

ANGELA CAROLINA GUILLEN

**DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR  
NA DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Sarcocystis*  
spp.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado  
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
"Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, SP,  
para obtenção do grau de médico veterinário

Preceptor: *Prof. Adj. Dr. Carlos Alberto Hussni*

Botucatu  
2011

ANGELA CAROLINA GUILLEN

**DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR  
NA DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Sarcocystis*  
spp.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado  
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,  
para obtenção do grau de médico veterinário

Preceptor: *Prof. Adj. Dr. Carlos Alberto Hussni*

Botucatu  
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Guillen, Angela Carolina.

Diferentes métodos de diagnóstico molecular na diferenciação das espécies de *Sarcocystis* spp. / Angela Carolina Guillen. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária)  
- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Alberto Hussni

Capes: 50500007

1. Sarcocistose - Diagnóstico Molecular. 2. Zoonoses.

Palavras-chave: Diagnóstico Molecular; Sarcocystis; Sarcocistose; Sarcosporidiose; Zoonose.

Guillen, Angela Carolina. Diferentes métodos de diagnóstico molecular na diferenciação das espécies de *Sarcocystis* spp. / Angela Carolina Guillen. – Botucatu : [s.n.], 2011. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

### **Resumo**

O gênero *Sarcocystis* agrupa protozoários parasitos obrigatórios heteroxenos. É o gênero mais numeroso dos seis que compõem a família Sarcocystidae. A infecção por parasitos desse gênero configura uma enfermidade denominada sarcocistose ou sarcosporidiose que possui um caráter zoonótico e cosmopolita. A sarcocistose embora, muitas vezes, assintomática em seus hospedeiros definitivos, pode ser fatal em seus hospedeiros intermediários.

Os métodos de diagnóstico mais utilizados para a sarcocistose se dão através da demonstração histológica de esquizontes nos vasos sanguíneos e órgãos e da observação de cistos nos músculos à necropsia ou biopsia, este último, é o mais comum e baseia-se em caracteres morfológicos do sarcocisto. No entanto, essas técnicas podem não ser adequadas para a identificação precisa da espécie infectante uma vez que, além do gênero apresentar grande número de espécies, estas, muitas vezes, apresentam características morfológicas semelhantes. Outro fator que dificulta o diagnóstico é a não especificidade de algumas espécies de *Sarcocystis* aos seus hospedeiros.

Sendo assim, métodos de diagnóstico molecular vêm sendo utilizados de modo a esclarecer qual a espécie infectante, quais são os ciclos biológicos específicos, identificar novas espécies e avaliar aspectos coevolutivos entre parasito e hospedeiro. Entre as técnicas moleculares mais empregadas destacam-se Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), nested-PCR e Técnica de Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP).

Palavras chave: Diagnóstico Molecular; *Sarcocystis*; Sarcocistose; Sarcosporidiose; Zoonose.

Guillen, Angela Carolina. Different molecular diagnostic methods on *Sarcocystis* spp species differentiation / Angela Carolina Guillen. – Botucatu : [s.n.], 2011. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

## **ABSTRACT**

The *Sarcocystis* genus includes obligatory two-host life cycle protozoan parasites. It is the most numerous of the six genera of the Sarcocystidae family. The infection caused by parasites of this genus is a zoonotic and cosmopolitan disease known as sarcosistosis or sarcosporidiosis. The sarcosistosis though frequently asymptomatic in its definitive hosts can be fatal in its intermediate hosts.

The usual diagnoses of sarcosistosis takes place through a histological demonstration of schizonts in blood vessels and organs, and the presence of cysts in muscle tissue by necropsy or biopsy, this second method still more common and based on morphological features of the sarcocyst. However, these methods can be inadequate to a precise identification of the infector species once that, besides the genus being of numerous species, these often present similar morphological features. Another factor that makes the diagnostic more difficult is the non specificity of some *Sarcocystis* species to their hosts.

Consequently, molecular diagnostic methods have been used in order to identify the infector species and the parasite specific biological cycles, demonstrating also new species and coevolutive aspects between parasite and host. Among the most employed molecular techniques the Polimerase Chain Reaction (PCR), the nested-PCR and the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) stands out.

Key-words: Molecular Diagnoses; *Sarcocystis*; Sarcosistosis; Sarcosporidiosis; Zoonosis

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1 Classificação .....	3
2.2 Ciclo de vida .....	3
2.3 Especificidade aos hospedeiros intermediários .....	4
2.4 Zoonose .....	6
2.5 Variedade de espécies .....	7
2.6 Métodos de diagnóstico molecular .....	8
3. COMENTÁRIOS GERAIS .....	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

## 1.Introdução

O gênero *Sarcocystis* pertence ao filo Apicomplexa que é composto por parasitas intracelulares obrigatórios que se caracterizam por possuir, em alguma fase de sua vida, uma estrutura chamada complexo apical que tem como função a fixação e penetração do parasito nas células dos hospedeiros (REYS, 2008).

Dentro desse grupo destacam-se duas famílias de protozoários de interesse médico e veterinário: as famílias Eimeriidae e Sarcocystidae. A família Sarcocystidae, segundo Levine (1988), compreende cerca de 200 espécies de coccídeos heteroxenos que formam cistos teciduais em hospedeiros intermediários. Os gêneros *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia* e *Neospora* são classificados dentro da subfamília Toxoplasmatinae e os gêneros *Sarcocystis* e *Frenkelia* pertencem à subfamília Sarcocystinae (MUGDRIGE et al., 1999).

As espécies de *Sarcocystis* podem infectar mamíferos, pássaros e répteis (MATUSHIMA et al., 2009). São heteroxenos obrigatórios que geralmente têm como hospedeiro definitivo um vertebrado carnívoro. O hospedeiro definitivo se infecta pela ingestão de cistos teciduais (sarcocistos) presentes nos tecidos musculares de hospedeiros vertebrados herbívoros ou onívoros, chamados de hospedeiros intermediários. Estes, por sua vez, adquirem o parasito ao ingerir esporocistos que são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos. (DUBEY et al., 1989).

Nos hospedeiros intermediários a infecção por *Sarcocystis* spp, pode ser altamente patogênica (DOLEZEL et al., 1999), pois nestes ocorre a dispersão do parasito por todo o sistema sanguíneo.

A patogenia da sarcocistose é mais bem conhecida nos animais de produção, uma vez que pode gerar perdas econômicas relevantes devido à condenação de carcaça, e está associada aos efeitos dos esquizontes nos vasos sanguíneos. Nessas espécies, principalmente nos bovinos, a infecção pode causar anemia, anorexia, caquexia, encefalomielite, hemorragias, aborto e morte em casos de infestação massiva (DOMENIS et al., 2001; PESCADOR et al., 2007; RUAS et al., 2001).

Há espécies de *Sarcocystis* que têm como hospedeiro definitivo o homem, caracterizando a sarcocistose como uma doença zoonótica. Em humanos, a sarcocistose pode causar sintomas gastrointestinais como dor abdominal, anorexia, diarreia e náusea, mas de maneira geral é uma infecção subclínica e autolimitante (NEVES, 2005).

O gênero *Sarcocystis* compreende grande variedade de espécies que geralmente possuem características morfológicas distintas e especificidade aos hospedeiros. No entanto, há algumas exceções em que não é possível estabelecer distinção morfológica entre as espécies (DOMENIS et al., 2001; MATUSHIMA et al., 2009; TENTER & HECKEROTH, 1999), ou mais de uma espécie é capaz de infectar o mesmo hospedeiro (MATUSHIMA et al., 2009). Fatores esses que dificultam um diagnóstico específico da espécie do parasito presente em seus hospedeiros.

O diagnóstico da sarcocistose pode ser dado por meio de observação da sintomatologia clínica associada à presença de cistos nos músculos, à necropsia ou biopsia e à demonstração histológica de esquizontes nos vasos sanguíneos e órgãos (REYS, 2008). Esses métodos podem ser falhos na determinação específica de espécie infectante de *Sarcocystis*, já que a morfologia do parasito pode ser comum a várias espécies.

Para melhor identificação das espécies de *Sarcocystis*, métodos de diagnóstico molecular como as técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR), nested-PCR (NPCR), polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e sequenciamento, entre outros, são empregados (DOMENIS et al., 2011; DUBEY et al., 2010; OLIAS et al., 2010; PRAKAS et al., 2011).

Esses métodos de detecção do parasito visam superar as dificuldades encontradas nos métodos diagnósticos comuns. As técnicas são aplicadas no estudo da sistemática, em particular na resolução do problema taxonômico, em ecologia dos parasitos, evolução biológica, genética de população, estrutura de comunidades, epidemiologia e interação com seus hospedeiros, melhorando o entendimento da relação parasito hospedeiro (DOLEZEL et al., 1999; GRECA, 2010; MUDRIDGE et al., 2000;).



## **2.Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Classificação**

O gênero *Sarcocystis* pertence ao filo Apicomplexa e à família Sarcocystidae. Esse filo caracteriza-se por apresentar protozoários parasitos obrigatórios que apresentam um ciclo biológico onde se alternam a reprodução sexuada e a reprodução assexuada. Caracterizam-se ainda por possuírem no pólo anterior de seu corpo alongado uma estrutura celular chamada de complexo apical, utilizada para a penetração nas células dos seus hospedeiros(REYS, 2008; SERCUNDES, 2010).

A família Sarcocystidae (subordem Eimeriorina, Ordem Eucoccidiorida, subclasse Coccidiasina,) caracteriza-se por apresentar multiplicação por esquizogonia ou por endodiogenia. Em sua fase sexuada, os parasitos dão origem a oocistos com dois esporocistos, contendo cada qual quatro esporozoítas (REYS, 2008).

O gênero *Sarcocystis* compreende protozoários obrigatoriamente heteroxenos. No hospedeiro intermediário se formam sarcocistos no tecido muscular que servem de forma infectante para o hospedeiro definitivo, onde evoluem diretamente para gametas no intestino. Outra característica desse gênero é que a esporogonia dos oocistos ocorre no intestino do hospedeiro definitivo com a eliminação dos oocistos esporulados ou de esporocistos nas fezes (NEVES, 2005; REYS, 2008; STELMANN & AMORIM, 2010).

### **2.2 Ciclo de vida**

A sarcocistose é uma enfermidade que acomete uma grande variedade de animais causando uma doença parasitária do sistema vascular que pode levar a óbito. Nos hospedeiros definitivos deve ocorrer a fase sexuada do parasita e nos hospedeiros intermediários sua fase assexuada.

As espécies do gênero *Sarcocystis* possuem como hospedeiro definitivos predadores carnívoros e onívoros, em especial o cão e o gato; e como hospedeiros intermediários, herbívoros ou onívoros (DOMENIS et al., 2011), configurando uma epidemiologia com base na relação presa/predador (DOMENIS et al., 2011; RUAS et al., 2001).

Nos hospedeiros definitivos a infecção ocorre através da ingestão de carne contendo sarcocistos. O parasito desenvolve seu ciclo sexuado numa fase intestinal que culmina na eliminação de oocistos contendo em seu interior dois esporocistos similares, com quatro esporozoítos cada (RUAS et al., 2001). Os bradizoítos provenientes dos sarcocistos penetram na lâmina própria intestinal onde os estágios sexuais, microgametas e macrogametas, desenvolvem-se. O oocisto esporula no hospedeiro definitivo, produzindo dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítos. Estes esporocistos livres são normalmente observados nas fezes do hospedeiro definitivo (REYS, 2008; STELMANN & AMORIM, 2010).

Nos hospedeiros intermediários a infecção por *Sarcocystis* spp se dá através da ingestão dos oocistos ou esporocistos eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos. No trato intestinal do hospedeiro intermediário, os esporocistos se rompem e liberam esporozoítos infectantes. Estes penetram na mucosa intestinal, são disseminados pelo sistema vascular e desenvolvem-se intracelularmente nas células endoteliais dos capilares e em outros pequenos vasos (REYS, 2008; STELMANN & AMORIM, 2010). Os esporozoítos se tornam multinucleados, transformando-se em esquizontes os quais produzem numerosos merozoítos que podem ser liberados no sistema vascular por meio do rompimento da célula hospedeira. Os merozoítos penetram nas células musculares cardíacas e esqueléticas e transformam-se em sarcocistos, ou seja, formam cistos nos tecidos musculares, repletos de bradizoítos (STELMAN & AMORIM, 2010; TENTER & HECKEROTH, 1999). Dependendo da espécie pode ocorrer outras merogonias teciduais. Os cistos podem se desenvolver em todo o tecido muscular, no entanto, o coração, esôfago, diafragma e a língua são os órgãos que com mais frequência são afetados. (DOMENIS et al., 2011)

### **2.3 Especificidade aos hospedeiros intermediários**

A maioria das espécies de *Sarcocystis* possuem especificidade quanto aos hospedeiros intermediários específicos ou as espécies hospedeiras com características muito próximas. Por exemplo, esporocistos de *S. hominis* parasitam suínos e não bovinos e, ao contrário, *S. suihominis* parasitam bovinos e não suínos. (RUAS et al., 2001). Esporocistos de *S. ovifelis*

provenientes de gatos e *S. ovis* provenientes de cães parasitam ovinos, mas não parasitam bovinos e caprinos. *Sarcocystis hirsuta* parasita bovinos e não ovinos.

Há, no entanto, vários relatos que negam essa especificidade. Box e Smith (1982), demonstraram, experimentalmente, que canários (*Serinus canarius*), diamantes mandarim (*Poephila guttata*) e pombo comum (*Columbia livia*), que pertencem à diferentes ordens, servem de hospedeiro intermediário para *S. falculata*. O agente da mieloencefalite por protozoário, *S. Neurona*, causa distúrbio neurológico fatal em equinos, focas, guaxinim, tatus, gatos, furões e aves do gênero *Molothrus* (DOMENIS et al., 2011).

Muitos desses estudos, no entanto, são baseados apenas em caracteres morfológicos. Esses achados não conseguem responder a questão sobre a especificidade do *Sarcocystis* ao seu hospedeiro intermediário sem que investigações baseadas na genética sejam conduzidas. Sendo assim, o diagnóstico molecular da sarcocistose vem aumentando e inúmeros estudos têm mostrado resultados interessantes quanto a informações moleculares e a classificação filogenética das diferentes espécies de *Sarcocystis*.

Prakas et al. (2011) realizou um estudo em gaivotas argêntas (*Larus argentatus*), e identificou, por análise molecular, que o fragmento genético de *Sarcocystis* isolado das gaivotas era diferente em apenas a posição de um nucleotídeo de *S. wobeseri* isolado de ganso-das-faces-brancas (*Branta leucopsis*) e do pato-real (*Anas platyrhynchos*). Como a especificidade de hospedeiros ainda não é clara, não se pode dizer que foi identificada uma nova espécie de *Sarcocystis* ou ainda que o *S. wobeseri* parasita também gaivotas argêntas.

Situação semelhante se deu em estudo realizado em um rebanho bovino na Itália, em que a espécie de *Sarcocystis* encontrada apresentou 97,6% de homologia genética ao *S. hominis*, sugerindo ser uma diferente forma de *S. hominis* caminhando para um processo de especiação ou ainda, uma nova espécie de *Sarcocystis* pode ter sido identificada, cujo ciclo de vida e potencial zoonótico deve ser investigado. (DOMENIS et al., 2011)

## 2.4 Zoonose

Duas espécies de *Sarcocystis* são zoonoses, *S. hominis* e *S. suihominis*. Experimentalmente, alguns primatas como o chimpanzé (*Chimpanzee trogloditis*) e macaco rhesus (*Macaca mulatta*) também serviram como hospedeiros definitivos para essas espécies de parasitos (DOMENIS et al., 2011, REYS, 2008).

*Sarcocystis hominis* tem como hospedeiro intermediário o gado bovino e além do homem algumas espécies de primatas podem atuar como hospedeiro definitivo do parasito. Os esporocistos de *S. hominis* só aparecem nas fezes humanas cerca de 10 dias após a infecção, mas seguem sendo eliminados por 40 dias ou mais (REYS, 2008).

O *Sarcocystis suihominis* tem o porco doméstico (*Sus scrofa*) como hospedeiro intermediário, seu período pré patente é semelhante ao *S. hominis* e a eliminação de esporocistos pode ir até 30 dias, pelo menos (REYS, 2008).

A infecção por *Sarcocystis* configura uma enfermidade denominada sarcocistose ou sarcosporidiose que de maneira geral causa lesões mínimas na mucosa intestinal uma vez que não há ciclo esquizogônico nos hospedeiros definitivos (REYS, 2008). Muitas vezes a infecção não se traduz por um quadro sintomático grave, mas as manifestações clínicas costumam ser mais pronunciadas quando a espécie infectante é *S. suihominis* e em pacientes imunocomprometidos (REYS, 2008).

A sarcocistose é uma enfermidade cosmopolita estando presente em alta porcentagem nos rebanho de animais de produção em todo o mundo. Em localidades da Europa a prevalência dessa enfermidade chega a quase 100% do rebanho (DOMENIS et al., 2011). No Brasil os bovinos apresentam também alta prevalência de sarcocistose (RUAS et al., 2001) e casos dessa enfermidade também foram relatados em ovelhas (PESCADOR et al., 2007; DA SILVA et al., 2009). Essa alta prevalência pode ser um fator de risco que contribui para a contaminação humana, uma vez que a infecção do hospedeiro definitivo se dá através da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo os sarcocistos.

## 2.5 Variedade de espécies

O gênero *Sarcocystis* conta com um significativo número de diferentes espécies responsáveis pela infecção de uma grande e diversificada quantidade de hospedeiros definitivos e intermediários, é o gênero mais numeroso dos seis que pertencem à família Sarcocystidae (DOLEZEL et al., 1999).

De maneira geral a relação de parasitismo entre espécies de *Sarcocystis* e seus hospedeiros definitivos e intermediários mostra um traço de coevolução entre parasito e hospedeiro (DOLEZEL et al., 1999; PRAKAS et al., 2011) o que por sua vez culmina em um alto número de espécies de *Sarcocystis*.

As espécies de *Sarcocystis* possuem características distintas que servem de critério para diferenciá-las. A distinção se dá normalmente através de caracteres fenotípicos como morfologia dos esporocistos, características ultraestruturais dos estágios de desenvolvimento, relação entre parasita e hospedeiro, tamanho total, presença ou não de septos e morfologia ultraestrutural da cápsula (DOLEZEL et al., 1999).

A estrutura da cápsula do sarcocisto é, ainda hoje, a principal característica de identificação das espécies de *Sarcocystis* (PRAKAS et al., 2011). Cada cisto é envolvido por nítida parede, com aspecto liso em algumas espécies e, em outras, com inúmeras projeções externas filiformes e digitiformes. O interior do cisto é, em geral, dividido por delgados septos que limitam compartimentos repletos de elementos conhecidos como cistozoítas: uns são redondos (metrócitos) e outros em forma de banana (bradizoítas). Na parte central dos cistos velhos, os cistozoítas morrem e se desintegram, deixando ver o desenho dos septos que lembra o de favos de mel (REYS, 2008).

Em muitos casos, espécies de *Sarcocystis* que compartilham o mesmo hospedeiro podem ser identificadas com sucesso com base na estrutura da cápsula do sarcocisto (PRAKAS et al., 2011), no entanto, esse diagnóstico é impossível de se fazer se o mesmo tipo de estrutura de cápsula é encontrada em mais de uma espécie de hospedeiro intermediário. Além disso, um tipo de estrutura de cápsula chamado de tipo-1, o tipo mais comum e primitivo, foi observado em mais de 20 espécies de *Sarcocystis* que parasitam hospedeiros intermediários distantes taxonomicamente (PRAKAS et al., 2011). Nesses

casos, apenas dados morfológicos são insuficientes para a identificação das espécies de *Sarcocystis*.

## **2.6 Métodos de diagnóstico molecular**

Os métodos de diagnóstico molecular vêm sendo amplamente utilizados no estudo do gênero *Sarcocystis* de maneira a esclarecer pontos já previamente destacados como aspectos coevolutivos e relação entre parasito e hospedeiro, biologia do parasito e diferenciação de espécies morfológicamente iguais (BUTSKAUKAS et al., 2007; DOMENIS et al., 2011; MUDRIDGE et al., 2000; PRAKAS et al., 2011). Dentre os métodos de diagnóstico molecular três deles serão destacados devido a sua prevalência de escolha como metodologia de estudo na diferenciação de espécies de *Sarcocystis* spp: PCR, nested-PCR e RFLP.

### **2.6.1 Reação em Cadeia pela Polimerase**

A PCR consiste na duplicação do DNA. Esta técnica realiza uma amplificação enzimática de um fragmento específico de DNA de maneira a produzir cópias desse fragmento.

É necessário que haja uma denaturação da dupla molécula de DNA, obtida em alta temperatura, assim obtêm-se fitas simples da molécula que servirá de molde para a síntese de novas cadeias complementares. A formação dessas cadeias complementares se dá pela ação da enzima DNA polimerase (taq polimerase) que requer um ponto de início específico na fita molde que servirá de apoio para que os nucleotídeos sejam adicionados à fita que se forma.

A escolha desse ponto inicial de síntese configura uma etapa importante e crítica na PCR (MUDRIDGE et al., 2000). Esse ponto inicial é fornecido por meio de um oligonucleotídeo, comumente chamado de *primer* ou iniciador de reação, que se fixa num ponto específico da molécula. É a partir desse ponto que um fragmento da molécula é amplificado e este fragmento é que caracteriza e diferencia as espécies. Dessa forma, a região de DNA a ser sintetizada é definida pelos *primers* que se pareiam especificamente às suas

sequências complementares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA a ser amplificado. Assim delimitado, a taq polimerase atua e sintetiza novas cadeias de nucleotídeos.

Após a repetição de vários ciclos de denaturação, pareamento e síntese obtêm-se um número significativo de cópias de determinada sequência. O DNA amplificado pode ser observado em eletroforese de gel de agarose ou poliacrilamida.

Embora a PCR seja rápida, altamente sensível e acurada, tem algumas limitações, falso positivos podem resultar de detecção de ácidos nucléicos livres de microorganismos não viáveis ou de contaminação laboratorial. (GRECA, 2010).

A PCR, de maneira geral, é a técnica mais relatada nos estudos realizados sobre gênero *Sarcocystis*. Entre as diferentes aplicações da diferenciação das espécies de *Sarcocystis* foi possível inferir um grau de parentesco entre diferentes populações de renas, quando demonstrou-se, pela primeira vez na Islândia, que sua população de renas era parasitada pelas mesmas espécies da população presente na Noruega (DAHLGREN et al., 2007).

### **2.6.2 Nested-PCR**

A nested-PCR é um método sensível no qual o produto amplificado (amplicon) na primeira PCR é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a sequências internas do seguimento já amplificado. O segundo par de iniciadores usado sempre amplifica uma sequência menor que o primeiro par, tornando a reação de PCR mais específica e sensível (GRECA, 2010).

Esse método foi escolhido para um estudo em espécies que parasitavam ovelhas, uma vez que havia algumas regiões variáveis na sequência de gene *ssrRNA* com a diferença de apenas pouco nucleotídeos entre elas. Essas regiões são espécie específicas e, portanto, foi possível diferenciar duas espécies: *S. tenella* e *S. arieticanis* (TENTER & HECKEROTH, 1999).

### **2.6.3 Técnica de Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)**

O princípio da RFLP é a digestão dos produtos da PCR ou da nested-PCR por enzimas específicas. Estas enzimas clivam o DNA em fragmentos de determinados tamanhos cuja análise no gel de agarose ou poliacrilamida resulta em diferentes padrões de tamanhos de fragmentos, de acordo com a espécie examinada, possibilitando a identificação. Esse método detecta variações mínimas num gene onde uma única substituição de base pode criar um sítio capaz de ser digerido pelas endonucleases ou abolir o sítio de restrição. Embora útil o método de RFLP não detecta todas as variações de comprimento e sequência dentro ou entre amplicons durante as análises, porque as endonucleases usadas somente reconhecem uma pequena quantidade de locais potencialmente variáveis (GRECA, 2010).

Sharifivazdi et al. (2010) realizou um estudo em búfalo asiáticos (*Bubalus bubalis*) com o objetivo de determinar um método eficaz de diagnóstico da sarcocistose por meio de RFLP. A sequência alvo de escolha foi parte do gene mitocondrial 18SrRNA. Após o processo de RFLP realizado com endonucleases de restrição específicas, bandas molde com diferentes tamanhos de fragmentos foram geradas. Esses fragmentos são espécie específicos e, portanto, cada uma dessas bandas é característica de espécies distintas, indicando então um quadro de múltipla infecção.

Quando em análise mais profunda dos produtos da PCR-RFLP, a sequência de genes apresentadas revelou alto grau de homologia entre as espécies de *Sarcocystis* que parasitam bois e as que parasitam búfalos. Em consequência foi presumido que é possível que as espécies *S. levinei*, *S. dubeyi* e *S. buffalonis* já descritas em búfalos asiáticos sejam, na verdade, *S. cruzi*, *S. hominis* e *S. hirsuta* responsáveis pela infecção de gado bovino.



### 3.Comentários gerais

A sarcocistose configura uma zoonose emergente e cosmopolita e que embora cause lesões brandas e muitas vezes assintomáticas em seus hospedeiros definitivos, entre eles o homem, pode ter manifestação severa em seus hospedeiros intermediários podendo levar, em situações extremas, à morte(DOMENIS et al, 2001; REYS,2008).

O gênero *Sarcocystis* é capaz de parasitar grande número de espécies, de maneira geral, seus hospedeiros definitivos são representados por animais carnívoros que contraem o parasito por meio da ingestão de sarcocistos presentes na musculatura dos hospedeiros intermediários. Seus hospedeiros intermediários são representados por animais herbívoros e onívoros. No Brasil, a doença é mais estudada nos rebanhos bovinos, que hoje conta com crescente número de cabeças o que pode representar, juntamente com o hábito de consumo de carne crua ou mal cozida, um fator de risco para a disseminação da doença.

No Brasil é baixo o relato de estudos relacionados à sarcocistose, seja através do emprego de técnicas moleculares ou não. Esse dado pode indicar ou a baixa incidência da doença no país, ou ainda que ela é subdiagnosticada. Foi demonstrada uma alta prevalência da enfermidade em rebanhos bovinos no sul do país. Revelou-se também a presença de espécies de *Sarcocystis*, entre elas *S. neurona*, responsável por severa doença neurológica em equinos e outras espécies no estado de São Paulo.

O diagnóstico da sarcocistose comumente se dá por meio da demonstração histológica de esquizontes nos vasos sanguíneos e órgãos e da presença de cistos nos músculos à necropsia ou biopsia. Muitas vezes essas técnicas não são eficazes para a diferenciação da espécie de *Sarcocystis* presente em seu hospedeiro. O principal critério de classificação das espécies infectantes é a sua morfologia de cápsula, somada a outras características ultraestruturais, no entanto, várias espécies de *Sarcocystis* apresentam características semelhantes sendo, portanto, indistinguíveis.

Outra limitação é que várias espécies distintas são capazes de parasitar o mesmo hospedeiro, dessa maneira é dificultoso estabelecer um ciclo

biológico característico de cada espécie do parasito e ainda, determinar se este é espécie-específico ou não. Logo, a determinação da espécie infectante é essencial para o entendimento da relação entre parasito e hospedeiro, o que pode refletir diretamente na escolha de medidas profiláticas no ciclo epidemiológico.

Visando superar as dificuldades desses métodos de diagnóstico, análises baseadas em biologia molecular vêm sendo amplamente utilizadas. Dentre as técnicas moleculares três delas são observadas como de escolha para a identificação das espécies de *Sarcocystis* spp, são elas: PCR, nested-PCR e RFLP. Essas técnicas são baseadas na duplicação do DNA ou de fragmentos específicos dele. Essas características genéticas são específicas de cada espécie, portanto, é possível diferenciá-las.

Essas técnicas ainda vêm sendo padronizadas, uma vez que algumas espécies podem diferir umas das outras em apenas um pequeno fragmento genético, ou ainda, podem diferir apenas quanto à localização de um nucleotídeo. Por meio delas, relevantes resultados vêm aparecendo: como a identificação de novas espécies de *Sarcocystis*; demonstração de que espécies tidas como distintas podem ser, na verdade, as mesmas; estabelecimento de aspectos coevolutivos entre parasito e hospedeiro e até mesmo pôde-se inferir sobre grau e parentesco entre diferentes populações de hospedeiros intermediários.

As técnicas moleculares empregadas ao diagnóstico das espécies de *Sarcocystis* spp. configuram então métodos mais seguros e precisos que vêm revelando dados de relevante importância para o estudo da sarcocistose. No entanto, esses resultados também demonstraram que há ainda muitos ciclos biológicos a serem estudados e que deve ser investigado também o potencial zoonótico de cada um deles para o melhor entendimento da enfermidade.

#### 4.Referências

BOX, E.D.; SMITH, J.H.The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds. **J Parasitol**.v.68.p.668–673.1982.

BUTKAUSKAS, D.; SRUOGA, A.; KUTKIENE, L.; PRAKAS, P. Investigations of the phylogenetic relationships of *Sarcocystis* spp. from Greylag (*Anser anser*)and White-fronted (*Anser albifrons*) gese to ohter cyst forming coccidia using 18s and 28s rRNA gene sequences. **Acta Zoologica Lituanica**.Lithuania.v.17.n. 2.p.1392-1657.2007.

DAHLGREN, S.S & GJERDE, B.; *Sarcocystis* in Norwegian roe deer (*Capreolus capreolus*): molecular and morphological identification of *Sarcocystis oviformis* n. sp. And *Sarcocystis gracilis* and their phylogenetic relationship with other *Sarcocystis* species.**Parasitol Res**.Oslo.v.104.p.993–1003.2009.

DAHLGREN, S.S.; GJERDE, B.; SKIRNISSON, K.; GUDMUNDSDOTTIR,B. Morphological and molecular identification of three species of *Sarcocystis* in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Iceland. **Veterinary Parasitology**.Oslo.v.149.p.191-198.2007.

DA SILVA, R.C; SU,C.; LANGONI,H. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil.**Veterinary Parasitology**.Botucatu.n.165.p 332-336.2009.

DOLEZEL,D.; KOUDELA,B.;JIRKUE,M.;HYPSIA, V.;OBORNIK, M.; VOTYA,J.; MODRYA, D.; SLAPETA,J.R.; LUKES, J. Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. Of mammals and reptiles supports the coevolution of *Sarcocystis* spp with their final hosts. **International Journal of Parasitology**. Člėskeã Budeļjovicev.29.p.795-798.1999.

DOMENIS, L.; PELETTO, S.; MODESTO, P.; ZUCCON, F.; CAMPANELLA,C. MAURELLA, C.; GUIDETTI, C.; ACUTIS P.L. Detection of a morphogenetically novel *Sarcocystis* hominis-like in the context of a prevalence study in semi-intensively bred cattle in Italy. **Parasitol Res**. Torino. 2011.

DUBEY, J.P.; ROSENTHAL, B.M.; FELIX, A.T.Morphologic and molecular characterization of the *Sarcocystis rleyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the mallard duck (*Anas Platyrhynchos*). Maryland. **The Journal of Parasitology**. v.96. n.4. 2010.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.; FAYER, R. **Sarcocystosis of Animals and Man**. Florida, Bocca Raton, 1989. 215p.

GRECA, M.P.S. **Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e gatos de Curitiba em região metropolitana**.2010. Dissertação (Mestrado- Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Universidade Federal do Paraná.

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

MATUSHIMA, E.R.; CASAGRANDE R.A.; CESAR, M.O.; PENA, H.F.J.; ZWARG,T.;TEIXEIRA, R.H.F.; NUNES, A.L.V.; NEVES, D.V.D.A.; GOMES, M.; QUAGGLIA NETO, F.; MILANELLO, L.; FONTENELLE, J.H.Occurrence of *Sarcocystis* spp. in opossums (*Didelphis aurita* and *Didelphis albiventris*) in regions of the State of São Paulo, Brazil. **Braz.J.vet.Res.anim.Sci.** SãoPaulo.v.46.n.2.p.101-106, 2009

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

MUDRIDGE, N.B.; MORRISON, D.A.; HECKEROTH, A.R.;JOHNSON,A.M.;TENTER, A.M. Phylogenetic analysis based in full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **Internacional Journal of Parasitology**.Sydney,n.29.p.1554-1556.1999.

MUDRIDGE, N.B.; MORRISON, D.A.; HECKEROTH, A.R.;JOHNSON,A.M.;TENTER, A.M. Effects of sequence alignment and structural domains or ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family Sarcocystidae. **Mol.Biol.Evol.**Sydney.n.17.v.12.p.1842-1853.2000.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. Atheneu. São Paulo. 2005.p 173-175.

OLIAS P.; OLIAS,L.; LIERZ,M.; MEHLHORN, H.; GRUBER, A.D. *Sarcocystis calchasi* is distinct to *Sarcocystis columbae* sp Nov, from de Wood pigeon (*Columba palumbus*) an *sarcocystis* sp. From the sparrowhawk (*Accipiter nisus*).**Veterinary Parasitology**. Berlin.v.171.p.7-14.2010

PESCADOR, C.A.; COBERLINNI, L.GL.; DE OLIVEIRA, E.C.; BANDARRA, P,M,; LEAL, J.S.; PEDROSO, P.M.O.; DRIEMEIER, D. Abortos ovinos associado com infecção por *Sarcocystis* sp. **Pesq.Vet.Bras.**Porto Alegre.v.27.n.10.p. 393-397. 2007

PRAKAS, P.; Kutkiene, L.; SRUOGA, A.; BUTKAUSKAS, D. *Sarcocystis* sp. from the herring gull (*Larus argentatus*) identity to *Sarcocystis wobeseri* based on cyst morphology and DNA results.**Parasitol Res**.Vilnius. 2011.

REYS, L. **Parasitologia**. 4.ed.Guanbara Koogan. Rio de Janeiro. 2008. 181-186.

RUAS, J.; CUNHA, C.W.; SILVA, S.S.; Prevalência de *Sarcocystis* spp (Lankester,1882) em bovinos clinicamente sadios, na região sul do Rio Grande

do Sul, Brasil. **Rev. Bras. de Agrociências**. Pelotas. v.7.n.3.p.227-230.2001

SERCUNDES, M.K.; **Filogenia molecular de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise de genes mitocondriais e de apicoplasto**.2010.94p. Dissertação (Mestrado- Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal).Universidade de São Paulo.

SHARIFIVAZDI, H.;ORYAN, A.; KHORDADMEHR, M.; LARKI, S. Characterization of Sarcocystis fusiformis based on sequencing and PCR-RFLP in water buffalo (Bubalus bubalis) in Iran. **Parasitol Res**.Shiraz. 2011.

STELMANN, U.J.P.; AMORIM, R.M. Mieloencefalite protozoária equina. **Vet e Zootec**.Botucatu. v.17n.2p.163-167.2010

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R. Development of species-specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystosis in sheep. **International Journal for Parasitology**.Hannover.v.29.p 1331-1349,1999.