador de proteína de choque térmico estudado por Monteiro et al. (2007), é codificador de uma proteína universal encontrada em muitos organismos eucariontes (ESCALANTE et al., 1998). O gene Cyt B não é afetado por múltiplas substituições de nucleotídeos fixadas por pressões seletivas, já que muitas das substituições encontradas neste locus são sinônimas (MEYER, 1994; AVISE, 1998). Além disso, pelo fato de ser um gene codificador de uma proteína universal, permite que alinhamentos de seqüências homólogas possam ser realizados com confiabilidade maior que os alinhamentos de seqüências de genes codificadores de RNA ribossômicos ou seqüências não codificadoras (RUSSO, 2001).

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 a 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. Os genes de apicoplasto também são de transmissão uniparental.

Kohler et al. (1997), analisaram genes presente em plastídios que também estavam presentes e conservados em alguns procariotos, demonstrando assim a plausibilidade da ocorrência de fixação do material nuclear dos plastídios. Até o momento não se sabe muito sobre a função do apicoplasto e quais proteínas ele é capaz de produzir. Apenas se sabe que o apicoplasto é mais uma organela que possui um DNA conservado ao longo da história evolutiva, podendo assim ser utilizado como marcador filogenético (KOHLETER et al., 1997).

Uma justificativa para a realização deste trabalho é que por serem mais conservados que o gene codificador de proteína de choque térmico, os genes localizados no genoma mitocondrial e no genoma de apicoplasto poderiam solucionar uma questão que não ficou esclarecida no trabalho de Monteiro et al. (2007) que é o posicionamento filogenético relativo dos três gêneros principais de *Toxoplasmatinae*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TOXOPLASMA GONDII

O parasito *T. gondii* foi descrito em 1908, quase ao mesmo tempo e independentemente por Splendore, em coelhos, no Brasil, e logo depois por Nicolle e Manceaux, em roedores, no Norte da África (REY, 2001; DUBEY; 2008; FERGUSON, 2009).

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, que invade diversos tipos de células, no organismo dos hospedeiros. Tem predileção por células do sistema fagocítico mononuclear, no qual, penetra na célula do hospedeiro por processo ativo de endocitose (REY, 2001).

É um protozoário que pode infectar a maioria dos animais homeotérmicos, entre os quais várias espécies de mamíferos, de aves e o próprio homem (BONAMETTI et al., 1997; TENTER et al., 2000; MAINARDI et al., 2003; SILVA et al., 2003). Este protozoário pode ser encontrado em três formas infectantes distintas: taquizoitos, bradizoitos e oocistos (FIALHO; ARAÚJO, 2003). O ciclo completo de *T. gondii* pode ser caracterizado por uma fase sexuada, na qual felídeos são os hospedeiros definitivos e várias espécies de sangue quente como hospedeiros intermediários (fase assexuada) (REY, 2001; DUBEY, 2004; BOWMAN et al., 2006)

Os oocistos encontrados nas fezes são formas de vida que podem contaminar o ambiente, já que o parasito secreta uma rígida parede protetora que permite a sua sobrevivência no ambiente externo ao corpo do hospedeiro contaminando vegetais e águas, elucidando assim como animais herbívoros poderiam adquirir a infecção (REY, 2001; FERGUNSON, 2009). ,

O *T. gondii* é prevalente em várias áreas do mundo tendo importância veterinária e médica, por causar abortos, mortalidade de recém nascidos, problemas conjuntivos, anorexia, distúrbios respiratórios entre outros problemas nas diversas espécies de hospedeiros intermediários (KALITA et al., 1978; LUCAS et al., 1998; CANTOS et al., 2000; TENTER et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001). Nos EUA e Europa o *T. gondii* é prevalente em 16 a 40% da população, já na América Central e do Sul estima-se que a infecção ocorra em uma porcentagem de 50 a 80% da

população, sendo que a maior parte dessas ocorre de maneira assintomática (HILL; DUBEY, 2002).

A doença em animais e seres humanos pode ocorrer em decorrência da infecção congênita, quando a infecção aguda na mãe coincide com a prenhez (LANGONI, 2001). Nos seres humanos, causa grande apreensão principalmente no primeiro trimestre da gestação, pois além da infecção estabelecer-se por via transplacentária, pode ocorrer também após recrudescência de uma fase crônica, para uma fase aguda (VARELLA et al., 2003). As gestantes infectadas podem sofrer abortos, partos prematuros, crianças com algum retardamento mental entre outras sintomatologias (DABANCH, 2003; VARELLA et al., 2003).

Pacientes imunodeprimidos são acometidos com maior frequência e de maneira mais severa. Entre as doenças que levam pacientes com HIV a morte o *T. gondii* é responsável por 30% desta letalidade na Europa e EUA (HILL; DUBEY, 2002).

Outra forma de infecção na espécie humana pode ser derivada da ingestão de carnes cruas ou mal cozidas de ovinos (SILVA et al., 2003), suínos (FIALHO; ARAÚJO, 2003); (DAVIES et al., 1998). A infecção também pode ser adquirida pelo consumo de carne crua ou mal cozida de bovídeos (OLIVEIRA et al., 2001) e pela ingestão de leite caprino *IN NATURA*, porém essas formas de infecção são mais raras (SILVA et al., 2003).

Entre os animais, a maior parte dos hospedeiros intermediários está entre os mamíferos domésticos como ovinos, caprinos, bovídeos, suínos e canídeos (WORK et al., 1970 apud OLIVEIRA et al., 2001; LANGONI et al., 2001), que podem contrair a infecção através de ingestão de oocistos presentes na água, ração e eventualmente ingerindo no caso dos carnívoros roedores infectados ou carne contaminada (FIALHO; ARAÚJO, 2003).

A infecção por *T. gondii* na criação de caprinos e ovinos, foi discutida por Silva et al. (2003), sugerindo que a maior concentração de animais associada à oferta de alimentos contaminados, favorece a transmissão desta. Risco maior de infecção é apontado em animais criados confinados, especialmente na presença de um gato que esteja eliminando oocistos. O autor discute ainda sobre criações intensivas, com grandes concentrações de animais, próximas a centros urbanos, onde a difusão de enfermidade infecciosa é facilitada pelo contato com outras espécies. Neste contexto, o estudo da infecção por *T. gondii* entre animais é

relevante, devido a potencial ocorrência de problemas da esfera reprodutiva e a possibilidade de transmissão do agente para o homem.

Estudos vêm sendo realizados como forma de avaliar a infecção, desenvolver tratamentos eficientes e diagnosticar animais e humanos acometidos pela doença (HILL; DUBEY, 2002). Vários métodos de pesquisa e diagnóstico foram e estão sendo desenvolvidos, entre eles os bioensaios, métodos sorológicos como Hemaglutinação Indireta (HAI), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação microscopia (MAT) e ELISA, e mais atualmente testes baseados em biologia molecular (ZARNKE et al., 2000; HILL; DUBEY, 2002).

Com o advento da biologia molecular, a PCR tornou-se ferramenta essencial nas pesquisas com *T. gondii*, pois a partir de um único cisto retirado de tecido animal ou humano ou de oocisto de fezes e do ambiente é possível detectar o parasita (HILL; DUBEY, 2002). Também é possível se ter certeza se este é o parasita procurado, já que vários apicomplexas como *H. hammondi*, *H. heydorni* e *N. caninum* são muito similares em aspectos morfológicos (ELLIS et al., 1999; DUBEY et al., 2002a; HEYDORN; MEHLHORN, 2002).

Embora as amostras atualmente conhecidas de *T. gondii* possuem similaridades antigênica, morfológica e na capacidade de infectar vários hospedeiros (TENTER; JOHNSON, 1997; DUBEY et al., 1988). Considerável diversidade genética é verificada entre isolados de *T. gondii*. (LEHMANN et al., 2000).

Estudos iniciados em 1988 com o emprego de técnicas moleculares e com a utilização de isoenzimas demonstraram que a estrutura populacional de *T. gondii* era do tipo clonal. Em 1995, um sistema de tipificação baseado na diferenciação multilocus por PCR-RFLP permitiu subdividir a população deste parasito em três linhagens clonais, denominadas tipos I, II e III. Estas linhagens possuem características biológicas como virulência distintas e espectro de hospedeiros. (HOWE; SIBLEY, 1995).

Estudos posteriores com marcadores microsátélites (AJZENBERG et al., 2004) e de PCR-RFLP multilocus (LEHMANN et al., 2004), aplicados a uma maior número de amostras, revelaram que as amostras de *T. gondii* oriundas de outras regiões do mundo, além de Europa e Estados Unidos, apresentavam genótipos recombinantes em relação aos arquétipos clonais I, II e III (DUBEY et al., 2004a; SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007a,b).

Estas variações genéticas foram observadas particularmente no Brasil, onde alguns estudos revelaram que muitos isolados de *T. gondii* eram diferentes dos Tipos I, II e III. Entre muitas outras linhagens divergentes das arquetípicas I, II e III, algumas linhagens consideradas clonais foram encontradas em estudos realizados no Brasil e designadas BrI, BrII, BrIII e BrIV. Com base na taxa de mortalidade em camundongos infectados, o isolado do tipo BrI é considerado virulento, o tipo BrIII não-virulento, e os Tipos BrII e BrIV são considerados virulentos intermediários (PENA et al., 2008).

2.2 NEOSPORA CANINUM E NEOSPORA HUGHESI

Na Noruega em 1984, foi descrita uma enfermidade neurológica em filhotes de cães que tinham por sintomatologia encefalomielite, miosite e paresia. Quando os animais foram necropsiados encontrou-se no cérebro cistos que se assemelhavam aos de *T. gondii*, porém testes sorológicos, bem como bioensaios indicaram resultados negativos para essa infecção (DUBEY; LINDSAY, 2006). Em 1988, Dubey et al. descreveram o parasita encontrado como um novo gênero e espécie. A partir de então, a neosporose emergia como uma doença séria que causa abortamentos no gado e sintomas clínicos diversos em outros animais (DUBEY et al., 2007c).

N. caninum é um protozoário que possui ciclo heteroxeno facultativo. Cães (*Canis familiares*) e coiotes (*Canis latrans*) são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos desse parasita (GONDIM et al., 2004; DUBEY et al., 2006). Bovinos e uma ampla variedade de mamíferos podem atuar como hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2006).

O ciclo de vida é tipificado por três estágios de infecção: taquizoitos, bradizoitos e oocistos. Taquizoitos e bradizoitos são estágios encontrados no hospedeiro intermediário e ocorrem intracelularmente (DUBEY; LINDSAY, 2006). Os oocistos, formas eliminadas somente pelo hospedeiro definitivo, são excretados não esporulados. Essa esporulação ocorre a partir de 24 horas após os oocistos serem eliminados no ambiente (LINDSAY et al., 1999). Até o momento pouco se conhece quanto à sobrevivência desses oocistos no meio ambiente, porém alguns

pesquisadores aventam a possibilidade de oocistos de *N. caninum* terem a mesma resistência dos oocistos de *T. gondii* (DUBEY et al., 2007c).

Todos os três estágios de infecção de *N. caninum* estão envolvidos na transmissão do parasita. Os carnívoros são infectados quando ingerem carne contendo bradizoitos e os herbívoros são infectados quando consomem água e alimento contaminado com esses oocistos (DUBEY; LINSLEY, 2006; DUBEY et al., 2007c). Outra forma de infecção é a transplacentária, na qual os taquizoitos passam da mãe infectada para o feto (ANDERSON et al., 2000; DUBEY; LINSLEY, 2006).

Os oocistos de *N. caninum* são muito similares ao de outros coccídios, como *T. gondii*, *H. hammondi* e *H. heydorni*. Heydorni e Mehlhorn (2002) relatam em seu artigo que *N. caninum* vêm sendo comparado principalmente com *T. gondii*, quando na verdade deveria ser comparado com *H. heydorni*, já que há similaridades em relação ao hospedeiro definitivo. Contudo, Dubey et al (2002b) rebatem essa opinião mostrando diferenças presentes no cultivo celular, diferenças ultra-estruturais e gênicas entre estes dois parasitos.

Quanto ao crescimento *in vitro*, o *N. caninum* pode ser mantido continuamente em diferentes linhagens de células, mas a *H. heydorni* não. Diferenças morfológicas nos taquizoitos também são descritas, pois *H. heydorni* possui grânulos de amilopectina e um número inferior de micronemas comparados com os taquizoitos de *N. caninum*. Quando comparado em termos de variabilidade molecular, o agente *N. caninum* se mostrou distinto de *H. heydorni* (SLAPETA et al., 2002b ; MONTEIRO et al., 2007).

O *N. caninum* tem sido admitido como importante causador de desordens neuromusculares em cães e desordens reprodutivas em bovinos acarretando grandes prejuízos econômicos (DUBEY, 2003b). Os estudos da neosporose bovina têm grande importância epidemiológica, pois de 10 a 40% dos abortos que acometem bovinos tem o *N. caninum* como agente (DUBEY, 2003b; BOWMAN et al., 2006).

Neospora caninum é transmitido eficientemente em bovinos. Ambas as rotas de transmissão horizontal e vertical são importantes na infecção e vitais para a sobrevivência do parasita. A transmissão horizontal ocorre quando o gado se alimenta de oocistos esporulados, já a transmissão vertical é aquela em que o patógeno passa da mãe para o feto, via transplacentária (DUBEY et al., 2006).

Atualmente os termos transmissão transplacentária exógena e endógena tem sido proposta para descrever mais precisamente a origem e a rota de infecção do feto (DUBEY et al., 2006). A infecção exógena é aquela que é adquirida pela mãe durante a gravidez e a endógena é aquela em que a mãe soropositiva passa a infecção para o feto, mas essa adquiriu a infecção antes da gestação (TREES; WILLIAMS, 2005).

Vários métodos baseados em PCR vêm sendo reportados para detectar o DNA de *N. caninum* (YAMAGE et al., 1996; ELLIS et al., 1998). Gottstein et al. (1998), realizaram um estudo com 83 fetos bovinos oriundos da Suíça, encontrando 24 animais positivos para *N. caninum* e 4 para *T. gondii*. Mais recentemente, Slapeta et al. (2002) baseando-se no estudo de seqüências ITS-1 e do gene D2 LSU rDNA empregou a técnica para detecção e diferenciação entre *N. caninum* e *H. heydorni*. Os *primers* utilizados para reação foram bem sucedidos e permitiram a discriminação entre estes parasitos. A diferenciação entre *H. heydorni* e *N. caninum* também é possível de ser realizada por meio de PCR-RFLP sobre fragmentos de genes codificadores de proteína de choque térmico HSP70 (MONTEIRO et al., 2008)

Outro organismo muito estreitamente relacionado ao *N. caninum* foi encontrado em eqüinos. Inicialmente pensava-se tratar do próprio *N. caninum*, mas depois da caracterização molecular realizada por Marsh et al. (1996), revelou-se que o organismo encontrado distinguia-se de *N. caninum*. Marsh et al. (1998) nomeou o organismo como *N. hughesi*.

As duas espécies de *Neospora* têm morfologia similar, mas ultra estruturalmente, antigenicamente e geneticamente possuem diferenças importantes (MARSH et al., 1998). Em termos de variabilidade molecular, as duas espécies foram comparadas em genes codificadores de antígenos de superfície (SAG-1) e em locus ITS-1.

Entretanto, métodos de caracterização molecular vêm revelando que ambas as espécies de *Neospora* são quase idênticas, quando comparadas em seqüências de genes constitutivos, tendo sido encontrado apenas uma substituição de nucleotídeos quando comparados fragmentos gênicos de HSP70 (MONTEIRO et al., 2007).

O *N. hughesi* é descrito como um parasita apicomplexa que está associado à causa de mieloencefalite eqüina (EPM). Os sinais clínicos dessa infecção são variáveis e além de sinais neurológicos, incluem anemia, perda de peso, ataxia e

abortamentos. O parasita é freqüentemente encontrado em cérebro e na medula espinhal, mas em alguns casos é possível encontrá-los nas periferias dos nervos, na musculatura dos olhos, nos intestinos e nos fetos (WALSH et al., 2000).

Pouco se sabe sobre o ciclo de vida ou a prevalência de *N. hughesi*. Dubey (1999), reporta que 69 de 296 cavalos dos Estados Unidos tinha anticorpos para *Neospora* sp. Até o momento somente a caracterização molecular desse parasita é que permite diferenciar as duas espécies do gênero *Neospora*.

2.3 HAMMONDIA HAMMONDI

Hammondia hammondi é um coccídio que, a semelhança de *T. gondii* tem os gatos como hospedeiro intermediário, mas com ciclo heteroxeno obrigatório. Possui como hospedeiros intermediários alguns roedores e outros mamíferos (FRENKEL; SMITH, 2003; SREEKUMAR et al., 2005).

A transmissão do parasito ocorre ciclicamente entre o hospedeiro intermediário (geralmente roedores) e o hospedeiro definitivo (gatos). Porém, o ciclo não se completa pela transmissão entre hospedeiros intermediários (de roedores para roedores) e nem entre hospedeiros definitivos (de gatos para gatos) (FRENKEL; SMITH, 2003). Por ser heteróxico obrigatório *H. hammondi* é preciso que o gato se alimente do camundongo infectado para que haja a transmissão do parasita, pois a ingestão dos oocistos do solo raramente promove a infecção do hospedeiro definitivo (FRENKEL; DUBEY, 2000).

Estudos morfológicos demonstraram que *H. hammondi* difere de *T. gondii* em três critérios. A primeira é que nos taquizoitos, as roptrias de *H. hammondi* são elétron densas, enquanto que em *T. gondii* são eletron-lúcidas, outra diferença está na presença de corpo cristalóide em *H. hammondi*, que não é encontrado em *T. gondii*. O ultimo critério é o tamanho dos cistos musculares dos dois gêneros, mas este caractere não parece ser suficiente para a diferenciação entre os dois parasitos (FRENKEL; DUBEY, 2000).

Estudos realizados por Dubey e Sreekumar (2003d) demonstram que o *T. gondii* consegue permanecer ativo após diversas passagens em camundongos, e todos os estágios do parasita podem infectar células *in vitro*, sendo os taquizoitos mantidos indefinidamente em cultura. No caso de *H. hammondi*, somente taquizoitos

e esporozoítos tem infectividade em cultura celular, porém esse parasito não se mantém indefinidamente *in vitro* (SHEFFIELD et al,1976; RIAHI et al.,1995; SREEKUMAR et al., 2005).

A patogenicidade dos dois protozoários, quando avaliada em relação à mortalidade em camundongos, demonstra que *T. gondii* é muito mais letal que *H. hammondi*. Sintomatologia clínica associada à infecção por *H. hammondi* não foi demonstrada em nenhum hospedeiro intermediário, com exceção dos murinos. Infecções experimentais em camundongos mostraram que *H. hammondi* algumas vezes pode ser patogênica provocando sintomas como anorexia, diarreia, letargia e algumas vezes levando o animal à morte (DUBEY, 1975).

Vários autores relatam a ausência ou a presença de reação cruzada em testes sorológicos para ambos os parasitas em questão. Frenkel e Dubey (1975) relatam que não há reação cruzada entre *H. hammondi* e *T. gondii* nos testes realizados com soros coletados de gatos, quando esses sofrem primeiro infecção por um dos agentes e é testado sorologicamente para a infecção pelo outro agente. Já em camundongos, constatou-se que há reação cruzada em alguns testes como ELISA e Fixação de Complemento, mas não nos testes de Imunofluorescência e de Hemaglutinação Indireta (WEILAND et al., 1979).

Riahi et al. (1999) enfatizou que existe reação cruzada entre *H. hammondi* e *T. gondii*, porém apenas com títulos muito baixos. Os autores ainda adicionam que algumas organelas de *H. hammondi*, como complexo apical, roptrias e micronemas apresentam antígenos que são reconhecidos por anticorpos monoclonais de *T. gondii*.

2.4 HAMMONDIA HEYDORNI

Heydorn e Rommel (1972) encontraram oocistos não esporulados em fezes de cães que, após a esporulação, foram considerados pelo tamanho e morfologia como similares a oocistos de *Isospora bigemina*.

O nome *Isospora begemina* foi utilizado inicialmente em parasitos que se desenvolviam na lâmina própria do intestino de cães, porém o protozoário recém descrito tinha desenvolvimento na superfície do epitélio intestinal (DUBEY et al., 2002c).

Estudos realizados por Heydorni sobre o ciclo biológico do parasita, fez com que Tadros e Laarman (1976) propusessem outro nome para o protozoário, já que esse se desenvolvia na superfície do epitélio intestinal de cães. O nome dado foi *Isospora heydorni*. Em 1977, Dubey propôs que *I. heydorni* fosse transferido para o gênero *Hammondia* por causa da sua biologia, que incluía um ciclo heteróximo obrigatório, o que não acontecia com os parasitas do gênero *Isospora* que são monóxenos.

Hammondia heydorni é um coccídio com ciclo heteróximo obrigatório, que tem o cão, raposa e o coioote como hospedeiros definitivos (SCHARES et al., 2003; ABEL et al., 2006; SOARES et al., 2009). Alguns animais incluem-se no ciclo como hospedeiros intermediários, entre mamíferos e aves (BLAGBURN et al., 1988; MOHAMMED et al., 2003).

Os canídeos adquirem a infecção ao se alimentar de carne contendo cistos teciduais e após essa ingestão, em intervalo de 5 a 8 dias, os animais começam a excretar oocistos não esporulados no ambiente. Os oocistos levam até três dias para esporular e os hospedeiros intermediários se infectam com esses oocistos presentes no solo (BLAGBURN et al., 1988).

Pesquisas recentes com coccídios da espécie *H. heydorni*, vêm demonstrando que pode haver mais de uma espécie de *H. heydorni* (SCHARES et al., 2002).

No trabalho publicado por Schares et al. (2002), analisou-se a possibilidade de oocistos de *H. heydorni* eliminados por raposas pertencerem a uma espécie diferente daqueles eliminados por cães. Os oocistos obtidos de raposas quando submetidos a PCR (polimerase chain reaction) para o marcador de *N. caninum*,

mostraram-se negativas. Quando submetidos à PCRs baseadas em seqüências ITS-1 e aos domínios D2/D3 do gene ribossômico 28S, os autores verificaram diferenças em relação às amostras de cães. A possibilidade de que os isolados de raposas e cães constituíssem populações geneticamente distintas ao se utilizar o marcador dos domínios D2/D3 também foi explorado por Mohammed et al. (2003).

Posteriormente, outros autores investigaram essa possível diferença realizando estudos com marcadores moleculares para PCR e RFLP empregados em isolados da Argentina, Brasil e Estados Unidos (SREEKUMAR et al., 2004). Nesse trabalho os autores compararam amostras de *H. heydorni* empregando métodos como polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) e análise de fragmentos gerados pelo polimorfismo dos fragmentos gerados por enzima de restrição (RFLP). Com esse estudo, inferem que a heterogeneidade das amostras nada tem haver com a distribuição geográfica ou com a espécie hospedeira, mas deixam clara a existência de duas linhagens de *H. heydorni*.

Já ABEL et al. (2006) utilizou-se de seqüências ITS-1 e de seqüências codificadoras do gene alfa-tubulina para o estudo dos isolados de *H. heydorni* de raposa e cães. Duas linhagens foram reconhecidas e elas diferiram em genes codificadores de alfa-tubulina por uma inserção-deleção de 9 pb, além de diferenças em substituições de nucleotídeos em ITS-1. Monteiro et al. (2007) pesquisando variabilidade em locus ITS-1 e HSP70, também verificaram a ocorrência de duas linhagens dentro da espécie *H. heydorni*.

Todavia estudos epidemiológicos sobre os parasitos do gênero *Hammondia* são muito difíceis de serem realizados, pois não há exames sorológicos disponíveis para a detecção de infecção por *Hammondia*, sendo que os métodos de diferenciação desses coccídios dos demais são baseados somente em métodos moleculares (MUGRIDGE et al., 1999; MONTEIRO et al., 2008).

2.5. BESNOITIA

Besnoitia sp são coccídios apicomplexas que tem por hospedeiro intermediário caprinos, eqüinos, bovinos, roedores, gambás e lagartos (DUBEY, 1993; VENTURINI et al., 2002). Há nove espécies de *Besnoitia* conhecidas (*Besnoitia jellisoni*, *Besnoitia wallacei*, *Besnoitia darlingi*, *Besnoitia bennetti*,

Besnoitia besnoiti, *Besnoitia caprae*, *Besnoitia tarandi*, *Besnoitia akodoni* e *Besnoitia oryctofelisi*) e algumas têm o seu ciclo de vida e seus hospedeiros bem estabelecidos como *B. wallacei*, *B. darlingi* e *B. oryctofelisi*, que possuem o gato como hospedeiro definitivo, mas outras ainda necessitam de mais estudos (VENTURINI et al., 2002; DUBEY, 2002c, 2003c).

Taquizoítas e cistos teciduais são estágios da *Besnoitia* encontrados no hospedeiro intermediário enquanto que esquizontes e gamontes ocorrem em hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 2003c). Os cistos teciduais de *Besnoitia* são diferentes dos cistos dos outros coccídeos, porque neles ocorre a inclusão do núcleo da célula do hospedeiro (DUBEY et al., 2003c).

Neste gênero, uma das espécies mais estudadas é a *Besnoitia besnoiti* que é responsável pela besnoitiose bovina doença não fatal, mas que provoca um considerável impacto econômico (SCHARES et al., 2009). Besnoitiose bovina tem como sintomatologia na fase aguda elevada temperatura aumento da frequência cardíaca e respiratória, inchaço dos linfonodos, diarreia, desenvolvimento de formações nodulares ao nível da pele, tecido conjuntivo subcutâneo, membranas mucosas, aparelho digestivo, respiratório, circulatório e genito-urinário e, ocasionalmente, abortamentos (CORTES et al., 2003, 2006).

A doença acomete animais em vários países da África, Ásia e Europa, porém ela ainda não foi encontrada nos países do norte europeu. Contudo, há evidências que a doença esteja se espalhando para o norte da França (ALZEU et al., 2007).

Em relação ao ciclo de vida, os bovinos são os hospedeiros intermediários deste parasita na infecção natural, mas ainda não se pode inferir nada sobre o hospedeiro definitivo. Neste contexto, embora alguns autores já tenham sugerido o gato como hospedeiro definitivo, no entanto o assunto é controverso (DUBEY, 1976; CORTES et al., 2003). BIGALKE em 1968 verificou que tabanídeos poderiam carregar mecanicamente, em seu aparelho bucal sugador, as formas assexuadas do parasito, transmitindo-o de um hospedeiro a outro.

Diagnósticos com base na morfologia da *Besnoitia* são difíceis, devido variação do tamanho do cisto tecidual e da espessura da parede deste cisto. Ressalta-se que tais características dependem do hospedeiro intermediário, assim como a afinidade aos tecidos e a duração da infecção (DUBEY et al., 2003c).

Outros meios diagnósticos como o histopatológico já foram testados se mostrando muito eficazes em animais com doença aguda onde há vários depósitos

de cistos nodulares na pele. Porém, esse tipo de diagnóstico não é recomendando para animais em fase crônica onde esses nódulos se tornam escassos (CORTES et al., 2004).

Pare et al. (1995) realizaram estudos de sorodiagnóstico com o teste ELISA, mostrando que o uso de antígenos somáticos em ELISA pode apresentar uma maior sensibilidade diagnóstica, porém pode haver alguns problemas de especificidade, exigindo assim, um teste confirmatório adicional. Com isso Cortes et al. (2006) utilizou o Western-Blot como teste confirmatório ao ELISA. Contudo, ambos os testes realizados por estes autores demonstraram a ocorrência de reação cruzada contra respostas a *N. caninum* e *T. gondii*.

Além dos testes indiretos, iniciaram-se estudos moleculares para diagnóstico das espécies de *Besnoitia*. Schares et al. (2009) realizou um estudo em que utilizou os genes 18S ribossomal e ITS -1 para detectar a presença de *Besnoitia besnoiti* em gado de corte na Alemanha. Ellis et al. (2000) fez um estudo da filogenia de *Besnoitia* com o gene 18S tentando relacioná-la com *T. gondii*, *N. caninum* e *H. hammondi*. Os resultados dessas análises mostraram que *Besnoitia* é um grupo irmão dos demais *Toxoplasmatineos*, porém distante dos gêneros *Hammondia*, *Neospora* e *Toxoplasma*.

Grissard et al. (1997) relata o encontro de uma espécie de *Besnoitia sp* em um roedor denominado *Akodon montensis* na área rural do município de Timbó, Santa Catarina. O parasita foi isolado e transmitido para camundongos de laboratório por inoculação parenteral de bradizoitos e taquizoitos. Foram realizados testes imunológicos para detecção de *Besnoitia sp* no soro dos camundongos além de exames de cortes histológicos. Ambos os diagnósticos confirmaram a presença desse agente.

Dubey et al. (2003c), caracterizou as amostras de Timbó para dois genes, sendo eles o SSU rRNA o gene ITS-1. Com esse estudo os autores mostraram que a *Besnoitia* encontrada no Brasil não era a *B. jellisoni* e sim uma nova espécie que foi nomeada como *Besnoitia akodoni*.

2.6 FILOGENIA DOS TOXOPLASMATINAE

Descrição de gêneros e espécies dentro da sub-família *Toxoplasmatinae* vem sendo feita com base em dados fenotípicos como especificidade de hospedeiro, padrões de ciclo de vida, grau de heteroxenia (heteroxenia facultativa ou obrigatória), modo de transmissão dos estágios infecciosos, categoria de células parasitadas bem como morfologia e localização dos cistos teciduais.

Por outro lado, dados moleculares podem ser obtidos sem necessariamente o conhecimento de características de ciclo de vida, pois muitas vezes podem ser recuperados de qualquer forma de vida do parasito. Ainda, este tipo de informação fornece maior número de dados filogeneticamente informativos para inferências evolutivas, em especial para o caso de organismos estreitamente relacionados. De fato, caracteres moleculares atendem a premissa evolutiva de homologia, bem como possuem suficiente variabilidade para fornecer diferentes estados de caractere (RUSSO, 2001).

Reconstruções filogenéticas baseadas nas informações do gene codificador da unidade 28S do RNA ribossômico oferecem informações suficientes para que seja sugerido que os membros da sub-família *Toxoplasmatinae* sejam organizados em um clado estatisticamente bem suportado, separando-os dos demais gêneros da Família *Sarcocistidae* (ELLIS et al., 1999; MURGRIDGE et al., 1999). Todavia, nestas análises o gênero *Hammondia* é parafilético, pois *H. heydorni* e *N. caninum* formam *clusters* distintos do grupo formado por *H. hammondi*, *T. gondii*.

Os primeiros estudos filogenéticos de *Toxoplasmatineos* em que foram utilizados genes codificadores de proteína como marcadores moleculares demonstraram que os táxons *H. hammondi* e *T. gondii* são monofiléticos e geneticamente muito próximos, mas contrariando os resultados de outros autores, não foi demonstrada a monofilia entre os táxons *H. heydorni* e *N. caninum*. (MONTEIRO et al., 2007). De fato, a análise de diversidade nucleotídica de gene codificador de proteína de choque térmico mostra que a distância entre *H. heydorni* e *N. caninum* é tão grande quanto a distância de cada uma destas espécies com *T. gondii*. Em adição, foi possível identificar, dentre as amostras de oocistos, duas linhagens divergentes de *H. heydorni*. Os resultados mostram que as espécies *H.*

heydorni e *N. caninum* são espécies bastante divergentes do ponto de vista filogenético.

Até o momento, em todos os estudos filogenéticos sobre a sub-família Toxoplasmatinae somente seqüências de genoma nuclear foram empregadas. Porém genes extra nucleares podem ser utilizados como marcadores eficientes para identificação desses parasitas e para construção de história evolutiva.

O gene Cyt B tem se mostrado um marcador molecular de grande valor para as filogenias moleculares, pois tem permitido a reconstrução de histórias evolutivas nas mais diversas classes de organismos, desde salamandras, rãs, roedores até insetos como os triatomídeos (FAIVOVICH et al., 2005; MARTINEZ et al., 2006; JING et al., 2007; MATSUI et al., 2007). Entretanto, a despeito de sua aplicabilidade para diversos modelos biológicos, em estudos com protozoários do filo Apicomplexa apenas reconstruções filogenéticas para os gêneros *Plasmodium* e *Leishmania* tem sido descritas (PERKINS, 2000; RICKLEFS; FALLON, 2002; PERKINS; SCHALL, 2002; SCHRENZEL et al., 2003; RICKLEFS et al., 2004; BEADELL et al., 2006; FOULET et al., 2007).

Os genes mitocondriais são de transmissão materna em metazoários, pois estão presente no DNA mitocondrial e, assim como o gene codificador de proteína de choque térmico estudado por Monteiro et al. (2007), é codificador de uma proteína universal encontrada em muitos organismos eucariontes (ESCALANTE et al., 1998). O gene Cyt B não é afetado por múltiplas substituições de nucleotídeos fixadas por pressões seletivas, já que muitas das substituições encontradas neste locus são sinônimas (MEYER 1994; AVISE, 1998). Além disso, pelo fato de ser um gene codificador de uma proteína universal, permite que alinhamentos de seqüências homólogas possam ser realizados com confiabilidade maior que os alinhamentos de seqüências de genes codificadores de RNA ribossômicos ou seqüências não codificadoras (RUSSO, 2001).

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 associado uma cianobáctéria. Porém, em alguns trabalhos mais recentes sugere-se a alga verde como o ancestral desse DNA, e outros a alga

vermelha como a origem mais provável (MCFADDEN et al., 1997; BLANCHARD; HICKS, 1999; OBORNIK et al., 2009). 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.

Kohler et al. (1997), analisaram genes presente em plastídios que também estavam presentes e conservados em alguns procariotos, demonstrando assim a plausibilidade da ocorrência de fixação do material nuclear dos plastídios. Até o momento não se sabe muito sobre a função do apicoplasto e quais as proteínas ele é capaz de produzir. O que se sabe até o momento é que o apicoplasto possui uma herança uniparental, e que apresentam DNA conservado o que o torna uma importante ferramenta para escrever histórias evolutivas (FEAGIN, 1994; KOHLER et al., 1997).

Alguns estudos têm utilizado os genes de apicoplasto para a caracterização de organismos, para ampliação do conhecimento do genoma dessa organela, para elaboração de drogas mais eficientes e resoluções de questões filogenéticas (FEAGIN, 1994).

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 *Eimeria tenella* e *Babesia bovis* já foram estudados com esse marcador (RATHORE et al., 2001; MARTINSEN et al., 2008; LAU et al., 2009). Outro gene importante encontrado no apicoplasto é o codificador da subunidade beta de RNA polimerase DNA dependente (RpoB), essa subunidade processa a atividade da polimerase, que é catalizar a síntese de RNA. Em alguns organismos como as bactérias essa subunidade é bastante pesquisada como alvo para a produção de drogas anti-bacterianas, pois bactérias como a *Mycobacterium tuberculosis* são resistentes a essa droga (KAPUR et al., 1994). Já o *P. falciparum* é sensível a essa droga que provoca a morte do parasita (FEAGIN, 1994).

3 OBJETIVOS

- Desenhar e empregar *primers* para PCR para identificar membros da sub-família Toxoplasmatinae a partir de seqüências gênicas codificadoras de citocromo B (CytB), situado no genoma mitocondrial do parasito e de genes codificadores da subunidade beta de RNA polimerase (RpoB) e o gene ClpC, que codifica um produto pertencente a família de proteínas caseinolíticas ambos encontrados no genoma de apicoplasto.
- Propor reconstrução filogenética dos organismos estudados com os dados obtidos e com aqueles recuperados de bases de dados de acesso público.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 AMOSTRAS

Foram utilizadas as seguintes amostras de parasitos provenientes do Laboratório de Doenças Parasitárias do VPS-FMVZ-USP:

- **Tgol:** taquizoitos RH88, arquétipo clonal Tipo I (*Toxoplasma gondii*)
- **Tgoll:** taquizoitos CTG, arquétipo clonal Tipo II (*Toxoplasma gondii*)
- **Tgolll:** taquizoitos PTG: arquétipo clonal Tipo III (*Toxoplasma gondii*)
- **Tgo115:** oocistos (*Toxoplasma gondii*)
- **Tgo64:** oocistos (*Toxoplasma gondii*)
- **Hha300:** oocistos (*Hammondia hammondi*)
- **Hha305:** oocistos (*Hammondia hammondi*)
- **Nca:** taquizoitos Nc-1 (*Neospora caninum*)
- **Nca10/05:** oocistos (*Neospora caninum*)
- **HheV2:** oocistos (*Hammondia heydorni*)
- **HheV3:** oocistos (*Hammondia heydorni*)
- **HheV5:** oocistos (*Hammondia heydorni*)
- **HheV8:** oocistos (*Hammondia heydorni*)
- **Hhe376:** oocistos (*Hammondia heydorni*)
- **HheBR:** oocistos (*Hammondia heydorni*)

Também foram empregadas amostras de DNA de *Neospora hughesi* (**Nhu**), isolado Oregon, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Luís Fernando Pita Gondim da Universidade Federal da Bahia e amostras de taquizoitos de *Besnoitia akodoni* (**Bak**), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor, da Universidade Federal de Minas Gerais.

As amostras de oocistos foram obtidas de cães naturalmente infectados, cujas amostras estavam estocadas nos laboratórios do VPS/FMVZ/USP. Estas amostras de oocistos já haviam sido previamente caracterizadas por Monteiro et al. (2007), através de filogenia molecular de genes nucleares. As amostras de taquizoitos de *N. caninum* e *T. gondii* foram obtidas de cultura celular e de camundongos inoculados, respectivamente.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA E PCR

Os oocistos detectados diretamente em lâminas microscópicas pelo método de flutuação em sacarose foram recolhidos das mesmas em placas de Petri estéreis. Para tanto, cada lâmina contendo o material observado foi lavada com solução TE (TrisHCl pH 8,0 10mM, EDTA 1mM) sobre placa de Petri. O lavado obtido foi transferido da placa para microtubos de 1,5mL e a seguir centrifugado por 12.000xg por 5 minutos. O sedimento contendo os oocistos foi ressuspensionado em 500uL de um tampão de lise (TrisHCl pH 8,0 50mM, EDTA 25mM, NaCl 100mM, 10ug/mL, SDS 1%) e depois submetido a três ciclos consecutivos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Após o ciclo de congelamento e descongelamento, foi adicionado a cada amostra enzima proteinase K qsp 10ug/mL.

Sedimentos de taquizoitos de cultura celular ou de lavado peritoneal de camundongos foram tratados da mesma forma que sedimentos de oocistos exceto pelos ciclos de congelamento e descongelamento.

Imediatamente após a adição de proteinase K, as amostras foram incubadas em banho-maria por duas horas a 56°C ou “overnight” a 37°C. Após a digestão, adicionou-se 250µl de fenol e 250µl de clorofórmio, seguido por homogeneização em *vortex* e centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante cerca de (400 µl) foi transferido a novo microtubo e em seguida adicionou-se 400µl de propanol. A mistura alcoólica foi estocada por 2 horas em freezer -20°C. Após a retirada do freezer, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 12.000g a 4°C e em seguida o propanol foi descartado por inversão. Adicionou-se 1000µl de etanol 70% e centrifugou-se a 12.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo deixado em posição invertida até estar totalmente seco.

Por fim adicionou-se 30µl de TE (10mM Tris HCL pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) ao sedimento e então as amostras foram homogeneizadas em *vortex* e incubadas a 56°C por 10 minutos. As soluções resultantes foram guardadas em freezer a – 20°C até a sua utilização.

4.3 DESENHO DOS *PRIMERS*

Primers foram desenhados a partir de seqüências do gene CytB obtidas em pesquisa de bancos de dados de seqüências EST e de RNAm de *N. caninum* e de *T. gondii*, respectivamente. As seqüências obtidas dos dois parasitos foram alinhadas e *primers* consensuais foram desenhados de forma a amplificar indistintamente fragmentos gênicos de ambos os parasitos. Os *primers* desenhados são os seguintes:

CytB-F (senso): TTA CTA TAG CCA CTG CCT TCC

CytB-R (anti-senso): CCA TCC ACT GAC TAC ATT TCG

Os *primers* acima delimitam um fragmento de 608 pares de bases na seqüência gênica de *T. gondii*. Nesta espécie, o gene CytB é composto de 1080 nucleotídeos e o fragmento gerado pelos *primers* está localizado entre as posições 338 e 945 (posições contadas a partir da primeira posição do códon de iniciação).

Primers foram desenhados também a partir de seqüências do gene *RpoB* obtidas em bancos de dados de seqüências genômicas, à semelhança do método empregado para desenhar os *primers* para CytB. Este gene foi selecionado porque há seqüências disponíveis para parasitos do grupo Toxoplasmatinae, como *T. gondii*, *N. caninum* e *Besnoitia* spp.. As seguintes seqüências foram recuperadas: *N. caninum*, AF138960; *T. gondii* AF095904; *Besnoitia oryctofelisi*, AY181999 e *Besnoitia darlingi*, AY181998. A seguir, as seqüências dos quatro parasitos foram alinhadas e *primers* consensuais foram desenhados de forma a amplificar indistintamente fragmentos gênicos de todas as espécies relacionadas acima. Os *primers* são os seguintes:

RpoB (senso): ATT TTT GTG GAT ATG ATT TTG AAG ATG C

RpoB (antisenso): TTT CCA TAT CTT CCA CAT AAT TTA TCT C

Os *primers* acima delimitam um fragmento de 517 pares de bases na seqüência gênica de *T. gondii*. Nesta espécie, a ORF que contém gene *RpoB* é composto de 3156 nucleotídeos e o fragmento gerado pelos *primers* está localizado entre as posições 1892 e 2408 (posições contadas a partir da primeira posição do códon de iniciação).

Finalmente, *primers* foram desenhados a partir de seqüências do gene *ClpC* obtidas em pesquisa de bancos de dados de seqüências genômicas. Foram obtidas

seqüências de *T. gondii* (gi 5231237) e de parasitos do gênero *Sarcocystis* (gi 165880123 e gi 165880121). A seguir, as três seqüências foram alinhadas e *primers* consensuais foram desenhados de forma a amplificar indistintamente fragmentos gênicos destas espécies de parasitos. Os *primers* são os seguintes:

ClpC F (senso): 5' GCT GAT TTA ATT AGA TTT GAT ATG AGT G 3'

ClpC R (antisenso): 5' GGC GTG CAC CAT ATA ATG GAT GA 3'

Os *primers* acima delimitam um fragmento de 601 pares de bases na seqüência gênica de *T. gondii*. Nesta espécie, o gene ClpC é composto de 2298 nucleotídeos e o fragmento gerado pelos *primers* está localizado entre as posições 1522 e 2122 (posições contadas a partir da primeira posição do códon de iniciação).

4.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

O protocolo de amplificação empregado utilizou 45µL de mix de reagentes (24,2 µL H₂O mQ, 8 µL dNTP (1,25mM), 3 µL de cada primer (10pmol/ µL), 5 µL de 10X PCR Buffer, 1,5 µL MgCl₂ (50mM), 0,5 µL taq Polimerase) e 5µL de amostra, resultando no total de 50 µL em cada microtubo que foi levado à máquina termocicladora.

O termociclador utilizado, da marca Eppendorf, realizou a reação em 2h35min, sendo que cada ciclo era composto de 2min a 95°C, 30s a 95°C, 35s a 53°C, 40s a 72°C, repetido 40 vezes. Após as repetições, era mantido a 72°C por 5min e finalmente levado a 15°C.

4.5 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em cuba horizontal, imersos em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA 1mM). A foto documentação dos géis com os fragmentos amplificados foi com auxílio da câmera Image Master GE Healthcare.

Logo após a eletroforese as bandas de interesse foram excisadas do gel e então eluídas da matriz de agarose com o auxílio de kit comercial, seguindo instruções do fabricante (GFX Gel extraction system).

4.6 SEQÜENCIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Para a reação de seqüenciamento automático foi utilizado o kit comercial BigDye™ terminator – cycle sequencing ready reaction – Applied Biosystems. O DNA obtido de cada produto de PCR após a reação de purificação descrita no item anterior foi utilizada como amostra para a reação de seqüenciamento. Cada produto de PCR foi seqüenciado em duplicata, com os *primers* senso e anti-senso para cada reação.

As quantidades de reagentes utilizados para a reação de seqüenciamento são: SaveMoney - 2 µl; Big Dye - 2 µl; Primer - 1 µl. A quantidade de DNA colocada é a de 5 µl. As sequencias do cromatograma foram editadas usando o programa Sequencher 4.1 (Genocodes Corp).

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

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

O ciclo é repetido por 39 vezes a partir da segunda etapa (Desnaturação) ao terminar a reação o termociclador mantém as amostras a 10°C até a retirada do aparelho.

4.7 PRECIPITAÇÃO DO DNA

Nas amostras seqüenciadas são adicionadas 40 µl de isopropanol a 65%. Essas foram homogeneizadas em *vortex* e incubadas a temperatura ambiente e no escuro por 30 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 30 minutos.

O sobrenadante foi descartado com auxílio de pipeta e em seguida adicionou-se 300 µl de etanol 70%. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 14.000g por 10 minutos.

O etanol foi removido com auxílio de 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 precipitadas foram guardadas a -20°C até o momento de irem ao seqüenciador.

4.8 ELETROFORESE DE SEQÜENCIAMENTO

As amostras foram homogeneizadas com formamida, colocadas em banho seco por 3 minutos a 95°C e depois refrigeradas a 4°C por 2 a 4 minutos. Em seguida foram aplicadas na placa de seqüenciamento através do protocolo do manual técnico do equipamento ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

4.9 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

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

Determinada as seqüências 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 seqüências homólogas disponíveis no GenBank.

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

Os parâmetros para as reconstruções filogenéticas estão indicados sob as árvores, na legenda das respectivas figuras.

4.10 CLONAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS (SOMENTE PARA OS PRODUTOS DO GENE CYTB)

Foi empregado o kit TOPO TA *cloning kit for sequencing* (Invitrogen) para a clonagem dos produtos de PCR obtidos das amostras. Os produtos de PCR foram inseridos em plasmídeos pCR4-TOPO e o produto final foi empregado para transformar linhagens de *Escherichia coli* TOP10, seguindo estritamente as condições do manual do kit. As colônias transformantes (resistentes a Ampicilina) foram recuperadas e submetidas à extração de DNA plasmidial, seguindo protocolo descrito por Ausubel (1994). Após precipitação com Etanol, os plasmídeos foram usados como amostra para PCR empregando os primers T3 e T7, disponíveis no *kit* para clonagem e complementares a regiões do plasmídeo. Os produtos desta PCR correspondem a um fragmento do tamanho do inserto que foi adicionado ao plasmídeo somado a cerca de 100 nucleotídeos correspondentes a regiões do plasmídeo que flanqueiam o sítio de clonagem onde os primers T3 e T7 ancoram-se.

5 RESULTADOS

5.1 CITOCROMO B (CytB)

As bandas mostradas na figura 1 foram geradas a partir dos *primers* elaborados para região codificadora de citocromo B do DNA mitocondrial, responsáveis por amplificar um produto de PCR de 608 pares de bases.

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados de gene codificador de citocromo B

1. DNA ladder com fragmentos múltiplos de 100bp
2. Tgo115 (*Toxoplasma gondii*)
3. Hha305 (*Hammondia hammondi*)
4. Nhu (*Neospora hughesi*)
5. Nca10/05 (*Neospora caninum*)
6. HheV4 (*Hammondia heydorni*)
7. Água ultrapura
8. Tgol (*Toxoplasma gondii*)

Todos os produtos de PCR das amostras elencadas no item Amostras de Material e Métodos (exceto a amostra Bak) foram purificados e seqüenciados conforme a descrição pertinente. Porém, após a purificação dos produtos de PCR de cada amostra, notou-se que os mesmos eram compostos por dois fragmentos de dimensões bastante similares (Figura 2), o que nos levou a concluir que os *primers* poderiam possuir outros sítios de hibridização na seqüência alvo ou poderiam amplificar outros sítios.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados de gene codificador de citocromo B purificado pelo Kit GFX.

1. Tgo115 (*Toxoplasma gondii*)
2. Tgo1 (*Toxoplasma gondii*)
3. Tgo64 (*Toxoplasma gondii*)
4. Hha300 (*Hammondia hammondi*)
5. Hha305 (*Hammondia hammondi*)
6. Nca10/05 (*Neospora caninum*)
7. Nhu (*Neospora hughesi*)
8. HheV4 (*Hammondia heydorni*)
9. HheV3, (*Hammondia heydorni*)
10. HheV8, (*Hammondia heydorni*)
11. HheV5, (*Hammondia heydorni*)
12. Hhe09/06, (*Hammondia heydorni*)

Estes produtos de PCR purificados foram então submetidos a seqüenciamento automático. Os cromatogramas obtidos revelaram a presença de picos de fluorescência com pouca resolução, indicando provável ocorrência de mistura de seqüências.

Tal condição é esperada em casos de seqüenciamento de produtos amplificados contendo mistura de seqüências e, portanto com possibilidade de competição entre sítios de hibridização para os *primers*. A figura 3 mostra um cromatograma onde se percebe uma seqüência com baixa qualidade, decorrente da sobreposição de picos de fluorescência.

Figura 3 - Cromatograma obtido após sequenciamento automático de produto de PCR amplificado a partir da amostra HheV5.

Uma estratégia para contornar este problema é a clonagem dos produtos de PCR para que seja possível isolar cada um dos fragmentos obtidos com a PCR. Estes produtos, depois de inseridos em plasmídeos, devem ser clonados em sistema procariótico competente para posterior seqüenciamento do plasmídeo transformado.

O procedimento de clonagem foi então realizado, mas empregando-se apenas as seguintes amostras:

1. Nca (*Neospora caninum*)
2. HheBR, (*Hammondia heydorni*)
3. Nhu (*Neospora hughesi*) isolado Oregon
4. Tgol (*Toxoplasma gondii*)
5. Hha300 (*Hammondia hammondi*)
6. Hhe376 (*Hammondia heydorni*)

Pelo trabalho realizado por Monteiro et al. (2007), duas linhagens de *H. heydorni* foram descritas. As amostras de *H. heydorni* utilizadas acima foram escolhidas para que ambas as linhagens fossem contempladas em nossas análises. Assim a linhagem I ou HheI é representada pela amostra Hhe376 enquanto a linhagem II ou HheII, pela amostra HheBR.

Após a clonagem, de cinco a dez colônias obtidas de cada amostra tiveram o plasmídeo extraído e o fragmento recombinante de cada colônia foi amplificado

empregando-se os *primers* T3 e T7, específicos para as regiões do plasmídeo que flanqueiam o sítio recombinante do mesmo conforme figura 4.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR inserido em plasmídeo para o gene CytB sobre amostras de plasmídeos transformados

1. Lader
2. HheBR (*Hammondia heydorni*)
3. HheBR (*Hammondia heydorni*)
4. HheBR *Hammondia heydorni*
5. HheBR *Hammondia heydorni*
6. HheBR *Hammondia heydorni*
7. Nca *Neospora caninum*
8. Nca *Neospora caninum*
9. Nca *Neospora caninum*
10. Nca *Neospora caninum*
11. Nca *Neospora caninum*
12. Hha300 *Hammondia hammondi*
13. Hha300 *Hammondia hammondi*
14. Nhu *Neospora hughesi*
15. Nhu *Neospora hughesi*
16. Tgol *Toxoplasma gondii*
17. Nhu *Neospora hughesi*
18. Nhu *Neospora hughesi*
19. Nhu *Neospora hughesi*
20. Nhu *Neospora hughesi*
21. Tgol *Toxoplasma gondii*
22. Tgol *Toxoplasma gondii*
23. Tgol *Toxoplasma gondii*
24. Hha 300 *Hammondia hammondi*

Os fragmentos obtidos foram eluídos do gel e seqüenciados com os *primers* T3 e T7. Após as análises dos cromatogramas as seqüências foram editadas e empregadas para análises filogenéticas. Não foram encontradas seqüências de diferentes tamanhos ou picos de fluorescência com pouca resolução após o

procedimento de clonagem. Assim, as bandas duplas que foram geradas pelos *primers* para gene codificador de citocromo B permanecem sem elucidação.

As seqüências obtidas foram submetidas ao BLAST para busca de seqüências homólogas pertencentes a outros organismos filogeneticamente próximos aos Toxoplasmatíneos e que pudessem servir como grupo externo em relação às espécies analisadas. Com esta busca, somente foi possível obter seqüências EST de *Sarcocystis neurona*. As seqüências EST, por serem produtos do transcrito celular não são apropriadas para estudos filogenéticos em razão de não serem necessariamente cópias fiéis do genoma do parasito.

Como não foi encontrada nenhuma outra seqüência genômica de integrante da família *Sarcocystidae*, foi necessário amplificar uma amostra de parasito que pudesse ser usada como grupo externo.

Para tanto foi utilizada a amostra de taquizoitos de *Besnoitia akodonti* (Bak). Este gênero é reconhecidamente o mais próximo conhecido dos demais agentes estudados, e é pertencente à sub-família Toxoplasmatinae.

Esta amostra foi amplificada e seqüenciada com sucesso, exatamente como as amostras de outros toxoplasmatíneos. Porém, os produtos de CytB para esta amostra não precisaram ser clonados visto que o seqüenciamento direto a partir dos produtos de PCR foram de boa qualidade.

As reconstruções filogenéticas empregando-se este gene podem ser encontradas nas figuras 5, 6 e 16. Na figura 21 encontra-se o alinhamento das seqüências de CytB utilizadas nesta análise. Foi possível seqüenciar um total de 549 nucleotídeos. O alinhamento das seqüências mostra que nenhuma inserção ou deleção ocorre no fragmento analisado.

Figura 5 – Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 8 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 549 nucleotídeos da região codificadora de citocromo B. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi* e **Sne EST**: *Sarcocystis neurona*. Outgroup: Sne EST

Figura 6 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 7 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 549 nucleotídeos da região codificadora de citocromo B. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*. Outgroup: Bak

5.2 SUBUNIDADE BETA DE RNA POLIMERASE (RpoB)

Os *primers* desenhados para amplificar o gene RpoB foram capazes de gerar o produto esperado de cerca de 500 pares de bases de todas as amostras de Toxoplasmatíneos (Figura 7). Na figura 7 não estão mostradas as bandas obtidas com as amostras Bak e Hhe376.

Figura 7 – Foto do gel de agarose amplificando os produtos de RpoB

1. DNA ladder com fragmentos múltiplos de 100bp
2. Nca (*Neospora caninum*)
3. HheBR, (*Hammondia heydorni*)
4. Água ultra-pura
5. Nhu (*Neospora hughesi*) isolado Oregon
6. TgoI (*Toxoplasma gondii*)
7. Hha300 (*Hammondia hammondi*)

Após as análises dos cromatogramas, as seqüências foram editadas para serem utilizadas na análise filogenética. Não foram encontrados seqüências de baixa qualidade, como aquelas encontradas para o gene CytB. Na figura 8 mostra-se o cromatograma no qual é possível notar a qualidade do seqüenciamento e a inexistência de picos sobrepostos como aqueles encontrados no gene mitocondrial. O alinhamento das seqüências é mostrado na figura 17. Foi possível seqüenciar entre 440 e 449 nucleotídeos das diferentes espécies. O alinhamento das seqüências mostra que inserções ou deleções ocorrem no fragmento analisado. Os fragmentos mais longos com 449 nucleotídeos foram obtidos de Bak e os mais curtos de Nca e Nhu. Os fragmentos gerados por Hhel, Hhell, Hha e Tgo foram de 446 nucleotídeos.

Figura 8 - Cromatograma obtido após sequenciamento automático de produto de PCR amplificado a partir da amostra Bak para o gene RpoB.

As seqüências obtidas foram submetidas ao BLAST para a busca de seqüências homólogas pertencentes a outros organismos filogeneticamente próximos aos da sub-família Toxoplasmatinae. As seqüências homólogas encontradas foram duas espécies de *Besnoitia*, *Besnoitia oryctofelisi* (AY181999) e *Besnoitia darlingi* (AY181998). Além dessas seqüências, encontrou-se também três seqüências referentes ao gênero *Sarcocystis* que também foram admitidas como grupo externo. Essas foram: *Sarcocystis falcatula* (AY165001), *Sarcocystis neurona* (AY165000) e *Sarcocystis lindsayi* (AY164997).

As reconstruções filogenéticas empregando-se este gene podem ser encontradas nas figuras 9, 10 e 17. Na figura 23 encontra-se o alinhamento das seqüências de RpoB utilizadas nesta análise.

Figura 9 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 12 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 449 nucleotídeos da região codificadora de RpoB. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodonti*; **Bda 27884026**: *Besnoitia darlingi*; **Bor 27884028**: *Besnoitia oryctofelisi*; **Sne 27469347**: *Sarcocystis neurona*; **Sfa 27469345**: *Sarcocystis falcatula*; **Sly 27469341**: *Sarcocystis lindsayi*. Outgroup: Sne, Sfa e Sly

Figura 10 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 12 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 449 nucleotídeos da região codificadora de RpoB. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodonti*; **Bda 27884026**: *Besnoitia darlingi*; **Bor 27884028**: *Besnoitia oryctofelisi*. Outgroup: Bak, Bda e Bor

5.3 UNIDADE C DA PROTEÍNA CASEINOLÍTICA (ClpC)

Os *primers* desenhados para amplificar o gene ClpC amplificaram fragmentos de cerca de 600 pares de bases de todos os integrantes da subfamília Toxoplasmatinae, incluindo Bak. Não está disponível a foto dos produtos desta PCR.

Após o seqüenciamento dos produtos de PCR, os cromatogramas das seqüências foram editados para serem utilizadas na análise filogenética. Picos sobrepostos e de baixa qualidade não foram encontrados para esse gene (Figura 11).

Figura 11 - Cromatograma obtido após seqüenciamento automático de produto de PCR amplificado a partir da amostra Bak para o gene ClpC.

As seqüências obtidas a partir do seqüenciamento foram submetidas ao BLAST para a busca de seqüências homólogas pertencentes a outros organismos filogeneticamente próximos a sub-família Toxoplasmatinae. Encontrou-se três seqüências homólogas, sendo essas de *Eimeria tenella* (AY217738), *Sarcocystis* sp (EU371500) e *Sarcocystis* sp (EU371499). Seqüências EST de *Sarcocystis neurona* (CV193278) e *Sarcocystis falcatula* (DV177580) foram recuperadas e empregadas como *outgroup* em algumas das reconstruções filogenéticas. As figuras 12 a 15 e 18

contém as reconstruções filogenéticas para o gene ClpC. Na figura 22 encontra-se o alinhamento das sequências de ClpC utilizadas nesta análise.

Figura 12 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 8 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 482 nucleotídeos da região codificadora de ClpC. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*). Outgroup: Bak

Figura 13 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 10 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 482 nucleotídeos da região codificadora de ClpC. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*; **Ssp 165880123**: *Sarcocystis* sp **Ssp2 165880121**: *Sarcocystis* sp. Outgroup: Ssp 165880123 e Ssp2 165880121

Figura 14 – Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 12 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 482 nucleotídeos da região codificadora de ClpC. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodonti*; **Ssp 165880123**: *Sarcocystis* sp **Ssp2 165880121**: *Sarcocystis* sp; **Sfa 77051640**: *Sarcocystis falcatula*; **Sne 52122115**: *Sarcocystis neurona*. Outgroup: Sfa, Sne, Ssp e Ssp2

Figura 15 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatineos com 13 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 482 nucleotídeos da região codificadora de ClpC. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodonti*; **Ssp 165880123**: *Sarcocystis* sp **Ssp2 165880121**: *Sarcocystis* sp; **Sfa 77051640**: *Sarcocystis falcatula*; **Sne 52122115**: *Sarcocystis neurona*; **Ete 31322455**: *Eimeria tennela*. Outgroup: Ete

Figura 16 - Reconstruções filogenéticas do grupo dos Toxoplasmatineos, inferida por método de máxima parcimônia com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, utilizando 549 nucleotídeos da região codificadora de citocromo B. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **HheI**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **HheII**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi* e **Sne EST**: *Sarcocystis neurona*

Figura 17 - Reconstruções filogenéticas do grupo dos Toxoplasmatineos, inferida por método de máxima parcimônia com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando 449 nucleotídeos da região codificadora de RpoB. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **HheI**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **HheII**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*; **Bda 27884026**: *Besnoitia darlingi*; **Bor 27884028**: *Besnoitia oryctofelisi*; **Sne 27469347**: *Sarcocystis neurona*; **Sfa 27469345**: *Sarcocystis falcatula*; **Sly 27469341**: *Sarcocystis lindsayi*

Figura 18 - Reconstruções filogenéticas do grupo dos Toxoplasmatineos, inferida por método de máxima parcimônia com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, utilizando 482 nucleotídeos da região codificadora de ClpC. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **Hhel**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **Hhell**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodonti*; **Ssp 165880123**: *Sarcocystis* sp **Ssp2 165880121**: *Sarcocystis* sp; **Sfa 77051640**: *Sarcocystis falcatula*; **Sne 52122115**: *Sarcocystis neurona*.

5.4 ANÁLISE CONCATENADA

Foram realizadas análises concatenadas a partir dos dados obtidos para os três genes organelares (ClpC, RpoB, CytB). A construção das arvores concatenadas foram realizadas para os métodos de distancia entre vizinhos (neighbor-joining) e máxima parcimônia.

As árvores filogenéticas foram montadas a partir dos dados obtidos para os três genes dos sete táxons submetidos a análise dentro da sub-família Toxoplasmatinae. A análise concatenada dos genes proporcionou a mesma conformação filogenética encontrada nas outras arvores em que somente um gene era analisado. Não houve mudança na conformação das arvores para os dois

métodos. Nota-se apenas que no método de máxima parcimônia o bootstrap para o ancestral comum do gênero *Neospora* e aquele formado por *T.gondii* e *H.hammondi* é melhor suportado.

Figura 19 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatíneos com 7 taxons, inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando as três seqüências de organelas em análise concatenada. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **HheI**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **HheII**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*. Outgroup: Bak

Figura 20 - Reconstrução filogenética do grupo dos Toxoplasmatíneos com 7 taxons, inferida por método de parcimônia com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*, utilizando as três seqüências de organelas em análise concatenada. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4. **HheI**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **HheII**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi*. Outgroup: Bak

Tabela 1 - Conteúdo de GC (%) e identificação para os diferentes táxons empregados nas análises filogenéticas

Identificação	Espécie	RpoB	ClpC	CytB
Sfa_27469345	<i>Sarcocystis falcatula</i>	20,45	ND	ND
Sfa2_27469349	<i>Sarcocystis falcatula</i>	20,45	ND	ND
Sly_27469341	<i>Sarcocystis lindsayi</i>	20,45	ND	ND
Sne_27469347	<i>Sarcocystis neurona</i>	19,77	ND	ND
Bda_27884026	<i>Besnoitia darlingi</i>	19,15	ND	ND
Bor_27884028	<i>Besnoitia oryctocaralho</i>	18,93	ND	ND
Bak	<i>Besnoitia akodoni</i>	18,93	20,75	36,43
Hhel	<i>Hammondia heydorni linhagem I</i>	17,49	21,99	35,34
Hhell	<i>Hammondia heydorni linhagem II</i>	17,26	21,16	35,15
Hha	<i>Hammondia hammondi</i>	19,06	20,12	35,34
Tgol	<i>Toxoplasma gondii</i> arquétipo I	18,61	20,54	34,97
Tgoll	<i>Toxoplasma gondii</i> arquétipo I	18,61	20,33	ND
TgolII	<i>Toxoplasma gondii</i> arquétipo I	18,61	20,33	ND
Nhu	<i>Neospora hughesi</i>	18,41	20,95	35,70
Nca	<i>Neospora caninum</i>	18,41	20,75	35,70
Ete_31322455	<i>Eimeria tenella</i>	ND	20,75	ND
Sfa_77051640	<i>Sarcocystis falcatula</i>	ND	20,75	ND
Sne_52122115	<i>Sarcocystis neurona</i>	ND	20,95	ND
Ssp_165880123	<i>Sarcocystis sp</i>	ND	19,92	ND
Ssp2_165880121	<i>Sarcocystis sp</i>	ND	20,12	ND
Sne_EST	<i>Sarcocystis neurona</i>	ND	ND	33,70
Média		18,97	20,67	35,29
Desvio padrão		0,98	0,52	0,78

6 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, verificamos as relações filogenéticas entre organismos do grupo de protozoários classificados na sub-família *Toxoplasmatinae*, com base em informações obtidas a partir de seqüências gênicas de DNA de organelas celulares. Foram analisadas seqüências gênicas de CytB (Citocromo B, de DNA mitocondrial) e de dois genes de DNA de apicoplasto, RpoB e ClpC. O gene RpoB é codificador da subunidade B de RNA polimerase, enquanto o gene ClpC codifica um produto pertencente à família de proteínas caseinolíticas.

Nota-se que os genes de organelas possuem um conteúdo de G/C bem inferior ao de genes nucleares. Ainda, o conteúdo de G/C das três seqüências gênicas de DNA de organelas de *Toxoplasmatíneos* não é significativamente diferente do conteúdo de G/C dos táxons que foram empregados como grupo externo o que é uma característica desejável para estudos filogenéticos. Na verdade, a comparação entre genes homólogos com conteúdos de G/C muito discrepantes pode interferir nos resultados em virtude da ocorrência de viés de uso de códons (do Inglês, *codon usage bias*) (RATHORE et al., 2001).

A história evolutiva do grupo *Toxoplasmatinae* foi reconstruída empregando como grupo externo táxons muito próximos filogeneticamente dos táxons de interesse, como *Besnoitia* spp. e *Sarcocystis* spp. ambos pertencentes à família *Sarcocystidae*. MONTEIRO et al. (2007), trabalhando com reconstruções baseadas em gene codificador de HSP70 empregaram em suas análises filogenéticas táxons do gênero *Cyclospora* como grupo externo. Por serem *Eimerídeos*, os indivíduos do gênero *Cyclospora* são bem menos aproximados filogeneticamente dos *Toxoplasmatíneos* que os coccídeos formadores de cistos pertencentes à família *Sarcocystidae*. Até o momento, o gênero *Besnoitia* é o mais próximo do grupo formado pelos gêneros *Hammondia*/*Toxoplasma*/*Neospora* e por esta razão pode ser considerado o gênero de protozoário mais adequado para ser empregado como grupo externo em estudos de relações filogenéticas do grupo de interesse.

Todas as seqüências genéticas dos táxons (grupos externos) foram obtidas do GenBank, com exceção da amostra de *B. akodon*. A *B. akodon* foi a única espécie deste gênero descrita no Brasil até o momento, tendo sido isolada de um roedor silvestre (DUBEY et al., 2003c). Esta amostra teve o DNA amplificado com sucesso por todos os *primers* empregados neste estudo.

As topologias reconstruídas com outros táxons além dos *Toxoplasmatineos* permitem inferir que, de fato, os organismos do gênero *Besnoitia* estão filogeneticamente associados aos organismos do grupo *Neospora/Toxoplasma/Hammondia* (são grupos irmãos), mas a distância evolutiva entre eles é acentuada. Desta forma, mostra-se que o gênero *Besnoitia* é, de fato, o grupo de protozoário conhecido mais adequado para ser empregado como grupo externo em análises filogenéticas do grupo *Neospora/Toxoplasma/Hammondia*. Ellis et al. (2000), realizaram uma pesquisa cujo objetivo era analisar filogeneticamente algumas espécies dos gêneros *Sarcocystis*, *Frankelia*, *Neospora*, *Hammondia*, *Toxoplasma*, *Besnoitia* e *Isospora*. Os resultados para a análise filogenética feita a partir do gene 18S ribossomal mostrou que os parasitas do gênero *Besnoitia* são um grupo irmão do clado formado pelos *Toxoplasmatineos* *Neospora/Hammondia/Toxoplasma*.

Nas análises realizadas com os genes de apicoplasto, é marcante a divergência entre as duas linhagens de *H. heydorni*. Vale ressaltar que a distância evolutiva (quando comparadas as seqüências gênicas codificadoras de RpoB analisadas no presente estudo) entre *B. darlingi* e *B. oryctofelisi*, espécies que possuem o gato como hospedeiro definitivo, é comparável à distância evolutiva existente entre as duas linhagens genéticas de *H. heydorni*, que possuem o cão como hospedeiro definitivo.

Dubey et al. (2004), ao descreverem a *B. tarandi* reconstruíram a filogenia deste gênero com o emprego de seqüências ITS-1. Pelos resultados, os autores demonstraram que *B. darlingi* e *B. oryctofelisi* possuem apenas cinco diferenças nucleotídicas. O mesmo número de diferenças nucleotídicas para este locus foi encontrado entre seqüências das duas linhagens de *H. heydorni* (MONTEIRO et al., 2007). Assim, se a classificação taxonômica de *B. darlingi* e *B. oryctofelisi* é correta, ou seja, se estas duas diferentes espécies de protozoário pertencem a um mesmo gênero, é plausível supor que as duas linhagens de *H. heydorni* também possam representar espécies distintas de um mesmo gênero. Obviamente, esta hipótese poderá ser mais bem suportada quando estas duas espécies de *Besnoitia* forem analisadas com os mesmo marcadores que foram empregados nas análises das duas variantes de *H. heydorni*. Ressalta-se que as linhagens de *H. heydorni* não foram comparadas quanto a quaisquer características morfológicas.

Como comentado no parágrafo anterior, pela análise do locus ITS-1 Monteiro et al. (2007) demonstraram extenso polimorfismo entre seqüências nucleotídicas das duas linhagens de *H. heydorni*. Este polimorfismo é tão elevado quanto aquele existente entre seqüências das duas espécies de organismos do gênero *Neospora*, *N. caninum* e *N. hughesi*. Portanto, por critérios obtidos a partir de informações moleculares, se *N. caninum* e *N. hughesi* são considerados espécies diferentes, as linhagens geneticamente distintas de *H. heydorni* também seriam espécies distintas de um mesmo gênero.

O que se tentou demonstrar neste trabalho é se de fato a reconstrução filogenética entre os membros da subfamília *Toxoplasmatinae* organizaria seus membros em consonância com as espécies de seus respectivos hospedeiros definitivos, ou seja, se *H. hammondi* e *T. gondii* formariam um clado, *H. heydorni* e *Neospora* spp. formariam outro clado e estes dois cladogramas teriam então se originado de um ancestral comum. O primeiro clado seria aquele de membros cujos hospedeiros definitivos são felídeos e o segundo clado, aquele formado por membros cujos hospedeiros definitivos são canídeos. Esta hipótese não foi demonstrada.

As reconstruções filogenéticas para o gênero *Cryptosporidium*, um gênero de protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, demonstram que os organismos que se multiplicam em tecidos gástricos e os que se multiplicam em tecidos entéricos formam grupos monofiléticos (XIAO et al., 2002). Porém, em cada um dos grupos existem parasitos com diversas especificidades de hospedeiro. Por exemplo, *Cryptosporidium andersoni* é filogeneticamente mais próximo de *Cryptosporidium serpentis* do que de *Cryptosporidium bovis*. Ressalta-se que *C. andersoni* e *C. serpentis* são de replicação em tecidos gástricos enquanto o *C. bovis* é de tecido intestinal. Quanto à especificidade por hospedeiros, *C. andersoni* e *C. bovis* são específicos de ruminantes enquanto *C. serpentis* é específico de répteis.

Ainda, dentro do grupo de *Cryptosporidium* entéricos, existem espécies adaptadas a hospedeiros não ruminantes que são filogeneticamente mais próximas de *Cryptosporidium parvum* (espécie adaptada a hospedeiro bovino) do que de *C. bovis*. Ou seja, para o gênero *Cryptosporidium* a adaptação ao hospedeiro definitivo não parece ser um caractere filogeneticamente informativo.

De forma geral, os resultados de variabilidade nucleotídica encontrados com a pesquisa dos genes CytB, RpoB e ClpC não diferiram daqueles gerados com a

pesquisa de genes nucleares. Em uma análise conjunta das árvores produzidas por métodos de distância e dos dados de similaridade de nucleotídeos e de aminoácidos, verifica-se que a espécie *H. heydorni* é um táxon equidistante de todas as outras espécies de *toxoplasmatineos*.

Os posicionamentos relativos dos gêneros *Toxoplasma*, *Neospora* e *Hammondia* nas árvores filogenéticas não foram congruentes em todas as reconstruções. Analisando-se as diferentes árvores, nota-se que, dependendo dos táxons que são empregados como grupos externos, as topologias das reconstruções filogenéticas para a subfamília *toxoplasmatinae* variam e os clados formados são estatisticamente pouco suportados, pois possuem valores de *bootstrap* baixos. Na pesquisa realizada por Monteiro et al. (2007), a reconstrução filogenética da subfamília *Toxoplasmatinae* usando o gene codificador de HSP70, demonstrou que o gênero *Neospora* e o gênero *Toxoplasma* têm um ancestral comum posterior ao ancestral que teria dado origem a todos os *Toxoplasmatinae*. Porém, também neste caso, o agrupamento de *Neospora* e *Toxoplasma* em um mesmo clado é uma inferência com suporte estatístico baixo.

A análise concatenada das três seqüências de organelas revelou topologias com maior suporte estatístico, em especial na análise por parcimônia. Nesta análise o gênero *Neospora* e o gênero *Toxoplasma* têm um ancestral comum posterior ao ancestral que teria dado origem a todos os *Toxoplasmatinae*, ou seja, a topologia da reconstrução filogenética é idêntica àquela proposta por Monteiro et al. (2007).

As reconstruções filogenéticas de organismos da sub-família *toxoplasmatinae* empregando gene codificador de 28S também posicionam o gênero *Neospora* e o gênero *Toxoplasma* em um clado originado por um ancestral comum posterior ao ancestral que teria dado origem a todos os *Toxoplasmatinae* (DUBEY et al., 2004). Mas também neste caso, o agrupamento de *Neospora* e *Toxoplasma* é uma inferência com baixo suporte estatístico.

Portanto, com os resultados até então obtidos a partir das informações geradas por genes nucleares e de organelas não é possível agrupar a *H. heydorni* (em termos de ancestralidade comum) nem com *T. gondii* nem com *N. caninum*. Então, uma hipótese plausível para explicar a evolução entre *T. gondii*, *N. caninum* e *H. heydorni* seria a ocorrência de evolução radiada, ou seja, a emergência destas três espécies em tempos muito próximos ou até simultâneos.

Em uma reconstrução filogenética, diz-se de uma politomia quando não há dicotomia, 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. As politomias podem ser “leves” (*soft polytomy*), ou seja, resultado de dados insuficientes ou conflitantes; ou “consistentes” (*hard polytomy*) que indicam um evento real de especiação praticamente simultânea de mais de dois grupos, como no caso de uma radiação adaptativa.

Evento de evolução radiada foi proposto por Barth e colaboradores (BARTH et al., 2008) para explicar o posicionamento filogenético de todos os 15 membros conhecidos do complexo de espécies denominados como *Paramecium aurelia*. Nesta filogenia, os autores descartam a possibilidade de ocorrência de politomia leve em virtude de dois fatores: (i) não consideram que sua amostragem tenha sido pouco representativa, pois todas as espécies conhecidas do complexo *P. aurelia* foram contempladas no estudo; e (ii) não foi registrado ocorrência de saturação de substituições. No caso da filogenia de toxoplasmatinae, ressalta-se que todas as espécies conhecidas de organismos similares a *Toxoplasma*, *Hammondia*, e *Neospora* foram contempladas neste trabalho. Igualmente, as seqüências marcadoras não apresentaram saturação de substituições de nucleotídeos (dados não mostrados).

Nas diversas topologias reconstruídas por método de distância é possível observar que os ramos internos que se bifurcam em nós de baixo suporte estatístico são curtos. Esta pequena dimensão deve indicar que o tempo decorrido para a ocorrência de especiação foi demasiado curto 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, CHUBB; 2004 e ; WHITFIELD; LOCKHART, 2007.

Em resumo, a reconstrução de topologias com ramos curtos que derivam nós de baixo suporte estatístico somada à equidistância evolutiva entre os táxons avaliados (*Neospora* spp., *H. heydorny* e *T. gondii*) permite supor que uma politomia consistente poderia explicar a evolução para estes organismos, ou seja, a resolução para o posicionamento relativo entre os táxons *T. gondii*, *N. caninum* e *H. heydorni* poderia ser resultado de evolução radiada.

Rathore et al. (2001), realizaram um estudo filogenético para várias espécies de *Plasmodium*. O objetivo do estudo era comparar as informações já obtidas das

espécies de *Plasmodium* com os genes codificadores de unidade ribossômica 18S (nuclear) e de citocromo B (mitocondrial), com as novas seqüências obtidas a partir do gene ClpC. As topologias propostas com as árvores obtidas para cada marcador não foram concordantes e a estruturação dessas teve um baixo suporte estatístico, visto que muitos dos nós internos das árvores obtidas possuíam baixos valores de *bootstrap*. Assim, em relação às propriedades biológicas dos táxons pesquisados pouco se pôde concluir. Neste caso, porém, propor evolução radiada para explicar os nós com baixo suporte estatístico não parece ser uma alternativa válida, pois um número pequeno de táxons foi empregado nesta análise, em vista da grande diversidade de espécies que pertencem ao gênero *Plasmodium*.

O gene mitocondrial CytB também foi utilizado em pesquisas sobre a filogenia de espécies de *Plasmodium* que acometem primatas. O estudo das topologias das árvores para o gene CytB mostra que o gênero *Plasmodium* é polifilético. Neste locus, a grande maioria das substituições encontradas é sinônima, sugerindo que a proteína não está sofrendo pressão seletiva para o acúmulo de polimorfismo (ESCALANTE et al., 1998).

Nesse mesmo trabalho Escalante et al. (1998) demonstram que as características da infecção como periodicidade de manifestação clínica, virulência do agente e ocorrência de recrudescência de infecções crônicas não podem ser aplicados como marcadores de estudos filogenéticos para espécies de *Plasmodium*, pois quando as topologias das árvores obtidas com dados moleculares são estudadas para este fim, as espécies com as mesmas características biológicas não se encontram em monofilia.

Perkins e Schall (2002) propuseram filogenia molecular empregando o locus de Citocromo B para espécies de *Plasmodium* de mamíferos, aves e répteis. A reconstrução proposta mostra clados estatisticamente consistentes apenas para táxons adaptados a mamíferos. Os táxons de répteis e aves são reunidos em clados com baixo suporte estatístico. Os autores creditam este evento a uma deficiência na amostragem de parasitos de répteis e aves, pois este grupo deve possuir uma variedade grande de espécies.

Os genes de organelas mostraram-se mais conservados em relação aos genes nucleares. Comparando-se seqüências gênicas codificadoras de HSP70, RpoB, ClpC e CytB, dos táxons Hhel, Hha, Nhu, Nca e Tgo percebe-se que as diversidades nucleotídicas são classificadas nesta ordem, ou seja alinhamentos de

seqüências de HSP70 possuem o maior valor de diversidade nucleotídica enquanto os de seqüências de Cyt B são os mais baixos (dado que a diversidade nucleotídica para HSP70 é de 0,09148).

Porém, embora os genes de apicoplasto possam ser mais conservados que os genes HSP70, eles parecem ter as relações entre substituições não sinônimas e substituições sinônimas consideravelmente superiores àquelas de genes nucleares e mitocondriais. De fato, a variabilidade de aminoácidos em seqüências de apicoplasto (comparando-se seqüências dos táxons Hhel, Hha, Nhu, Nca e Tgo) é maior que a variabilidade de aminoácidos em seqüências nucleares e mitocondriais.

Outro parâmetro importante em que as seqüências de genes de apicoplasto diferem das seqüências de genoma mitocondrial e nuclear é a variabilidade em sítios não sinônimos. Em uma dada seqüência gênica codificadora de proteína, é possível determinar quantas posições são sítios sinônimos e quantas são sítios não sinônimos. Sítios sinônimos são aqueles nos quais qualquer substituição não mudaria o aminoácido codificado pelo códon no qual a substituição tenha ocorrido. Para sítios não sinônimos, considera-se a situação inversa. Pelos resultados, a variabilidade em sítios não sinônimos é consideravelmente superior para seqüências de apicoplasto em relação às demais, particularmente no caso das seqüências RpoB. Também em termos de substituições não sinônimas, percebe-se que as seqüências de genes de apicoplasto de *H. heydorni* são tão distintas das de *T. gondii* quanto de *N. caninum*.

Uma interpretação possível para a maior taxa de substituições não sinônimas em genes de apicoplasto pode ser a ocorrência de pressão seletiva positiva. Evolutivamente as substituições não sinônimas são baixas, porque são desvantajosas, no entanto, a seleção positiva pode favorecer uma mudança na proteína. Assim, uma razão não sinônima/sinônima elevada poderia surgir quando a seleção natural favorece uma troca na proteína codificada por um gene (RIDLEY, 2006).

A maior pressão seletiva positiva pode estar associada a um mecanismo de escape do parasito, que evolui para superar os sistemas imunes dos seus hospedeiros (RIDLEY, 2006). E estes mecanismos de escape podem ser traduzidos pelas diferenças biológicas marcantes observadas entre estes parasitos que possuem diferentes espectros de hospedeiros e diferentes patogenicidades. Ou

seja, os produtos gênicos de apicoplasto devem de fato ser determinantes para a interação entre parasito e hospedeiro.

Já para o caso dos genes mitocondriais e nucleares, é possível supor que os mesmos estejam submetidos à pressão seletiva negativa, indicando que as substituições tendem a ser deletérias aos organismos e por isso as mudanças nos produtos gênicos devam ser menos freqüentemente registradas. Por serem genes constitutivos e codificadores de produtos essenciais à manutenção do parasito, os mesmos não devem estar sujeito à seleção adaptativa.

Considerando-se a variabilidade nucleotídica entre os organismos alvo deste estudo, revela-se que apenas uma substituição sinônima ocorre entre as linhagens arquétipas de *T. gondii*, sendo que Tgol difere das demais apenas no fragmento gênico derivado de ClpC. Também neste locus, apenas uma substituição sinônima é registrada entre as diferentes espécies de *Neospora*. Entretanto, a divergência entre as duas linhagens de *H. heydorni* é marcadamente superior, com apenas uma substituição sinônima em RpoB, mas 6 diferenças para o locus ClpC, sendo uma delas não sinônima. Mais uma vez, vale ressaltar que as diferenças genotípicas entre as duas linhagens de *H. heydorni* são maiores que as diferenças entre as duas espécies reconhecidas de *Neospora*, indicando que as duas linhagens de *H. heydorni* poderiam ser classificadas como duas espécies distintas, se apenas critérios de evolução molecular fossem considerados.

7 CONCLUSÕES

1. Os primers desenhados para seqüências gênicas de genoma de apicoplasto e mitocondrial permitiram a amplificação de ácidos nucléicos de todos os organismos conhecidos da sub-família *Toxoplasmatinae*.
2. As informações filogenéticas obtidas a partir de seqüências de genes extracromossomais permitiram concluir que *H. hammondi* é estreitamente relacionado à *T. gondii*, por estarem num mesmo clado, enquanto que *H. heydorni* é evolutivamente tão distante de *N. caninum* quanto de *T. gondii*.
3. A reconstrução de topologias com ramos curtos que derivam nós de baixo suporte estatístico somada à eqüidistância evolutiva entre os táxons avaliados (*Neospora spp.*, *H. heydorny* e *T. gondii*) permite supor que uma politomia consistente explica a evolução para estes organismos, ou seja, a resolução para o posicionamento relativo entre os táxons *T. gondii*, *N. caninum* e *H. heydomi* poderia ser resultado de uma evolução radiada
4. A partir dos dados adquiridos com a pesquisa de variabilidade nucleotídica, conclui-se que as diferenças genotípicas entre as duas linhagens de *H. heydorni* são maiores que as diferenças entre espécies de um mesmo gênero da sub-família toxoplasmatinae, sugerindo que as duas linhagens de *H. heydorni* poderiam ser classificadas como duas espécies distintas, se apenas critérios de evolução molecular fossem considerados.

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, p. 187-192, 2006
- AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185-1196, 2004.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; Nesse sentido, é lícito supor que uma politomia consistente poderia explicar a evolução para os organismos estudados CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science** v. 6061 p. 417-431, 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.
- BEADELL, J. S.; ISHTIAQ, F.; COVAS, R.; MELO, M.; WARREN, B. H.; ATKINSON, C. T.; BENSCH, S.; GRAVES, G. R.; JHALA, Y. V.; PEIRCE, M. A.; RAHMANI, A. R.; FONSECA D. M.; FLEISCHER, R. C. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. **Proceeding Biological Science**, v. 7, n. 273, p. 2935-2944, 2006.
- BIGALKE, R. D. New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by Laboratory and field investigations. **Onderstepoort Journal Veterinary Research** v. 35, p. 3-138, 1968.
- BLANCHARD, J. L.; HICKS, J. S. The non-photosynthetic plastid in malarial parasites and other apicomplexans is derived from outside the green plastid lineage. **Journal Eukaryotic Microbiology**. v. 46, p. 367–375, 1999.
- BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S.; SWANGO, L.; PIDGEON, G. L.; BRAUND, K. G. Further characterisation of the biology of *Hammondia heydorni*. **Veterinary Parasitology**, v. 27, p. 193-198, 1988.
- BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; SILVA, E. M. K.da.; BORTOLIERO, A. L. Surto de Toxoplasmose Aguda Transmitida Através da Ingestão de Carne crua de Gado Ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 21-25, 1997.
- BOWMAN, D.D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8ª edição, Ed: Manole, 2006
- CANTOS, G. A.; PRANDO, M. D.; SIQUEIRA, M. V.; TEIXEIRA, R. M. Toxoplasmose: Ocorrência de Anticorpos Anti-*Toxoplasma gondii* e Diagnóstico. **Revista da Associação de Medicina do Brasil**, v. 46, n. 4, p. 335-341, 2000.
- CORTES, H.; FERREIRA, M.L; SILVA, J. F; VIDAL, R.; SERRA, P.; CAEIRO, V. Contribution to the knowledge of bovine besnoitiosis in Portugal. **Revista Portuguesa de Ciencias Veterinárias**, v. 98, n. 545, p. 43-46, 2003.

CORTES, H.; LEITÃO, A.; VIDAL, R.; REIS, Y.; WAAP, H.; PEREIRA DA FONSECA, I.; FAZENDEIRO, I.; FERREIRA, M. L., CAEIRO, V. Bovine besnoitiosis, one approach for a better understanding of its importance. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 23., Portugal. **Proceedings**,. p.35–36, 2004.

CORTES, H. C. E.; NUNES, S.; REIS, Y.; STAUBLI, D.; VIDAL, R.; SAGER, H.; LEITÃO, A.; GOTTSTEIN, B. Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. **Veterinary Parasitology**, v.141, p. 216–225, 2006.

DABANCH. J. P. Zoonosis. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 20, p. 47-51, 2003. Supplement, 1.

DAVIES , P. R.; MORROW, W.E.M.; DEEN, J.; GAMBLE, H.R.; PATTON, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* in fishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 36, p. 67-76,1998.

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

DUBEY, J. P. Immunity to *Hammondia hammondi* infection in cats. **Journal American Veterinary Medical Association**. v. 167, p. 373–377, 1975.

DUBEY, J. P.; FAYER, R. Development of *Isospora bigemina* in dogs and other mammals. **Parasitology**, v. 73, p. 371–380, 1976.

DUBEY, J. P. Taxonomy of *Sarcocystis* and other coccidia of dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 170, p. 778-782, 1977.

DUBEY J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 1259-1263, 1988.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Neospora* and other cyst-forming coccidian of human and animals. In: KREIER, J. P. (Ed.). **Parasitic Protozoa**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1993a.v. 6. p. 1-158.

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

DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 84, p. 349–367, 1999.

DUBEY J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: Unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 99–105, 2002a.

DUBEY, J. P.; HILL, D.; LINDSAY, D. L.; JENKINS, M. J.; UGGLA, U.; SPEER, C. A. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species. **Trends in Parasitology**, v.18, n. 2, p. 66-69, 2002b

DUBEY, J. P. B. C.; BARR, J. R.; BARTA, I.; BJERKAS, C.; BJORKMAN, B. L.; BLAGBURN, D. D.; BOWMAN, D.; BUXTON, J. T.; ELLIS, B.; GOSTEIN, A.; HEMPHILL, D. E.; HILL, D. K.; HOWE, M. C.; JENKINS, Y.; KOBAYASHI, B.; KOUDELA, A. E.; MARSH, J. G.; MATRSON, M. M.; MCALUSTER, D.; MODRI, Y.; OMATA, L. D.; SIBLEY, C. A.; SPEER, A. J.; TREES, A.; UGGLA, S. J.; UPTON, D. J. L.; WILLIAMS, D. S.; LINDSAY. Redescription of *Neospora caninum* Dubey, Carpenter, Speer, Topper, Uggla, 1988 and its differentiation from related coccidian especially *Isospora bigemina* and *Hammondia heydorni*. **International Journal for Parasitology**, v. 39 p. 929-946, 2002c.

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 the rodent *Akodon montensis* in Brazil. **Parassitologia**, v. 45, n. 2, p. 61-70, 2003a.

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003b.

DUBEY, J. P.; SHKAP, A.V.; PIPANO, B. E.; FISH, B. L.; FRITZ, D. L. Ultrastructure of *Besnoitia besnoiti* Tissue Cysts and Bradyzoites. **Journal Eukaryotic. Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 240–244, 2003c.

DUBEY, J. P.; SREEKUMAR, C. Redescription of *Hammondia hammondi* and its differentiation from *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1437–1453, 2003d.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I.T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Jornal Parasitology**, v. 90, p. 721–726, 2004.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Veterinary Clinics of North America :Food Animal**. v. 22, p. 645–671, 2006.

DUBEY, J. P.; WOUDE, W.; BOXTON, D. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, p. 267-289, 2006.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J. L.; DOS SANTOS, T. R. B.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Biologic and genetic comparasion of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 182-188, 2007a.

DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M. C.; BANDINI, L. M.; YAI, L. E.; KWOK, C. H.; SU, C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, **Brazilian Journal Parasitology**, v. 93, p. 60–64, 2007b.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n. 2, p. 323–367, 2007c.

DUBEY, J. P.; HUONG, L. T. T.; LAWSON, B. W. L.; SUBEKTI, D. T.; TASSI, P.; CABAJ, W.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; KWOK, O. C. K.; SU, C. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italy, Poland, and Vietnam. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 68–71, 2008a.

ELLIS, J. T.; AMOYAL, G.; RYCE, C.; HARPER, P. A. W.; CLOUGH, K. A.; HOMAN, W. L.; BRINDLEY, P. J. Comparison of the large subunit ribosomal DNA of *Neospora* and *Toxoplasma* and development of a new genetic marker for their differentiation based on the D2 domain. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, p. 1–13, 1998.

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.

ELLIS, J. T.; JOAKIM, O.; HOLMDAHL, M.; RYCE, C.; NJENGA, J.; HARPER, P. A. W.; MORRISON, D. Molecular Phylogeny of *Besnoitia* and the Genetic Relationships Among *Besnoitia* of Cattle, Wildebeest and Goats. **Protist**, v. 151, p. 329-336, 2000

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.

FAIVOVICH, J.; GARCIA, P. C.; ANANIAS, F.; LANARI, L.; BASSO, N. G.; WHEELER, W. C. A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 32, n. 3, p. 938-950, 2004.

FEAGIN, J. E. The extrachromosomal DNAs of apicomplexan parasites. **Annu Rev Microbiology**, v. 48, p. 81–104, 1994.

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

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. *Hammondia hammondi* gen nov., sp.nov., from domestic cats, a new coccidian related to *Toxoplasma* and *Sarcocystis*. **Parasitenk**, v. 46, p. 3–12, 1975.

FRENKEL, J. K. DUBEY, J. P. The taxonomic importance of obligate heteroxeny: distinction of *Hammondia hammondi* from *Toxoplasma gondii* – another opinion. **Parasitology Research**, v. 86 p. 783-786, 2000.

FRENKEL, J. K. SMITH, D. D. Determination of the genera of cyst-forming coccidian. **Parasitology Research**, v. 91 p. 384-389, 2003.

FIALHO, C. G.; ARAÚJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros suínos criados e abatidos em frigoríficos da região de grande Porto Alegre-RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.33, n. 5, p. 893-897, 2003.

FOULET, F.; BOTTEREL, F.; BUFFET, P.; MORIZOT, G.; RIVOLLET, D.; DENIAU, M.; PRATLONG, F.; COSTA, J.; BRETAGNE, S. Detection and Identification of *Leishmania* Species from Clinical Specimens by Using a Real-Time PCR Assay and Sequencing of the Cytochrome *b* Gene. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 7, p. 2110–2115, 2007.

GRISARD, E. C.; ELSAID, M. M. A.; TAFURI, W. L.; LIMA, J. L.; CARVALHO PINTO, J. C.; STEINDEL, J.; VITOR, R. W. A. *Besnoitia* sp. (Protozoa: Toxoplasmatinae) from *Akodon montensis* (Rodentia: Cricetidae) in Santa Catarina State, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 314-316, 1997.

GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 159–161, 2004.

GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R.; THÜR, B.; BUSATO, A.; STÄRK, K. D. C.; MÜLLER, N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **International Journal Parasitology**. v. 28, p. 679–691, 1998..

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

HEYDORNI, A. O.; MEHLHORN, H. *Neospora caninum* is an invalid specie name: na evaluation of facts and statements. **Parasitology Research** v. 88, p. 175-184, 2002.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical and Microbiological Infection**, v. 8, p. 634-640, 2002.

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

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

KAPUR, V.; LI, L.; HAMRICK, S. M. R.; WANGER, A.; KREISWIRTH, B. N.; MUSSLER, J. M. Characterization by Automated DNA Sequencing of Mutations in the Gene (*rpoB*) Encoding the RNA Polymerase 3 Subunit in Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from New York City and Texas. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1095-1098, 1994.

KALITA, C. C.; GAUTAM, O. P.; BHARDWAJ, R. Experimental toxoplasmosis in buffalo-cales. **Indian Journal Public Health**. v. 22, n. 4, p. 325,1978.

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, p. 1485-1489, 1997.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. **MEGA**: molecular evolutionary genetics analysis. Version 1.02. Pennsylvania: The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, 1993.

LANGONI, H.; SILVA, A. V. da; CABRAL, K. G.; CUNHA, E. L. P.; CUTOLO, A. A. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 23-244, 2001.

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, p. 236–243, 2009.

LEVINE, N. D. The Protozoan phylum apicomplexa. **Boca Raton**: CRC Press, 1988. 2 v. 1988.

LEHMANN, T.; BLACKSTON, C. R.; PARMLEY, S. F.; REMINGTON, J. S.; DUBEY, J. P. Stain Typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 5, p. 960-971, 2000.

LEHMANN, T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infection and Genetic Evolution**, v. 4, p. 107-114, 2004.

LIBRADO, P. and ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452 | doi: 10.1093/bioinformatics/btp187, 2009.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. AND DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p. 327-333, 1999.

LINDSAY, D. S.; RITTER, D. M.; BRAKE, D. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 909-911, 2001.

LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA JR., M. K.; RECHE, A.; GERMANO, P. M. L. Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em gatos infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 41-45, 1998.

MAINARDI, S. R.; MODOLO, J. R.; STACHISSINI, A. V. M.; PADOVANI, C. R.; LANGONI, H. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos de caprinos no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 759-761, 2003.

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.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; MADIGAN, J.; LAKRITZ, J.; NORDHAUSEN, R.; CONRAD, P. A. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal American Veterinary Medical Association**. v. 209, p.1907-1913, 1996.

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

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

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

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p.1473–1478, 1998.

MCFADDEN, G. I.; WALLER, R. F.; REITH, E.; LANG-UNNASCH, N. Plastids in apicomplexan parasites. **Plant Systematic Evolution**. v.11, p. 261–287, 1997.

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

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

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.

MONTEIRO, R. M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; SOUZA, S. O.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Differential diagnosis of oocysts of Hammondia-like organisms of dogs and cats by PCR-RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Parasitology Research** v.103, p. 235–238, 2008.

MOHAMMED, O. B.; DAVIES, A.; HUSSEIN, H. S.; DASZAK, P.; ELLIS, J. T. *Hammondia heydorni* from the Arabian Mountain Gazelle and Red Fox in Saudi Arabia. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 535–539, 2003.

MORRISON, D. A.; BORNSTEIN, S.; THEBO, P.; WERNERY, U.; KINNE, J.; MATTSSON, J. G. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidian (Sporozoa). **International Journal for Parasitology**, v. 34, p.501-514, 2004.

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.

OLIVEIRA, F. C. R. de; COSTA, A. J. da; SABATINI, G. A. Clinica e Hematologia de *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Babulos bubalis* Inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplamatinae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 621-626, 2001.

OBORNIK, M.; JANOUŠKOVEC, J. A.; CHRUDIMSKY, T. B.; LUKEŠ, J. Evolution of the apicoplast and its hosts: From heterotrophy to autotrophy and back again. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 1–12, 2009.

PARE, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of Neospora sp. infection in cattle. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 7, p. 352–359, 1995.

PERKINS, S. L.; SARKAR, I. N.; CARTER, R. The phylogeny of rodent malaria parasites: simultaneous analysis across three genomes. **Infectection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 74-83, 2007.

PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **Journal Parasitology**, v. 88, n. 5, p. 972-978, 2002.

PERKINS, S. L. Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*. **Proceedings of the Royal Society** v. 22, n. 26, p. 2345-50, 2000.

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.

RATHORE, D.; WAHL, A. M.; SULLIVAN, M.; MCCUTCHAN, T. M. A phylogenetic comparison of gene trees constructed from plastid, mitochondrial and genomic DNA of *Plasmodium* species. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 114, p. 89–94, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª edição, Ed: Guanabara Koogan, 2001.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3ª edição, Ed: Artmed, 2006

RIahi, H.; DARDE, M. L.; BOUTEILLE, B.; LEBOUTET, M. J.; PESTRE-ALEXANDRE, M. *Hammondia hammondi* cysts in cell cultures. **Journal Parasitology** v. 81, p. 821–824, 1995.

RIahi, H.; LEBOUTET, M. J.; BOUTEILLE, B.; DUBREMETZ, J. F.; DARDE, M. L. *Hammondia hammondi* organelle proteins are recognized by monoclonal antibodies directed against organelles of *Toxoplasma gondii*. **Journal Parasitology**, v. 85, p. 580–583, 1999.

RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E. Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. **Systematic Biology**, v. 53, n. 1, p. 111-119, 2004.

RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. **Proceedings of the Royal Society**, v. 7, n. 269, p. 885-892, 2002.

ROZAS, J.; SANCHEZ-DEL-BARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, p. 2496-2497, 2003.

RUSSO, C. A. M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: Mاتيoli, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. 1. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 130-136.

SLAPETA, J. R.; KOUDELA, B.; VOTYPKA, J.; MODRY, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **Veterinary Journal** v. 163, n. 2, p. 147-154, 2002a.

ŠLAPETA, J. R.; MODRÝ, D.; KYSELOVÁ, I.; HOŘEJŠ, R.; LUKEŠ, L.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 157–167, 2002b.

SCHARES, G.; HEYDORN, A. O.; COPPERS, A.; MEHLHORN, H.; GEUE, L.; PETERS, M.; CONRATHS, F. J. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. **Parasitology Research**, v. 88, p. 44-52, 2002.

SCHARES, G.; MEYER, J.; BA"RWALD, A.; CONRATHS, F. J.; RIEBE, R.; BOHNE, W.; ROHN, K.; PETERS, M. A. Hammondia-like parasite from the European fox (*Vulpes vulpes*) forms biologically viable tissue cysts in cell culture. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 229–234, 2003.

SCHARES, G.; BASSO, W.; MAJZOUB, D.; CORTES, C. E.; ROSTAHER, A.; SELMAIR, J.; HERMANN, W.; CONRATHS, F. J.; GOLLNICK, N. S. First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 315–322, 2009.

SCHRENZEL, M. D.; MAALOUF, G. A.; KEENER, L. L.; GAFFNEY, P. M. Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. **Journal Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 1025–1033, 2003.

SHEFFIELD, H. G.; MELTON, M. L.; NEVA, F. A. Development of *Hammondia hammondi* in cell cultures. **Proceedings of Helminthological Society of Washington**, v. 43, p. 217–225, 1976.

SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; ROSENTHAL, B. M.; VIANNA, M. C. B.; VENTURINI, L.; BASSO, W.; GENNARI, S. M.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Hammondia heydorni*: evidence of genetic diversity among isolates from dogs. **Experimental Parasitology**, v. 107, p. 65–71, 2004.

SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C. B.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; LINDQUIST, A.; DUBEY, J. P. Differential detection of *Hammondia hammondi* from *Toxoplasma gondii* using polymerase chain reaction. **Parasitology International**, v. 54, p. 267–269, 2005.

SCHRENZEL, M. D.; MAALOUF, G. A.; KEENER, L. L.; GAFFNEY, P. M. Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. **Journal Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 1025–1033, 2003.

SILVA, A. V. da; CUNHA, E. L. P.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R. A.; LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 115–119, 2003.

SOARES, R. M.; CORTEZ, L. R. P. B.; GENNARI, S. M.; SERCUNDES, M. K.; KEID, L. B.; PENA, H. F. J. Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), a South American canid, as a definitive host for *Hammondia heydorni*. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 46–50, 2009.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 841–848, 2006.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596–1599, 2007. doi:10.1093/molbev/msm092. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/24/8/1596>>. Acesso em: adicionar a data em que vc acessou este site.

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

TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. **Advanced Parasitology**, v. 39, p.69-139, 1997.

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

TENTER, A. M.; BARTA, J. R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D. W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D. A.; THOMPSON, R. C.; CONRAD, P. A. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. **International Journal Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 595-616, 2002.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends Parasitology**, v. 21, p. 558–561, 2005.

VARELLA, I. S.; WAGNER, M. B.; DARELA, A. C.; NUNES, L. M.; MULLER, R. W. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. **Jornal de Pediatria**. v. 79, n. 1, p. 69-74, 2003.

VENTURINI, L.; PETRUCCELLI, M.; PÍSCOPO, M.; ÚNZAGA, J. M.; VENTURINI, M. C.; BACIGALUPE, D.; BASSO, D.; DUBEY, J. P. Natural *Besnoitia* sp. infection in domestic rabbits from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 273–278, 2002.

WALSH, P.C.; DUNCAN JR., B. R.; ZAJAC, M. A.; BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. *Neospora hughesi*: experimental infections in mice, gerbils, and dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p.119–128, 2000.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain 'cyst' DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal Parasitology**, v. 82, p. 272–279, 1996.

WEILAND, G.; ROMMEL, M.; VON SEYERL, F. Serological crossreactions between *Toxoplasma* and *Hammondia*. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 244, p. 391–393, 1979.

WHITFIELD, J.B., LOCKHART, P.J., Deciphering ancient rapid radiations. **Trends Ecology Evolution**, v. 22, p.258–265, 2007.

XIAO, L; SULAIMAN, S; RYAN, U. N; ZHOU, L; ATWILL, E;TISCHLER, M. L; ZHANG, X; FAYER, R; LAL, A. Host adaptation and host–parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal of Parasitology**. v. 32, p. 1773 – 1785, 2002.

ZARNKE, R. L.; DUBEY, J. P.; KWOK, O. C. H.; HOEF, J. V. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in selected wildlife species from Alaskas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 2, p. 219-224, 2000.

Apêndice A

Figura 21 - Alinhamento de seqüências de nucleotídeos da região codificadora de citocromo B. **HheI**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **HheII**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodomi* e **Sne EST**: *Sarcocystis neurona*

Figura 22 - Alinhamento de seqüências de nucleotídeos da região codificadora de ClpC. **HheI**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **HheII**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodonti*; **Ssp 165880123**: *Sarcocystis* sp **Ssp2 165880121**: *Sarcocystis* sp; **Sfa 77051640**: *Sarcocystis falcatus*; **Sne 52122115**: *Sarcocystis neurona*; **Ete 31322455**: *Eimeria tennella*

Figura 23 - Alinhamento de seqüências de nucleotídeos da região codificadora RpoB. **HheI**: Hhe376 *Hammondia heydorni* linhagem I; **HheII**: HheBR *Hammondia heydorni* linhagem II; **Nhu**: *Neospora hughesi*, isolado Oregon; **Nca**: *Neospora caninum*; **Hha**: Hha300 *Hammondia hammondi*; **Tgo**: *Toxoplasma gondii*; **Bak**: *Besnoitia akodonti*; **Bda 27884026**: *Besnoitia darlingi*; **Bor 27884028**: *Besnoitia oryctofelisi*; **Sne 27469347**: *Sarcocystis neurona*; **Sfa 27469345**: *Sarcocystis falcatula*; **Sly 27469341**: *Sarcocystis lindsayi*

APÊNDICE B

Quadro 1 - Número de diferenças de nucleotídeos entre seqüências de genes codificadores de CytB

	1	2	3	4	5	6	7	8
[1] Sne_EST								
[2] Bak	122							
[3] Hhe_I	126	60						
[4] Hhe_II	126	59	1					
[5] Hha	125	64	28	27				
[6] Tgo	122	65	29	28	5			
[7] Nhu	122	65	22	21	27	27		
[8] Nca	122	65	22	21	27	27	0	

Diversidade nucleotídica entre HheI, Hha, Tgo, Nhu e Nca: **0,03898**

Diversidade nucleotídica entre HheI, Hha, Tgo, Nhu e Nca para sítios sinônimos e não sinônimos: **0,14798** e **0,00257**

Quadro 2 - Número de diferenças de aminoácidos entre seqüências de CytB

	1	2	3	4	5	6	7	8
[1] Sne_EST								
[2] Bak	25							
[3] Hhe_I	25	11						
[4] Hhe_II	25	11	0					
[5] Hha	25	11	0	0				
[6] Tgo	25	11	0	0	0			
[7] Nhu	24	12	1	1	1	1		
[8] Nca	24	12	1	1	1	1	0	

Diversidade de aminoácidos entre HheI, Hha, Tgo, Nhu e Nca: **0,003**

Quadro 3 - Número de diferenças de nucleotídeos entre seqüências de genes codificadores de RpoB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
[1] Sfa_27469345															
[2]Sfa2_27469349	0														
[3] Sly_27469341	2	2													
[4]Sne_27469347	3	3	3												
[5]Bda_27884026	99	99	99	98											
[6]Bor_27884028	98	98	98	97	1										
[7] Bak	100	100	100	99	3	4									
[8] Hhel	87	87	87	86	54	53	54								
[9] Hhell	87	87	87	86	53	52	53	1							
[10] Hha	92	92	92	91	51	50	53	32	31						
[11] Tgol	88	88	88	87	47	46	49	26	27	15					
[12] Tgoll	88	88	88	87	47	46	49	26	27	15	0				
[13] Tgolll	88	88	88	87	47	46	49	26	27	15	0	0			
[14] Nhu	90	90	90	91	50	49	50	31	30	29	26	26	26		
[15] Nca	90	90	90	91	50	49	50	31	30	29	26	26	26	0	

Diversidade nucleotídica entre Hhel, Hha, Tgo, Nhu e Nca: **0,05523**

Diversidade nucleotídica entre Hhel, Hha, Tgo, Nhu e Nca para sítios sinônimos e não sinônimos: **0,12611** e **0,02853**

Quadro 4 - Número de diferenças de aminoácidos entre seqüências de RpoB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
[1] Sfa_27469345															
[2]Sfa2_27469349	0														
[3] Sly_27469341	0	0													
[4]Sne_27469347	1	1	1												
[5]Bda_27884026	45	45	45	45											
[6]Bor_27884028	45	45	45	45	0										
[7] Bak	45	45	45	45	1	1									
[8] Hhel	41	41	41	41	21	21	21								
[9] Hhell	41	41	41	41	21	21	21	0							
[10] Hha	47	47	47	47	21	21	22	15	15						
[11] Tgol	43	43	43	43	18	18	19	10	10	6					
[12] Tgoll	43	43	43	43	18	18	19	10	10	6	0				
[13] Tgolll	43	43	43	43	18	18	19	10	10	6	0	0			
[14] Nhu	42	42	42	42	23	23	22	13	13	14	10	10	10		
[15] Nca	42	42	42	42	23	23	22	13	13	14	10	10	10	0	

Diversidade de aminoácidos entre Hhel, Hha, Tgo, Nhu e Nca: **0,072**

Quadro 5 - Número de diferenças de nucleotídeos entre seqüências de genes codificadores de ClpC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
[1] Ete_31322455														
[2] Sfa_77051640	133													
[3] Sne_52122115	133	2												
[4] Ssp_165880123	128	33	34											
[5] Ssp2_165880121	128	34	34	3										
[6] Bak	135	66	66	61	64									
[7] Hhel	134	74	74	67	70	42								
[8] Hhell	129	71	71	66	69	41	6							
[9] Hha	132	63	64	58	61	44	27	26						
[10] TgoI	132	66	67	59	62	44	27	26	8					
[11] TgoII	131	65	66	58	61	43	26	25	7	1				
[12] TgoIII	131	65	66	58	61	43	26	25	7	1	0			
[13] Nhu	132	64	64	62	65	48	24	23	21	23	22	22		
[14] Nca	133	64	64	61	64	48	24	23	22	24	23	23	1	

Diversidade nucleotídica entre Hhel, Hha, Tgo, Nhu e Nca: **0,04170**

Diversidade nucleotídica entre Hhel, Hha, Tgo, Nhu e Nca para sítios sinônimos e não sinônimos: **0,14764** e **0,00895**

Quadro 6 - Número de diferenças de aminoácidos entre seqüências de ClpC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
[1] Ete_31322455														
[2] Sfa_77051640	63													
[3] Sne_52122115	63	1												
[4] Ssp_165880123	63	11	10											
[5] Ssp2_165880121	63	10	9	1										
[6] Bak	62	25	24	23	24									
[7] Hhel	63	25	24	23	24	12								
[8] Hhell	62	24	23	22	23	11	1							
[9] Hha	63	24	23	22	23	11	3	2						
[10] Tgol	63	24	23	22	23	11	3	2	0					
[11] Tgoll	63	24	23	22	23	11	3	2	0	0				
[12] Tgolll	63	24	23	22	23	11	3	2	0	0	0			
[13] Nhu	64	24	23	22	23	15	4	5	5	5	5	5		
[14] Nca	64	24	23	22	23	15	4	5	5	5	5	5	0	

Diversidade de aminoácidos entre Hhel, Hha, Tgo, Nhu e Nca: **0,021**