

**RENATA MOLINA MONTEIRO**

***Caracterização de protozoários pertencentes à sub-família  
Toxoplasmatinae pela análise molecular do gene codificador  
de proteína do choque térmico (HSP70) e do espaçador  
interno transcrito 1 (ITS-1)***

São Paulo  
2006

**RENATA MOLINA MONTEIRO**

***Caracterização de protozoários pertencentes à sub-família  
Toxoplasmatinae pela análise molecular do gene codificador  
de proteína do choque térmico (HSP70) e do espaçador  
interno transcrito 1 (ITS-1)***

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

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de Concentração:**

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo  
2006

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.1757  
FMVZ

Monteiro, Renata Molina

Caracterização de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise molecular do gene codificador de proteína do choque térmico (HSP70) e do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1) / Renata Molina Monteiro. – São Paulo: R. M. Monteiro, 2006.

105 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. Fezes. 2. Diagnóstico. Reação em cadeia pela polimerase. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

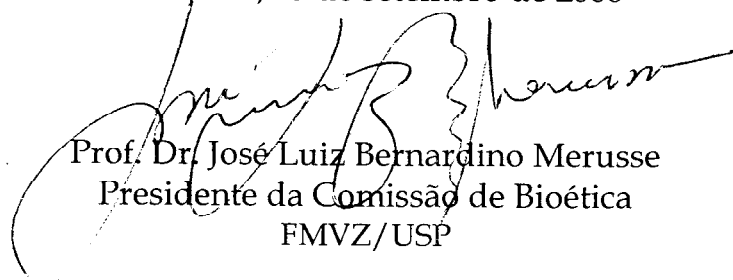
*Comissão Bioética*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise molecular do gene codificador de proteína do choque térmico (HSP70) e do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1)", protocolo nº551/2004, utilizando fezes de cães e gatos, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Characterization of protozoan of the subfamily toxoplasmatinae by molecular analysis of Heat Shock Protein (HSP70) coding sequences and internal transcribed spacer 1 (ITS-1)", protocol number 551/2004, utilizing shed in dogs and cats feces, under the responsibility of Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 13 de setembro de 2006



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

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MONTEIRO, Renata Molina

Título: Caracterização dos protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise molecular do gene codificador de proteína do choque térmico (HSP70) e do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1)

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Edson e Sonia, pelo imensurável amor e apoio,  
sempre me incentivando a seguir em frente,  
E ao meu avô Alfonso (in memoriam)  
por seu imenso amor e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela orientação, amizade, incentivo e acima de tudo, pela paciência.

À Profa. Solange Maria Gennari, pela amizade, ensinamentos, apoio e pela confiança em mim depositada.

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

Ao Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos por ter aberto as portas do VPS e por toda ajuda fornecida.

À Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena pelos ensinamentos e apoio prestado sempre que solicitado.

À pesquisadora Dra. Josete Garcia Bersano, do Laboratório de Doenças de Suínos do Instituto Biológico de São Paulo, pela forte amizade, confiança, oportunidade, e por ter me incentivado a dar os primeiros passos em direção à pesquisa científica.

Ao pesquisador Dr. Manoel Portugal, do Instituto Biológico, que não mediu esforços a me incentivar a iniciar a pós-graduação e pela sua grande amizade.

Ao meu namorado Ivan, que conheci no decorrer deste trabalho, pelo amor, dedicação, incentivo e por todo apoio que me foi imprescindível. E à Ana Luísa, sua irmã, pela sua amizade e alegria.

Às minhas tias e primos que sempre estiveram presentes nos diversos momentos da minha vida.

À amiga de pós-graduação e pesquisadora Vera Lettície A. Ruiz, do Instituto Biológico, pela grande amizade que fizemos depois de apenas alguns dias de convivência.

Aos amigos que encontrei no VPS e na FMVZ, Tatiana, Guacyara, Lílian, Cristina Brito, Leandro e Roberto.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias Alessandra, Mikaela, Lara, Aline, Lúcia, Luciana, Eliana, Daniela Chiebao, Richard, Alexandre Ataliba, Sílvio, Ricardo, Maurício, Adriano, Daniel, Alexandre Thomaz, pelos bons momentos de trabalho e convivência.

Aos demais pós-graduandos Lara, Adriana, Janaina, Daniela Ribeiro, Cristiana, Leslie, Patrícia, Gisele, Clarice e Sonia.

Às amigas de infância, Carolina e Priscilla, por todos os bons momentos que compartilhamos.

Às amigas de graduação, Camila e Adriana, pelos 5 anos de convivência e que apesar da distância continuam sempre presentes na minha lembrança.

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

Aos demais funcionários, Sandra, Bispo, Carol, Sheila, Gisele, Pedrinho, Tonhão e Alexandre (fininho).

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

E por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram e auxiliaram-me no desenvolvimento deste trabalho.



*“As coisas são semelhantes: isto faz a Ciência possível;  
as coisas são diferentes: isto faz a Ciência necessária.”*

*Levine e Lewontin, 1985*

*“ Completou-se uma jornada.  
Chegar é cair na inércia de um ponto final.  
Na euforia da chegada, porém,  
há um convite irrecusável  
para uma nova partida”*

*Helena Kolody*

## RESUMO

MONTEIRO, R. M. **Caracterização de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise molecular do gene codificador de proteína do choque térmico (HSP70) e do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1).** [Characterization of protozoan belonging to sub-family Toxoplasmatinae through the molecular analysis from of heat shock protein (HSP70) coding gene and internal transcript spacer 1 (ITS-1)]. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Os membros da sub-família Toxoplasmatinae conhecidos são *Hammondia hammondi*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora hughesi*, *Neospora caninum* e *Hammondia heydorni*. As duas primeiras espécies têm os felídeos como hospedeiro definitivo, enquanto as duas últimas têm desenvolvimento sexual em carnívoros da família dos canídeos. O ciclo biológico de *N. hughesi* é pouco conhecido. Foi estudado a variabilidade nucleotídica de seqüências intercaladas entre os genes codificadores das frações ribossômicas 18S, 5.8S (ITS-1). No entanto, como estas não permitem reconstruções filogenéticas com o uso de grupo externo, em virtude da inconsistência dos alinhamentos produzidos, pesquisamos uma seqüência codificadora de proteína sendo o marcador escolhido, o gene codificador da proteína de choque térmico HSP70 (*heat shock protein 70KDa*). Este gene é bastante utilizado para resolução de filogenias de outros organismos como, por exemplo, aqueles pertencentes ao gênero *Cryptosporidium*. No presente trabalho, amplificamos por PCR e seqüenciamos 951 pares de bases (pb) do gene codificador de HSP70 de oocistos *T. gondii*-like (oriundos de fezes gatos), de oocistos *Neospora*-like (de fezes de cães) e de taquizoitos de *N. caninum*, *N. hughesi* e *T. gondii* mantidos em laboratório. Os *primers* foram desenhados a partir de seqüências consenso obtidas em pesquisa de bancos de dados de seqüências EST de *N. caninum* e seqüências de RNAm de *T. gondii*. Seqüências ITS-1 destes oocistos também foram determinadas para a confirmação da espécie de parasito estudada. Os resultados mostram que os

táxons *H. hammondi* e *T. gondii* são monofiléticos e geneticamente muito próximos, mas contrariando resultados anteriores, não foi demonstrada a monofilia entre os táxons *H. heydorni* e *N. caninum*. De fato, a análise de diversidade nucleotídica de gene codificador HSP70 mostra que a distância evolutiva 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*. Paralelamente ao estudo filogenético também foi possível desenvolver um método diagnóstico diferencial para oocistos tipo *Hammondia*. As seqüências de gene HSP70 obtidas foram alinhadas e dois pares de *primers* internos a estas seqüências foram desenhados. O primeiro par amplifica 771 pb de oocistos *T. gondii*-like e o segundo 400 pb de oocistos *Neospora*-like. A clivagem do fragmento de 771 pb com enzima de restrição *Hin6I* produz perfis eletroforéticos distintos para amostras de *T. gondii* e *H. hammondi*. A clivagem do fragmento de 400pb com a enzima de restrição *MunI* também produz perfis eletroforéticos distintos entre amostras de *N. caninum* e *H. heydorni*. A diferenciação dos perfis de restrição pode ser feita em eletroforese em gel de agarose a 2,5%.

Palavras-chave: Fezes. Diagnóstico. Reação em cadeia pela polimerase.

## ABSTRACT

**MONTEIRO, R. M. Characterization of protozoan belonging to sub-family Toxoplasmatinae through the molecular analysis from of heat shock protein (HSP70) coding gene and internal transcript spacer 1 (ITS-1) [Caracterização de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise molecular do gene codificador de proteína do choque térmico (HSP70) e do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1)].** 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

*Hammondia hammondi*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora hughesi*, *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are the known members of the sub-family Toxoplasmatinae. *H. heydorni* and *N. caninum* use canids as definitive hosts whereas felids are the definitive hosts from *T. gondii* and *H. hammondi*. The definitive host of *N. hughesi* is unknown. Here, the nucleotide diversity at internal transcribed spacer (ITS-1) and heat shock protein (HSP70 kDa) loci in the subfamily toxoplasmatinae were studied. The HSP70 coding genes are widely used for phylogenetic studies in a number of other organisms specially within the genus *Cryptosporidium*. In the present study, it was amplified by PCR and sequenced 951 bases pairs (bp) from HSP70 coding gene from oocysts *T.gondii*-like (from cat), from oocysts *N. caninum*-like (from dog) and tachyzoites of *N. hughesi* grown on cell cultures. The *primers* were designed based on consensus sequences within EST sequences of *N. caninum* sequences and RNAm sequences of *T. gondii*. ITS-1 sequences amplified from oocysts were also obtained in order to confirm the species of the parasites. The results showed that *T. gondii* and *H. hammondi* are monophyletic and genetically very close, but the monophyletic status of *H. heydorni* *N. caninum* was not demonstrated. In fact, the nucleotide diversity at the HSP70 locus has shown that the evolutionary distance between *H. heydorni* and *N. caninum* is as high as that observed between either *H. heydorni* or *N. caninum* and *T. gondii*., In addition, it was possible to identify two distinct groups among the *H. heydorni* oocysts. Concomitantly to the phylogenetic study it was also possible to standardize a diagnostic test capable of

differentiate the oocysts *Hammondia*-like was development a diagnostic method that differ oocysts *T. gondii*-like and *N. caninum*-like. The sequences obtained from HSP70 coding gene were aligned and two new pair of PCR *primers* was designed. The first pair amplifies 771bp from *T. gondii*-like oocysts, whereas the second pair amplifies 400 bp from *N. caninum*-like oocysts. The restriction enzyme *Hin6I* used to cleave the 771 bp amplicons generated distinct profiles with samples from *H. hammondi* and *T. gondii*. The same occurred with the restriction of the fragments of 400bp cleaved by the enzyme *MunI* used in *N. caninum* e *H. heydorni* samples. The profiles can be differentiated by 2.5% agarose gel electrophoresis.

Key words: Feaces. Diagnostic. Polymerase chain reaction.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Posições dos sítios de clivagem da enzima *Hin6I* no fragmento de 771 pb das amostras de felinos amplificadas com os *primers* HSP70-F e HSP70-R..... 61
- FIGURA 2 - Esquematização do padrão eletroforético das clivagens realizadas pela enzima *Hin6I* nos fragmentos de 771 pb das amostras de felinos amplificadas com os *primers* HSP70-F e HSP70-R..... 62
- FIGURA 3 - Amplificação de amostras de taquizoítos em 7 diferentes temperaturas de hibridização para a observação da melhor temperatura de hibridização dos *primers*..... 67
- FIGURA 4 - Número de amostras de protozoários da sub-família toxoplasmatinae seqüenciadas; isolados (Hhe: *H. heydorni*; Tgo: *T. gondii*; Nca: *N. caninum*; Nhu: *N. hughesi*; Hha: *H. hammondi*); espécie do parasito; origem dos isolados; e resultados de identificação molecular (alelo) das sequencias de HSP70 e ITS-1..... 71
- FIGURA 5 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbor-joining e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros. As amostras de *Neospora caninum* (NcaPR) e *Neospora hughesi* (Nhu). Utilização de 951 nucleotídeos do gene codificador de HSP70. Foi incluído apenas um representante de cada alelo de *Hammondia heydorni*. Árvore gerada com o programa MEGA..... 71
- FIGURA 6 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbor-joining e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros. Seqüências de *Cyclospora colobi*, *C. cayetanensis* e *C. cercophiteci* (Cco, Cca e Cce) foram utilizadas como *outgroup*. Utilização de 951 nucleotídeos do gene codificador de HSP70. Foi incluído apenas um representante de cada alelo de *Hammondia heydorni*. Árvore gerada com o programa MEGA..... 72

FIGURA 7 -	Reconstrução filogenética com inferência pelo método Parcimônia e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Foi gerada apenas uma árvore mais parcimoniosa com 497 passos (CI = 0.830986, RI = 0.892169). Seqüências de <i>Cyclospora colobi</i> , <i>C. cayetanensis</i> e <i>C. cercophiteci</i> (Cco, Cca e Cce) foram utilizadas como <i>outgroup</i> . Utilização de 951 nucleotídeos do gene codificador de HSP70. Árvore gerada com o programa MEGA.....	73
FIGURA 8 -	Reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbor-joining e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros, excluindo a terceira posição dos codons. Seqüências de <i>Cyclospora colobi</i> , <i>C. cayetanensis</i> e <i>C. cercophiteci</i> (Cco, Cca e Cce) foram utilizadas como <i>outgroup</i> . Utilização de 634 nucleotídeos do gene codificador de HSP70. Foi incluído apenas dois representantes da espécie <i>Hammondia heydorni</i> (HheV2 e HheV5). Árvore gerada com o programa MEGA.....	73
FIGURA 9 -	Reconstrução filogenética com inferência pelo método Parcimônia e teste de bootstrap com 1000 réplicas, excluindo a terceira posição dos codons. Foi gerada apenas uma árvore mais parcimoniosa com 88 passos (CI = 0.931818, RI = 0.933333). Seqüências de <i>Cyclospora colobi</i> , <i>C. cayetanensis</i> e <i>C. cercophiteci</i> (Cco, Cca e Cce) foram utilizadas como <i>outgroup</i> . Utilização de 634 nucleotídeos do gene codificador de HSP70. Árvore gerada com o programa MEGA.....	74
FIGURA 10 -	PCR-RFPL das amostras de oocistos de cães frente as diferentes enzimas com os <i>primers</i> HSP400-F/HSP 400-R. As amostras tanto podem ser clivadas apenas com a enzima <i>MunI</i> , como podem ser utilizadas as enzimas que cortam apenas um dos organismos.....	75
FIGURA 11 -	PCR-RFPL das amostras de gatos com os <i>primers</i> HSP70-F/HSP70-R e clivagem com a enzima <i>Hin6I</i> . Consultar Figura 2 para conferência dos fragmentos gerados.....	76
FIGURA 12 -	Alinhamento das seqüências ITS-1 produzidas neste estudo. Não estão representadas as seqüências disponíveis em bancos de dados.....	94
FIGURA 13 -	Alinhamento das seqüências HSP70 produzidas neste estudo. Não estão representadas as seqüências disponíveis em bancos de dados. Não está representada neste alinhamento a seqüência originária de oocisto de <i>T. gondii</i> identificada como 76.....	99

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR e seqüenciamento, seus respectivos tamanhos em pares de bases e dos produtos que amplificam.....	52
QUADRO 2 -	Fragmentação dos produtos de PCR dos protozoários frente às diferentes enzimas de restrição.....	60
QUADRO 3 -	Diferença de número de nucleotídeos entre os alelos de HPS70 e ITS-1 nos de <i>H. heydorni</i> . O número entre parêntesis corresponde às diferenças entra as seqüências de ITS-1. O número fora dos parêntesis corresponde às diferenças entre os 951 nucleotídeos das seqüências do gene codificador HSP70.....	70
QUADRO 4 -	Número de amostras de protozoários da sub-família toxoplasmatinae seqüenciadas; isolados (Hhe: <i>H. heydorni</i> ; Tgo: <i>T. gondii</i> ; Nca: <i>N. caninum</i> ; Nhu: <i>N. hughesi</i> ; Hha: <i>H. hammondi</i> ); espécie do parasito; origem dos isolados; e resultados de identificação molecular (alelo) das sequencias de HSP70 e ITS-1.....	77



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
g	grama
<i>g</i>	gravidade terrestre
HCl	ácido clorídrico
HSP	heat shock protein – proteína do choque térmico
ITS	internal transcribed spacer– “espaçador interno transcrito”
KCl	cloreto de potássio
M	molar
µg	micrograma
µL	microlitro
mL	mililitro
µm	micrômetro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p	quantidade suficiente para
RFLP	restriction fragment lenght polymorphism – “polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição”
SDS	dodecil sulfato de sódio
TE	tampão Tris-EDTA
v/v	volume a volume

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE <i>Toxoplasma gondii</i> E <i>Hammondia hammondi</i> .....	21
1.2	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE <i>Neospora caninum</i> E <i>Hammondia heydorni</i> .....	26
1.2.1	<b><i>Hammondia heydorni</i></b> .....	27
1.2.2	<b><i>Neospora caninum</i></b> .....	34
1.3	Marcadores Moleculares para Estudos Filogenéticos da Sub-Família Toxoplasmatinae.....	38
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
3.1	AMOSTRAS ANALISADAS.....	45
3.2	PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	46
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA DOS OOCISTOS.....	46
3.4	PURIFICAÇÃO DOS TAQUIZOÍTOS DE <i>N. caninum</i> / <i>T. gondii</i> .....	48
3.5	EXTRAÇÃO DE DNA DOS TAQUIZOÍTOS DE <i>N. caninum</i> E <i>T.</i> <i>gondii</i> .....	48
3.6	DESENHO DOS <i>PRIMERS</i> .....	49
3.7	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	52
3.7.1	<b>Temperatura de Hibridização dos <i>Primers</i></b> .....	53
3.7.2	<b>Ciclo da Reação em Cadeia pela Polimerase</b> .....	54
3.8	DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	55
3.9	PESQUISA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO.....	56
3.10	SEQÜENCIAMENTO.....	63
3.10.1	<b>Purificação dos Produtos Amplificados</b> .....	63
3.10.2	<b>Quantificação dos Produtos de PCR Purificados</b> .....	63
3.10.3	<b>Reação de Seqüenciamento</b> .....	64
3.10.4	<b>Precipitação do DNA</b> .....	64
3.10.5	<b>Eletroforese de Seqüenciamento</b> .....	65
3.10.6	<b>Análise das Seqüências</b> .....	65

4	<b>RESULTADOS</b> .....	66
4.1	TEMPERATURA DE HIBRIDIZAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> .....	66
4.2	ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS.....	67
4.3	PCR-RFLP.....	74
5	<b>DISCUSSÕES</b> .....	78
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	85
	<b>REFERENCIAS</b> .....	86
	<b>APÊNDICE</b> .....	94

## 1 INTRODUÇÃO

O Filo Apicomplexa consiste de um grupo diversificado de protozoários, caracterizado pela presença de uma estrutura intracelular, denominada complexo apical, formada por organelas especializadas e localizada na extremidade anterior da célula parasitária (LEVINE, 1970). Este complexo apical está vinculado à invasão do parasito na célula hospedeira (SOLDATI et al., 2001; TOMLEY et al., 2001).

Neste filo, o grupo de organismos mais numeroso é aquele formado pelos coccídios, termo usualmente aplicado para a categoria classe ou sub-classe (LEE et al., 2001; TENTER et al., 2002). As hierarquias taxonômicas ulteriores são tradicionalmente definidas com base em traços fenotípicos, como caracteres morfológicos das formas de vida e características de ciclo biológico dos organismos (TENTER et al., 2002).

Entre os coccídios são descritas desde espécies homoxenas de estrita especificidade de hospedeiro até outras heteroxenas envolvendo grande amplitude de hospedeiros intermediários para o desenvolvimento de seu ciclo de vida (TENTER et al., 2002).

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. Esta Família é subdividida em duas sub-famílias denominadas Sarcocystinae e Toxoplasmatinae.

Enquanto a sub-família Sarcocystinae vem sendo considerada monogenérica com mais de 180 espécies descritas, a sub-família Toxoplasmatinae é composta por quatro

gêneros: *Toxoplasma* (uma espécie), *Neospora* (duas espécies), *Hammondia* (duas espécies) e *Besnoitia* (seis espécies) (TENTER; JOHNSON, 1997).

Integrantes 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 por penetração ativa ou fagocitose e se multiplicam rapidamente por endodiogenia dentro de um vacúolo parasitóforo. A célula hospedeira se rompe quando não suporta mais o crescimento dos taquizoitos, que então invadem células vizinhas (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; SPEER et al., 1999). Em um segundo momento, as células parasitárias se dividem lentamente, encerradas no interior de cistos teciduais. Nesta fase, as células parasitárias, os bradizoítos, 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 bradizoítos iniciam uma nova 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 esporozoítos cada (DUBEY, 1993).

## 1.1 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE *Toxoplasma gondii* E *Hammondia hammondi*

O *T. gondii* foi descrito em 1908, quase simultaneamente, por Splendore (1908), no Brasil, em coelhos, e por Nicole e Manceaux (1908), em um roedor africano, *Ctenodactylus gondi*, na Tunísia. Em 1970, Frenkel e Dubey (1970), confirmaram o gato como hospedeiro definitivo após identificarem estágios sexuais do parasito no intestino delgado e a presença de oocistos nas fezes desses animais.

O *T. gondii* é prevalente na maior parte do mundo e tem grande importância médica e veterinária, podendo causar abortos ou doenças congênitas graves nos hospedeiros intermediários. A infecção por *T. gondii* pode levar a formação de cistos latentes, bem como, em indivíduos imunossuprimidos haver uma reativação da infecção latente, levando a quadros clínicos severos e muitas vezes fatais. Em animais de produção como ovinos, caprinos e suínos, os abortamentos e mortalidades neonatais acarretam prejuízos econômicos (DUBEY, 1994).

O ciclo de vida do *T. gondii* é heteroxeno facultativo e pode envolver todos os animais de sangue quente, incluindo mamíferos, aves, humanos (DUBEY, 1994; TENTER; HECKEROTH; WEIS, 2000).

A *Hammondia hammondi* é estruturalmente e antigenicamente similar ao *T. gondii*. O gato é o único hospedeiro definitivo conhecido da *H. hammondi* (DUBEY; SREEKUMAR, 2003; FRENKEL; DUBEY, 1975a, b). Apesar da similaridade entre os dois agentes, existem algumas características antagônicas entre eles, tais como: a *H. hammondi* não é transmitida congenitamente pelos seus hospedeiros; os oocistos e taquizoítos não são

infectantes para os hospedeiros definitivos; e os taquizoítos e bradizoítos não infectam os hospedeiros intermediários. Esses se infectam apenas com a ingestão oral de oocistos (DUBEY; SREEKUMAR, 2003).

Diferentemente do que ocorre com o *T. gondii*, a *H. hammondi* é um parasito heteroxeno obrigatório (FRENKEL e DUBEY, 1975a, b; WALLACE, 1975). Isso foi observado por Frenkel e Dubey (1975a) a partir do isolamento em fezes de um gato selvagem (*Felis catus*) naturalmente infectado. No início acreditavam tratar-se de oocistos de *T. gondii*, mas estudos detalhados sobre o ciclo biológico desse organismo, indicaram que essa espécie de protozoário necessitava de um ciclo obrigatório em dois hospedeiros, ou seja, os felinos apenas infectam-se caso ingiram cistos teciduais dos hospedeiros intermediários (FRENKEL; DUBEY, 1975a).

Frenkel e Dubey (2000) consideram a diferença de ciclo biológico, heteroxeno facultativo no *T. gondii* e heteroxeno obrigatório na *H. hammondi*, como fator suficientemente importante para discriminar esses agentes em diferentes gêneros e espécies. Heydorny e Mehlhorn (2001) discutem essa proposição, uma vez que, estes autores afirmam que, o ciclo homoxeno de *T. gondii*, com a inoculação via oral de doses altas de oocistos, ocorreram apenas em condições experimentais e em menos de 30% dos gatos estudados. No entanto, a ingestão de cistos teciduais de *T. gondii*, levou a produção de oocistos em quase 95% dos gatos. Na opinião deles, o ciclo de vida do *T. gondii* é primariamente heteroxeno e apresenta restritas transmissões homoxenas.

Além disso, há o fato de que poucos estudos foram executados com a *H. hammondi* em gatos, o que torna insuficiente para categorizá-la como espécie de um novo gênero (HEYDORNY; MEHLHORN, 2001).

Em resposta a essas críticas, Dubey e Sreekumar (2003), relatam um extenso estudo sobre a *H. hammondi* e apresentam suas diferenças em relação ao *T. gondii*. A começar, duas características morfológicas ultraestruturais são diferentes entre os dois protozoários quando comparados em estudos citológicos. A primeira é que nos taquizoítos, as roptrias de *H. hammondi* são eletro-densas, enquanto que no *T. gondii* são eletro-lúcidas e a segunda diferença, está na presença de corpo cristalóide em esporozoítos de *H. hammondi* e a ausência dos mesmos nos *T. gondii* (DUBEY; SCREEKUMAR, 2003; SPEER et al., 1998).

Nos gatos foram encontrados esquizontes e gamontes de *H. hammondi* nas células do intestino delgado 4 dias após a ingestão de tecidos de camundongos cronicamente infectados. O desenvolvimento extraintestinal e a formação de taquizoítos e cistos teciduais não foram encontrados nesses animais em cortes histológicos, imunohistoquímica, ou pelo bioensaio. Ao passo que, essas formas biológicas do *T. gondii* já foram amplamente relatadas nos felinos (DUBEY; SREEKUMAR, 2003).

Em transmissões envolvendo a *H. hammondi*, os gatos infectam-se somente com a ingestão de cistos presentes nos hospedeiros intermediários. Como prova disso, camundongos foram inoculados via oral com oocistos de *H. hammondi* e com apenas 1 dia taquizoítos foram encontrados nos tecidos desses animais. No entanto, os felinos alimentados com esses camundongos não eliminaram oocistos. Tal fato ocorreu apenas quando os gatos foram alimentados com camundongos inoculados há 10 dias (DUBEY; STREITEL 1976; DUBEY; SREEKUMAR, 2003). No caso do *T. gondii*, os três estágios, taquizoítos, cistos contendo bradizoítos e oocistos, são infectantes tanto para hospedeiros intermediários como definitivos (DUBEY; BEATTIE, 1988).



Em observações microscópicas os cistos de *H. hammondi* foram visualizados principalmente nos músculos esqueléticos e cardíacos, vísceras, linfonodos mesentéricos e poucos no cérebro de camundongos experimentalmente infectados. Ao passo que, cistos de *T. gondii* são observados em grande quantidade no tecido nervoso desses animais (DUBEY; STREITEL 1976; DUBEY; SCREEKUMAR, 2003).

Os cistos intramusculares de *H. hammondi* e *T. gondii* não possuem diferenças significativas ultraestruturalmente nos músculos esqueléticos, exceto pelo tamanho dos bradizoítos que foi de 4 a 5 x 1,2  $\mu\text{m}$  e 7 a 8 x 1,5-2  $\mu\text{m}$ , respectivamente (MEHLHORN; FRENKEL, 1980). No entanto, essas mensurações discordam das obtidas por Dubey e Sreekumar (2003), onde os bradizoítos de *H. hammondi* foram ligeiramente maiores que os do *T. gondii*, sendo 5.9 x 1.3  $\mu\text{m}$  e 5.4 x 1.1  $\mu\text{m}$  respectivamente. De qualquer forma, as diferenças em termos de localização e tamanho entre os cistos teciduais de ambos protozoários não são suficientes para a diferenciação entre eles (HEYDORN; MEHLHORN, 2001; DUBEY; SREEKUMAR, 2003).

No geral, o estudo realizado por Dubey e Sreekumar (2003) relata que taquizoítos, bradizoítos, oocistos e esporozoítos da *H. hammondi* são aproximadamente 1 $\mu\text{m}$  maiores que essas estruturas no *T. gondii*.

Em cultura celular já foi descrita a infecção de *H. hammondi* nas células CRKF (rim de felino), CV1 (rim de macaco Verde Africano) e M617 (monócito de bovino), por taquizoítos e esporozoítos, que formaram estruturas que se assemelhavam a bradizoítos e cistos teciduais (RIABI et al., 1995; DUBEY; SCREEKUMAR, 2003). Os cistos formados nas culturas celulares foram similares aos observados nos músculos e tampouco diferiam dos cistos mantidos *in vitro* de *T. gondii* (RIABI et al., 1995). No

entanto, esse parasito não se mantém indefinidamente em cultura de células, como observado nas culturas de *T. gondii*. (DUBEY; SCREEKUMAR, 2003; RIAHI et al., 1995).

Outra diferença importante entre ambos os organismos é o fato de que em camundongos a *H. hammondi* não resiste a mais de uma passagem, diferentemente do *T. gondii* que pode ser mantido indefinidamente nesses animais (DUBEY; SREEKUMAR, 2003; WALLACE, 1975).

Nos gatos e nos hospedeiros intermediários, com exceção dos murinos, a infecção por *H. hammondi* não parece causar nenhuma sintomatologia clínica, no entanto, a infecção experimental com oocistos em camundongos mostrou ser algumas vezes patogênica, provocando sintomas como letargia, anorexia, diarreia e algumas vezes morte (FRENKEL; DUBEY, 1975a, b; DUBEY; STREITEL, 1976).

Quando comparado a patogenicidade entre os dois protozoários acometendo hamsters e camundongos, o *T. gondii* demonstra uma mortalidade de animais muito mais elevada do que a *H. hammondi*. Além disso, o número de mortes e de cistos viáveis nos cérebros de animais pré-imunizados com oocistos de *H. hammondi* e que sofreram posterior desafio com oocistos de *T. gondii* em doses altas, foi muito menor que em animais que não foram expostos anteriormente a *H. hammondi*, indicando que esse organismo confere certo fator de proteção às infecções por *T. gondii* (CHRISTIE; DUBEY, 1977).

Em relação aos testes sorológicos, a *H. hammondi* apresenta reação cruzada com o *T. gondii*, porém os títulos são inferiores, quando comparados aos títulos obtidos nas

infecções por *T. gondii* nos hospedeiros intermediários (FRENKEL; DUBEY, 1975b, 2000). Adicionalmente, algumas organelas internas da *H. hammondi* como o complexo apical, grânulos densos, micronemas e roptrias, apresentaram antígenos que foram reconhecidos por anticorpos monoclonais anti-*T. gondii* (RIAHI et al., 1999).

A partir dessas relações antigênicas encontradas entre os dois agentes, Heydorn e Mehlhorn (2001) mais uma vez contestam a existência da necessidade de se criar um novo gênero e uma nova espécie, uma vez que, não existam casos semelhantes de espécies pertencentes a gêneros diferentes que sejam capazes de mediar, mesmo que parcialmente, imunidade um contra o outro.

Antes da descrição do gênero *Hammondia*, a Microscopia Eletrônica permitia a diferenciação entre *T. gondii*, algumas espécies de *Frenkelia*, *Sarcocystis* e *Besnoitia* através da visualização das características específicas de cada gênero pela morfologia de cistos teciduais, (MEHLHORN; FRENKEL, 1980). Entretanto, após a descrição das duas espécies de *Hammondia* a dificuldade na diferenciação entre os organismos aumentou, uma vez que a morfologia entre os cistos de *T. gondii* e das *H. hammondi* e *H. heydorni*, são muito semelhantes (MATSUI, 1991; MEHLHORN; FRENKEL, 1980).

## 1.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE *Neospora caninum* E *Hammondia heydorni*

Divergências semelhantes ocorrem entre o *N. caninum* e a *H. heydorni* que tem os cães como hospedeiros definitivos, todavia, ambos parasitos não possuem suas características e ciclos biológicos bem elucidados.

### 1.2.1 *Hammondia heydorni*

Oocistos não esporulados foram encontradas nas fezes de um cão alimentado com carne crua de bovino por Heydorn e Rommel (1972). Após a esporulação esses oocistos mensuravam 11,9 x 11,1µm e foram considerados, devido ao tamanho e morfologia, como sendo similar aos oocistos de *Isospora bigemina* (HEYDORN; ROMMEL<sup>1</sup>, 1972 apud HEYDORN; MEHLHORN, 2002, p. 177). A partir daí, foi realizado uma série de experimentos usando este isolado denominado *I. bigemina* – Berlim 1971, onde o ciclo biológico foi em partes elucidado por Heydorn (1973) e Heydorn et al. (1975) (HEYDORN, 1973<sup>2</sup>; HEYDORN; et al., 1975<sup>3</sup> apud HEYDORN; MEHLHORN, 2002, p. 177).

O nome *Isospora bigemina* foi utilizado inicialmente em parasitos que se desenvolviam na lâmina própria do intestino de cães, porém o protozoário em questão possui o desenvolvimento na superfície do epitélio intestinal (DUBEY et al., 2002a, b).

Os resultados conferidos em relação ao ciclo biológico do *I. bigemina* foram os seguintes: estágios teciduais não foram detectados em cortes histológicos de cães e bovinos, porém, os cães que ingeriram experimentalmente tecidos de outros cães e de bovinos infectados, eliminaram oocistos nas fezes; oocistos esporulados infectaram cães, mas não induziram a eliminação de oocistos pelos mesmos; os oocistos não infectaram gatos, coelhos tampouco camundongos imunocompetentes; e por fim, a

---

<sup>1</sup> HEYDORN, A. O.; ROMMEL, M. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. II. Hundes und Katze als Überträger der Sarkosporidien des Rindes. **Berl Münch Tierärztl Wochenschr**, v. 85, p. 121-123, 1972.

<sup>2</sup> HEYDORN, A. O. Zum Lebenszyklus der Kleinen Form von *Isospora bigemina* des Hundes. I. Rind und Hund als mögliche Zwischernwirte. **Berl Münch Tierärztl Wochenschr**, v. 86, p. 323-329, 1973.

<sup>3</sup> HEYDORN, A. O.; GESTRICH, R.; IPENZYNSKI, V. Zum Lebenszyklus der Kleinen Form von *Isospora bigemina* des Hundes. II. Entwicklungsstadien im Darm des Hundes. **Berl Münch Tierärztl Wochenschr**, v. 88, p. 449-453, 1975.

produção de oocistos eliminados pelos cães foi sempre baixa (1-3 milhões/ cão) (HEYDORN, 1973; HEYDORN; et al., 1975 apud HEYDORN; MEHLHORN, 2002).

Devido aos estudos realizados por Alfred O. Heydorni sobre o ciclo biológico e pela diferença na localização do desenvolvimento do protozoário, Tadros e Laarman (1976) propuseram o nome *Isospora heydorni*. Posteriormente, Dubey (1977) questionou a classificação do parasito como pertencente ao gênero *Isospora*, uma vez que, os oocistos dos organismos deste gênero induzem reprodução sexuada nos hospedeiros definitivos, o que não ocorre com esse protozoário. Desta forma, o *I. heydorni* foi posicionado no gênero *Hammondia* recebendo o nome de *Hammondia heydorni* devido às similaridades estruturais e de ciclo biológico com a já conhecida *H. hammondi*.

Ainda em relação aos experimentos realizados por Heydorn (1973) e Heydorn et al. (1975) referentes ao ciclo biológico, revelaram oocistos não patogênicos, o cão como hospedeiro definitivo da *H. heydorni* e o ciclo sendo heteroxeno obrigatório (HEYDORN, 1973; HEYDORN; et al., 1975 apud HEYDORN; MEHLHORN, 2002).

Posteriormente Dubey e Fayer (1976) realizaram diversos experimentos também na tentativa de melhor elucidar o ciclo biológico da *H. heydorni* e relataram que em condições experimentais o cão pode servir tanto como hospedeiro definitivo, bem como hospedeiro intermediário.

Os achados do experimento supracitado foram os seguintes: ao microscópio não foram encontrados estágios teciduais ou oocistos nas fezes de cães inoculados oralmente com oocistos; oocistos infectaram cães, pois alguns animais que ingeriram tecidos de cães inoculados com oocistos eliminaram oocistos nas fezes; esquizontes e gamontes foram

encontrados nas células epiteliais de cães infectados; oocistos não esporulados mensuraram 11 x 12 $\mu$ m, e quando esporulados mensuraram 12 X 13 $\mu$ m; gatos e camundongos também não foram infectados por oocistos esporulados (DUBEY; FAYER, 1976).

Poucos anos depois, oocistos tipo *H. heydorni* foram encontrados nas fezes de uma raposa (*Vulpes vulpes*) após a ingestão de tecidos de um corço (*Capreolus capreolus*) naturalmente infectado, e nas fezes de coiotes (*Canis latrans*) após a ingestão de ovinos experimentalmente infectados com oocistos. Desta forma, foram caracterizados mais duas espécies de canídeos como hospedeiros definitivos da *H. heydorni*. (DUBEY; WILLIAMS, 1980; ENTZEROTH; SCHOLTYSECK; GRUEL, 1978). O estudo que envolveu o fornecimento de tecidos de corço para a raposa, foi paralelamente realizado em cães, porém esses animais não eliminaram oocistos em suas fezes (ENTZEROTH; SCHOLTYSECK; GRUEL, 1978).

Blagburn et al. (1988) realizaram bioensaios em cães, caprinos e um bovino, a partir de oocistos tipo *H. heydorni* encontrados nas fezes de um cão com caquexia, atrofia bilateral dos músculos temporais e diarreia. Os oocistos esporulados, maiores que o isolado de Heydorn (1973), mensuraram 12,6 x 11,9 $\mu$ m e a quantidade de oocistos encontrada nas fezes deste animal foi bastante elevada ( $1,37 \times 10^9$ ). A presença de sintomatologia e a alta quantidade de oocistos recolhida, foi creditada ao tratamento contínuo com corticosteróide que vinha sendo administrado. Os animais inoculados experimentalmente não adoeceram e estágios teciduais não foram encontrados histologicamente. Neste estudo, apenas os tecidos de caprinos inoculados é que resultam na eliminação de oocistos, o que discorda dos resultados anteriores onde o canibalismo entre cães resultou na eliminação de oocistos. Por todas essas diferenças,

o autor sugere que esse isolado tenha características biológicas diferentes dos isolados anteriormente estudados.

Heydorni e Mehlhorn (2002) apresentaram dados de um estudo não publicado de um isolado de *H. heydorni* que diferia em alguns aspectos do isolado original *I. bigemina* - Berlin -1971. O isolado em questão, denominado *I. bigemina* - Berlin -1974, foi adquirido de um cão poodle sacrificado devido a uma incurável diarreia hemorrágica. Cerca de 600 milhões de oocistos foram recolhidos. Ovinos e caprinos experimentalmente infectados com esses oocistos não apresentaram sintomatologia clínica, porém os cães alimentados com esses tecidos eliminaram uma grande quantidade de oocistos nas fezes. Este isolado assemelhou-se mais ao isolado descrito por Blagburn et al. (1988) do que ao isolado de 1971 descrito por Heydorn (1973), uma vez que, os oocistos apresentavam-se ligeiramente maiores e a quantidade eliminada pelos cães foi muito mais elevada.

Em estudos recentes também não publicados, os mesmos autores indicam a possibilidade de haver mais de uma espécie de coccídea formadores de oocistos tipo *H.heydorni*, todas sendo muito semelhantes, porém com ligeiras diferenças em tamanho, características biológicas e imunológicas (HEYDORNI; MEHLHORN, 2002).

Pesquisando oocistos tipo *H. heydorni* em fezes de cães, Sreekumar et al. (2003) demonstraram que, de cinco isolados negativos para uma PCR específica para detecção de seqüências de *N. caninum* (BASZLER et al., 1999), apenas dois isolados foram positivos pela PCR utilizando *primers* desenhados por Slapeta et al. (2002a), considerados *H. heydorni*-específicos. As amostras negativas foram então testadas por uma terceira PCR utilizando *primers* desenhados a partir de marcadores gerados por DNA polimórfico amplificado ao acaso (RADP), amplificados a partir de isolado

Manhattan-1 de *H. heydorni*, e continuaram negativas. A partir destes resultados, os autores concluem que deva existir variabilidade extensa no táxon atualmente denominado *H. heydorni*.

Algumas pesquisas recentes com coccídios do tipo *H. heydorni*, geneticamente distintos de *N. caninum* e de *H. heydorni* em cães vêm demonstrando que mais de uma espécie de *Hammondia* (ou mais de duas espécies de Toxoplasmatinae além de *H. heydorni* e *N. caninum*) podem utilizar cães como hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 2002a; SCHARES et al., 2002; SLAPETA et al., 2002b).

Schares et al. (2002) analisam a possibilidade de que os oocistos tipo *H. heydorni* eliminados nas fezes de raposas podem pertencer a um parasito diferente dos que acometem os cães, pois nesse estudo tanto os cães quanto as raposas se alimentaram de tecidos de ovinos e caprinos experimentalmente infectados, porém, apenas as raposas eliminaram oocistos tipo *H. heydorni*. Resultado similar ocorreu no estudo de Entzeroth, Scholtyssek e Gruel (1978) onde também apenas uma raposa eliminou oocistos.

Os oocistos isolados de raposa obtidos por Schares et al. (2002) não resultaram em fragmentos específicos para *N. caninum* na reação em cadeia pela polimerase (PCR). No seqüenciamento de genes RNA ribossomal, o ITS-1 e o domínio D2/ D3 (segmentos do DNA que codifica o 28S), revelaram similaridade às seqüências designadas *H. heydorni*. O gene ITS-1 foi 99% idêntico com *H. heydorni*, porém as regiões D2/D3 diferiam em algumas posições das seqüências disponíveis de *H. heydorni*.



Mohammed et al. (2003) baseado em seqüências do domínio D2/ D3 da subunidade maior do ribossomo (28S do rDNA), apontam para a possibilidade de que os isolados de cães e raposas *H. heydorni* constituem populações geneticamente diferentes.

Sreekumar et al. (2004) detectaram polimorfismo entre diferentes isolados de *H. heydorni* da Argentina, Brasil e Estados Unidos. Os métodos de detecção foi pelo polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) e pelo polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP). Este estudo não demonstra que essa ligeira heterogeneidade está relacionada com as diferentes distribuições geográfica, tampouco com a espécie hospedeira, cão ou raposa.

Ainda em relação à diversidade gênica da *H. heydorni* entre cães e raposas, Abel et al. (2006) estudaram oocistos em um cão naturalmente infectado, imunossuprimido devido a altas doses de medicamentos e com episódios de diarreia. Os oocistos deste animal foram comparados com os oocistos de raposas e de outros cães, através das seqüências de ITS-1 e  $\alpha$ -tubulina. Enquanto as seqüências de ITS-1 foram compatíveis com as seqüências disponíveis em banco de dados, as análises em gel de agarose e no seqüenciamento da  $\alpha$ -tubulina revelaram uma inserção de 9 pb nas amostras de raposas que estavam ausentes nas de cães, sugerindo que existam diferenças genéticas entre os isolados destas duas espécies de animais.

Os esporozoítos do isolado de oocistos de raposas similares, mas geneticamente diferentes da *H. heydorni* (SCHARES et al., 2002), foram adicionados a linhagens de células embrionárias de coração de bovino. Passado três meses de infecção, a média de vacúolos parasitóforos havia caído muito. Isto sugere que não se consegue estabelecer uma contínua cultura de células derivadas do isolado *Hammondia* sp. de

raposas. Esse fato contradiz com o que se observa em *T. gondii* e *N. caninum*, mas está de acordo com os resultados encontrados nas tentativas de se estabelecer um sistema de cultura de células contínuo para *H. heydorni* ou *H. hammondi* (SCHARES et al., 2003).

Esporozoítos de *H. heydorni* obtidos de um cão naturalmente infectado foram inoculados em culturas celulares de células endoteliais da artéria pulmonar (CPA), Madin-Darby bovine kidney (MDBK), monócitos de bovinos (M617) e monócitos de ovinos (WOMO). Os esporozoítos penetraram nas quatro linhagens celulares e se reproduziram por endodiogenia formando estruturas semelhantes a cistos. Com o passar dos dias as células foram se multiplicando cada vez menos e quando transferidas para outras culturas não inoculadas, os taquizoítos não penetraram nem se desenvolveram (SPEER et al., 1988).

A única descrição de cistos teciduais de *H. heydorni* foi em cérebros de dois cobaios que haviam ingerido oocistos do parasito. Esses cistos foram indistinguíveis dos cistos descritos de *T. gondii* (MATSUI, 1991).

Slapeta et al. (2002a) analisando seqüências disponíveis no GenBank indicaram a existência de inserções e deleções consistentes que acontecem na região ITS-1 de isolados de *T. gondii*, *H. heydorni*, *H. hammondi* e *N. caninum*. Com primers desenhados sobre estas inserções e deleções os autores desenvolvem um método diagnóstico capaz de detectar exclusivamente seqüências de *H. heydorni* em oocistos naturalmente eliminados de fezes de cães.

### 1.2.2 *Neospora caninum*

Em 1984 foi descrita uma enfermidade neurológica em filhotes de cães da Noruega, que provocava encefalomielite, miosite e paresia. Parasitos livres foram encontrados no cérebro e nos músculos e parasitos encistados no cérebro assemelhavam-se ao *Toxoplasma gondii*, porém os testes sorológicos e o boiensaio em camundongos foram negativos para este organismo (BJERKÄS; MOHN; PRESTHUS, 1984).

Pouco depois, Dubey et al. (1988a) tornaram a analisar cortes histológicos de 23 cães mortos anos e meses antes diagnosticados como toxoplasmose. Somente 13 desses animais confirmaram o *T. gondii* como causador das patologias, enquanto que nos outros 10 cortes foi identificado um novo gênero, o *Neospora*, e uma nova espécie, o *Neospora caninum*.

A nomeação desse parasito em um novo gênero ocorreu devido às diferenças observadas quando comparado ao *T. gondii*. Os sintomas clínicos do *N. caninum* foram relacionados a paresia e paralisia de cães, principalmente nos membros posteriores, o que não se observa na toxoplasmose. A ausência de um vacúolo parasitóforo ao redor dos taquizoítos também diferenciou o novo parasito do *T. gondii*. Nas observações relacionadas aos cistos teciduais, ambos organismos possuíram algumas diferenças morfológicas e divergências quanto à localização dos parasitos. A espessura da parede no *N. caninum* foi de 1-4µm e a localização estava restrita a tecidos nervosos, enquanto que a parede do *T. gondii* é bastante delgada com <0.5 µm e os cistos podem ser encontrados em diversos órgãos. Por fim, anticorpos de *T. gondii* não foram encontrados nos cães acometidos, e o parasito não reagiu com anticorpos de *T. gondii* em testes imunohistoquímicos (DUBEY et al., 1988a).

O ciclo biológico do *N. caninum* foi elucidado em 1998, quando foi demonstrada a eliminação de oocistos nas fezes de cães que ingeriram cistos nos cérebros de camundongo infectado, concluindo-se que o cão era um hospedeiro definitivo McAllister et al. (1998). Mais recentemente, observou-se que o coiote (*Canis latrans*) também pode eliminar oocistos nas fezes, demonstrando ser também hospedeiro definitivo do *N. caninum* (GONDIM et al., 2004).

Em relação aos oocistos, os de *N. caninum* não diferiram dos oocistos de *H. heydorni* dos cães tampouco de *H. hammondi* e *T. gondii* dos felinos. Quando esporulados foram de formato esférico a subsférico e mensuraram 11,7 x 11,3µm e os esporocistos alongados mensuraram 7,0 – 8,0 x 2,0 – 3,0µm (LINDSAY; UPTON; DUBEY, 1999).

Uma extensa discussão foi apresentada por Heydorn e Mehlhorn (2002), questionando algumas contradições apresentadas no trabalho que descreveu o *N. caninum* em 1988 quando comparado com estudos posteriores. No trabalho de Dubey et al. (1988a), os autores descreveram a ausência de vacúolo parasitóforo ao redor dos taquizoítos, fato esse que serviu para discriminar o novo organismo do outro coccídeo relacionado, o *T. gondii*. No entanto, no mesmo ano e em outros trabalhos posteriores, o autor descreveu a presença de vacúolo parasitóforo envolvendo os taquizoítos, o que indica que a ausência ou presença dessa estrutura na discriminação e diferenciação de gêneros foi indevida (DUBEY; LINDSAY, 1993; DUBEY et al., 1988b; LINDSAY; DUBEY, 1989; SPEER; DUBEY, 1989; SPEER et al., 1999).

Outra contradição encontrada foi quanto à espessura das paredes dos cistos. Em diversos trabalhos foi descrito as paredes do *N. caninum* como sendo mais espessas que as do *T. gondii*, com cerca de 1 a 4µm (DUBEY; LINDSAY, 1993). Porém, alguns

estudos posteriores descreveram a parede dos cistos bastante delgadas, chegando a cerca de 0,5 $\mu$ m, variando conforme a localização e o tempo de existência do cisto no hospedeiro (DUBEY et al., 1990; SPEER; DUBEY, 1989).

Ainda em relação aos cistos teciduais, a localização encontrada por Peters et al. (2001) também contraria os estudos iniciais sobre o *N. caninum*, uma vez que, foram relatados cistos nos músculos de quatro cães com neosporose e dois bovinos recém-nascidos, confirmados por marcação imunohistoquímica.

Heydorni e Mehlhorn (2002) comentam que os estudos apresentados sobre o *N. caninum* estão sendo comparados principalmente com o *T. gondii*, quando na verdade há a necessidade de se confrontar resultados que comparem o *N. caninum* com a *H. heydorni*, principalmente devido à similaridade de hospedeiros definitivos.

Dubey et al. (2002b) responde a tais críticas com comparações relacionadas às principais diferenças presentes no cultivo celular, nos taquizoítos e em diferenças moleculares. Em relação ao cultivo celular, o *N. caninum* pode ser mantido continuamente em diferentes linhagens de células, o que não ocorre na *H. heydorni*.

Diferenças ultraestruturais nos taquizoítos também são descritas, tais como, diversos grânulos de amilopectina na *H. heydorni* que são ausentes ou raros nos taquizoítos de *N. caninum* e o mesmo possui maior quantidade de micronemas que a *H. heydorni*. Adicionalmente, O *N. caninum* pode ser transmitido a uma variedade de hospedeiros por inoculações subcutâneas de tecidos infectados, enquanto que a *H. heydorni* necessita obrigatoriamente de dois hospedeiros para fechar o ciclo biológico (DUBEY et al., 2002b).

Através de métodos moleculares, o *N. caninum* apresentou-se distinto da *H. heydorni* baseado em seqüências gênicas do ITS-1 e do 28S DNA ribossomal (ELLIS et al., 1999, MUGRIDGE et al., 1999; SCHARES et al., 2001).

Schares et al. (2001) atentam que os experimentos muitas vezes descritos como sendo *H. heydorni* conduzidos anteriores à descoberta do cão como hospedeiro definitivo do *N. caninum* em 1998 (MCALLISTER et al., 1998), devam ser reavaliados criticamente, uma vez que, os estudos que utilizam oocistos tipo *Hammondia* encontrados nas fezes de canídeos podem ter sido descritos indevidamente como *H. heydorni* quando na verdade podem ser *N. caninum* ou talvez outros protozoários coccídeos que também tem o cão como hospedeiro definitivo.

De qualquer forma, o *Neospora caninum* tem sido admitido como um importante causador de desordens neuromusculares em cães e desordens reprodutivas em bovinos acarretando em prejuízos econômicos. Pouco se sabe sobre o seu ciclo biológico Este protozoário é transmitido via transplacentária e essa é a principal rota de transmissão para os bovinos, pela ingestão de tecidos infectados ou pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos excretados pelas fezes de cães (DUBEY, 2003).

Métodos baseados em técnicas moleculares como a PCR e o seqüenciamento automático de ácidos nucléicos podem oferecer uma alternativa eficiente para a diferenciação de organismos cujas características morfológicas são indistinguíveis. No caso dos membros da sub-família Toxoplasmatinae, PCRs específicas para *T. gondii* e *N. caninum* já foram desenvolvidas e tentativas de desenvolvimento de diagnóstico molecular de oocistos de outras espécies vêm sendo continuamente produzidas

(MÜLLER et al., 1996; SLAPETA et al., 2002a; YAMAGE; FLECHTNER; GOTTSTEIN, 1996).

### 1.3 Marcadores Moleculares para Estudos Filogenéticos da Sub-Família Toxoplasmatinae.

Inferências filogenéticas da sub-família Toxoplasmatinae feita com base em dados fenotípicos como especificidade de hospedeiro, padrões de ciclo de biológico, 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 podem ser problemáticas para análises dos gêneros *Toxoplasma*, *Hammondia* e *Neospora*, visto que ciclos de vida completos somente são conhecidos para o caso do *T. gondii* e *H. hammondi* (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 (TENTER et al., 2002).

O DNA codificador de RNA ribossomal de eucariotos consiste de múltiplas cópias de um conjunto de segmentos que contemplam genes que são transcritos para originar as unidades 18S, 5,8S e 28S, moléculas estruturais dos ribossomos. Neste conjunto de

segmentos de DNA, os genes que codificam as unidades 18S e 5,8S são intercalados por um segmento espaçador denominado ITS-1 (do Inglês *internal transcribed spacer*). Da mesma forma, os genes que codificam as unidades 5,8S e 28S são intercalados pelo segmento espaçador ITS-2 (HILLIS; DIXON, 1991).

De maneira geral, para comparação entre organismos, as seqüências codificadoras da unidade 18S (18S rDNA) são utilizadas para elucidar divergências pré-cambrianas enquanto as seqüências codificadoras da unidade 28S (28S rDNA), para divergências paleozóicas e mesozóicas. As seqüências ITSs são caracterizadas por possuírem uma taxa evolutiva muito superior àquelas das unidades codificadoras, sendo por isso utilizadas para revelar divergências entre organismos que ocorreram em períodos muito mais recentes (HILLIS; DIXON, 1991; OLSEN; WOESE, 1993).

Divergências entre os organismos pertencentes ao grupo dos coccídios vêm sendo aferidas pela pesquisa do *locus* ribossomal, em especial as seqüências 18S rDNA (JENKINS et al., 1999; MORRISON et al., 2004; TENTER et al., 1994). Recentemente, estudos filogenéticos empregando seqüências 28S rDNA e ITS-1 vêm sendo conduzidos para pesquisar divergências existente entre grupo de organismos estreitamente relacionados, como o grupo dos coccídios formadores de cistos e os pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae (ELLIS et al., 1998; 1999; HOMAN et al., 1997; LANGUNNASCH et al., 1998; MUGRIDGE et al., 1999; MUGRIDGE et al., 2000; OBORNIK et al., 2002a; OBORNIK et al., 2002b).

De fato, as elevadas taxas evolutivas das seqüências ITS do rDNA nuclear têm encorajado alguns autores a pesquisar estes marcadores para diferenciar organismos estreitamente relacionados dentro do filo Apicomplexa (TENTER et al., 2002).



Embora os dados moleculares vêm apontando que os membros da família Sarcocystidae são muito mais relacionados do que se imaginava quando consideradas apenas comparações de dados de natureza fenotípica (ELLIS et al., 1998, 1999, MURGRIDGE et al., 1999; SLAPETA et al., 2002a e 2002b; TENTER et al., 2002), reconstruções filogenéticas baseadas nas informações do gene codificador da unidade 28S do RNA ribossomal oferecem informações suficientes para que seja sugerido que os coccídios formadores de cistos sejam divididos em duas linhagens distintas, uma contendo os gêneros *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Neospora* e *Besnoitia* e outra contendo organismos do gênero *Sarcocystis* (ELLIS et al., 1999; MURGRIDGE et al., 1999). Nestas análises, o gênero *Hammondia* é parafilético, pois *H. Heydorni* e *N. caninum* formam *clusters* distintos do grupo formado por *H. hammondi*, *T. gondii*.

De fato, é consenso entre diversos autores que os dados moleculares sugerem que espécies de *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Neospora* e *Besnoitia* têm divergência recente, podendo ser até mesmo agrupadas em um mesmo gênero.

Independentemente das discussões acaloradas sobre a urgência na reclassificação taxonômica das espécies pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae, é fato que existe diversidade genotípica entre isolados pertencentes a este grupo de organismos, em especial aquelas que distinguem *N. caninum* e *H. heydorni* (ELLIS et al., 1999; SCHARES et al., 2002; SLAPETA et al., 2002b).

Além do estudo da região ITS-1, o gene codificador de proteína de choque térmico, HSP70, também pode ser esclarecedor em relação à constituição gênica de coccídias. Essas proteínas denominadas Proteínas de Choque Térmico (*Heat Shock Proteins* - HSPs) têm merecido destaque por constituírem uma resposta comum nos mais distintos

organismos e por serem conservadas ao longo de toda a escala evolutiva. Os genes que codificam HSP do grupo de 70 kDa (HSP70) foram os primeiros a serem isolados e estudados em diversos organismos (CRAIG et al., 1993).

A família HSP70 possui a função de reunir os complexos de proteínas, e quando atuam como moléculas chamadas chaperonas, auxiliam no dobramento de proteínas até a conformação funcional que precisam assumir. Em condições estressantes, as chaperonas são rapidamente ativadas para prevenir a agregação e o dobramento incorreto das proteínas (BUKAU; HORWICH, 1998).

Em condições normais para as células constituem proteínas abundantes e importantes. Entre as funções podemos citar: assistência no dobramento de proteínas recém traduzidas; auxílio para que as proteínas atravessem entre as membranas organelares pela ação de *cis* e *trans*; desmontar proteínas de estruturas oligoméricas; e facilitar degradação proteolítica de proteínas instáveis. Na maioria dos eucariotos, são localizadas em três regiões diferentes nas células, no lúmen do retículo endoplasmático, no citoplasma, e nas organelas como mitocôndrias e cloroplastos (KARLIN; BROCCHERI, 1998).

A incerteza em relação ao diagnóstico e diferenciação entre os protozoários da sub-família Toxoplasmatinae, resulta em discussões que até o momento não foram capazes de esclarecer e fornecer subsídios adequados para tal distinção. Uma apropriada elucidação destes organismos permitiria melhoria e direcionamento adequado nos estudos, além da necessidade que existe em se firmar ou corrigir, a nomenclatura de tais parasitos. A diferenciação torna-se ainda mais necessária no momento em que há o

envolvimento das sintomatologias e perdas econômicas que são provocadas pelo *T. gondii* e *N. caninum*.

Algumas ferramentas moleculares apresentadas permitem diagnosticar somente um dos protozoários, não podendo ser descartada a possibilidade de alguma falha na metodologia empregada da reação, o que acarretaria em falso resultado. Outra maneira de se obter resultados através de ferramentas moleculares baseia-se em PCR seguido de seqüenciamento das amostras, porém isso encarece o procedimento, além de ser possível apenas em laboratórios bem estruturados e que contenham os equipamentos necessários.

Entre as técnicas moleculares disponíveis para a caracterização de amostras de protozoários, está a análise de RFLP, que vem sendo utilizada para estudos de diferentes organismos como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Acanthamoeba*, *Cryptosporidium* (CRISTINA, 1991; GOBET; TOZE, 2001).

A técnica de RFLP baseia-se na clivagem de DNA com enzimas de restrição que reconhecem uma determinada seqüência de quatro a oito bases. Em uma mesma região de um determinado cromossomo compartilhado entre organismos relacionados, observa-se que a seqüência de DNA pode ser similar, porém não idênticas. Desta forma, ao se clivar duas seqüências de DNA relacionadas com a mesma enzima de restrição, o perfil eletroforético apresenta bandas de pesos moleculares diferentes que são os segmentos de comprimentos diferentes obtidos pela clivagem do DNA (CLARK; RUSSEL, 1997).

Com base no que foi exposto, o presente estudo visa identificar oocistos de tipo *H. heydorni* em fezes de carnívoros domésticos através de um método rápido e simples como a PCR-RFLP que seja capaz de gerar resultados possíveis de diferenciação entre os organismos. Adicionalmente, este estudo apresenta reconstruções filogenéticas com a utilização de um gene codificador de proteínas (HSP70) que permite a inclusão de grupos externos nas análises.

## 2 OBJETIVOS

- Identificar oocistos tipo *H. heydorni* em fezes de carnívoros pela análise da seqüência intercalada entre as frações codificadoras das unidades ribossômicas 18S e 5.8S e do gene codificador de proteína de choque térmico HSP70 (heat shock protein 70KDa).
- Distinguir os oocistos de *H. hammondi* dos de *T. gondii* de fezes de felinos e *Neospora* spp. dos de *H. heydorni* de fezes de canídeos por PCR-RFLP de fragmentos de gene codificador da HSP70.
- Propor reconstrução filogenética dos organismos estudados com os dados obtidos e com aqueles recuperados de bases de dados de acesso público.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Neste capítulo estão descritos os materiais e as metodologias utilizadas para a realização deste experimento.

#### 3.1 AMOSTRAS ANALISADAS

Amostras de fezes de cães e gatos submetidas à rotina de exames coproparasitológicos no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP foram avaliadas pelo método de centrifugo flutuação em solução de sacarose ( $d=1,203\text{g/cm}^3$ ) para a pesquisa de oocistos tipo *Hammondia* (*H. hammondi* e *T. gondii* em fezes de felinos e *Neospora* spp. e *H. heydorni* em fezes de caninos). Além das amostras de rotina, o Laboratório já dispunha de uma coleção de amostras armazenadas em dicromato de potássio 2,5%, positivas para oocistos tipo *Hammondia*.

Como controles positivos nas reações de PCR e também para teste da eficiência dos *primers* foram utilizados taquizoítos da cepa NC1 de *Neospora caninum* e da cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Os taquizoítos de *N. caninum* são mantidos por inoculações em células VERO e os de *T. gondii* por inoculação intraperitoneal em camundongos suíços albinos. Também foi utilizado neste estudo amostra de taquizoítos de *N. hughesi* mantido em células VERO, gentilmente cedidos pelo Prof. Luis Fernando Pita Gondim da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Todas as amostras utilizadas neste estudo estão reunidas no quadro 4.

### 3.2 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FEZES

As amostras positivas para oocistos tipo *Hammondia* foram submetidas a uma centrifugação para concentração de oocistos. Dissolveu-se cerca de 1 grama de fezes em 11mL de solução de sacarose ( $d=1,203\text{g/cm}^3$ ). O material foi transferido para tubos tipo falcon e centrifugado a 1.500g por 10 minutos. Os oocistos presentes na superfície da suspensão foram recuperados com o auxílio de uma alça de platina e depositados em lâmina coberta por uma lamínula para visualização ao microscópio óptico a fim de se avaliar a morfologia e estimar a quantidade de oocistos.

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

### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA DOS OOCISTOS

Adicionou-se ao sedimento de oocistos um tampão de extração (Tris-HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1%) até a obtenção de um volume final de 590 $\mu$ L. Realizou-se o congelamento e descongelamento das amostras três vezes consecutivas para melhor rompimento dos oocistos. Adicionou-se 5 $\mu$ L de proteinase K (10 $\mu$ g/ $\mu$ L) e procedeu-se uma incubação em banho-seco por 4 horas à 37°C ou 2 horas a 56°C. Após esse período, realizou-se três novo congelamentos e descongelamentos e adicionou-se mais 5 $\mu$ L de proteinase K (10 $\mu$ g/ $\mu$ L). As amostras foram novamente

incubadas em banho-seco por 2 horas a 56°C ou “overnight” a 37°C. O volume final obtido foi de 600µL.

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

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

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



### 3.4 PURIFICAÇÃO DOS TAQUIZOÍTOS DE *N. caninum*/ *T. gondii*

Partiu-se do material de inoculação de cada agente. Quando o material a ser extraído o DNA era *N. caninum* recolheu-se cerca de 300µL da suspensão de células VERO contendo taquizoítos e no caso de *T. gondii*, 300µL de suspensão de lavado intraperitoneal de camundongos contendo taquizoítos.

Para a extração dos taquizoítos o protocolo utilizado é muito semelhante ao de oocistos, porém mais simplificado e com menos etapas.

As suspensões foram lavadas adicionando-se TE (10mM Tris HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) até completar o volume total de 1,5mL e centrifugado a 12.000g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se o mesmo processo. Os sedimentos contendo taquizoítos foram submetidos à extração do DNA.

### 3.5 EXTRAÇÃO DE DNA DOS TAQUIZOÍTOS DE *N. caninum* E *T. gondii*

Adicionou-se ao sedimento um tampão de extração (Tris-HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1%; proteinase K 10µg/µL) até a obtenção de um volume final de 600µl. Em seguida procedeu-se uma incubação em banho-seco por 2 horas à 56°C ou “overnight” a 37°C.

Para a purificação do material adicionou-se 300µL de fenol e 300µL de clorofórmio, homogeneizou-se e foram centrifugados a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (cerca de 400µL) foi transferido a um novo microtubo e adicionou-se 10%

(40µL) deste volume recolhido de acetato de sódio (3M pH 5,3). As amostras foram homogeneizadas e mantidas em freezer a -20°C por no mínimo 2 horas, ou “overnight”.

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

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

### 3.6 DESENHO DOS *PRIMERS*

Para a amplificação de seqüências intercaladas entre as frações codificadoras das unidades ribossômicas 18S e 5,8S (ITS-1) de organismos da sub-família Toxoplasmatinae foram utilizados um *primer* senso complementar a região 3´terminal da seqüência 18S rDNA e um *primer* anti-senso complementar à região 5´ terminal do gene 5,8S rDNA,. Para isso, foi padronizada uma PCR com o *primer* JS4 (SLAPETA et al., 2002a) como *primer* senso e o *primer* CT2b anti-senso foi desenhado neste estudo.

O *primer* CT2b é complementar à região 5´terminal do gene 5,8S e seu desenho baseou-se nas seqüências parciais e completas do gene 5,8S de *H. heydorni*, *H. hammondi*, *N. caninum* e *T. gondii* disponíveis em bases de dados moleculares.

No presente estudo, descrevemos também os resultados obtidos com a caracterização molecular de fragmentos gênicos codificadores de proteína de choque térmico, no intuito de encontrar marcador molecular para a identificação de espécies pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae. O alvo elegido foi o gene codificador de proteína de choque térmico de 70KDa, a HSP70.

Para o desenho dos *primers*, buscamos regiões similares entre seqüências de *T. gondii* e *N. caninum* que pudessem servir de sítios de ancoragem de *primers* capazes de amplificar fragmentos gênicos de ambas as espécies. Os *primers* desenhados neste estudo foram denominados HSP70 out-F e HSP70-R.

A metodologia empregada para o desenho dos *primers* HSP70 out-F e HSP70-R está sumarizada nos itens a seguir:

1. Pesquisa no Genbank de seqüências de HSP70 para *T. gondii*.
2. Recuperação das seqüências encontradas no item anterior e submissão das mesmas no banco de dados de seqüências genômicas de *T. gondii* <http://toxodb.org/>. Com este procedimento verificamos que as seqüências pesquisadas no item 1 eram contínuas e não intercaladas por íntrons.
3. Submissão das seqüências encontradas no item 1 junto ao banco de seqüências de *N. caninum*, disponíveis no site <http://www.tigr.org/>.
4. Recuperação das seqüências obtidas no item 3.
5. Alinhamento das seqüências obtidas nos itens 1 e 3. As regiões de total similaridade entre as seqüências foram usadas para desenho dos *primers* HSP70out-F e HSP70-R

6. Os *primers* foram sintetizados e utilizados para amplificar as amostras disponíveis neste estudo.

Os pares de *primers* JS4/CT2b e HSP70out-F/HSP70-R (Quadro 1) foram testados para amplificar amostras de taquizoitos de *N. caninum* (cepa NC-1, mantida em cultura de células VERO nos laboratórios da FMVZ-USP) e *T. gondii* (cepa RH, mantida em camundongos nos laboratórios da FMVZ-USP). A seguir, foram testadas todas as amostras de oocistos isoladas de cão e de gato que estavam estocadas nos laboratórios da FMVZ-USP (n=23), bem como três amostras de taquizoitos mantidas em modelos biológicos (uma amostra de *N. hughesi*, cepa Oregon, uma amostra de *T. gondii*, cepa RH1 e uma amostra de *N. caninum*, cepa NC1).

Todas as 32 amostras testadas foram positivas para ambos os pares de *primers*. Dentre as amostras amplificadas com os *primers* JS4/CT2b, 25 foram seqüenciadas para a determinação da seqüência completa de ITS-1 (Quadro 4). Este fragmento foi seqüenciado com os mesmos *primers* que o geraram (ver protocolo detalhado de seqüenciamento nos itens seguintes). As seqüências obtidas foram submetidas ao BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) para a identificação molecular da espécie detectada, por comparação com seqüências já caracterizadas e disponíveis em rede.

Vinte e nove amostras foram seqüenciadas com os *primers* HSP70out-F/HSP70-R. Após a determinação das seqüências obtidas com o par de *primers* HSP70out-F/HSP70-R (Quadro 4), dois novos pares de *primers* internos a estas seqüências foram desenhados. O primeiro deles foi o par HSP70-F/HSP70-R, baseado em seqüências de *T. gondii* e de *H. hammondi*. O segundo par, o HSP400-F/HSP400-R, é baseado em seqüências de *N. caninum*, *N. hughesi* e *H. heydorni*. Assim, os *primers* HSP70-F e

HSP70-R foram utilizados para concluir o seqüenciamento dos fragmentos originados de *T. gondii* ou de *H. hammondi*. Os *primers* HSP400-F e HSP400-R foram utilizados para concluir o seqüenciamento dos fragmentos originados de *N. caninum*, *N. hughesi* ou *H. heydorni*. O desenho de *primers* internos foi necessário por que o fragmento gerado por HSP70out-F/HSP70-R é muito grande. As porções medianas do fragmento não seriam alcançadas com os *primers* HSP70 out-F/HSP70-R.

Todos os *primers* utilizados neste estudo estão identificados no quadro 1.

<b>Primers</b>	<b>Seqüências</b>	<b>Referência</b>	<b>Tamanho do produto</b>
JS4 (senso) CT2b (anti-senso)	5'-CGAAATGGGAAGTTTTGTGAAC-3' 5'-TTGCGCGAGCCAAGACATC-3'	SLAPETA et. al., 2002a Este estudo	Varia entre os organismos
HSP70 out-F (senso) HSP70-R (anti-senso)	5'-CAGTCGGACATGAAGCATTGGC-3' 5'-ATCGCACGCTCACCTTCGTACAC-3'	Este estudo Este estudo	1103
HSP70-F (senso) HSP70-R (anti-senso)	5'-GAACGTCCTCATCTTCGACATGG-3' 5'-ATCGCACGCTCACCTTCGTACAC-3'	Este estudo Este estudo	771
HSP400-F (senso) HSP400-R (anti-senso)	5'-GAAGAGGTTTCAGCCATGGTG-3' 5'-GGTTCTTGCGCTTGAAGTCCT-3'	Este estudo Este estudo	400

Quadro 1 - Seqüência dos *primers* utilizados nas reações de PCR e seqüenciamento, seus respectivos tamanhos em pares de bases e dos produtos que amplificam

### 3.7 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Os *primers* foram testados nas seguintes combinações: HSP70out-F/ HSP70-R, HSP400-F/ HSP400-R e HSP70-F/ HSP70-R.

Para uma reação de 50µL utilizou-se 2,5µL de cada *primer* (10pmol/µL), 5µL de 10x PCR *Buffer*, 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 8µL de dNTP (1,25mM), 0,3µL de *Taq* polimerase e 5µL de DNA extraído da amostra alvo.

### 3.7.1 Temperatura de Hibridização dos Primers

Para testar o desempenho dos pares de *primers* HSP70out-F e HSP70-R, HSP70-F e HSP70-R e HSP400-F e HSP400-R, amostras de DNA extraído de taquizoítos de *T. gondii*, bem como de *N. caninum*, foram submetidas a PCRs com diferentes temperaturas de hibridização, a fim de se avaliar com qual delas se obtinha uma melhor eficiência da reação. A amplificação do DNA foi feita em equipamento Martecycler Gradient Eppendorf.

Para testar os *primers* HSP70out-F e HSP70-R, o ciclo foi realizado da seguinte forma:

- ✓ Desnaturação a 94° por 3 minutos
- ✓ Desnaturação a 94° por 50 segundos
- ✓ Hibridização dos *primers* em 7 diferentes temperaturas: 50,0°C; 52,7°C; 54,0°C; 55,4°C; 56,8 °C; 58,1 °C; 60,4 °C por 50 segundos
- ✓ Extensão a 72°C por 50 segundos
- ✓ 40 ciclos de repetição a partir da desnaturação por 50 segundos
- ✓ Extensão final a 72°C por 5 minutos

Para os pares de *primers* HSP70-F/ HSP70-R e HSP400-F/ HSP400-R o ciclo foi realizado conforme o que se segue:

- ✓ Desnaturação a 94° por 3 minutos
- ✓ Desnaturação a 94° por 30 segundos
- ✓ Hibridização dos *primers* em 7 diferentes temperaturas: 50,0°C; 52,7°C; 54,0°C; 55,4°C; 56,8 °C; 58,1 °C; 60,4 °C por 50 segundos
- ✓ Extensão a 72°C por 30 segundos
- ✓ 40 ciclos de repetição a partir da desnaturação por 30 segundos
- ✓ Extensão final a 72°C por 5 minutos

### 3.7.2 Ciclo da Reação em Cadeia pela Polimerase

Após a determinação da melhor temperatura de hibridização de cada *primer*, o protocolo a seguir foi adotado para a amplificação das amostras com qualquer um dos *primers* desenhados neste estudo.

Para uma reação de 50µL foram utilizados:

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

Os *primers* JS4/CT2b, HSP70-F/HSP70-R, HSP 400-F/HSP 400-R foram utilizados com o seguinte ciclo:

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

Como os *primers* HSP70 out-F/ HSP70-R amplificam fragmentos de 1103 pb, o ciclo utilizado foi mais longo:

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

### 3.8 DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

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



Para a detecção de fragmentos obtidos após restrição enzimática utilizou-se o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 50 pb (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder), analisados em gel de agarose a 2,5%. Nesse caso, em cada orifício do gel foram depositados cerca de 30µL das amostras misturado a 2µL de corante de amostra.

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

A foto-documentação dos géis com os fragmentos amplificados foi realizada pelas câmaras Polaroid Fotodyne Incorporated ou Image Master GE Healthcare.

### 3.9 PESQUISA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO

Após o seqüenciamento dos fragmentos de gene HSP70 das amostras utilizadas neste estudo, foi possível desenhar os *primers* HSP70-F/ HSP70-R e HSP400-F/ HSP400-R.

Os *primers* HSP70-F e HSP70-R delimitam um fragmento de 771 pb tanto de *T. gondii* quanto de *H. hammondi*. Neste segmento, foram pesquisados, com auxílio do programa BIOEDIT (HALL, 1999) sítios para endonucleases de restrição exclusivos para seqüências de cada uma das espécies citadas acima.

Idêntico procedimento foi realizado para o segmento de 400 pb de *N. caninum*, *N. hughesi* ou *H. heydorni* determinado pelo o par HSP400-F/ HSP400-R. Porém, neste caso não foi possível encontrar sítios de restrição que diferenciem *N. hughesi* de *N.*

*caninum*. Entretanto, foram identificados sítios de endonucleases exclusivos para organismos do gênero *Neospora* e para organismos da espécie *H. heydorni*.

Assim, a identificação dos organismos da sub-família toxoplasmatinae das amostras analisadas foi feita com a utilização de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR), seguida de análise dos comportamentos dos fragmentos de restrição (RFLP), capaz de distinguir *H. hammondi* de *T. gondii* e *Neospora* spp. (*N. hughesi* ou *N. caninum*) de *H. heydorni*.

Fragmentos do gene codificador de HSP70 de 771 pb de amostras de oocistos de felinos (*T. gondii* ou *H. hammondi*) foram amplificados pela PCR (com os *primers* HSP70-F e HSP70-R) e submetidos à clivagem enzimática com a enzima *Hin6I*. Dois perfis distintos podem ser gerados a partir de amostras de *T. gondii*: um deles é formado por sete segmentos (clivagens nas posições 161, 230, 324, 326, 410 e 615) e o outro é separado em 6 segmentos (clivagens nas posições 230, 324, 326, 410, 615). Os fragmentos de *H. hammondi* são separados em 5 segmentos (clivagens nas posições 161, 230, 324, 615).

Para demonstração dos perfis foram utilizadas as amostras RH1 (amostra padrão de *T. gondii* utilizada no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ-USP) e 4 amostras de oocistos de *T. gondii* isolados de gatos. A amostra de *H. hammondi* foi de oocisto isolado de gato.

Em amostras de *Neospora* spp. ou *H. heydorni* os fragmentos de 400 pb do gene HSP70 (gerado com os *primers* HSP400-F e HSP400-R) foram clivados com a enzima de restrição *MunI*. Fragmentos oriundos de *Neospora* spp são separados em dois

segmentos de 115 e 285 pb cada, enquanto os fragmentos oriundos de *H. heydorni* dão origem a dois segmentos, um de 141 e outro de 259 pb. Alternativas de enzimas para as amostras de oocistos de cães são: utilização da enzima *KpnI* que cliva apenas fragmentos de *H. heydorni* em dois segmentos de 136 e 264 pb cada e a *StuI* que cliva apenas amostras de *Neospora* spp. em segmentos de 150 e 250 pb. O quadro 2 explica como ocorre a fragmentação dos diferentes produtos de PCR pelas enzimas utilizadas neste estudo. Para demonstração dos perfis obtidos foram utilizadas amostras de *N. caninum* e *H. heydorni* de oocistos isolados de cães.

A figura 1 mostra esquematicamente como os sítios de restrição se distribuem ao longo do fragmento respectivo a cada amostra e a figura 2 mostra uma simulação de migração eletroforética dos fragmentos a serem obtidos.

Em amostras de felinos utilizou-se uma reação de 30µl com o seguinte protocolo:

- ✓ 2,0µL (10 unidades/µL) de *Hin6I* (Fermentas Life Science)
- ✓ 3,0µL de 10X Buffer Tango (Fermentas Life Science)
- ✓ 5,0µL de água ultrapura autoclavada
- ✓ 20,0µL de DNA

Em amostras de caninos utilizando a enzima *MunI* utilizou-se uma reação de 50 µL com o seguinte protocolo:

- ✓ 2,0µL (10 unidades/µL) de *MunI* (Fermentas Life Science)
- ✓ 5,0µL de 10X Buffer G (Fermentas Life Science)
- ✓ 23,0µL de água ultrapura autoclavada
- ✓ 20,0µL de DNA

Em amostras de caninos utilizando a enzima *KpnI* utilizou-se uma reação de 50 µL com o seguinte protocolo:

- ✓ 2,0µL (10 unidades/µL) de *MunI* (Fermentas Life Science)
- ✓ 5,0µL de 10X Buffer *KpnI* (Fermentas Life Science)
- ✓ 23,0µL de água ultrapura autoclavada
- ✓ 20,0µL de DNA

Em amostras de caninos utilizando a enzima *StuI* utilizou-se uma reação de 50 µL com o seguinte protocolo:

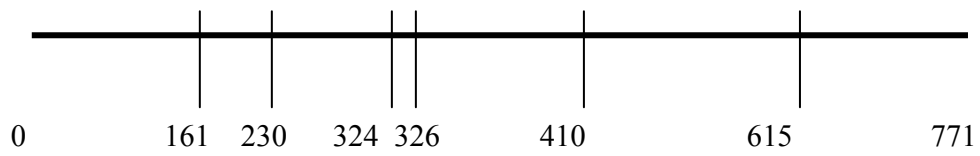
- ✓ 2,0µL (10 unidades/µL) de *StuI* (Fermentas Life Science)
- ✓ 5,0µL de 10X Buffer B (Fermentas Life Science)
- ✓ 23,0µL de água ultrapura autoclavada
- ✓ 20,0µL de DNA

As misturas acima foram incubadas em banho-maria a 37°C por duas horas e em seguida foram novamente submetidas à análise em gel de agarose a 2,0%, como descrito no item 3.7.2.

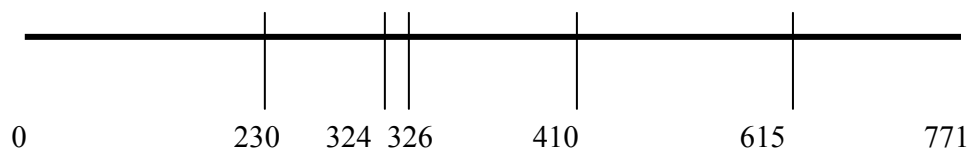
<b>Enzimas de Restrição</b>	<b>Sítios de Clivagem</b>	<b>Produto de 400 pares de bases (HSP400-F e HSP400-R)</b>	
<i>MunI</i>	C'AATTG	<i>Neospora ssp.</i> (115+285)	<i>H. heydorni</i> (141+259)
<i>KpnI</i>	GGTAC'C	Não cliva	(136+264)
<i>StuI</i>	AGG'CCT	(150+250)	Não cliva
<hr/>			
<b>Enzimas de Restrição</b>	<b>Sítios de Clivagem</b>	<b>Produto de 771 pares de bases (HSP70-F e HSP70-R)</b>	
<i>Hin6I</i>	G'CGC	<i>T. gondii</i> (2+84+94+156+205+230) ou (2+69+84+94+156+161+205)	<i>H. hammondi</i> (69+94+156+161+291)

Quadro 2 - Fragmentação dos produtos de PCR dos protozoários frente às diferentes enzimas de restrição

**Perfil 1**  
***T. gondii***



**Perfil 2**  
***T. gondii***



***H. hammondi***

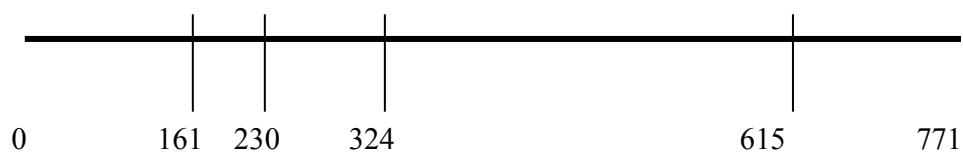


Figura 1 - Posições dos sítios de clivagem da enzima *Hin6I* no fragmento de 771 pb das amostras de felinos amplificadas com os *primers* HSP70-F e HSP70-R

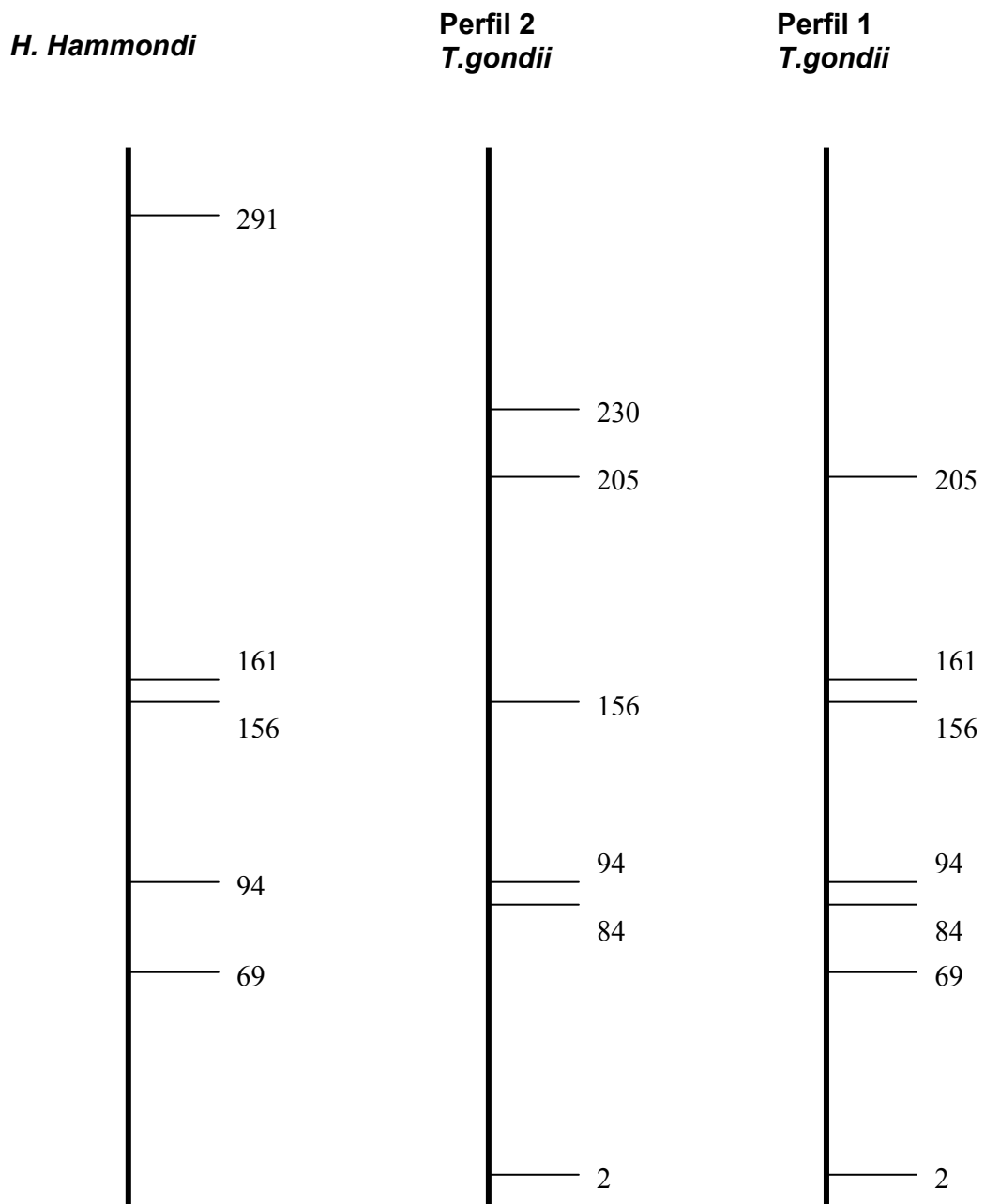


Figura 2 - Esquematização do padrão eletroforético das clivagens realizadas pela enzima *Hin6I* nos fragmentos de 771 pb das amostras de felinos amplificadas com os *primers* HSP70-F e HSP70-R

### 3.10 SEQÜENCIAMENTO

Nos itens abaixo estão descritos as metodologias realizadas para a obtenção das seqüências obtidas.

#### **3.10.1 Purificação dos Produtos Amplificados**

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

#### **3.10.2 Quantificação dos Produtos de PCR Purificados**

Após o procedimento item 3.7.2 Detecção do produto amplificado, alíquotas dos produtos de PCR purificados (5µL) foram quantificadas com o auxílio do marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas) em gel de agarose 1,5% imerso em Tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M). As intensidades luminosas das bandas adquiridas após purificação do DNA foram visualmente comparadas com as do marcador. A concentração em nanogramas de DNA das amostras foi determinada seguindo a tabela fornecida pelo fabricante do marcador de peso molecular.



### 3.10.3 Reação de Seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento utilizou-se o “kit” ABI PRISM™ Big Dye Terminator™ (Applied Biosystems). Misturou-se de 6ng de DNA purificado, 2µL de Big Dye™, 1µL de Tampão SaveMoney 5x (Tris-HCl 400mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM, pH 9,0), 2pmol de cada um dos *primers* (senso ou anti senso) e água q.s.p. 10 µL. As seqüências 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 repete-se por mais 39 vezes a partir da desnaturação. Em seguida, as amostras foram mantidas a 4 °C embrulhadas em folhas de alumínio até a sua precipitação.

### 3.10.4 Precipitação do DNA

Após o ciclo de seqüenciamento, adicionou-se 40µL de isopropanol a 65% (v/v em água) nas amostras. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 15 a 20

minutos em temperatura ambiente e local escuro. Em seguida, foram centrifugadas a 14.000 g por 25 minutos.

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

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

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

### **3.10.5 Eletroforese de Seqüenciamento**

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

### **3.10.6 Análise das Seqüências**

As árvores filogenéticas bem como as distâncias em diferenças de nucleotídeos entre as seqüências foram calculadas com auxílio do programa MEGA. As árvores produzidas foram visualizadas e preparadas para inclusão no documento por meio do programa Tree View. Todas seqüências podem ser visualizadas nos Apêndices A e B.

## 4 RESULTADOS

Neste capítulo estão descritos os resultados obtidos neste experimento.

### 4.1 TEMPERATURA DE HIBRIDIZAÇÃO DOS *PRIMERS*

As combinações de *primers* nas reações de PCR resultaram em fragmentos gênicos com dimensões esperadas.

Foram testadas as combinações de *primers* JS4/CT2b, HSP400-F/HSP400-R, HSP70-F/HSP70-R em amostras de taquizoítos de *T. gondii* ou *N. caninum* para observação das melhores temperaturas de hibridização.

Vale lembrar que os *primers* JS4/CT2b podem ser usados para amplificar seqüências de qualquer membro da sub-família Toxoplasmatinae: *T. gondii*, *Neospora spp.*, *H. heydorni* e *H. hammondi*. Os *primers* HSP400-F/HSP400-R são exclusivos para detecção de seqüências de *Neospora spp.* ou *H. heydorni*. Os *primers* HSP70-F/HSP70-R são para a detecção de *T. gondii* ou *H. hammondi*.

Com os resultados obtidos, pôde-se verificar que os *primers* JS4/CT2b funcionaram satisfatoriamente em qualquer uma das temperaturas de hibridização. Os pares HSP400-F/HSP400-R e HSP70-F/HSP70-R funcionaram melhor em temperaturas de hibridização entre 54,0°C e 55,4°C. Por este motivo adotou-se para todos os casos, a temperatura de hibridização de 55°C. As temperaturas de hibridização no ensaio com os dois diferentes pares de *primers* podem ser verificadas na figura 3.

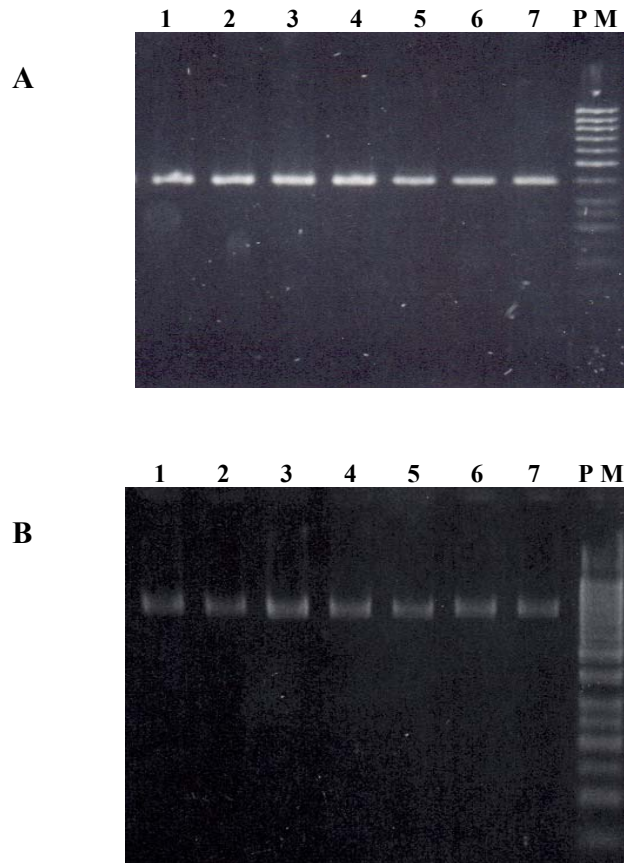


Figura 3 - Amplificação de amostras de taquizoítos em 7 diferentes temperaturas de hibridização para a observação da melhor temperatura de hibridização dos *primers*. (A) taquizoítos de *N. caninum* com os *primers* HSP400-F/HSP400-R. (B) taquizoítos de *T. gondii* com os *primers* HSP70-F/HSP70-R. Temperaturas: (1) 50,0°C; (2) 52,7°C; (3) 54,0°C; (4) 55,4°C; (5) 56,8°C; (6) 58,1°C; (7) 60,4 °C ; (PM) peso molecular

#### 4.2 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

Foram analisadas no total 25 seqüências completas de ITS-1 oriundas de fragmentos gerados pela PCR com os *primers* JS4/CT2b. Dentre elas, 12 seqüências de *H. heydorni*, 2 de *H. hammondi*, 7 de *T. gondii*, 3 de *N. caninum* e 1 de *N. hughesi*.

As seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências homólogas obtidas do GenBank com mapa gênico conhecido. Após o alinhamento, as seqüências foram editadas

manualmente, recuperando-se somente as frações estritamente homólogas à fração ITS-1. Os resíduos 5' terminais de 18S e os 3' terminais de 5.8S foram descartados. As dimensões da região ITS-1, em pares de bases, para *H. hammondi*, *T. gondii*, *H. heydorni*, *N. caninum* e *N. hughesi* foram, respectivamente: 394, 393, 400, 421 e 423.

Entre as seqüências de *T. gondii* identifica-se dois alelos. A diferença entre eles é de apenas um nucleotídeo. Dois alelos com apenas um nucleotídeo de diferença também são identificados entre as seqüências de *N. caninum*. As duas seqüências de *H. hammondi* foram idênticas entre si.

As amostras de *H. heydorni* mostraram-se bem mais divergentes que as das demais espécies. Dentre as seqüências de *H. heydorni*, são reconhecidos 5 alelos. A diferença de número de nucleotídeos entre os alelos de HPS70 e ITS-1 nas seqüências de *H. heydorni* encontra-se no quadro 3. A resolução filogenética para este nível taxonômico permite afirmar que os cinco alelos podem ser agrupados em dois *clados* divergentes, um formado pelos alelos I e II e o outro formado pelos alelos III, IV e V (Quadro 4). Os resultados da identificação molecular das amostras deste estudo encontram-se sumarizados no quadro 5 enquanto a proposta filogenética usando seqüências ITS-1 pode ser encontrada na árvore mostrada na figura 4

As seqüências de *H. hammondi* e *T. gondii* diferem em 14 nucleotídeos e em uma inserção/deleção. A seqüência de *N. hughesi* diferem dos alelos de *N. caninum* em 7 ou 8 substituições e uma inserção/deleção.

Para o gene codificador de HSP70, foram analisadas 29 amostras. Dentre elas, 16 seqüências de *H. heydorni*, 2 de *H. hammondi*, 7 de *T. gondii*, 3 de *N. caninum* e 1 de *N.*

*hughesi*. As seqüências foram alinhadas e comparadas entre si juntamente com duas seqüências padrão de *Toxoplasma gondii* disponíveis no Genbank. No alinhamento produzido não há a ocorrência de inserções/deleções entre nenhum par de seqüência.

As seqüências de *N. caninum* foram todas idênticas entre si. O mesmo ocorrendo com as duas seqüências de *H. hammondi*. A seqüência de *N. hughesi* apresentou apenas uma diferença de nucleotídeo em relação ao alelo de *N. caninum*.

Para as seqüências de *T. gondii* foram identificados pelo menos dois alelos. Seis alelos foram identificados entre as seqüências de *H. heydorni*.

O número de diferenças de nucleotídeos entre as seqüências codificadoras de HSP70 de *H. heydorni* e *T. gondii* variam de 107 a 109, o de *H. heydorni* e *N. caninum* variam de 103 a 113, *H. heydorni* e *H. hammondi* de 106 a 108, *N. caninum* e *H. hammondi* variam em 100, *H. hammondi* e *T. gondii* em 24 e *N. caninum* e *T. gondii* variam em 103 nucleotídeos. Da mesma forma que para o fragmento ITS-1, os alelos de *H. heydorni* podem ser agrupados em dois *clados* divergentes. Um dos *clados* é formado pelos alelos I e II e o outro, pelos alelos III, IV, V e VI (Quadro 4). A árvore ilustrada na figura 5 mostra a divergência observada entre os *clados* de *H. heydorni*.

Tanto na análise de seqüências ITS-1 quanto HSP70, a divergência entre os *clados* propostos é suportada por um ramo com valor de bootstrap 100, o que confere grande confiabilidade a esta reconstrução.

Para se verificar as relações filogenéticas entre as espécies estudadas (*T. gondii*, *H. hammondi*, *H. heydorni* e *N. caninum*) foi inferida uma árvore utilizando como grupo

externo seqüências homólogas de organismos do gênero *Cyclospora*. Os resultados mostram que os táxons *H. hammondi* e *T. gondii* são monofiléticos e geneticamente muito próximos, mas contrariando resultados anteriores, não foi demonstrada a monofilia entre os táxons *H. heydorni* e *N. caninum*. De fato, a análise de diversidade nucleotídica de gene codificador de HSP70 mostra que a distância entre *H. heydorni* e *N. caninum* é tão grande quanto a distância de cada uma destas espécies com *T. gondii*.

As inferências filogenéticas utilizando métodos de distância (Figura 6) e parcimônia (Figura 7) não são concordantes e em nenhum caso a topologia de ramos para reconstrução de filogenia destes táxons é fortemente suportada.

Para se reduzir a interferência de possíveis ruídos filogenéticos devido à saturação de 3° base, foi proposta uma filogenia utilizando apenas os dados da primeira e segunda posição dos códons. Neste caso, nota-se uma topologia com maior suporte estatístico, posicionando o *N. caninum* como grupo irmão de *T. gondii* e não de *H. heydorni* (Figuras 8 e 9).

	I	II	III	IV	V	VI
I						
II	1 (1)					
III	8 (6)	9 (7)				
IV	9 (5)	10 (6)	5 (1)			
V	10 (4)	11 (5)	6 (2)	1 (1)		
VI	8 (-)	9 (-)	4 (-)	1 (-)	2 (-)	

Quadro 3 – Diferença de número de nucleotídeos entre os alelos de HPS70 e ITS-1 nos de *H. heydorni*. O número entre parêntesis corresponde às diferenças entra as seqüências de ITS-1. O número fora dos parêntesis corresponde às diferenças entre os 951 nucleotídeos das seqüências do gene codificador HSP70

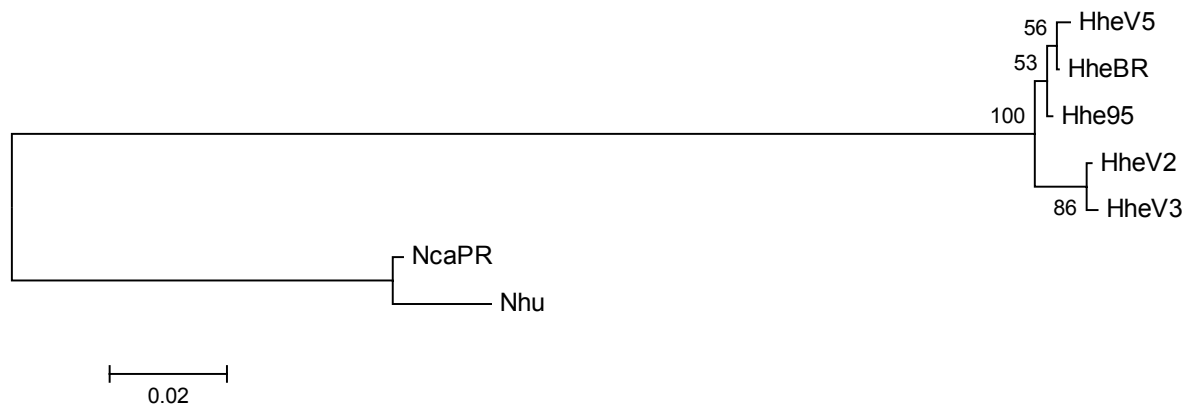


Figura 4 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbor-joining e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros. As amostras de *Neospora caninum* (NcaPR) e *Neospora hughesi* (Nhu) foram utilizadas como *outgroup*. Seqüências completas de ITS-1. Foi incluído apenas um representante de cada alelo de *Hammondia heydorni*. Árvore gerada com o programa MEGA

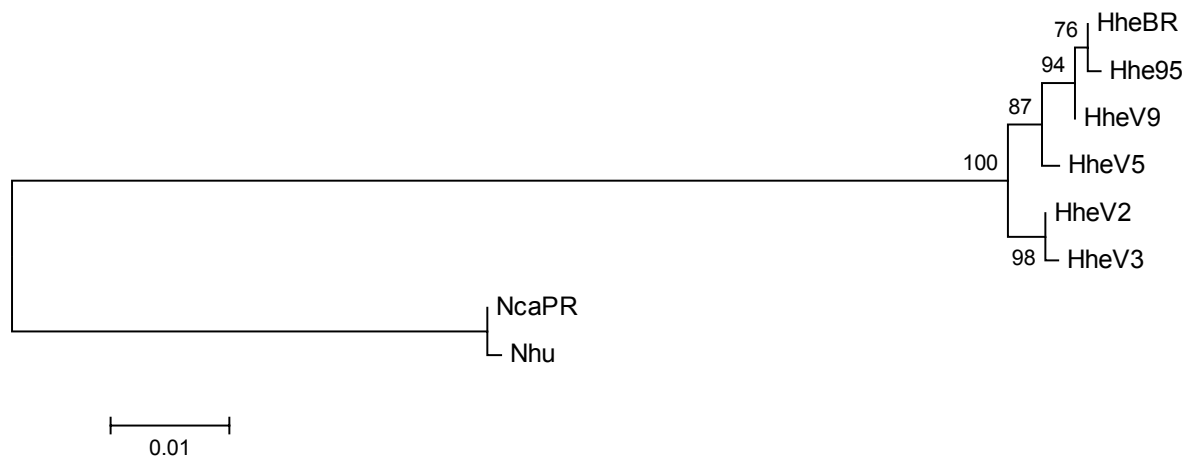


Figura 5 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbor-joining e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros. As amostras de *Neospora caninum* (NcaPR) e *Neospora hughesi* (Nhu). Utilização de 951 nucleotídeos do gene codificador de HSP70. Foi incluído apenas um representante de cada alelo de *Hammondia heydorni*. Árvore gerada com o programa MEGA



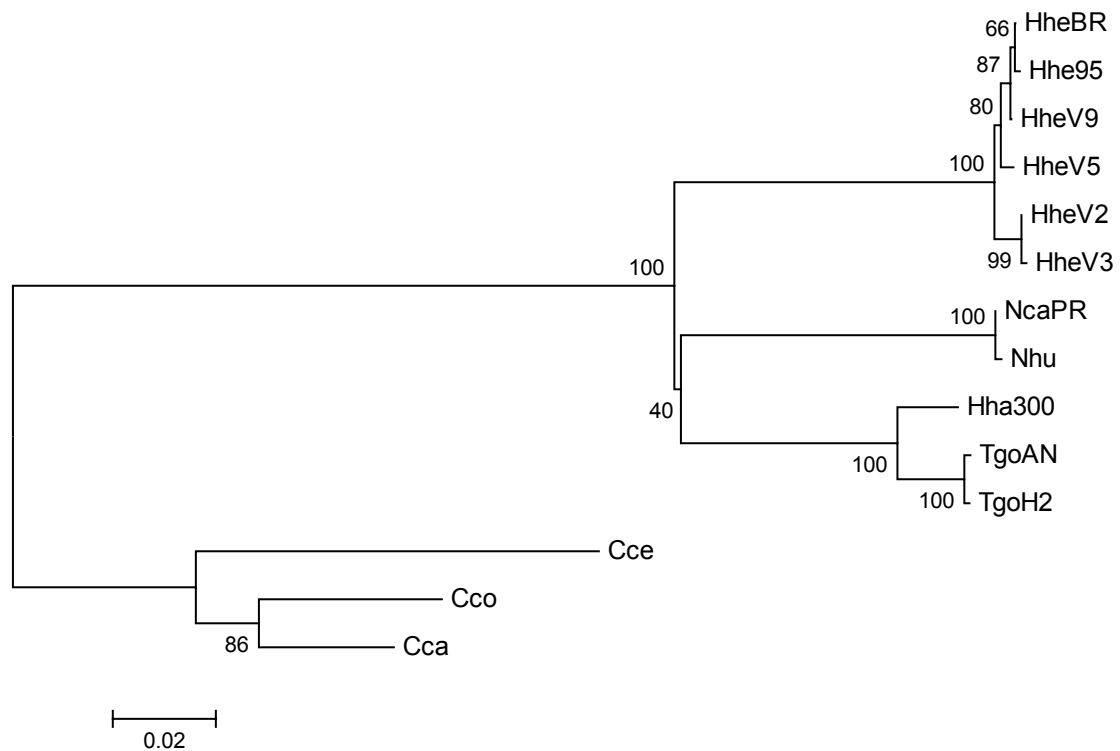


Figura 6 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbor-joining e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros. Seqüências de *Cyclospora colobi*, *C. cayetanensis* e *C. cercophiteci* (Cco, Cca e Cce) foram utilizadas como *outgroup*. Utilização de 951 nucleotídeos do gene codificador de HSP70. Foi incluído apenas um representante de cada alelo de *Hammondia heydorni*. Árvore gerada com o programa MEGA

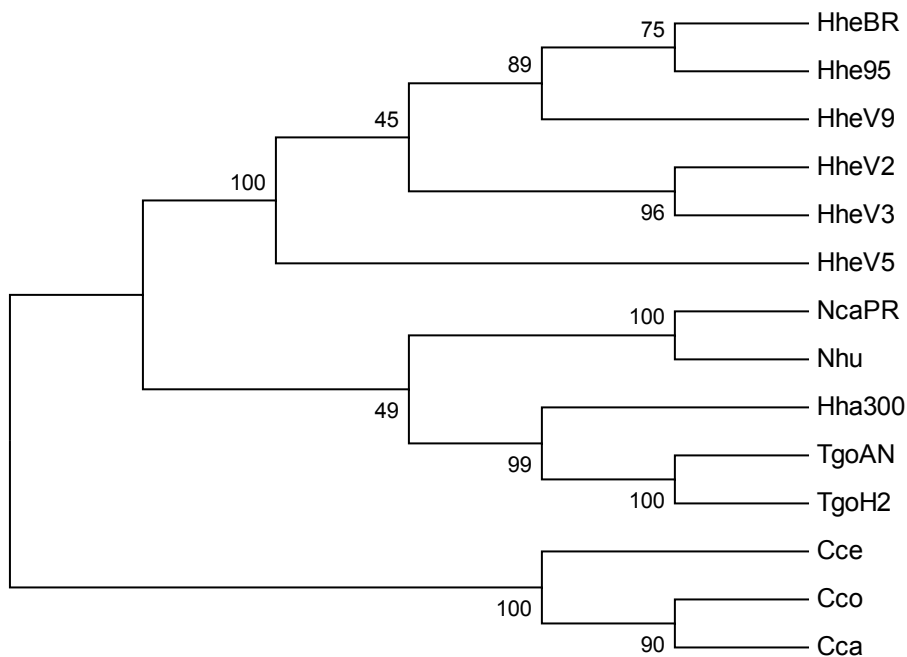


Figura 7 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Parcimônia e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Foi gerada apenas uma árvore mais parcimoniosa com 497 passos (CI = 0.830986, RI = 0.892169). Seqüências de *Cyclospora colobi*, *C. cayetanensis* e *C. cercophiteci* (Cco, Cca e Cce) foram utilizadas como *outgroup*. Utilização de 951 nucleotídeos do gene codificador de HSP70. Árvore gerada com o programa MEGA

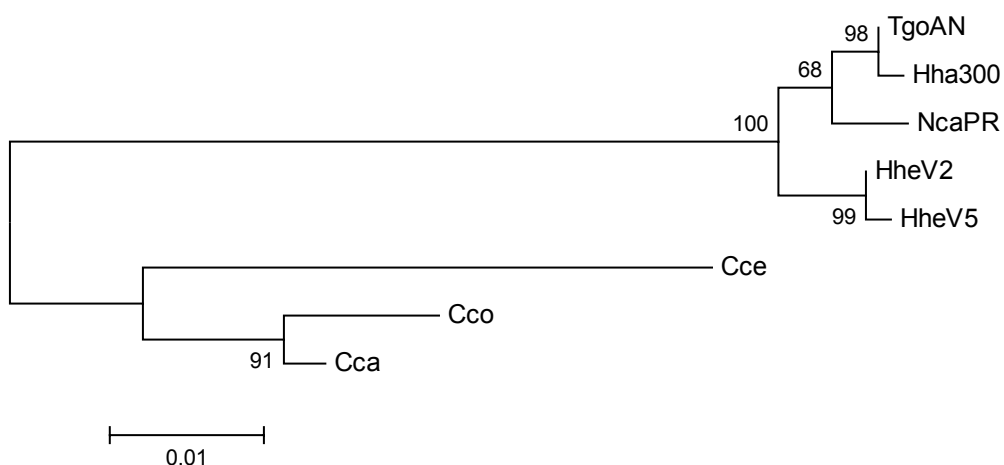


Figura 8 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Neighbor-joining e teste de bootstrap com 1000 réplicas. Modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros, excluindo a terceira posição dos codons. Seqüências de *Cyclospora colobi*, *C. cayetanensis* e *C. cercophiteci* (Cco, Cca e Cce) foram utilizadas como *outgroup*. Utilização de 634

nucleotídeos do gene codificador de HSP70. Foi incluído apenas dois representantes da espécie *Hammondia heydorni* (HheV2 e HheV5). Árvore gerada com o programa MEGA

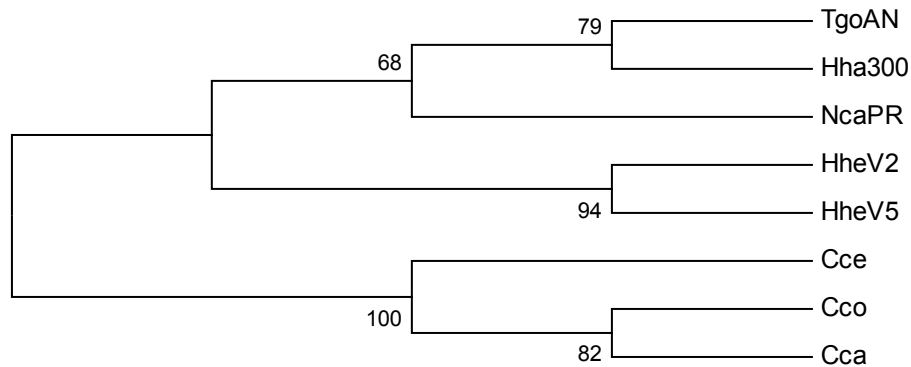


Figura 9 - Reconstrução filogenética com inferência pelo método Parcimônia e teste de bootstrap com 1000 réplicas, excluindo a terceira posição dos codons. Foi gerada apenas uma árvore mais parcimoniosa com 88 passos (CI = 0.931818, RI = 0.933333). Seqüências de *Cyclospora colobi*, *C. cayetanensis* e *C. cercophiteci* (Cco, Cca e Cce) foram utilizadas como *outgroup*. Utilização de 634 nucleotídeos do gene codificador de HSP70. Árvore gerada com o programa MEGA

#### 4.2 PCR-RFLP

Os resultados da PCR-RFLP mostram que é possível a diferenciação entre amostras de *Neospora* spp. e amostras de *H. heydorni* (Figura 10). Também é possível, com outra PCR-RFLP, diferenciar amostras de *T. gondii* de *H. hammondi* (Figura 11).

Ressalta-se que embora duas linhagens de *H. heydorni* podem ser reconhecidas (ver item anterior), os perfis de restrição com as enzimas empregadas neste estudo são idênticos para ambas as linhagens, como pode ser verificado pela análise das seqüências das amostras.

No caso das amostras de *T. gondii*, dois perfis ligeiramente distintos para o fragmento amplificado de 771 pb foram identificados. Entretanto, o único perfil identificado para *H. hammondi* tem padrão claramente diferente dos dois perfis de *T. gondii* (Figura 11).

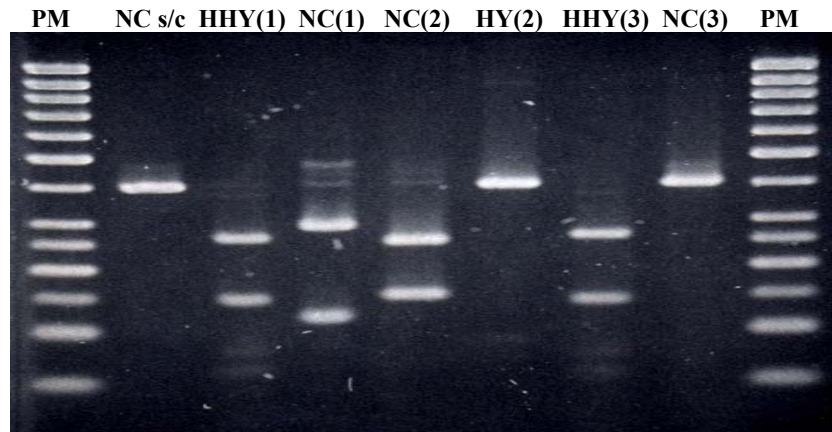


Figura 10 - PCR-RFLP das amostras de oocistos de cães frente as diferentes enzimas com os *primers* HSP400-F/HSP 400-R. As amostras tanto podem ser clivadas apenas com a enzima *MunI*, como podem ser utilizadas as enzimas que cortam apenas um dos organismos. PM: peso molecular; NC s/c: fragmento de 400pb de *N. caninum* sem clivar (indistinguível de *H. heydorni*); Hhy(1): fragmento de 400pb *H. heydorni* clivado com a enzima *MunI* (141 e 259pb); NC(1): fragmento de 400pb *N. caninum* clivado com a enzima *MunI* (115 e 285pb); NC(2): fragmento de 400pb *N. caninum* clivado com a enzima *StuI* (150 e 250pb); Hhy(2): fragmento de 400pb *H. heydorni* submetido à enzima *StuI* (400 pb, não clivado); Hhy(3): fragmento de 400pb *H. heydorni* clivado com a enzima *KpnI* (264 e 136pb); NC(3): fragmento de 400pb *N. caninum* submetido à enzima *KpnI* (400 pb, não clivado)

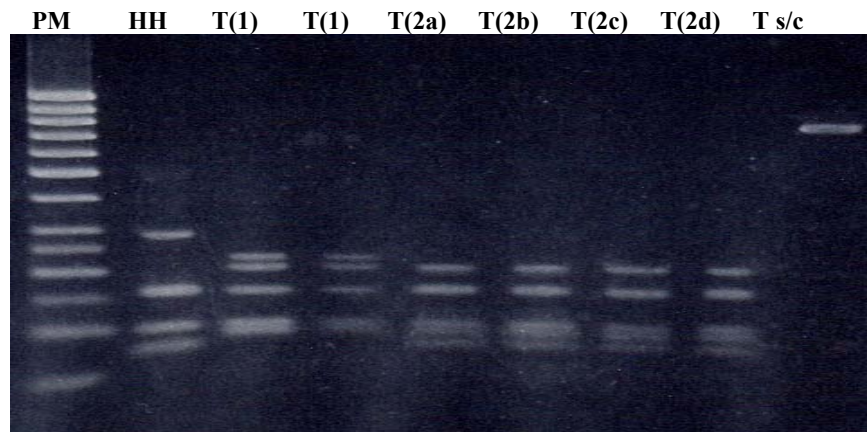


Figura 11 - PCR-RFPL das amostras de gatos com os *primers* HSP70-F/HSP70-R e clivagem com a enzima *Hin6I*. Consultar Figura 2 para conferência dos fragmentos gerados. PM: peso molecular; Hh: *H. hammondi* clivado; T(1): *T. gondii* RH1 usada no laboratório; T(2a): *T. gondii* amostra de oocisto de origem felina; T(2b): *T. gondii* amostra de oocisto de origem felina; T(2c): *T. gondii* amostra de oocisto de origem felina; T(2d): *T. gondii* amostra de oocisto de origem felina; T s/c: *T. gondii* sem clivar (771 pb)

Nº amostras	Isolado	Espécie	Origem	HSP70	ITS-1
1	HheV2 (Virginia -1)	<i>H. heydorni</i>	USA	I	I
2	Hhe47	<i>H. heydorni</i>	Brasil	I	I
3	Hhe147	<i>H. heydorni</i>	Brasil	I	I
4	Hhe376	<i>H. heydorni</i>	Brasil	I	I
5	HheV1 (Manhattan-1)	<i>H. heydorni</i>	USA	II	I
6	HheV3 (Arg33)	<i>H. heydorni</i>	Argentina	II	II
7	HheV5 (Brazil-1)	<i>H. heydorni</i>	Brasil	III	III
8	HheBR	<i>H. heydorni</i>	Brasil	IV	IV
9	HheRHN	<i>H. heydorni</i>	Brasil	IV	IV
10	HheV7 (Arg32)	<i>H. heydorni</i>	Argentina	IV	IV
11	HheV8 (Arg52)	<i>H. heydorni</i>	Argentina	IV	IV
13	HheOTO	<i>H. heydorni</i>	Brasil	V	IV
14	Hhe95	<i>H. heydorni</i>	Brasil	V	V
12	HheV9 (Arg29)	<i>H. heydorni</i>	Argentina	VI	IV
15	Tgo64	<i>T. gondii</i>	Brasil	I	I
16	TgoAN	<i>T. gondii</i>	Brasil	I	II
17	TgoH2	<i>T. gondii</i>	Brasil	II	II
18	TgoP1	<i>T. gondii</i>	Brasil	I	II
19	Tgo115	<i>T. gondii</i>	Brasil	I	II
20	Tgo12_06	<i>T. gondii</i>	Brasil	I	II
21	NcaPR	<i>N. caninum</i>	Brasil	I	I
22	Nca10_06	<i>N. caninum</i>	Brasil	I	I
23	NcaAL	<i>N. caninum</i>	Brasil	I	II
24	Nhu (Oregon1)	<i>N. hughesi</i>	USA	I	I
25	Hha300	<i>H. hammondi</i>	Brasil	I	I
26	Hha305	<i>H. hammondi</i>	Brasil	I	I

Quadro 4 – Número de amostras de protozoários da sub-família Toxoplasmatinae seqüenciadas; isolados (Hhe: *H. heydorni*; Tgo: *T. gondii*; Nca: *N. caninum*; Nhu: *N. hughesi*; Hha: *H. hammondi*); espécie do parasito; origem dos isolados; e resultados de identificação molecular (alelo) das sequencias de HSP70 e ITS-1

## 5 DISCUSSÃO

A especificidade de uma reação de PCR é muito influenciada pela temperatura de hibridização e fusão empregada nos ciclos de amplificação (DIEFFENBACH et al., 1995). A temperatura de hibridização dos primers ao DNA-alvo depende da temperatura de fusão da molécula híbrida, que é a temperatura em que 50% das moléculas estão hibridizadas, em um equilíbrio dinâmico. Essa temperatura de fusão pode ser calculada de diferentes formas e depende das seqüências primárias das moléculas envolvidas e do tamanho dos *primers*. Em uma PCR, é desejável que essa temperatura seja semelhante para ambos os *primers* desenhados. (ABD-ELSALAM, 2003; DIEFFENBACH et al., 1995). Com os *primers* HSP70-F/ HSP70-R e HSP400-F/ HSP400-R deveriam ser usados com fins diagnóstico, foi necessário um experimento para testar as melhores temperaturas de hibridização a serem empregadas.

Assim, foram analisadas diferentes temperaturas de hibridização. Para tanto, utilizou-se um gradiente de temperatura que permitiu variar a temperatura de hibridização em cada tubo separadamente, com amostras de DNA de taquizoítos de *T. gondii* e *N. caninum*.

Todas as temperaturas analisadas resultaram em fragmentos amplificados com dimensões esperadas e sem bandas inespecíficas, porém as temperaturas em que os fragmentos apareceram mais nítidos com os pares de *primers* HSP70out-F/ HSP70-R, HSP70-F/ HSP70-R e HSP400-F/ HSP400-R, encontraram-se na faixa de temperatura entre 54,0°C e 55,4°C. Desta forma, foi possível determinar 55°C como a temperatura de hibridização ideal para todos os *primers* utilizados.

A metodologia utilizada neste trabalho foi baseada em técnicas de PCR e seqüenciamento de duas diferentes regiões gênicas, o espaçador interno transcrito (ITS-1) e o gene codificador de proteínas de choque térmico (HSP70 kDa).

Para a amplificação do ITS-1 empregou-se um par de *primers* (JS4, CT2b), sendo que o JS4 foi desenhado por Slapeta et. al., 2002a na região 3'terminal conservada do gene 18S, e o CT2b que é complementar à região 5'terminal do gene 5,8S, foi desenhado baseado no alinhamento de seqüências parciais e completas do gene 5,8S de *H. heydorni*, *H. hammondi*, *N. caninum* e *T. gondii* disponíveis em bases de dados moleculares. Com ambos *primers* desenhados em regiões conservadas foi possível amplificar todas as amostras de fezes positivas para a presença de oocistos do tipo *Hammondia*, sem distinção dos gêneros e espécies. Após a amplificação, os fragmentos ITS-1 foram seqüenciados e as seqüências foram submetidas ao BLAST para comparação com seqüências já descritas. Este procedimento foi importante para a identificação das espécies de oocistos dos organismos analisados, pois as seqüências de ITS-1 já são conhecidas para todas as espécies de Toxoplasmatinae.

O locus ITS se repete diversas vezes no genoma dos organismos, evolui bastante rápido quando comparados aos genes 18S e 28S e contem sítios polimórficos que pode algumas vezes discriminar populações ou espécies de um mesmo gênero (HILLIS; DIXON, 1991). No caso da sub-família Toxoplasmatinae, as seqüências ITS-1 possuem variações que dificultam um alinhamento robusto com organismos externos relacionados aos membros desta sub-família (ELLIS et al., 1999). Diante da dificuldade em se utilizar organismos externos nas reconstruções filogenéticas pelas dificuldades em se obter um alinhamento múltiplo de seqüências com adequada confiabilidade, a filogenia gerada com esse marcador apenas permite a comparação entre organismos da sub-família



Toxoplasmatinae. No caso deste trabalho a filogenia com ITS-1 permite apenas demonstrar as divergências formadas com as seqüências de *H. heydorni*.

Não obstante, praticamente todos os trabalhos apresentados para solucionar questões filogenéticas referentes aos organismos da sub-família Toxoplasmatinae são baseados em seqüências do gene 18S, ITS-1 e 28S do rDNA (HEYDORN; MEHLHORN, 2002). Desta forma, há uma necessidade muito grande de mais informações filogenéticas válidas especialmente aquelas fornecidas por outros genes, para melhor elucidar a relação entre as espécies classificadas dentro dos gêneros *Toxoplasma*, *Hammondia* e *Neospora* (MUGRIDGE et al., 1999).

Baseado na necessidade de encontrar outro gene que servisse como marcador molecular para os organismos da sub-família Toxoplasmatinae, utilizou-se o gene HSP70. Este gene tem sido amplamente utilizado para examinar a relação evolutiva entre diversos organismos, entre procarionotos e eucarionotos, por codificar uma proteína essencial às células e por possuir seqüências altamente conservadas entre as diversas espécies (GUPTA; GOLDING, 1993).

A informação evolutiva conferida pelo gene codificador de HSP70 foi muito similar àquela fornecida pela seqüência de ITS-1. Dentre as seqüências ITS-1 de *H. heydorni*, são reconhecidos cinco alelos que podem ser agrupados em dois *clados* divergentes. Para o locus HSP70 seis alelos foram identificados entre as seqüências de *H. heydorni* que também puderam ser agrupados em dois *clados* divergentes.

Os resultados acima descritos entram em acordo com os de Sreekumar, et al., 2004 que estudaram o polimorfismo entre 14 isolados de *H. heydorni* baseados nas seqüências do

gene ITS-1. Neste trabalho os autores verificaram a ocorrência de duas linhagens de *H. heydorni* geneticamente divergentes.

Os achados nas resoluções filogenéticas baseadas no gene HSP70 tanto pelo método Neighbor-joining, bem como pelo método Parcimônia, com a utilização de seqüências de *Cyclospora* spp. como grupo externo corroboram com alguns estudos onde a monofilia entre *H. hammondi* e *T. gondii* e a parafilia entre a *H. hammondi* e *H. heydorni* foram demonstradas com a utilização dos genes ITS-1, e 28S (ELLIS, et al.. 1998, 1999; MUGRIDGE et al., 1999, 2000).

As vantagens apresentadas na utilização de genes codificadores de proteínas em resoluções filogenéticas é que as análises de seqüências podem ser baseadas tanto nas seqüências de nucleotídeos, bem como nas seqüências de aminoácidos. Esse fator é importante, uma vez que alguns aminoácidos são codificados por no mínimo dois códons diferentes que diferem apenas na terceira posição. Em vista da degeneração no código genético, muitas mudanças na terceira base não resultam em mudança nas seqüências de proteínas, nem mesmo entre espécies muito próximas. Desta maneira, é comum a observação de casos em que ocorre saturação de substituições na terceira base e que resultam em perdas de sinal filogenético. Neste caso, a exclusão da terceira base pode auxiliar na redução de substituições que não são evolutivamente importantes (GUPTA, 1998).

A reconstrução filogenética pelo método Neighbor-joining com exclusão da terceira base do códon utilizadas neste estudo, demonstram a monofilia entre *H. hammondi* e o *T. gondii*. Entre as seqüências de *N. caninum* e *H. heydorni* não foi demonstrada uma monofilia entre os táxons, e sim o *N. caninum* parece estar mais relacionado com o

*clado* formado pelo *T. gondii* e *H. hammondi* que com o *clado* formado pelas duas linhagens de *H. heydorni*.

Slapeta et al. 2002b seqüenciaram e construíram árvores filogenéticas com as seqüências do gene ITS-1 e do domínio D2 do gene 28S do rDNA. As árvores apresentaram 3 *clados* distintos, sendo um constituído pelas seqüências de *N. caninum* e *N. huguesi*, outro pelas seqüências de *T. gondii* e *H. hammondi* e um terceiro *clado* constituído das seqüências de *H. heydorni*. Neste trabalho, a relação entre *H. heydorni* e *N. caninum* é fracamente suportada pelo gene D2 28S rDNA e os resultados entre os dois genes analisados apresentam forte congruência, mesmo com a presença dos sítios variáveis do ITS-1.

Em termos morfológicos, os oocistos tipo *Hammondia* (*N. caninum* e *H. heydorni*) em amostras de fezes de canídeos são indistinguíveis. Para confirmação diagnóstica da espécie de oocistos tipo *Hammondia*, os métodos moleculares disponíveis são a PCR com utilização de *primers* específicos para detecção do *N. caninum* com o gene Nc5, ou a amplificação seguida de seqüenciamento da região ITS-1 (DUBEY et al., 2002b; SREEKUMAR et al., 2003). No procedimento que envolve a detecção de gene Nc5 por PCR, os oocistos morfológicamente similares a *N. caninum* são diagnosticados como *H. heydorni* se não for visualizado qualquer fragmento, ou seja, se a PCR para o gene Nc5 resultar negativa.

Para a detecção exclusiva de *H. heydorni*, Slapeta et al. (2002a) padronizaram uma PCR com um dos *primers* ancorado na região 18S (*primer* JS5) e outro na região ITS-1. Entretanto, esta PCR falhou em detectar três amostras de oocistos de *H. heydorni*, dentre cinco isolados analisados (SREEKUMAR et al., 2003).

Pelas razões apontadas acima, foi padronizada neste trabalho uma PCR-RFLP que pudesse ser capaz de distinguir oocistos de *H. heydorni* dos de *N. caninum* em fezes de canídeos.

Entre as amostras de fezes de felinos, os oocistos de *H. hammondi* e *T. gondii* também são morfologicamente indistinguíveis. O diagnóstico pode ser feito baseado em bioensaios em camundongos (DUBEY et al., 2004), PCR e seqüenciamento da região ITS-1. Para detectar e diferenciar oocistos da *H. hammondi* dos de *T. gondii*, há primers internos a seqüência de ITS-1, sendo que um par de primers amplifica apenas fragmentos de *T. gondii* enquanto outro detecta apenas seqüências de *H. hammondi* (SREEKUMAR et al., 2005).

No presente estudo, após a obtenção das seqüências e alinhamento do gene codificador HSP70, foi desenhado um novo par de *primers* e encontrada uma enzima que clivasse com comprimentos de segmentos diferentes as seqüências de *Neospora* spp. e as seqüências de *H. heydorni*. Como alternativa, foi selecionada também uma enzima de restrição capaz de clivar apenas os fragmentos de PCR oriundos de *Neospora* spp e outra enzima que cliva apenas os de *H. heydorni*.

Para as amostras contendo oocistos de felinos, foi encontrado apenas uma enzima, a *Hin6I*, que gera perfis eletroforéticos bastante distintos entre as amostras de *H. hammondi* e *T. gondii*.

Com os procedimentos acima discutidos, tornou-se possível com apenas dois pares de *primers* detectar e identificar oocistos de fezes de cães e de felinos, respectivamente. A diferenciação entre as espécies é realizada com restrição enzimática. Desta forma, os

resultados serão sempre através de emissão de sinal molecular e não de ausência de sinal molecular, ou seja, o diagnóstico da presença do agente não é definido pela ausência de sinal, mas pela ocorrência do mesmo.

## 6 CONCLUSÕES

1. Foi possível identificar entre os isolados de *H. heydorni* duas linhagens geneticamente distintas, tanto pela informação fornecida com seqüências ITS-1 quanto pela informação obtida com o gene codificador de HSP70.
2. Com a PCR-RFLP padronizou-se duas reações moleculares, uma capaz de diferenciar oocistos de *H. heydorni* de *N. caninum* e outra capaz de diferenciar oocistos de *T. gondii* de *H. hammondi*.
3. As informações filogenéticas obtidas com os loci HSP70 e ITS-1 permitem concluir que a *H. hammondi* é estreitamente relacionado ao *T. gondii*, enquanto a *H. heydorni* é evolutivamente tão distante de *N. caninum* quanto de *T. gondii*.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, J.; SCHARES, G.; ORZESZKO, K.; GASSER, R. B.; ELLIS, J. T. *Hammondia* isolated from dogs and foxes are genetically distinct. **Parasitology**, v. 136, p. 1-6, 2006.
- ABD-ELSALAM, K. A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 5, p. 91-95, 2003.
- BASZLER, T. V.; GAY, L. J. C.; LONG, M. T.; MATHISON, B. A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4059-4064, 1999
- BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S.; SWANGO, L. J.; PIDGEON, G. L.; BRAUND, K. G. Further characterization of the biology of *Hammondia heydorni*. **Veterinary Parasitology**, v. 27, p. 193-198, 1988.
- BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The HSP70 and HSP60 chaperone machines. **Cell**, v.92, n. 6, p. 351-366, 1998.
- CHRISTIE, E.; DUBEY, J. P. Cross-immunity between *Hammondia* and *Toxoplasma* infections in mice and hamsters. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 2, p. 412-415, 1977.
- CLARK, D. P.; RUSSEL, L. D. **Molecular biology**: made simple and fun. Illinois: Cache River Press, 1997. p. 235-268.
- CRAIG, E. A.; GAMBILL, B. D; NELSON, R. J. Heat Shock Proteins: Molecular Chaperones of Proteins Biogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 402-414, 1993.
- CRISTINA, N.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P.; SANTORO, F. Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* satrains. **Parasitology Research**, v. 77, n. 2, p. 266-268, 1991.
- DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M. J.; DVEKSLER, G. S. General Concepts for PCR Primer Design. In: DIEFFENBACH, C. W.; DVEKSLER, G. S. (Ed). PCR primer. A laboratory manual, New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1995. p. 133-155.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidian of man and animals. In: KREIER, J. P. (Ed). **Parasitic protozoa**, 3<sup>rd</sup> ed., vol 6. New York Academic Press, 1993; 1-158.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal of Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002a.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988. 220 p.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988a.

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 of American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 1259-1263, 1988b.

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

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, v. 9, n. 12, p. 452-458, 1993.

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

DUBEY, J. P.; MILLER, S.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. *Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 1, p. 66-69, 1990.

DUBEY, J. P.; WILLIAMS, C. S. F. *Hammondia heydorni* infection in sheep, goats, moose, dogs and coyotes. **Parasitology**, v. 81, p. 123-127, 1980.



ELLIS, J. T.; AMOYAL, G.; RYCE, C.; HARPER, P. A.; 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, n. 1, 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. Pt 4.

ENTZEROTH, R.; SCHOLTYSECK, E.; GRUEL, E. The roe deer intermediate host of different coccidian. **Naturwissenschaften**, v. 655, n. 395, 1978.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. *Hammondia hammondi*: a new coccidian of cats producing cysts in muscle of other mammals. **Science**, v. 189, p. 222-224, 1975b.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. *Hammondia hammondi* gen. nov., sp. nov., from domestic cats, a new coccidian related to *Toxoplasma gondii* and *Sacocystis*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 46, p. 3-12, 1975a.

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.

GOBET, P.; TOZE, S. Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 200, p. 37-41, 2001.

GUPTA, R. S. Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationship among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1435-1491, 1998.

GUPTA, R. S.; GOLDING, G.B. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. **Journal of Molecular Evolution** v. 37, n. 6, p. 573-82, 1993

HEYDORNY, A. O.; MEHLHORN H. Further remarks on *Hammondia hammondi* and the taxonomic importance of obligate heteroxeny. **Parasitology Research**, v. 87, p. 573-577, 2001.

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

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

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The quarterly review of biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991

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

JENKINS, M. C.; ELLIS, J. T.; LIDDELL, S.; RYCE, C.; MUNDAY, B. L.; MORRISON, D. A., DUBEY, J. P. The relationship of *Hammondia hammondi* and *Sarcocystis mucosa* to other heteroxenous cyst-forming coccidian as inferred by phylogenetic analysis of the 18S SSU ribosomal DNA sequence. **Parasitology**, v. 199, p. 135-142, 1999.

KARLIN, S.; BROCCHERI, L. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparison, function and evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v. 47, p. 565-577, 1998.

LANG-UNNASCH, N.; REITH, M. E.; MUNHOLLAND, J.; BARTA, J. R. Plastids are widespread and ancient in parasites of the phylum Apicomplexa. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 11, p. 1743-1754, 1998

LEE, J. J.; HUTNER, S. H.; BOVEE, E. C. The illustrated guide to the protozoa. Lawrence, KS: 2<sup>nd</sup> ed. Allen Press. 2001.

LEVINE, N. D. Taxonomy of the sporozoa. **Journal of Parasitology**, v. 56, p. 208-209, 1970.

LEVINE, N. D. The Protozoan Phylum Apicomplexa. Raton, FL: CRC Press, Boca. 1988. 2v.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 163-165, 1989b.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Canine neosporose. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 14, p. 1-11, 2000.

MATSUI, T. The tissue stages of *Isospora heydorni* in the guinea pig as an intermediate host. **Japanese Society of Parasitology**, v. 40, n. 6, p. 581-586, 1991.

MORRISON, D. A.; BORNSTEIN, S.; THEBO, P.; WERNERY, U.; KINNE, J.; MATTSON, J. G. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa). **International Journal of Parasitology**, v. 34, n. 4, p. 501-514, 2004.

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; HECKEROTH, A. R.; JOHNSON, A. M.; TENTER, A. M. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1545-1556, 1999.

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; JAKEL, T.; HECKEROTH, A. R.; TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family sarcocystidae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 12, p. 1842-1853, 2000.

MÜLLER, N.; ZIMMERMANN, V.; HENTRICH, B.; GOTTSTEIN, B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2850-2852, 1996.

OBORNIK, M.; JIRKU, M.; SLAPETA, J. R.; MODRY, D.; KOUDELA, B.; LUKES, J. Notes on coccidian phylogeny, based on the apicoplast small subunit ribosomal DNA. **Parasitology Research**, v. 88, n. 4, p. 360-363, 2002a.

OBORNIK, M.; VAN DE PEER, Y.; HYPSTA, V.; FRICKEY, T.; SLAPETA, J. R.; MEYER, A.; LUKES, J. Phylogenetic analyses suggest lateral gene transfer from the mitochondrion to the apicoplast. **Gene**, v. 285, n. 1-2, p. 109-118, 2002b.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB J.** v. 7, n. 1, p. 113-123. 1993.

PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal of Parasitology**, v. 31 p. 1144-1148, 2001.

RIAHI, H.; DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; LEBOUTET, M. J.; PESTRE-ALEXANDRE, M. *Hammondia hammondi* cysts in cell cultures. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 821-824, 1995.

RIAHI, H.; LEBOUTET, M. J.; BOUTEILLE, B.; DUBREMETZ, J. F.; DARDÉ, M. L. *Hammondia hammondi* organelle proteins are recognized by monoclonal antibodies direct against organelles of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 3, p. 580-583, 1999.

SCHARES, G.; HEYDORN, A. O.; CÜPPERS, A.; CONRATHS, F. J.; MEHLHORN, H. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. **Parasitology Research**, v. 87, p. 808-816, 2001.

SCHARES, G.; HEYDORN, A. O.; CÜPPERS, 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, n.1, p. 44-52, 2002. Erratum in: **Parasitology Research**, v. 88, n. 6, p. 592, 2002.

SCHARES G.; MEYER, J.; BÄRWALD, 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.

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*. **The Veterinary Journal**, v. 163 n. 2, p. 147-154, 2002a.

SLAPETA, J. R.; MODRY, D.; KYSELOVA, I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 3-4, p. 157-167, 2002b.

SOLDAT, I. D.; DUBREMET, Z. J. F.; LEBRUN, M. Microneme protein: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v. 31, p. 1293-1302, 2001.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. **Journal of Protozoology**, v. 36, p. 458-463, 1989.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P.; BLIXT, J. A.; BLAGBURN, B. Development of *Hammondia heydorni* in cultured bovine and ovine cells. **Journal of Protozoology**, v. 35, n.3, p. 352-356, 1988.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P.; MCALLISTER, M. M.; BLIXT, J. A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1509-1519, 1999.

SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; FOURNET, V. M.; ROSENTHAL, B. M.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Detection of *Hammondia heydorni*-like organisms and their differentiation from *Neospora caninum* using random-amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **The Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 1082-1085, 2003.

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, K.B.; 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.

TADROS, W.; LAARMAN, J. J. *Sarcocystis* and related coccidian parasites: A brief general review, together with a discussion on some biological aspects of their life cycles and a new proposal for their classification. **Acta Leiden**. v. 44, p. 1-107, 1976.

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 for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 595-616, 2002.

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

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

TENTER, A. M.; LUTON, K.; JOHNSON, A. M. Species-specific identification of *Sarcocystis* and *Toxoplasma* by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene fragments. **Applied Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 173-188, 1994.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TOMLEY, F. M.; BILLINGTON, K. J.; BUMSTEAD, J. M.; CLARCK, J. D.; MONAGHAN, P. EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-1 repeats. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1303-1310, 2001.

WALLACE, G. D. Observation on a feline coccidium with some characteristics of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 46, p. 167-178, 1975.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cysts" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 272-279, 1996.

## APÊNDICE

Figura 12 - Alinhamento das seqüências ITS-1 produzidas neste estudo. Não estão representadas as seqüências disponíveis em bancos de dados.

```

          10          20          30          40          50          60          70          80
HheV2  A C A C G T C C T T T A T T C T T A T T A A C C C T C A A C C T T T G A A T C C C A A G C A A A A C A T G A G C T T G C A T C T C T C C A G C G T G A G A C
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....
HheBR  .....
HheRHN .....
HheV7  .....
HheV8  .....
HheV9  .....
Hhe0T0 .....
Hhe95  .....
Tgo64  .....A T . C T .....A .....T .....T .....T T .....G
TgoAN  .....A T . C T .....A .....T .....T .....T T .....G
TgoH2  .....A T . C T .....A .....T .....T .....T T .....G
TgoP1  .....A T . C T .....A .....T .....T .....T T .....G
Tgo115 .....A T . C T .....A .....T .....T .....T T .....G
Tgo12_06 .....A T . C T .....A .....T .....T .....T T .....G
NcaPR  .....T . C .....A .....T .....T T .....G
Nca10_06 .....T . C .....A .....T .....T T .....G
NcaAL  .....T . C .....T A .....T .....T T .....G
Nhu    .....T . C .....T . C .....T T T .....G
Hha300 .....A T . C T .....A .....T .....T .....T . .....G
Hha305 .....A T . C T .....A .....T .....T .....T . .....G

          90          100          110          120          130          140          150          160
HheV2  A G G T G C A T T C A A G A A G T G T A A T G C - T A C T C T C G A C G G A T T C G G C G A T T G A A G T A T T A C C T T C T T C A T G T - G G A T A T T T T
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....
HheBR  .....
HheRHN .....
HheV7  .....
HheV8  .....
HheV9  .....
Hhe0T0 .....
Hhe95  .....
Tgo64  . T T ..... C . G . A G - - - . A . . . A A . G . A - - - - - T . . . G . . . . . T . . . . . C C .
TgoAN  . T T ..... C . G . A G - - - . A . . . A A . G . A - - - - - T . . . G . . . . . T . . . . . C C .
TgoH2  . T T ..... C . G . A G - - - . A . . . A A . G . A - - - - - T . . . G . . . . . T . . . . . C C .
TgoP1  . T T ..... C . G . A G - - - . A . . . A A . G . A - - - - - T . . . G . . . . . T . . . . . C C .
Tgo115 . T T ..... C . G . A G - - - . A . . . A A . G . A - - - - - T . . . G . . . . . T . . . . . C C .
Tgo12_06 . T T ..... C . G . A G - - - . A . . . A A . G . A - - - - - T . . . G . . . . . T . . . . . C C .
NcaPR  G . . . A . . . . . C . G . A T A C . . . C . T G T . A G . . - - - - - . . . C G . . . . .
Nca10_06 G . . . A . . . . . C . G . A T A C . . . C . T G T . A G . . - - - - - . . . C G . . . . .
NcaAL  G . . . A . . . . . C . G . A T A C . . . C . T G T . A G . . - - - - - . . . C G . . . . .
Nhu    G . . . A . . . . . A . G . A T A C . . . C . T G T . A G . . - - - - - . . . C G . . . . .
Hha300 . T T ..... C . G . A G - - - . G C . . . A A . G . A - - - - - T . . . G . . . . . T . . . . . C .
Hha305 . T T ..... C . G . A G - - - . G C . . . A A . G . A - - - - - T . . . G . . . . . T . . . . . C .

```



```

          10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2  ACACGTCCTTTATTCTTATTAACCCCTCAACCTTTGAATCCCAAGCAAAACATGAGCCTTGCATCTCTCTCCAGCGTGAGAC
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....
HheBR  .....
HheRHN .....
HheV7  .....
HheV8  .....
HheV9  .....
Hhe0T0 .....
Hhe95  .....
Tgo64  .....AT.CT.....A.....T.....T.....TT.....G
TgoAN  .....AT.CT.....A.....T.....T.....TT.....G
TgoH2  .....AT.CT.....A.....T.....T.....TT.....G
TgoP1  .....AT.CT.....A.....T.....T.....TT.....G
Tgo115 .....AT.CT.....A.....T.....T.....TT.....G
Tgo12_06 .....AT.CT.....A.....T.....T.....TT.....G
NcaPR  .....T.C.....A.....T.....TT.....G
Nca10_06 .....T.C.....A.....T.....TT.....G
NcaAL  .....T.C.....T.A.....T.....TT.....G
Nhu    .....T.C.....T.....C.....TTT.....G
Hha300 .....AT.CT.....A.....T.....T.....T.....G
Hha305 .....AT.CT.....A.....T.....T.....T.....G

```

```

          90      100     110     120     130     140     150     160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2  AGGTGCATTCAAGAAGTGTAAATGC--TACTCTCGACGGATTGGGCGATTGAAGTATTACCTTCTTCATGT--GGATATTTT
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....
HheBR  .....
HheRHN .....
HheV7  .....
HheV8  .....
HheV9  .....
Hhe0T0 .....
Hhe95  .....
Tgo64  .TT.....C.G.AG---.A...AA.G.A-----T...G.....T.....CC.
TgoAN  .TT.....C.G.AG---.A...AA.G.A-----T...G.....T.....CC.
TgoH2  .TT.....C.G.AG---.A...AA.G.A-----T...G.....T.....CC.
TgoP1  .TT.....C.G.AG---.A...AA.G.A-----T...G.....T.....CC.
Tgo115 .TT.....C.G.AG---.A...AA.G.A-----T...G.....T.....CC.
Tgo12_06 .TT.....C.G.AG---.A...AA.G.A-----T...G.....T.....CC.
NcaPR  G...A.....C.G.ATAC...C.TGT.AG..-----CG.....
Nca10_06 G...A.....C.G.ATAC...C.TGT.AG..-----CG.....
NcaAL  G...A.....C.G.ATAC...C.TGT.AG..-----CG.....
Nhu    G...A.....A.G.ATAC...C.TGT.AG..-----CG.....
Hha300 .TT.....C.G.AG---.GC...AA.G.A-----T...G.....T.....C.
Hha305 .TT.....C.G.AG---.GC...AA.G.A-----T...G.....T.....C.

```

```

          170      180      190      200      210      220      230      240
HheV2  GCTCTACGT-----ATGTAGCTGCTGATATCCGGGAGTGGACGGGAGAGGAG
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....
HheBR  .....
HheRHM .....
HheV7  .....
HheV8  .....
HheV9  .....
Hhe0T0 .....
Hhe95  .....
Tgo64  ..G..G..T.-----CCAATATTGG.A.CCAG..A.G.....G..C..A.C.....G.
TgoAN  ..G..G..T.-----CCAATATTGG.A.CCAG..A.G.....G..C..A.C.....G.
TgoH2  ..G..G..T.-----CCAATATTGG.A.CCAG..A.G.....G..C..A.C.....G.
TgoP1  ..G..G..T.-----CCAATATTGG.A.CCAG..A.G.....G..C..A.C.....G.
Tgo115 ..G..G..T.-----CCAATATTGG.A.CCAG..A.G.....G..C..A.C.....G.
Tgo12_06 ..G..G..T.-----CCAATATTGG.A.CCAG..A.G.....G..C..A.C.....G.
NcaPR  ..A...T.TTTTCAAGCGTTCTATTGAACGCCTGATAATGA.A..GTG..AT.....T...C...GA
Nca10_06 ..A...T.TTTTCAAGCGTTCTATTGAACGCCTGATAATGA.A..GTG..AT.....T...C...GA
NcaAL  ..A...T.TTTTCAAGCGTTCTATTGAACGCCTGATAATGA.A..GTG..AT.....T...C...GA
Nhu    ..A...T.TTTTCAAGCGTTCTATTGAACGCCTGATAATGA.A..GTG..AT.....T...C...GA
Hha300 ..G..G..T.-----CCAATATTGG.A.CCAG..A.....G..C..A.C.....G.
Hha305 ..G..G..T.-----CCAATATTGG.A.CCAG..A.....G..C..A.C.....G.

          250      260      270      280      290      300      310      320
HheV2  CTCGATCTCTGGAAATTGGTGTTCAACTGGGCACTGATTTCCAGGAGCTCCTTCGAAGTGCATTCTTTTCTT--CCAC
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....
HheBR  .....
HheRHM .....
HheV7  .....
HheV8  .....
HheV9  .....
Hhe0T0 .....
Hhe95  .....
Tgo64  ...A..T.....C...C..TGT...T.....T.T...AGT.....T.C...
TgoAN  ...A..T.....C...C..TGT...T.....T.T...AGT.....T.C...
TgoH2  ...A..T.....C...C..TGT...T.....T.T...AGT.....T.C...
TgoP1  ...A..T.....C...C..TGT...T.....T.T...AGT.....T.C...
Tgo115 ...A..T.....C...C..TGT...T.....T.T...AGT.....T.C...
Tgo12_06 ...A..T.....C...C..TGT...T.....T.T...AGT.....T.C...
NcaPR  ...G..A.....AA...C..T.T...TT.A.C.....T.T...A.T.....T.C...
Nca10_06 ...G..A.....AA...C..T.T...TT.A.C.....T.T...A.T.....T.C...
NcaAL  ...G..A.....AA...C..T.T...TT.A.C.....T.T...A.T.....T.C...
Nhu    ...G..A.....AAC...C..T.T...TT.A.C.....T.T...A.T.....T.CTC...
Hha300 ...TA.....C...C..TGT...T.....T.T...AGT.....T.C...
Hha305 ...TA.....C...C..TGT...T.....T.T...AGT.....T.C...

```

```

          330      340      350      360      370      380      390      400
HheV2  ACCGTTTTTCAAACCAATAAATCTGGGGGAGCATCTGAGAGGAGTCAGAAGACGCGATGTCCTTTCTGCATTTTTCTCTAT
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....A.....T.....C.....
HheBR  .....A.....T.....
HheRHN .....A.....T.....
HheV7  .....A.....T.....
HheV8  .....A.....T.....
HheV9  .....A.....T.....
Hhe0T0 .....A.....T.....
Hhe95  .....A.....T.....
Tgo64  .....A..TC..A..C.....A..-A..T.....AGAGTGA...T-TG.A.....C.C...G..
TgoAN  .....A..TC..A..C.....A..-A..T.....AGAGTGA...T-TG.A.....C.C...G..
TgoH2  .....A..TC..A..C.....A..-A..T.....AGAGTGA...T-TG.A.....C.C...G..
TgoP1  .....A..TC..A..C.....A..-A..T.....AGAGTGA...T-TG.A.....C.C...G..
Tgo115 .....A..TC..A..C.....A..-A..T.....AGAGTGA...T-TG.A.....C.C...G..
Tgo12_06 .....A..TC..A..C.....A..-A..T.....AGAGTGA...T-TG.A.....C.C...G..
NcaPR  .....A..TT..A..C.....AT...G.T...G.A-AGAGA...T-.G.C.....T...C.....
Nca10_06 .....A..TT..A..C.....AT...G.T...G.A-AGAGA...T-.G.C.....T...C.....
NcaAL  .....A..TT..A..C.....AT...G.T...G.A-AGAGA...T-.G.C.....T...C.....
Nhu    .....A..TT..A..C.....AT...G.T...TG.A-AGAGA...T-.G.C.....T...C.....
Hha300 .....A..TC..A..C.....A..-G...T.....AGAGTGA...T-AC.A.....C...AG.
Hha305 .....A..TC..A..C.....A..-G...T.....AGAGTGA...T-AC.A.....C...AG.

```

```

          410      420      430      440
HheV2  GTGATGCCAGATTATTTACGAAA-CAAAGATGTTTTTCT-
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .C.....C.....
HheBR  .C.....C.....
HheRHN .C.....C.....
HheV7  .C.....C.....
HheV8  .C.....C.....
HheV9  .C.....C.....
Hhe0T0 .C.....C.....
Hhe95  .C.....C.....
Tgo64  ...C.TT.....GC..C.T...-T.TA.....-A.T.T
TgoAN  ...C.TT.....GC..C.T...-T.TA.....-A.T.T
TgoH2  ...C.TT.....GC..C.T...-T.TA.....-A.T.T
TgoP1  ...C.TT.....GC..C.T...-T.TA.....-A.T.T
Tgo115 ...C.TT.....GC..C.T...-T.TA.....-A.T.T
Tgo12_06 ...C.TT.....GC..C.T...-T.TA.....-A.T.T
NcaPR  TC.C.TT.....C...T...AA.T.TA.....-
Nca10_06 TC.C.TT.....C...T...AA.T.TA.....-
NcaAL  TC.C.TT.....C...T...AA.T.TA.....-
Nhu    TC.C.TT.....CC...T...AA.T.TA.....-
Hha300 ...C.TT.....GC..C.T...-T.TA.....-A.T.T
Hha305 ...C.TT.....GC..C.T...-T.TA.....-A.T.T

```

Figura 13 - Alinhamento das seqüências HSP70 produzidas neste estudo. Não estão representadas as seqüências disponíveis em bancos de dados.

	10	20	30	40	50	60	70	80
HheV2	GGAGAGAAGAACTTTCCACCC	TGAAGAGGTTTCAGCCATGGT	GCTGGGCAAGATGAAAGGAGATCGCGGAAGCGTACCT					
Hhe47	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Hhe147	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Hhe376	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheBR	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheRHN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV7	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Hhe95	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Hhe0T0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tgo64	.....G.....	.....C.....	.....TT.....	.....A.....	.....A.....	.....G.....	.....T.....	
TgoAN	.....G.....	.....C.....	.....TT.....	.....A.....	.....A.....	.....G.....	.....T.....	
Tgo12_06	.....G.....	.....C.....	.....TT.....	.....A.....	.....A.....	.....G.....	.....T.....	
TgoP1	.....G.....	.....C.....	.....TT.....	.....A.....	.....A.....	.....G.....	.....T.....	
Tgo115	.....G.....	.....C.....	.....TT.....	.....A.....	.....A.....	.....G.....	.....T.....	
TgoH2	.....G.....	.....C.....	.....TT.....	.....A.....	.....A.....	.....G.....	.....T.....	
NcaPR	..G...A...G...G...	.....T.....	.....A.....	.....A.....	.....T.....			
Nca10_06	..G...A...G...G...	.....T.....	.....A.....	.....A.....	.....T.....			
NcaAL	..G...A...G...G...	.....T.....	.....A.....	.....A.....	.....T.....			
Nhu	..G...A...G...G...	.....T.....	.....A.....	.....A.....	.....T.....			
Hha300	.....G.....	.....C.....	.....C.....	.....T.....	.....A.....	.....A.....	.....G.....	.....T.....
Hha305	.....G.....	.....C.....	.....C.....	.....T.....	.....A.....	.....A.....	.....G.....	.....T.....

	90	100	110	120	130	140	150	160
HheV2	GGGGAAGGACGTC	AAAGGAGCTGTCATC	ACGGTGCCCTGCGTACTTCAACGATTCC	CAGCGTCAGGCCACCAAGGATGCTG				
Hhe47	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Hhe147	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Hhe376	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheBR	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheRHN	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV7	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV8	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Hhe95	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Hhe0T0	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HheV9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tgo64	C..C...A..G...G..C...	.....T..C..T.....	.....G.....	.....T.....				
TgoAN	C..C...A..G...G..C...	.....T..C..T.....	.....G.....	.....T.....				
Tgo12_06	C..C...A..G...G..C...	.....T..C..T.....	.....G.....	.....T.....				
TgoP1	C..C...A..G...G..C...	.....T..C..T.....	.....G.....	.....T.....				
Tgo115	C..C...A..G...G..C...	.....T..C..T.....	.....G.....	.....T.....				
TgoH2	C..C...A..G...G..C...	.....T..C..T.....	.....G.....	.....T.....				
NcaPR	.....T.....	.....C.....	.....T.....	.....C..C.....	.....C..G.....	.....G.....		
Nca10_06	.....T.....	.....C.....	.....T.....	.....C..C.....	.....C..G.....	.....G.....		
NcaAL	.....T.....	.....C.....	.....T.....	.....C..C.....	.....C..G.....	.....G.....		
Nhu	.....T.....	.....C.....	.....T.....	.....C..C.....	.....C..G.....	.....G.....		
Hha300	C..C...A..G...G..C...	.....T..C..C..C.....	.....G.....	.....T.....				
Hha305	C..C...A..G...G..C...	.....T..C..C..C.....	.....G.....	.....T.....				

```

          170      180      190      200      210      220      230      240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2      GCACAAATTGCTGGCCTTAGCGTCCCTCCGTATCATCAACGAACTACTGCCGCTGCCATCGCCTACGGCCCTCGACAAGAAG
Hhe47      .....
Hhe147     .....
Hhe376     .....
HheV1      .....
HheV3      .....
HheV5      .....
HheBR      .....
HheRHN     .....
HheV7      .....
HheV8      .....
Hhe95      .....
Hhe0T0     .....
HheV9      .....
Tgo64      .T.C....C....C....C....C.T.....G.C.A.G.....T.T.T.T.G.....
TgoAN      .T.C....C....C....C....C.T.....G.C.A.G.....T.T.T.T.G.....
Tgo12_06   .T.C....C....C....C....C.T.....G.C.A.G.....T.T.T.T.G.....
TgoP1      .T.C....C....C....C....C.T.....G.C.A.G.....T.T.T.T.G.....
Tgo115     .T.C....C....C....C....C.T.....G.C.A.G.....T.T.T.T.G.....
TgoH2      .T.C....C....C....C....C.T.....G.C.A.G.....T.T.T.T.G.....
NcaPR      .T.T....A....C.T...G.....G...C.G.....G...T.G.....A
Nca10_06   .T.T....A....C.T...G.....G...C.G.....G...T.G.....A
NcaAL      .T.T....A....C.T...G.....G...C.G.....G...T.G.....A
Nhu        .T.T....A....C.T...G.....G...C.G.....G...T.G.....A
Hha300     .T.C....C....C....C....C.T.....G.C.A.G.A.....T.T.G.....
Hha305     .T.C....C....C....C....C.T.....G.C.A.G.A.....T.T.G.....

```

```

          250      260      270      280      290      300      310      320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2      GGCTGTGGTGAGATGAACGTGCTCATCTTCGACATGGGTGGCGGTACCTTCGATGTGTTCGCTCCTGACCATTGAAGACGG
Hhe47      .....
Hhe147     .....
Hhe376     .....
HheV1      .....
HheV3      .....
HheV5      .....
HheBR      .....
HheRHN     .....
HheV7      .....
HheV8      .....
Hhe95      .....
Hhe0T0     .....
HheV9      .....
Tgo64      ....C.....C.....G.....G.T.A.C.....
TgoAN      ....C.....C.....G.....G.T.A.C.....
Tgo12_06   ....C.....C.....G.....G.T.A.C.....
TgoP1      ....C.....C.....G.....G.T.A.C.....
Tgo115     ....C.....C.....G.....G.T.A.C.....
TgoH2      ....C.....C.....G.....G.T.A.C.....
NcaPR      ....C.A.....C.....T.....T.G...A.....
Nca10_06   ....C.A.....C.....T.....T.G...A.....
NcaAL      ....C.A.....C.....T.....T.G...A.....
Nhu        ....C.A.....C.....T.....T.G...A.....
Hha300     ....C.....C.....T.....G.T.A.C.....
Hha305     ....C.....C.....T.....G.T.A.C.....

```

```

          330      340      350      360      370      380      390      400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2      TATCITTGAAGTCAAGGCGACGGCCGGAGATACTCACCTTGGCGGTGAAGATTTCGACAACCGCTTGGTGGACTTCTGCG
Hhe47      .....
Hhe147     .....
Hhe376     .....
HheV1      .....
HheV3      .....
HheV5      .....
HheBR      .....
HheRHH     .....
HheV7      .....
HheV8      .....
Hhe95      .....
Hhe0T0     .....
HheV9      .....
Tgo64      .....C..C..T..T..C..C..T...T.....T.....T.....
TgoAN      .....C..C..T..T..C..C..T...T.....T.....T.....
Tgo12_06   .....C..C..T..T..C..C..T...T.....T.....T.....
TgoP1      .....C..C..T..T..C..C..T...T.....T.....T.....
Tgo115     .....C..C..T..T..C..C..T...T.....T.....T.....
TgoH2      .....C..C..T..T..C..C..T...T.....T.....T.....
NcaPR      .....G..A..A..A...C.....T..A.....T.....C.....T.....
Nca10_06   .....G..A..A..A...C.....T..A.....T.....C.....T.....
NcaAL      .....G..A..A..A...C.....T..A.....T.....C.....T.....
Nhu        .....G..A..A..A...C.....T..A.....T.....C.....T.....
Hha300     .....C..C..T..T...C..T...T.....T.....T.....
Hha305     .....C..C..T..T...C..T...T.....T.....T.....

```

```

          410      420      430      440      450      460      470      480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2      TCCAGGACTTCAAGCGCAAGAACCGGGGAAAGGACATCAGCACAAAAGCCGTGCCCTCCGCCGCTCCGCACCCAGTGC
Hhe47      .....
Hhe147     .....
Hhe376     .....
HheV1      .....
HheV3      .....
HheV5      .....C.....
HheBR      .....C.....
HheRHH     .....C.....
HheV7      .....C.....
HheV8      .....C.....
Hhe95      .....C.....
Hhe0T0     .....C.....
HheV9      .....C.....
Tgo64      .....A.....C.....T..T...G..T.....
TgoAN      .....A.....C.....T..T...G..T.....
Tgo12_06   .....A.....C.....T..T...G..T.....
TgoP1      .....A.....C.....T..T...G..T.....
Tgo115     .....A.....C.....T..T...G..T.....
TgoH2      .....T.....A.....C.....T..T...G..T.....
NcaPR      .....C.....T.....C.....C.....T.....G..T...A...
Nca10_06   .....C.....T.....C.....C.....T.....G..T...A...
NcaAL      .....C.....T.....C.....C.....T.....G..T...A...
Nhu        .....C.....T.....C.....C.....T.....G..T...A...
Hha300     .....A.....C.....T..T..G..G..T.....
Hha305     .....A.....C.....T..T..G..G..T.....

```

```

          490      500      510      520      530      540      550      560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2  GAGCGAACGAAAGAGAACTCTCTCCAGCAGCACTCAGGCCAGCCATCGAAATCGATTGCTCTTCGAAGGTATTGACTACTC
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....
HheBR  .....
HheRHN .....
HheV7  .....
HheV8  .....
Hhe95  .....G.
Hhe0T0 .....G.
HheV9  .....
Tgo64  .....C..C.....T.....A.....T..C..T..T..T..G..C.....
TgoAN  .....C..C.....T.....A.....T..C..T..T..T..G..C.....
Tgo12_06 .....C..C.....T.....A.....T..C..T..T..T..G..C.....
TgoP1  .....C..C.....T.....A.....T..C..T..T..T..G..C.....
Tgo115 .....C..C.....T.....A.....T..C..T..T..T..G..C.....
TgoH2  .....C..C.....T.....A.....T..C..T..T..T..G..C.....
NcaPR  .....C..C.....A.....T.....C.....
Nca10_06 .....C..C.....A.....T.....C.....
NcaAL  .....C..C.....A.....T.....C.....
Nhu    .....C..C.....A.....T.....C.....
Hha300 .....C..C.....T.....A.....T..C..T..T.....G..C.....
Hha305 .....C..C.....T.....A.....T..C..T..T.....G..C.....

```

```

          570      580      590      600      610      620      630      640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2  TGTCTCTATCTCTCGCGCACGTTTCAGGAGCTCTGCATGGACTACTTCCGCAACTCGCTGCTCCCTGTCGAGAAAGGTCC
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....
HheBR  G.....
HheRHN G.....
HheV7  G.....
HheV8  G.....
Hhe95  G.....
Hhe0T0 G.....
HheV9  G.....
Tgo64  .....G.....T..G..C..T.....T.....C..T..G..C.....
TgoAN  .....G.....T..G..C..T.....T.....C..T..G..C.....
Tgo12_06 .....G.....T..G..C..T.....T.....C..T..G..C.....
TgoP1  .....G.....T..G..C..T.....T.....C..T..G..C.....
Tgo115 .....G.....T..G..C..T.....T.....C..T..G..C.....
TgoH2  .....G.....T..G..C..T.....T.....C..T..G..C.....
NcaPR  .....G..C.....T.....C.....T.....T.....C.....G..A.....A.....
Nca10_06 .....G..C.....T.....C.....T.....T.....C.....G..A.....A.....
NcaAL  .....G..C.....T.....C.....T.....T.....C.....G..A.....A.....
Nhu    .....G..C.....T.....C.....T.....T.....C.....G..A.....A.....
Hha300 .....G.....C..T..G.....T.....T.....CT..T..G..C.....
Hha305 .....G.....C..T..G.....T.....T.....CT..T..G..C.....

```



```

          650      660      670      680      690      700      710      720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2      TCAAGGACTCTGGTATCGACAAGCGATCGGTCAGCGAAGTCGTCCCTGGTTGGTGGATCGACCCGTATCCCCAAGATCCAG
Hhe47      .....
Hhe147     .....
Hhe376     .....
HheV1      .....
HheV3      .....
HheV5      .G.....
HheBR      .....
HheRHM     .....
HheV7      .....
HheV8      .....
Hhe95      .....
Hhe0T0     .....
HheV9      .....
Tgo64      .....T.....C.....T..GT.....T.....T...
TgoAN      .....T.....C.....T..GT.....T.....T...
Tgo12_06   .....T.....C.....T..GT.....T.....T...
TgoP1      .....T.....C.....T..GT.....T.....T...
Tgo115     .....T.....C.....T..GT.....T.....T...
TgoH2      .....T.....C.....T..GT.....T.....T...
NcaPR      .G...T...C..T.....C.....G..T..GT.....C..G.....T...
Nca10_06   .G...T...C..T.....C.....G..T..GT.....C..G.....T...
NcaAL      .G...T...C..T.....C.....G..T..GT.....C..G.....T...
Nhu        .G...T...C..T.....C.....G..T..GT.....C..G.....T...
Hha300     .....T.....T.....T..GT.....T.....T...
Hha305     .....T.....T.....T..GT.....T.....T...

```

```

          730      740      750      760      770      780      790      800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2      CAGCTCATCACTGACTTCTTCAAAGGAGCCGTGCCGGTCCGATCAACCCCGATGAGGCCGTTGCCGTACGGTGCCGC
Hhe47      .....
Hhe147     .....
Hhe376     .....
HheV1      .....
HheV3      .....
HheV5      .....
HheBR      .....
HheRHM     .....
HheV7      .....
HheV8      .....
Hhe95      .....
Hhe0T0     .....
HheV9      .....
Tgo64      .....A.....A.....T...
TgoAN      .....A.....A.....T...
Tgo12_06   .....A.....A.....T...
TgoP1      .....A.....A.....T...
Tgo115     .....A.....A.....T...
TgoH2      .....A.....A.....T...
NcaPR      .....C.....A.....C..A..C.....C.....G.....T..C...
Nca10_06   .....C.....A.....C..A..C.....C.....G.....T..C...
NcaAL      .....C.....A.....C..A..C.....C.....G.....T..C...
Nhu        .....C.....A.....C..A..C.....C.....G.....T..C...
Hha300     .....A.....A.....T.....T.....T...
Hha305     .....A.....A.....T.....T.....T...

```

```

      810      820      830      840      850      860      870      880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2  TGTCCAGGCAGCTATTCTGAAGGGAGTCCACGACTCTCAGGTGCAAGACTTGTCTTTTGTGGATGTTGCGCCCTCTCGC
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....T.....T
HheBR  .....T.....
HheRHN .....T.....
HheV7  .....T.....
HheV8  .....T.....
Hhe95  .....T.....
Hhe0T0 .....T.....
HheV9  .....T.....
Tgo64  .....G..CT.....T.....G..T.....C.TC.....T...T.
TgoAN  .....G..CT.....T.....G..T.....C.TC.....T...T.
Tgo12_06 .....G..CT.....T.....G..T.....C.TC.....T...T.
TgoP1  .....G..CT.....T.....G..T.....C.TC.....T...T.
Tgo115 .....G..CT.....T.....G..T.....C.TC.....T...T.
TgoH2  .....G..CT.....T.....G..T.....C.TC.....T...T.
NcaPR  ..T.....T.....T.....C..A.....C.TC.C.....C.....C.
Nca10_06 ..T.....T.....T.....C..A.....C.TC.C.....C.....C.
NcaAL  ..T.....T.....T.....C..A.....C.TC.C.....C.....C.
Nhu    ..T.....T.....T.....C..A.....C.TC.C.....C...t..C.
Hha300 .....G..CT.....T.....C..A.....G..T.....C.TC.....T...T.
Hha305 .....G..CT.....T.....C..A.....G..T.....C.TC.....T...T.

```

```

      890      900      910      920      930      940      950
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HheV2  TGGGTCTGGAGACGGCCGGTGGTGTGATGACGAAAGCTCATTGAGAGAAACACCACTATCCCCACCAAGGAG
Hhe47  .....
Hhe147 .....
Hhe376 .....
HheV1  .....
HheV3  .....
HheV5  .....C.....
HheBR  .....C.....
HheRHN .....C.....
HheV7  .....C.....
HheV8  .....C.....
Hhe95  .....C.....
Hhe0T0 .....C.....
HheV9  .....C.....
Tgo64  .C.....A..T.....C.....G.....A.....A..G.....G.....
TgoAN  .C.....A..T.....C.....G.....A.....A..G.....G.....
Tgo12_06 .C.....A..T.....C.....G.....A.....A..G.....G.....
TgoP1  .C.....A..T.....C.....G.....A.....A..G.....G.....
Tgo115 .C.....A..T.....C.....G.....A.....A..G.....G.....
TgoH2  .C.....A..T.....C.....G.....A.....A..G.....G.....
NcaPR  .C..A.....T..T.....T..G..C.....G..C.....
Nca10_06 .C..A.....T..T.....T..G..C.....G..C.....
NcaAL  .C..A.....T..T.....T..G..C.....G..C.....
Nhu    .C..A.....T..T.....T..G..C.....G..C.....
Hha300 .C.....A..T.....C.....G.....A..G.....G..T.....
Hha305 .C.....A..T.....C.....G.....A..G.....G..T.....

```