

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**Diversidade genética da sequência *18S* do DNA ribossomal de
Theileria equi em equinos oriundos das cinco regiões geográficas
do Brasil**

Gabriela Lopes Vivas Vitari

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DA SEQUÊNCIA 18S DO DNA
RIBOSSOMAL DE *Theileria equi* EM EQUINOS ORIUNDOS DAS
CINCO REGIÕES GEOGRÁFICAS DO BRASIL**

GABRIELA LOPES VIVAS VITARI

Sob a orientação do Professor
Huarrisson Azevedo Santos

e Co-orientação do professor
Carlos Luiz Massard

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2018

V837d

Vitari, Gabriela Lopes Vivas , 1988-
Diversidade genética da sequência 18S do DNA
ribossomal de Theileria equi em equinos oriundos das
cinco regiões geográficas do Brasil / Gabriela Lopes
Vivas Vitari. - 2018.
60 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.

Coorientador: Carlos Luiz Massard.

Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2018.

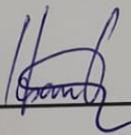
1. Piroplasmose equina. 2. Doença transmitida por
carrapato. 3. Região hipervariável. 4. Genótipos. 5.
Entropia. I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1981-,
orient. II. Massard, Carlos Luiz, 1947-, coorient.
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

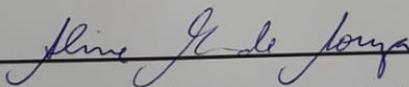
GABRIELA LOPES VIVAS VITARI

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

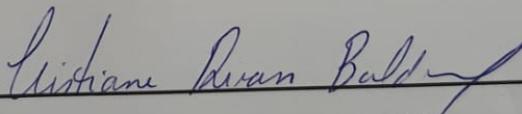
TESE APROVADA EM 28/03/2018



Dr. Huarrisson Azevedo Santos. UFRRJ
(Orientador)



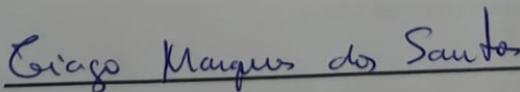
Dr.ª. Aline Moreira de Souza. UFF



Dr.ª. Cristiane Divan Baldani. UFRRJ



Dr.ª. Nádia Regina Pereira Almosny. UFF



Dr. Tiago Marques dos Santos. UFRRJ

Dedico este trabalho a Deus por suas infinitas bênçãos e a Nossa Senhora que está sempre cuidando de mim. Ao meu filho Pedro que todos os dias me traz a alegria de viver. Ao meu marido Raphael pelo companheirismo e apoio. Aos meus pais Patricia e Ricardo, pelo exemplo e incentivo. À minha irmã Bela por estar sempre ao meu lado. Obrigada pelo amor incondicional de vocês e por serem minha base nos momentos difíceis.



“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus** pela minha vida, por me permitir viver toda essa experiência, por me abençoar cada dia mais e por todas as pessoas que Ele coloca em meu caminho. À minha **mãezinha Nossa Senhora**, minha fiel e incansável intercessora, que sempre cuida de mim.

Agradeço a Deus por me presentear com a vida do **Pedro**, meu filho, um bebê gordinho, cheiroso, lindo e cheio de saúde. Obrigado meu menino por me mostrar nesses 4 meses de vida que sou mais forte, mais capaz e mais feliz do que um dia imaginei ser.

Ao meu marido **Raphael**, pela parceria e pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza e medo. Muito obrigado por confiar em mim, pelos momentos de alegria, por seu amor e cuidado com nossa família.

Aos meus pais **Ricardo e Patricia**, que dignamente me apresentaram à importância da família, dos estudos e ao caminho da honestidade e persistência. À minha irmã **Izabela**, pelos conselhos, amizade e por me inspirar a ser uma pessoa melhor. Obrigado por todo apoio que sempre me dedicaram, por todo amor, por serem meu porto seguro, por confiarem em mim e acreditarem nos meus sonhos.

Aos meus **avós, padrinhos, tios, primos e toda a minha família** que sempre acreditou no meu sucesso, me incentivaram na caminhada e rezaram por mim.

À **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, minha amada Rural, onde tive a oportunidade de cursar a Graduação em Medicina Veterinária e o curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias tanto ao nível de Mestrado quanto ao nível de Doutorado. São 12 anos nessa “casa” que me recebeu de braços abertos e me ajudou a amadurecer não só profissionalmente mas também como ser humano.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa durante o Doutorado, este auxílio foi fundamental durante esta jornada.

Ao **Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias** e todos os seus professores pelos conhecimentos transmitidos que foram fundamentais para a realização desta obra.

Ao meu orientador, professor **Dr. Huarrisson Azevedo Santos**, por ser o grande mentor de cada passo deste trabalho e de tantos outros que desenvolvemos juntos a toda a equipe. Obrigada por sua disponibilidade, amizade, estímulo e pelos ensinamentos. Obrigada por acreditar em mim, por me ajudar nos momentos difíceis e pela dedicação incansável.

Ao meu co-orientador, professor **Dr. Carlos Luiz Massard**, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria. Obrigado por me acolher em sua equipe de forma tão carinhosa e por sua amizade. Sou grande admiradora do seu Dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

Aos meus companheiros de laboratório e grandes amigos da vida, **Dra. Renata Lins da Costa, Dra. Claudia Bezerra da Silva, Dra. Maristela Peckle Peixoto, M^a. Ana Paula Martinez de Abreu e Dr. Marcus Sandes Pires** por toda amizade, carinho e pela ótima convivência no dia-a-dia durante esses anos. Obrigada pelas idéias compartilhadas, por toda ajuda, paciência, por me apoiarem nos momentos difíceis e partilharem muitas risadas comigo. Vocês foram fundamentais na concretização deste trabalho. Aprendi muito com vocês e espero reencontrá-los muitas vezes ainda por essas estradas.

À toda equipe do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal (DPA/IV-UFRJ), **Daniela Coelho, Nelson Meireles e Monique Davel** por todo o carinho, ajuda e incentivo dado por vocês.

Ao colega **Zeca** que de forma gentil e prestativa sempre nos auxilia no manejo dos animais da Estação para Pesquisa Parasitológica W. O. Neitz.

À toda equipe do Laboratório de Sanidade Avícola (IV-UFRRJ), **Patricia Paulino, Tays Araujo, Débora Martins, Roberta Tolomelli, Thamiris Vilela, Rodrigo Gredilha e Josemar Gonçalves** por toda ajuda e principalmente pela amizade e excelente convívio.

A todos os amigos e colegas do curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias, por todo auxílio, pelas alegrias e pelo ótimo convívio.

Ao professor **Dr. Douglas McIntosh** pelo apoio em ceder o Laboratório Multi-usuário de Biologia Molecular (BIOMOL) para execução de parte das análises. E a **Tassia Furtado**, técnica deste laboratório, que junto ao professor me receberam muito bem e me auxiliaram em todas as análises.

Aos colegas **Dra. Cristiane Divan Baldani, Dra. Isabele da Costa Angelo, Dr. Carlos Henrique Coelho de Campos e Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto** pela colaboração na coleta do material biológico nas diferentes regiões. A participação e o apoio de vocês foi fundamental para a realização deste projeto. Muito obrigado a todos.

A todos os proprietários e/ou responsáveis que gentilmente aceitaram participar deste trabalho, possibilitando assim sua realização.

Aos animais, motivo real das minhas escolhas, meu respeito e gratidão.

A todas as pessoas que de alguma forma tenham contribuído para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

GABRIELA LOPES VIVAS VITARI, filha de Ricardo Baptista Vitari e Patricia Lopes Vivas Vitari, nasceu em 10 de junho de 1988, no município do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro.

Estudou no Colégio Golfinho Amigo e no Colégio Belisário dos Santos. Coursou o ensino fundamental e o ensino médio no Colégio Nossa Senhora do Rosário, em Campo Grande, Rio de Janeiro, concluindo em 2005.

No ano de 2006, ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no curso de Medicina Veterinária.

Durante a graduação realizou estágios na área de Clínica Médica no Hospital Veterinário de Grandes Animais (HVGA), e na área de nutrição e patologia clínica veterinária no Grupo de Pesquisa/CNPq relacionados à Produção e Saúde dos Equinos, sob a orientação do professor Dr. Fernando Queiroz de Almeida, na UFRRJ.

Fez estágio externo em Clínica Veterinária, no Centro Integrado de Saúde Animal (C.I.S.A.), em Campo Grande, auxiliando no diagnóstico de diversas doenças de importância Médico Veterinária e na realização do tratamento adequado de animais em terapia intensiva.

Concluiu o curso de Medicina Veterinária em 2010.

No ano de 2012, ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias na UFRRJ, área de concentração Parasitologia Veterinária, ao nível de Mestrado, sob orientação do professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos e co-orientação do professor Dr. Carlos Luiz Massard, sendo contemplada com bolsa da CAPES. Em fevereiro de 2014 concluiu seu mestrado e defendeu sua dissertação intitulada “Infecção natural por *Theileria equi* (Piroplasmida: Theileriidae) e *Babesia caballi* (Piroplasmida: Babesiidae) em carrapatos coletados em pastagens frequentadas por equinos e bovinos nas microrregiões de Itaguaí e Serrana, estado do Rio de Janeiro” com êxito, obtendo o título de mestra.

Em março de 2014 ingressou no Doutorado no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias na UFRRJ, novamente sob orientação do professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos e co-orientação do professor Dr. Carlos Luiz Massard, sendo contemplada com bolsa do CNPq.

Ao longo do curso de doutorado participou de diversos projetos de dissertação e tese, juntamente com seus orientadores e toda a equipe do laboratório de Hemoparasitas e Vetores da UFRRJ, e desenvolveu trabalhos que foram publicados em congressos nacionais, internacionais e periódicos científicos com temas relacionados aos hemoparasitas de importância medico-veterinária em animais de produção e companhia. Entre os anos de 2014 e 2018, desenvolveu sua tese com o objetivo de caracterizar a diversidade genética da sequência *18S* do DNA ribossomal de *Theileria equi* em equinos oriundos das cinco regiões geográficas do Brasil.

RESUMO

VITARI, Gabriela Lopes Vivas. **Diversidade genética da sequência 18S do DNA ribossomal de *Theileria equi* em equinos oriundos das cinco regiões geográficas do Brasil.** 2018. 60p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A piroplasmose equina, causada pelo hemoparasito *Theileria equi*, é endêmica no Brasil e é considerada uma das principais doenças de equinos no mundo. O objetivo do presente estudo foi investigar a diversidade genética de isolados geograficamente distintos de sequências do gene *18S rRNA* de *T. equi* em equinos naturalmente infectados provenientes das cinco regiões do Brasil, caracterizar as regiões hipervariáveis das sequências *18S rRNA* de *T. equi* deste estudo e elucidar as relações taxonômicas entre os isolados de *T. equi* do Brasil e do mundo. As amostras de sangue dos equinos foram coletadas nas cinco regiões do país. O DNA genômico foi extraído e as amostras foram submetidas a PCR em tempo real para a seleção das amostras positivas. Posteriormente, as amostras selecionadas foram submetidas a PCR convencional para a amplificação do gene *18S rRNA* (~1600 pb) de *T. equi*, sendo os produtos sequenciados. As sequências foram alinhadas utilizando o ClustalW, e o alinhamento foi submetido ao método de reconstrução da Máxima Verossimilhança com distâncias moleculares estimadas pelo General Time Reversible Model, utilizando 1000 repetições. Desse alinhamento foi desenvolvida uma matriz de similaridade e foram observadas as regiões hipervariáveis. As análises filogenéticas foram realizadas de três formas distintas: utilizando sequências de *T. equi* do Brasil, utilizando sequências de diferentes espécies de *Theileria* e *Babesia*, e utilizando sequências de *T. equi* provenientes de todo o mundo. Foram obtidas vinte e três sequências parciais do gene *18S rRNA* de *T. equi*, sendo treze delas variantes únicas do gene no Brasil. As regiões do gene hipervariáveis V2, V4 e V8 foram identificadas nas amostras do estudo, sendo a V4 a mais variável. Essas regiões hipervariáveis foram confirmadas pela análise de entropia. Foram identificados dois genótipos distintos circulantes nas regiões do Brasil. Apenas na região Norte foi observado um único genótipo, enquanto que nas demais regiões observaram-se ambos. As amostras se agruparam em dois clados (A e C), estando a maioria das sequências do estudo agrupadas no clado C. Em outra árvore, todas as sequências de *T. equi* se agrupam dentro do grupo 1, diferente das demais theilerias e babesias, presentes nos grupos 2 e 3. Em relação às amostras de *T. equi* do mundo, três clados foram observados: A, B e C. Este estudo acrescenta importantes informações sobre a diversidade gênica de *T. equi* em equinos de todas as regiões do Brasil baseado na sequência *18S rRNA*.

Palavras-chave: Piroplasmose equina; doença transmitida por carrapato; região hipervariável; genótipos; entropia.

ABSTRACT

VITARI, Gabriela Lopes Vivas. **Genetic diversity of the 18S sequence of ribosomal DNA of *Theileria equi* in horses from the five geographic regions of Brazil.** 2018. 60p. Tesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Equine piroplasmosis, caused by the hemoparasite *Theileria equi*, is endemic in Brazil and is considered one of the major equine diseases in the world. The objective of the present study was to investigate the genetic diversity of geographically distinct isolates of *18S rRNA* gene sequences of *T. equi* in naturally infected horses from the five Brazilian regions, characterize the hypervariable regions of the *T. equi 18S rRNA* sequences from this study and to elucidate the taxonomic relationships between *T. equi* isolates from Brazil and of the world. Equine blood samples were collected in the five regions of the country. The genomic DNA was extracted and the samples were submitted to real-time PCR for the selection of positive samples. Subsequently, the selected samples were submitted to a conventional PCR for amplification of the *18S rRNA* gene (~1600 bp) of *T. equi*, the products being sequenced. The sequences were aligned using ClustalW, and the alignment was submitted to the Maximum Likelihood reconstruction method with molecular distances estimated by the General Time Reversible Model, using 1000 replicates. From this alignment a similarity matrix was developed and the hypervariable regions were observed. Phylogenetic analyzes were performed in three different ways: using *T. equi* sequences from Brazil, using sequences from different species of *Theileria* and *Babesia*, and using *T. equi* sequences from all over the world. Twenty-three partial sequences of the *18S rRNA* gene of *T. equi* were obtained, of which thirteen were unique variants of the gene in Brazil. The hypervariable gene regions V2, V4 and V8 were identified in the study samples, with V4 being the most variable. These hypervariable regions were confirmed by entropy analysis. Two distinct genotypes circulating in the Brazilian regions were identified. Only a single genotype was observed in the North region, while in the other regions both were observed. Samples were grouped into two clades (A and C), most of the study sequences being clustered in clade C. In another tree, all *T. equi* sequences grouped into group 1, different from the other theilerias and babesias, present in groups 2 and 3. In relation to the *T. equi* samples of the world, three clades were observed: A, B and C. This study adds important information on the genetic diversity of *T. equi* in horses from all regions of Brazil based on the *18S rRNA* sequence.

Keywords: Equine piroplasmosis; tick-borne disease; hypervariable region; genotypes; entropy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Relação das sequências do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> que foram utilizadas nas análises filogenéticas de acordo com o país de origem e código de acesso do GenBank.....	25
Tabela 2.	Relação das sequências do gene <i>18S rRNA</i> das espécies de <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i> que foram utilizadas na análise filogenética e o código de acesso do GenBank.....	27
Tabela 3.	Identificação das sequências deste estudo pela região do Brasil, estado e município de origem da amostra, tamanho do <i>contig</i> formado após o sequenciamento e código de acesso do GenBank.....	30
Tabela 4.	Diferenças de nucleotídeos na região V2 do gene <i>18S rRNA</i> entre a sequência de referência de <i>Theileria equi</i> e as amostras deste estudo.....	31
Tabela 5.	Diferenças de nucleotídeos na região V4 do gene <i>18S rRNA</i> entre a sequência de referência de <i>Theileria equi</i> e as amostras deste estudo.....	32
Tabela 6.	Diferenças de nucleotídeos na região V8 do gene <i>18S rRNA</i> entre a sequência de referência de <i>Theileria equi</i> e as amostras deste estudo.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Árvore filogenética de protozoários do Filo Apicomplexa com genomas completamente sequenciados segundo Kappmeyer et al. (2012). Pf (<i>Plasmodium falciparum</i>), Pv (<i>Plasmodium vivax</i>), Tg (<i>Toxoplasma gondii</i>), Cp (<i>Cryptosporidium parvum</i>), Bb (<i>Babesia bovis</i>), Te (<i>Theileria equi</i>), Tp (<i>Theileria parva</i>), Ta (<i>Theileria annulata</i>).....	17
Figura 2.	Mapa do Brasil destacando as diferentes regiões geográficas, estados e municípios de coleta.....	20
Figura 3.	Gráfico de amplificação de um fragmento de 85pb do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> obtidas na PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Curvas de amplificação na cor azul referem-se ao controle positivo, e em amarelo demonstram amostras consideradas positivas pela técnica.....	28
Figura 4.	Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de 1.600pb do gene <i>18S rRNA</i> específico para <i>Theileria equi</i> . Poço: 1- Peso Molecular (<i>100bp Plus DNA LadderTM</i>); 2- Controle positivo de <i>T. equi</i> ; 3- Controle negativo; 4, 5, 6, 8, 12- amostras consideradas positivas para <i>T. equi</i> ; 7, 9, 10, 11, 13: amostras consideradas negativas para <i>T. equi</i>	29
Figura 5.	Entropia das sequências deste estudo do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> com alinhamento ClustalW. O eixo X é a posição do nucleotídeo no gene, enquanto no eixo Y encontra-se o valor de entropia em cada posição.....	34
Figura 6.	Matriz de similaridade e número de nucleotídeos díspares baseado no gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> das amostras deste estudo.....	36
Figura 7.	Árvore filogenética resultante da análise de sequências do Brasil do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> . Os números apresentados nos nós da árvore indicam os valores de Bootstrap que suportam os ramos. Os nomes das espécies estão descritos, seguidos da localidade e o número de acesso do GenBank em parênteses. As amostras obtidas nesse estudo estão destacadas com ▲. <i>Theileria bicornis</i> e duas sequências de <i>Babesia caballi</i> foram utilizadas como “outgroup”.....	39
Figura 8.	Árvore filogenética resultante da análise de diferentes espécies dos gêneros <i>Theileria</i> e <i>Babesia</i> , considerando o gene <i>18S rRNA</i> . Os números apresentados nos nós da árvore indicam os valores de Bootstrap que suportam os ramos. Os nomes das espécies estão descritos, seguidos do número de acesso do GenBank em parênteses. As amostras obtidas nesse estudo estão destacadas com ▲. <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Plasmodium juxtannucleare</i> foram utilizados como “outgroup”.....	41

Figura 9. Árvore filogenética resultante da análise de sequências do mundo do gene *18S rRNA* de *Theileria equi*. Os números apresentados nos nós da árvore indicam os valores de Bootstrap que suportam os ramos. Os nomes das espécies estão descritos, seguidos da localidade e o número de acesso do GenBank em parênteses. As amostras obtidas nesse estudo estão destacadas com ▲. *Theileria bicornis* e duas sequências de *Babesia caballi* foram utilizadas como “outgroup”

LISTA DE ABREVIACOES

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
DNA	cido desoxirribonucleico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITS	Região intergênic
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MW	Centro-oeste – Midwest
N	Norte – North
NE	Nordeste – Northeast
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pb	Pares de bases
qPCR	PCR em tempo real
SE	Sudeste – Southeast
S	Sul -South
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Brasil e suas regiões.....	4
2.2 O cavalo no Brasil.....	5
2.3 Histórico e Importância da Theileriose Equina.....	7
2.4 Posição Taxonômica e Morfologia.....	9
2.5 Carrapatos Vetores no Brasil e no mundo.....	10
2.6 Patogenia.....	11
2.7 Análises filogenéticas de Piropasmida com enfoque em <i>Theileria equi</i>	14
2.7.1 Baseado no marcador molecular <i>18S rRNA</i>	15
2.7.2 Baseado em diferentes marcadores moleculares.....	15
2.8 Caracterização molecular de <i>Theileria equi</i> no Brasil e no mundo.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Descrição dos locais de estudo.....	19
3.2 Coleta e Envio de Amostras.....	20
3.3 Extração de DNA total.....	21
3.4 Detecção Molecular de <i>Theileria equi</i> utilizando a PCR em tempo real.....	21
3.5 Amplificação do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> através de PCR convencional.....	22
3.5.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	23
3.5.2 Purificação do Produto da PCR	23
3.6 Sequenciamento das Amostras	24
3.7 Análises do Sequenciamento	24
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Detecção molecular de <i>Theileria equi</i> e seleção das amostras	28
4.2 Análise filogenética do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i>	37
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS	
Anexo I – Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas do uso de animal	60

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os equinos têm sido utilizados em diversas categorias, incluindo animais de estimação, esporte, agricultura, na lida com o rebanho bovino e na exportação de carne, que já é considerada uma realidade ainda que pequena no mercado alimentício nacional (SEIXAS, 2015). Para desempenhar estes papéis, o manejo alimentar e o treinamento físico, bem como a saúde do animal devem estar plenos.

A babesiose ou piroplasmose equina é considerada uma das principais hemoparasitoses dos equinos devido aos danos que podem causar no organismo desses animais (FRIEDHOFF, 1988). Esta afecção acomete os animais de forma endêmica em todo território brasileiro, assim como em diversos países em todo o mundo. Muitos estudos têm sido desenvolvidos a respeito desta doença em função dos distúrbios que ela pode gerar nos animais acometidos, além das enormes perdas econômicas na equideocultura.

O Brasil apresenta um vasto território, sendo considerado, de maneira geral, um país de clima tropical, o que propicia a ocorrência de diversas espécies de carrapatos responsáveis pela propagação de doenças e manutenção da transmissão natural aos hospedeiros. A variedade de espécies de carrapatos pode ser um dos fatores responsáveis pela sustentação das altas taxas de prevalência da piroplasmose equina, tornando nosso país endêmico para a doença segundo a OIE (Organização Mundial de Saúde Animal). Essa mesma organização classifica a piroplasmose equina como uma doença da lista “B”, doença transmissível e de importância sócio-econômica e/ou saúde pública e que é significativa no comércio internacional de animais. Corroborando com essa afirmação, Knowles (1996) considera essa doença o principal impedimento para o trânsito internacional de equinos, ou seja, animais positivos são proibidos de ingressar em países considerados livres da doença, desde a participação em competições esportivas ou para exportação definitiva. Apenas equinos sorologicamente negativos podem entrar em áreas livres da doença (WEILAND, 1986). Outro fator que contribui para essa restrição é o risco de dispersão dos agentes de áreas enzoóticas para áreas livres destes hemoparasitos (FRIEDHOFF et al., 1990).

Essa doença é causada pelos protozoários intra-eritrocíticos: *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn; Schein (1998) e *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912), e pode ocorrer pela presença de apenas um ou de ambos os parasitos (PHIPPS; OTTER, 2004). A piroplasmose é a única doença parasitária intra-eritrocitária dos equinos, a qual é transmitida por carrapatos e pode acometer equinos, asininos, muares, zebras e até camelos (CORRÊA; CORRÊA, 1992; BAYLY, 2000; SLOBODA et al., 2011). Além de serem os causadores da

piroplasmose equina, esses agentes têm grandes similaridades, fato que explica *T. equi* ter sido classificada como membro da família Babesiidae, gênero *Babesia*, até o ano de 1998. No entanto, este parasito não realiza transmissão transovariana no carrapato vetor (FRIEDHOFF, 1988) e, no hospedeiro vertebrado, faz primeiramente uma esquizogonia exo-eritrocítica em linfócitos (SCHEIN et al., 1981; MOLTMANN et al., 1983) e suas formas intra-eritrocíticas se apresentam em formato de “Cruz de Malta” (SCHEIN, 1988), o que diverge totalmente dos parasitos da família Babesiidae.

Além destes fatores, estudos de sensibilidade às drogas comprovaram que *T. equi* apresenta resistência à fármacos “babesicidas”, sugerindo um metabolismo distinto (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Além disso, tem demonstrado ser altamente susceptível a fármacos “esquizonticidas” usados no tratamento da theileriose bovina (ZWEYGARTH et al., 1984; KUTTLER et al., 1988; ZAUGG; LANE, 1989; KUMAR, 2003). Esta mudança na sistemática de *Babesia equi* para *T. equi* vem sendo discutida desde a década de 80, e alguns autores concordam com a transferência desse parasito para o gênero *Theileria* (SCHEIN et al., 1981; MOLTMANN et al., 1983; ZAPF; SCHEIN, 1994; MELHORN; SCHEIN, 1998), enquanto outros acreditam que seria melhor a criação de uma nova família (ALLSOPP, 1994).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos em torno da ampla sistemática dos Piroplasmas pela análise do fragmento da sequência *18S* do DNA (ácido desoxirribonucleico) ribossomal (ALLSOPP, 1994; CHAE et al., 1999; CHANSIRI et al., 1999; CRIADO-FORNELIO et al., 2004; CRIADO et al., 2006; REICHARD et al., 2005; ALTAY et al., 2007; BHOORA et al., 2009), já que este gene aumenta a capacidade de realizar análises genéticas em população de agentes patogênicos (KEIM et al., 2004).

O fragmento *18S* do DNA ribossomal é uma parte do RNA (ácido ribonucléico) ribossômico, abreviado como *18S rRNA*, e é um componente da pequena subunidade ribossomal eucariótica (40S). O *18S rRNA* é o RNA estrutural para o pequeno componente dos ribossomos citoplasmáticos eucarióticos e, portanto, um dos componentes básicos de todas as células eucarióticas. Os genes que codificam essa região são referidos como genes *18S rRNA*. As sequências desse gene são amplamente utilizadas na análise molecular para reconstruir a história evolutiva dos organismos, pois sua taxa de evolução é lenta (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006).

A subunidade menor do gene *18S rRNA* é uma das mais utilizadas em estudos filogenéticos e um alvo importante para a reação em cadeia da polimerase (PCR) na triagem ambiental (MEYER et al., 2010). Além disso, ao utilizar sequências do gene *18S rRNA* em uma árvore de referência pode-se realizar estudos de biodiversidade, comparando sequências

provenientes de diferentes regiões (HADZIAVDIC et al., 2014). Em geral, as sequências desse gene são de fácil acesso porque a região é altamente conservada, permitindo o uso de “primers” (oligoiniciadores) universais. Outra ferramenta é a análise multigênica, que proporciona resultados mais confiáveis para a observação de eventos mais profundos, porém ainda existe pouca variedade com relação aos genes completos depositados nas bases de dados públicas para os Piropasmidas dificultando a realização deste tipo de análise.

Estudos sobre a classificação filogenética e a diversidade genética de *T. equi* têm utilizado esse mesmo gene alvo em todo o mundo (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006; BHOORA et al., 2009; SALIM et al., 2010). Embora tenha-se observado algumas diferenças genotípicas deste agente em amostras de equinos infectados do estado do Rio de Janeiro (PECKLE et al., 2018), no Brasil ainda não há dados que confirmem esta variabilidade genética de *T. equi* em outras regiões. O gene *18S rRNA*, apesar de conservado, possui regiões variáveis que são muito utilizadas em estudos filogenéticos. Esta heterogeneidade pode ser observada dentre os diferentes isolados de *T. equi* do mundo (NAGORE et al., 2004; BHOORA et al., 2009).

O presente estudo teve como objetivos (i) caracterizar a diversidade genética dos isolados geograficamente distintos de sequências *18S rRNA* de *T. equi* em equinos naturalmente infectados provenientes das cinco regiões geográficas do Brasil, (ii) caracterizar as regiões hipervariáveis das sequências *18S rRNA* de *T. equi* deste estudo e (iii) observar as relações entre os isolados de *T. equi* do Brasil e do mundo utilizando análises filogenéticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Brasil e suas regiões

O Brasil é considerado um país continental, com uma área de 8.547.403 quilômetros quadrados, sendo o terceiro em extensão territorial nas Américas. Seu território representa 47% de todo o espaço terrestre da América do Sul e 50% da população. O país está situado em um ponto geograficamente privilegiado do continente, fazendo fronteira com grande parte dos países sul-americanos, o que facilita as negociações comerciais, além do fluxo de capital e mercadoria. Por esses motivos o Brasil é considerado uma potência, no campo político e econômico (FREITAS, 2015).

Em relação a localização geográfica mundial, o Brasil é um país ocidental, estando a oeste do meridiano de Greenwich, pertence ao hemisfério sul (mais de 90% do seu território), e tem o clima considerado tropical. As temperaturas elevadas em grande parte do território facilitam o desenvolvimento das práticas agropecuárias. Devido a sua grande área de extensão e localização geográfica, o país é composto de uma grande biodiversidade, com uma imensa variedade de plantas e animais, e grande riqueza de recursos naturais.

Por sua enorme extensão territorial, o Brasil é dividido em regiões. A divisão estabelecida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 1970 é a que está em vigor até hoje, estando o país dividido em cinco regiões: Centro-Oeste, Nordeste, Norte, Sul e Sudeste, levando em consideração critérios como semelhança nos aspectos físicos, humanos, culturais, sociais e econômicos (FRANCISCO, 2017).

A região Centro-Oeste é a única região brasileira que não é banhada pelo mar. Ela é composta pelos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e pelo Distrito Federal, ocupando uma área de 1.604.850 km² e tendo a segunda maior extensão territorial entre as regiões brasileiras. Faz fronteira com a Bolívia e o Paraguai, e sua localização permite ligação com todas as outras regiões brasileiras.

O Nordeste brasileiro é formado pelos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Faz parte ainda dessa região, a Ilha de Fernando de Noronha, que pertence ao estado de Pernambuco. Sua área é de 1.554.257,0 km². É a região brasileira que possui a maior costa litorânea do país, o que contribui para o desenvolvimento do turismo na região.

Já a região Norte, ocupa uma área de 3.853.397,2 km² sendo a maior das regiões brasileiras, fazendo fronteira com a Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e

a Guiana Francesa. É composta pelos estados de Roraima, Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Tocantins, e ocupa aproximadamente 42% do território nacional.

Os estados que formam a região Sudeste são: Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. Sua extensão territorial é de 924.511,3 km², sendo a segunda menor região brasileira em extensão territorial e a mais desenvolvida economicamente.

A região Sul do Brasil ocupa uma área de 576.409,6 km², sendo a menor região brasileira. Essa região faz fronteira com o Uruguai, Argentina e Paraguai e é formada pelos estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul.

Todas as regiões, assim como os diferentes estados, possuem uma grande diversidade cultural, além das diferenças climáticas, econômicas e sociais. Os colonizadores, imigrantes e populações que chegaram ao Brasil ao longo desses anos contribuíram para essa pluralidade brasileira .

2.2 O cavalo no Brasil

As características do processo de introdução do cavalo no Brasil diferem daquelas verificadas nos demais países do continente americano. Nos países sob colonização espanhola, a principal função do cavalo foi como arma de guerra.

Em sua segunda viagem à América, em 1493, Cristóvão Colombo trouxe alguns exemplares para a Ilha de São Domingos (América Central). Na América do Sul, a introdução do cavalo ocorreu em 1532, quando Pizarro utilizou cavalos na sua incursão ao Peru. No Brasil, os primeiros cavalos desembarcaram em 1534 na capitania de São Vicente (SP), vindos das caravelas que trouxeram Martim Afonso de Souza à Olinda (PE). Em 1549, foi registrada oficialmente a chegada de cavalos ao nosso país, Tomé de Souza (primeiro governador-geral) mandou vir alguns animais de Cabo Verde para a Bahia, na caravela Galga. Assim, nos primeiros anos da Colônia, a sua criação (junto com o gado bovino) foi iniciada formalmente e seria fundamental para a formação do Brasil, já que as principais atividades econômicas do Brasil colonial eram a açucareira e a criatória (pecuária). A atividade açucareira limitou-se à zona da mata, enquanto a pecuária foi o principal fator de penetração e ocupação do interior do Brasil (CNA, 2004).

Com o início do ciclo da mineração, surge também a necessidade de abastecer os núcleos mineradores, reforçando a interiorização do gado e conseqüentemente do cavalo, expandindo a criação nas direções do Centro-Oeste e Norte, a partir de dois centros: Bahia e Pernambuco. Na região Sul, a introdução do cavalo ocorreu de forma distinta. Nos estados do

Paraná e Santa Catarina (atualmente) misturaram-se os cavalos vindos de São Paulo (junto com a criação de gado bovino) com cavalos descendentes de animais extraviados da viagem de Cabeça de Vaca. Rapidamente, a criação de cavalos no Rio Grande do Sul ganhou importância, transformando-se em fornecedor de equídeos para as demais regiões (CNA, 2004).

A criação de cavalos no Brasil colonial teve também importância estratégica. Durante o século XVII e parte do século XVIII o Brasil foi o grande fornecedor de cavalos para as tropas portuguesas na África. O fato do Brasil exportar cavalos nunca inibiu a sua importação. E com a chegada da família real, cavalos de melhor qualidade começaram a ser importados (CNA, 2004). Em 1808, na sua fuga para o Brasil, D. João VI trouxe os cavalos da coudelaria do Alter Real para o Rio de Janeiro (COSTA, 2008). Posteriormente, em 1819, determinou a criação do “Estabelecimento de Manadas Reais”, em Minas Gerais, com a importação de cavalos. Outras importações de destaque ocorreram também em 1821 (de cavalos da Áustria, pela Imperatriz D. Leopoldina) e 1825 (de cavalos ingleses, para a coudelaria de Cachoeira dos Campos).

As raças tipicamente nacionais desenvolvidas desde a época do Império são o Mangalarga, o Crioulo Brasileiro e o Campolina. Todas as raças de cavalos são originadas da espécie *Equus caballus*, porém existem mais de 100 raças de cavalos diferentes em todo o mundo (COSTA, 2008).

O Brasil hoje tem o terceiro maior rebanho do mundo e o maior da América Latina, com aproximadamente 7,7 milhões de animais que geram empregos, contribuem com tributos e movimentam bilhões de reais a cada ano. Em 2006, estudos apontaram um PIB da equideocultura de 7,5 bilhões de reais, em 2012 atingiu 12,3 bilhões de reais e no ano de 2015 o PIB da equinocultura chegou à marca histórica de 16 bilhões de reais (IBGE, 2015). Além disso, hoje o Brasil é o oitavo maior exportador de carne equina no mundo.

O maior número de animais é observado no estado de Minas Gerais, seguido pelo Rio Grande do Sul e Bahia (IBGE, 2015). Em relação ao efetivo de equinos e sua função, a maioria dos animais, aproximadamente 3.900.000, está relacionado ao trabalho e lida, enquanto 1.100.000 animais está relacionado ao esporte, lazer e criação. Observa-se que as raças que predominam no Brasil são, pela ordem, Mangalarga Marchador, Nordestino, Quarto de Milha e Crioula (MAPA, 2016). Estes animais enquadram-se em diversos segmentos do agronegócio do cavalo no Brasil, como os animais de trabalho (cavalo militar, cavalos de lida com gado bovino, usados na terapêutica -equoterapia- e outros), criação, treinamento e esporte (rodeio, enduro, hipismo, adestramento, salto, corrida etc.).

Em termos regionais, a região Sudeste concentra o maior número de equinos (24,4%), depois a região Nordeste (23,4%), Centro-Oeste (18,7%), Sul (18,2%) e Norte (15,3%) (IBGE, 2013). Com essa grande importância da equinocultura no nosso país, todos os estudos que envolvam uma melhoria na saúde, desempenho e rendimento desses animais, independente da atividade que o cavalo irá exercer, merecem destaque.

2.3 Histórico e Importância da Theileriose Equina

A piroplasmose equina, também conhecida como babesiose ou nutaliose, é uma doença de destaque em âmbito nacional e internacional é causada pelos hemoprotozoários *Theileria equi* e *Babesia caballi*.

No final do século XIX, o pesquisador Victor Babés observou a presença de microrganismos em eritrócitos de bovinos na Romênia, e associou a ocorrência de uma doença denominada “Febre da água vermelha”, que causava hemoglobinúria (BABÉS, 1888). Ele também observou mais tarde organismos similares nas células vermelhas de ovelhas. Em 1893, o agente da “Febre do Texas” em bovinos nos Estados Unidos, uma doença anemiante, foi denominado de *Pyrosoma bigeminum* por Smith e Kilborne. Estes autores constataram a participação de carrapatos na transmissão deste agente para os animais. Este achado foi o primeiro relato de protozoários transmitidos por artrópodes. Ainda em 1893, Starcovici renomeou esses parasitos em homenagem a Victor Babés, que fez a primeira descrição, dando os nomes de *Babesia bovis*, *Babesia ovis* e *Babesia bigemina*, respectivamente (UILENBERG, 2006).

Antes de 1901, a piroplasmose equina não era reconhecida como uma nova doença e era sempre confundida com outras doenças já descritas como a febre antrax, febre biliar ou malária equina (ROBERTS et al., 1962). A piroplasmose era referida como malária equina, por exemplo, porque os sinais clínicos observados nos equinos eram parecidos com os encontrados em humanos quando infectados por *Plasmodium* (USDA, 2010).

Finalmente no ano de 1901, Laveran observando esfregaços sanguíneos da África do Sul, descreveu o pequeno piroplasma dos equinos, denominando-o de *Piroplasma equi*. Nuttall e Strickland, em 1910, descreveram um novo parasito, *Piroplasma caballi* (Nuttall; Strickland, 1910), morfológicamente distinto de *P. equi*, mas também causador da piroplasmose equina. Eles observaram que os parasitos estavam no interior dos eritrócitos, porém estes eram maiores do que *P. equi*. Alguns nomes já foram propostos desde então, sendo o termo “piroplasma” o mais conhecido. Esse nome teve origem da característica

morfológica desses parasitos, durante sua multiplicação intra-eritrocítica, ser semelhante a uma “pêra”. A denominação *Piroplasma* permanece como sinonímia para o gênero *Babesia* e tanto as babesioses quanto as theilerioses são comumente agrupadas sob a designação de "piroplasmoses" (UILENBERG, 2006).

No Brasil, a piroplasmose equina causada por *T. equi* foi descrita pela primeira vez no ano de 1910 por Carini, que realizou o diagnóstico clínico e laboratorial de animais oriundos do estado de São Paulo. Desde então esse parasito foi diagnosticado em diversos estados como o Rio de Janeiro (PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; BOTTEON et al., 2002), Minas Gerais (RIBEIRO; LIMA, 1989), Goiás (LINHARES, 1994), e Rio Grande do Sul (CUNHA et al., 1997). A doença ocorre em todo o mundo nas áreas tropicais e subtropicais e é considerada endêmica em todo território brasileiro.

Pela importância da piroplasmose equina, muitos estudos foram desenvolvidos em torno do agente *Babesia equi*, que no ano de 1998 foi reclassificado para o gênero *Theileria*, família Theileriidae, por Mehlhorn e Schein. Estes pesquisadores levaram em consideração que a primeira esquizogonia do agente no hospedeiro vertebrado ocorria em linfócitos (SCHEIN et al., 1981), além da ocorrência de transmissão transtadial e falha na transmissão transovariana (SIGRIST, 1983). Essa esquizogonia linfocítica pré-eritrocítica realizada pelos esporozoítos de *Theileria* (SCHEIN et al., 1981; MOLTSMANN et al., 1983) difere do gênero *Babesia*, que parasita os eritrócitos assim que adentram no organismo do hospedeiro vertebrado. Essa diferença causa algumas manifestações mais graves nas infecções por *Theileria* quando comparadas as infecções por *Babesia*, tais como linfadenopatia, pirexia, trombocitopenia e panleucopenia (HOMER et al., 2000). *Babesia caballi* por sua vez possui uma menor atividade patogênica e diferente sensibilidade a quimioterápicos, pois se apresenta mais sensível a produtos para o tratamento de babesiose (NAVARRETE; SERRANO, 1999; OIE, 2014) enquanto *T. equi* se mostra mais sensível a fármacos utilizados no tratamento da theileriose (ZAUGG; LANE, 1989; KUMAR, 2003). Embora possuam características em comum, *T. equi* e *B. caballi* possuem diferenças biológicas, morfológicas e metabólicas significativas.

Theileria equi, a denominação que será admitida neste trabalho em concordância aos fatos descritos na nova taxonomia, tem como sinônimos: *Babesia equi*, *Piroplasma equi*, *Nutallia equi*, *Nutallia asini*, *Nutallia minor* e *Achromaticus equi* (LEVINE, 1985).

Sabe-se que essa doença pode trazer consequências graves a saúde dos equinos como perda da “performance”, anemia, cólicas, abortamento e até óbito, porém o principal destaque dessa doença se dá pelas implicações econômicas. Além do custo no tratamento e a alta

morbidade dos animais, a proibição na exportação ou deslocamento para competições esportivas torna essa doença o principal impedimento no transito internacional de equinos (KNOWLES, 1996; GUIMARÃES et al., 1998; MARTIN, 1999). O risco de dispersão dos agentes de áreas enzoóticas para áreas livres da doença contribui para essa restrição no trânsito (FRIEDHOFF et al., 1990). Sendo assim, apenas equinos sorologicamente negativos podem ser transportados e inseridos em áreas consideradas livres da doença (WEILAND, 1986), já os equinos com anticorpo contra *T. equi* ou *B. caballi* são restritos de ingressar em diversos países, incluindo os Estados Unidos, Austrália e Japão (FRIEDHOFF, 1982; SCHEIN, 1988; SALIM et al., 2013).

Dentro desse contexto a theileriose se destaca devido à dificuldade no controle da infecção. Após o tratamento da doença aguda e resolução do caso clínico, o animal portador não possui indicações de infecção, apenas a presença de anticorpos. Entretanto, estudos mostram que *T. equi* pode persistir no organismo do equino infectado por anos, provavelmente por toda a vida (SCHEIN, 1988). Logo, o animal uma vez infectado representa uma fonte de infecção contínua potencial do parasita no ambiente (KNOWLES, 1996). Portanto, o diagnóstico preciso de animais infectados e que se apresentam clinicamente normais é primordial na prevenção da transmissão para animais suscetíveis.

2.4 Posição Taxonômica e Morfologia

A atual posição taxonômica deste protozoário:

Domínio: Eukaryota Chatton, 1925

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Filo: : Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Infrafilo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Ordem: Piroplasmida Wenyon, 1926

Família: Theileriidae Du Toit, 1918

Gênero: *Theileria* Bettencourt, 1907

Espécie: *Theileria equi* (LAVERAN, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998.

A ordem Piroplasmida engloba diversos gêneros de parasitos heteroxenos que tem como hospedeiro invertebrado os carrapatos (ROBERTS; JANOVY, 2005), que infectam mamíferos, e em menor proporção as aves e, portanto, possuem importância médica e

econômica (LACK et al., 2012). Esta ordem é caracterizada por organismos pleomórficos que podem ser piriformes, amebóides, alongados e que se locomovem por flexão ou deslizamento.

A família Theileriidae é composta por organismos de formato esférico, em vírgula ou amebóide. Parasitam linfócitos e eritrócitos, são pequenos e se multiplicam por esquizogonia no hospedeiro vertebrado. No hospedeiro invertebrado ocorre a gametogonia, esporogonia e a esquizogonia (NAVARRETE; SERRANO, 1999), e realizam naturalmente transmissão transestadial (NEITZ, 1956; SOULSBY, 1987).

Os membros do gênero *Theileria* são hemoprotozoários de vertebrados transmitidos por carrapatos (LEVINE, 1985). Alguns membros deste gênero são patogênicos e causam doenças com perdas econômicas significativas em animais domésticos e selvagens em todo o mundo (CHAE, 1999). Outros membros, porém, são considerados moderadamente patogênicos ou benignos (BROWN, 1990).

Em relação a espécie *T. equi*, os merozoítos eritrocíticos são relativamente pequenos, menores que 2-3 µm de comprimento (LEVINE, 1985). No esfregaço sanguíneo observa-se, além das pequenas inclusões arredondadas, quatro merozoítos piriformes unidos pelas extremidades formando tétrades, caracterizadas como “Cruz de Malta” (LAVERAN, 1901; NEITZ, 1956; SOULSBY, 1982; NAVARRETE; SERRANO, 1999; ZAUGG, 2002; De WALL; HEERDEN, 2004).

2.5 Carrapatos Vetores no Brasil e no mundo

A piroplasmose ocorre em grande parte dos países e está distribuída em todo o mundo, a infecção é mantida dentro de populações equinas, desde que vetores competentes estejam presentes (THOMPSON, 1969). Embora não sejam conhecidos totalmente os requisitos necessários para a manutenção da relação parasito-hospedeiro para ocorrência da theileriose, sabe-se que densidades crescentes de cavalos com esta doença estão relacionadas ao aumento de carrapatos infectados em uma determinada área (CLOUSE et al., 2011).

O vetor de *T. equi* ainda não está bem estabelecido no Brasil (PECKLE et al., 2017). Dados experimentais indicam o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* como vetor da theileriose equina no Brasil (GUIMARÃES et al., 1998). Por outro lado, dados epidemiológicos reforçam que a espécie *Amblyomma sculptum* poderia ser vetor de *T. equi* no nosso país (KERBER et al., 2009; PECKLE et al., 2013), porém um estudo experimental não confirmou essa hipótese (RIBEIRO et al., 2011). Considerando todos os possíveis carrapatos

vetores no mundo, o polimorfismo genético observado em *T. equi* pode ser um reflexo do uso de diferentes hospedeiros de invertebrados em seu ciclo de vida (PECKLE et al., 2017).

No continente americano há a descrição de um surto de theileriose em uma fazenda no sul do Texas envolvendo aproximadamente 400 cavalos no ano de 2009 (SCOLES, 2011). Os cavalos infectados haviam sido encontrados infestados por quatro espécies diferentes de carrapatos: *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma maculatum*, *Dermacentor nitens* e *Dermacentor variabilis*. Neste surto, *A. cajennense* foi o mais abundante, sendo identificado em aproximadamente 79% dos cavalos infectados, seguido de *A. maculatum* (19%), *D. variabilis* (16%) e *D. nitens* (3%) (WISE et al., 2013). Nesta investigação foram determinados dois vetores competentes de *T. equi* nos Estados Unidos (*A. cajennense* e *D. variabilis*), confirmando que esses carrapatos coletados dos cavalos infectados nas instalações eram capazes de transmitir biologicamente *T. equi* aos cavalos nativos (WISE et al., 2013). Apesar disso, o papel de *D. variabilis* como vetor natural neste surto permanece questionável (SCOLES et al., 2011). O papel de *A. maculatum* no foco não ficou claro e, embora *D. nitens* seja um vetor conhecido de *B. caballi*, faltam evidências da sua capacidade de transmitir *T. equi* (WISE et al., 2013). Anteriormente, nos Estados Unidos, eram reconhecidos experimentalmente como competentes na transmissão de *T. equi* apenas as espécies *D. variabilis* (popularmente conhecido como carrapato americano) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (“carrapato do gado do sul”) (SCOLES et al., 2011), contudo após esse surto a espécie *A. cajennense* foi identificada como potencial vetor. Em outro estudo, *A. cajennense* foi confirmado como vetor intraestadial competente de *T. equi* (SCOLES; UETI, 2013). No Iran, o DNA genômico de *T. equi* foi detectado em glândulas salivares das espécies *Hyalomma anatolicum excavatum* e *Rhipicephalus Bursa* (ABEDI et al., 2014).

Estudos vêm sendo realizados ao redor do mundo com o intuito de preencher as lacunas sobre a transmissão dos agentes causadores da piroplasmose equina. No entanto, sabe-se que algumas espécies de Ixodídeos dos gêneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma* e *Haemaphysalis* são responsáveis pela transmissão destes hemoparasitos, *B. caballi* e *T. equi* (MEHLHORN; SCHEIN, 1998; ASGARALI et al., 2007; WISE et al., 2013). Segundo Wise et al. (2013), há a descrição da transmissão de *T. equi* por 14 espécies de carrapatos: 4 espécies do gênero *Dermacentor*, 4 do gênero *Hyalomma*, 5 do gênero *Rhipicephalus*, e a espécie *A. cajennense*.

2.6 Patogenia

Existem três diferentes estágios de vida de *Theileria equi*, quando levamos em consideração seu ciclo biológico: esporozoíto (forma evolutiva de transmissão assexuada), merozoíto (forma sanguínea assexuada) e gametócito (forma sanguínea sexual). Dependendo da espécie de carrapato estudada, pode haver variação no desenvolvimento desses parasitas (WISE et al., 2013).

Ao se alimentar no equino, o carrapato infectado inocula através da saliva os esporozoítos (forma infectante) de *Theileria equi*, que realiza sua invasão inicial em linfócitos ou macrófagos, fato crucial na classificação taxonômica desta espécie, onde haverá multiplicação dos esporozoítos dentro de grandes esquizontes, durante aproximadamente 9 dias (WISE et al., 2013; GUIDI et al., 2015). Posteriormente ocorre liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, os quais irão invadir eritrócitos, se multiplicar formando quatro células filhas, apresentando morfologia de tétrede ou “cruz de malta”, podendo também formar gametócitos no sangue periférico dos equinos (UILENBERG, 2006). O período de incubação deste parasito no hospedeiro ainda não está determinado (WISE et al., 2013).

Merozoítos e/ou gametócitos circulantes no sangue do equino infectado serão ingeridos posteriormente por um carrapato não infectado, durante o repasto sanguíneo. No organismo do carrapato, os gametócitos se diferenciarão em gametas, que através da reprodução sexuada se fundirão originando o zigoto, dentro do intestino médio do carrapato. Este processo de formação do zigoto pode ser variável dependendo da espécie de carrapato. Após 6 à 24 dias, esporozoítos estarão presentes na glândula salivar do carrapato (WISE et al., 2013).

Equinos com infecção aguda de *Theileria equi* podem se tornar subclínicos e apresentar-se como portadores, com parasitemia variando de 10^3 a 10^6 / ml de sangue. Fato que torna estes animais reservatórios para a transmissão por via iatrogênica (compartilhamento de agulhas entre animais positivos e negativos), transfusão sanguínea (doador é um cavalo cronicamente infectado), contaminação de instrumentos cirúrgicos e vetorial (carrapato) (UETI et al., 2012).

Apesar da patogênese na piroplasmose equina ter pontos obscuros, a infecção por *T. equi* irá causar a lise de eritrócitos, provocando graus variados de anemia hemolítica, devido à ruptura mecânica das hemácias com a liberação dos merozoítos intravascular. Além disso, eritrócitos parasitados sofrem fagocitose por macrófagos esplênicos, resultando numa anemia hemolítica extravascular. Sabe-se que o processo de invasão dos esporozoítos de *T. equi* nas

hemácias e o estresse oxidativo provocado pelo sistema imune do hospedeiro, alteram a estrutura bioquímica destas células, causando deformidades e incapacidade na maleabilidade da membrana (KUMAR et al., 2012; RADAKOVIC et al., 2016; SUMBRIA et al., 2016).

Alteração na coagulação sanguínea por mecanismos desconhecidos, porém com prolongação do tempo de coagulação, sugerindo-se que a trombocitopenia imunomediada, o sequestro esplênico e/ou o consumo de plaquetas contribuam para uma coagulação intravascular disseminada. Quadros clínicos graves de piroplasmose equina podem causar hipercoagulabilidade (WISE et al., 2013) e miopatias, devido a uma resposta inflamatória sistêmica (PASOLINI et al., 2018).

Relatos de transmissão transplacentária em éguas transportadoras infectadas cronicamente para os fetos têm sido relatados em todo o mundo, provocando abortamentos, natimortos ou infecção neonatal, mesmo em placentas histologicamente normais (SANT et al., 2016). A prevalência da transmissão placentária pode estar relacionada à genética individual do cavalo ou isolamento geográfico (WISE et al., 2013).

Acredita-se que a infecção subclínica persistente de *T. equi* seja resultado do sequestro do organismo em capilares, sistema nervoso central e medula óssea, e uma estratégia de evasão do sistema imune, porém o mecanismo de latência permanece desconhecido (RIBEIRO et al., 2013).

Os sinais clínicos da infecção por *T. equi* se desenvolvem de 12 a 19 dias, e estes estão diretamente relacionados à parasitemia e imunidade do hospedeiro, podendo se apresentar de diferentes formas (WISE et al., 2013). Na infecção aguda, geralmente os animais vão apresentar anemia hemolítica e sinais clínicos inespecíficos como febre (40°C), anorexia, perda de peso, edema de membros periféricos e petéquias em mucosas (relacionada à trombocitopenia) (SUDAM et al., 2015; MAHMOUD et al., 2016). Como resultado da anemia hemolítica, é possível visualizar mucosas ictéricas, taquicardia, taquipnéia, fraqueza, hipofosfatemia, hiperbilirrubinemia, hemoglobinúria e/ou bilirrubinúria (PASOLINI et al., 2018). Alguns equinos podem apresentar alterações sistêmicas como: cólicas intestinais, diarreia, pneumonia, edema pulmonar, arritmias cardíacas, enterite catarral, laminite, e alterações neurológicas (ataxia, mialgia e convulsões) (WISE et al., 2013). Além disso, é possível observar insuficiência renal aguda, insuficiência hepática e coagulação intravascular disseminada (CID) em consequência da hemoglobinúria e/ou bilirrubinúria, bem como da redução do fluxo sanguíneo renal (RADAKOVIC et al., 2016; SUMBRIA et al., 2016).

A introdução de equinos sadios em áreas endêmicas é o principal fator para a morte rápida por infecção de *T. equi* (UILENBERG, 2006). Além disso, neonatos podem apresentar

sinais clínicos agudos e graves, e quando não há evolução para o óbito, os animais recém-nascidos apresentam sinais clínicos de fraqueza, redução da amamentação, icterícia, febre e anemia (podendo ou não ter petéquias e/ou hemoglobinúria) (GEORGIS et al., 2011; WISE et al., 2013).

Na infecção crônica por *T. equi*, os animais apresentam sinais inespecíficos, como: letargia, moderada anorexia, perda de peso, atrofia muscular e perda da performance. Além disso, é possível observar uma discreta anemia e esplenomegalia, devido à hemólise extravascular (PASOLINI et al., 2018). Em geral, *T. equi* é considerado mais patogênico quando comparado a *B. caballi*, uma vez que, mesmo após o tratamento, o animal torna-se persistentemente infectado (SCHEIN, 1988).

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com doenças (anemia infecciosa equina, arterite viral equina, erliquiose equina, púrpura hemorrágica e anemia hemolítica imunomediada) que apresentem sinais clínicos inespecíficos, como ocorre para a piroplasmose equina na fase subclínica (WISE et al., 2013).

2.7 Análises filogenéticas de Piroplasmida com enfoque em *Theileria equi*

A identificação de um Piroplasmida é, na maioria das vezes, baseada em morfologia e biologia. Porém, estes métodos são considerados de utilidade limitada, visto que existem apicomplexos estreitamente relacionados (GRAY, 2006). *Babesia* e *Theileria*, por exemplo, têm muitas diferenças biológicas no hospedeiro vertebrado e no ixodídeo vetor, aspectos estes bem revisados por Uilenberg (2006). Embora estas tenham sido as ferramentas exclusivamente utilizadas no passado para diferenciar *Theileria* e *Babesia*, além de distinguir suas diferentes espécies, existem algumas exceções às regras biológicas e morfológicas.

De acordo com Schnittger et al. (2012) existe um terceiro grupo, além de *Theileria* e *Babesia*, referido como *Babesia sensu latu (s.l.)*, originalmente representado pelos Piroplasmídeos que não poderiam ser atribuídos inequivocamente a nenhum dos dois grupos. Os representantes mais bem estudados são *Theileria (Babesia) equi* e *Babesia microti*. Estas espécies foram membros questionados dentro do gênero *Babesia*, pela presença de esquizogonia pré-eritrocítica (SCHEIN et al., 1981; MEHLHORN & SCHEIN, 1984). *Babesia equi* hoje é mais aceita como *Theileria equi*. No caso de *Babesia microti*, os estudos ainda não chegaram a uma conclusão.

Portanto, as análises filogenéticas possuem a finalidade, nestes casos, de contribuir como mais uma ferramenta na avaliação taxonômica das espécies de Piroplasmida, sendo de fundamental importância em estudos taxonômicos e na separação de genótipos.

2.7.1 Baseado no marcador molecular *18S rRNA*

A análise filogenética das sequências de *18S rDNA* de Piroplasmida revelou que *Babesia* e *Theileria* são grupos polifiléticos, com divergência evolutiva de 14,62%, e que *Cytauxzoon* está inserido no clado de *Theileria* spp. (LACK et al., 2012). Neste mesmo estudo, os autores observaram que os Piroplasmidas estavam divididos em quatro clados, sendo um indivíduo adicional inconclusivo e não resolvido: *Theileria bicornis*. A maioria das espécies de *Theileria* foram alocadas no clado III apresentando 4,62% de divergência entre pares e sendo considerados estritamente relacionados. Associado à biologia deste theilerídeos de ungulados, eles representam os “verdadeiros integrantes” do gênero (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; REICHARD et al., 2005; ALLSOPP: ALLSOPP, 2006). O clado II consistiu de uma única espécie de *Theileria*, *T. equi* / *B. equi*, organismo no qual as características que distinguem *Theileria* de *Babesia* se tornaram conflitantes. Lack et al. (2012) sugerem que *T. equi* distingue-se geneticamente de *Theileria* e de *Babesia*, com distância evolutiva de 9,5% e 15,71%, respectivamente. Porém ressalta que a posição de *T. equi* dentro deste clado não foi estatisticamente bem suportada para nenhum método de análise filogenética realizado. Mesmo sem dados sólidos, diversos estudos sugerem que *T. equi* merece distinção genética (ALLSOPP et al., 1994; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; REICHARD et al., 2005; LACK et al., 2012; SCHNITTGER et al., 2012).

Schnittger et al. (2012) finaliza seu estudo, baseado no marcador *18S rRNA*, afirmando que *T. equi* e *B. bicornis* são um grupo monofilético, fortemente suportados estatisticamente.

2.7.2 Baseado em diferentes marcadores moleculares

Embora o gene *18S rRNA* venha sendo utilizado como principal marcador molecular para elucidar as relações filogenéticas dos parasitos Piroplasmidas, outros genes também são úteis para este fim. Análises filogenéticas com espécies de *Babesia* foram realizadas utilizando o gene *hsp70* (RUEF et al., 2000) e mais recentemente, outra análise com o mesmo alvo incluiu também espécies de *Theileria* (SCHNITTGER et al., 2012). Os dados da análise filogenética de Schnittger et al. (2012) utilizando o *hsp70*, concorda com a maioria dos

resultados utilizando o alvo no *18S rRNA* pelo mesmo autor, exceto por *Babesia ovis* não se comportar como irmã de *B. bovis*. Nas análises de *hsp70*, *T. equi* distingue-se das “theilérias verdadeiras” da mesma forma que para o *18S rRNA*. A grande desvantagem da utilização deste alvo é a falta de disponibilidade de sequências, principalmente pelos Piroplasmidas dos clados II e III, segundo Schnittger et al. (2012).

A região intergênica (ITS) exibe uma variabilidade significativamente maior do que o marcador *18S rRNA* (COLLINS & ALLSOPP, 1999). A ITS apresenta um poder de resolução mais alta em sequências com distâncias evolutivas menores em comparação ao *18S rRNA*, sendo um bom marcador inclusive para separar diferentes isolados (SCHMID et al., 2008). Portanto, o marcador ITS não deve ser utilizado para construir uma “árvore de espécies”, sendo considerado muito variável para estudar as relações entre espécies evolutivamente distantes.

Os genes mitocondriais do Citocromo b (*cob*) e Citocromo c subunidade I (*cox1*) também podem ser utilizados para distinguir os Piroplasmídeos (CRIADO et al., 2006; HIKOSAKA et al., 2010). No estudo realizado por Hikosaka et al. (2010), as sequências de aminoácidos de *cob* e *cox1* foram concatenadas e após análise filogenética não foi possível concluir a posição taxonômica de *T. equi*. Embora estes alvos não tenham sido úteis na avaliação de *T. equi*, a variação da sequência do gene do citocromo b é maior que a do marcador *18S rRNA*, uma vantagem em comparações ao nível da espécie ou abaixo do mesmo (CRIADO et al., 2006).

Por último, após análise genômica comparativa de *T. equi* utilizando sequências de aminoácidos deduzidas de 150 genes de *T. equi* e oito genomas de Apicomplexa completamente sequenciados, Kappmeyer et al. (2012) revelaram que o posicionamento filogenético de *T. equi* é um táxon irmão de *Theileria* spp (Figura 1).

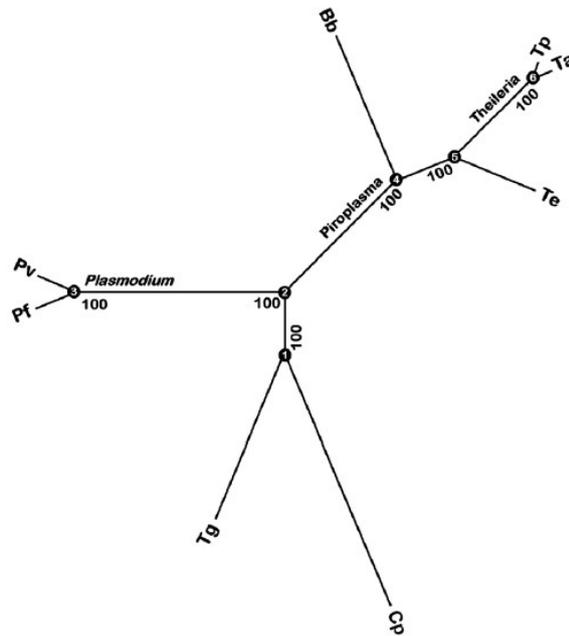


Figura 1. Árvore filogenética de protozoários do Filo Apicomplexa com genomas completamente sequenciados segundo Kappmeyer et al. (2012). Pf (*Plasmodium falciparum*), Pv (*Plasmodium vivax*), Tg (*Toxoplasma gondii*), Cp (*Cryptosporidium parvum*), Bb (*Babesia bovis*), Te (*Theileria equi*), Tp (*Theileria parva*), Ta (*Theileria annulata*).

2.8 Caracterização molecular de *Theileria equi* no Brasil e no mundo

O advento das técnicas moleculares tornou possível a caracterização molecular das diferentes espécies de piroplasmas. A sequência *18S rRNA* é uma região altamente conservada no genoma sendo uma das mais utilizadas em estudos filogenéticos de organismos eucariotos e um importante alvo para a reação em cadeia da polimerase (PCR) na triagem ambiental (MEYER et al., 2010). Além disso, ao utilizar sequências do gene *18S rRNA* em uma análise de agrupamento genético pode-se realizar estudos de biodiversidade, obter melhores informações sobre a heterogeneidade genética, comparando sequências provenientes de diferentes regiões em um determinado país (HADZIAVDIC et al., 2014; LIU et al., 2016). A sequência *18S rRNA*, apesar de conservada, possui regiões consideradas hipervariáveis que são muito utilizadas em estudos filogenéticos. Esta heterogeneidade das regiões hipervariáveis pode ser observada dentre os diferentes isolados de *T. equi* do mundo (NAGORE et al., 2004; BHOORA et al., 2009).

Alguns estudos filogenéticos utilizando sequências do *18S rRNA* de *T. equi* de todo o mundo, agruparam os dados em três clados principais denominados I, II e III (BHOORA et

al., 2009; PECKLE et al., 2018). Outros, ao montar seu conjunto de dados do marcador *18S rRNA* de *T. equi*, encontraram cinco grupos distintos (QABLAN et al., 2013; LIU et al., 2016). Liu et al. (2016) de fato observaram cinco grupos, porém estes autores citam três grupos como principais ao analisar a região de ligação da sonda no marcador. Outros estudos observaram quatro grupos após agrupamento das sequências do *18S rRNA* de *T. equi* (A à D) (SALIM et al., 2010; HALL et al., 2013).

Essas diferenças de agrupamento podem ocorrer por diversos motivos. Dentre eles, podemos citar: a seleção de sequências nos bancos de dados, o tamanho destas sequências, os métodos de alinhamento e análise filogenética utilizados, dentre outros. Estudos que utilizam sequências completas ou próximas ao comprimento total do marcador, com métodos de alinhamento e filogenia mais robustos, são considerados mais acurados.

Em um estudo realizado por Peckle et al. (2018), observaram a presença de doze sequências distintas de *T. equi* baseando-se no *18S rRNA* de *T. equi* dentre 20 amostras sequenciadas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. O menor valor de identidade compartilhado dentro destas sequências foi de 95,8% e elas agruparam-se em dois clados, I e II. No Rio Grande do Sul, Vieira et al. (2017) incluíram nove amostras do *18S rRNA* de *T. equi* em uma análise filogenética baseada no métodos de Máxima Verossimilhança e estas sequências agruparam em três grupos principais, subdivididos em 9 clados. Todas as sequências do Rio Grande do Sul, Brasil, apresentaram 99-100% de similaridade com as sequências do Texas e bordas do México, EUA. Em outro estudo desenvolvido no Brasil, na Ilha de São Luís, estado do Maranhão, Braga et al. (2017) observaram na análise filogenética a formação de três grupos principais, subdivididos em 8 clados (A-H), estando as sete sequências de *18S rRNA* de *T. equi* agrupadas nos grupos 1 e 3.

No mundo, estudos demonstraram que isolados distintos de *T. equi* coexistem nas mesmas regiões geográficas. Na África do Sul, por exemplo, foram observadas oito sequências heterogêneas do gene *18S rRNA* de *T. equi* em equídeos (BHOORA et al., 2009), com 96,1% de identidade mínima com outras sequências da África do Sul depositadas no Genbank. Os mesmos autores encontraram mais 13 novas sequências de *T. equi* em zebras no ano seguinte (BHOORA et al., 2010). No Sudão e na Jordânia, onze e dez sequências distintas do *18S rRNA* de *T. equi* foram observadas, respectivamente (SALIM et al., 2010; QABLAN et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição dos Locais de Estudo

O estudo foi realizado utilizando amostras de sangue de equinos das cinco regiões brasileiras (Norte, Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul) buscando uma verdadeira representatividade do Brasil, sendo selecionado um estado e um município em cada região (Figura 2). Os locais escolhidos para coleta de amostras de sangue dos equinos foram selecionados por conveniência não probabilística. Além disso, dentro de cada região foi selecionado um estado de destaque populacional, econômico e de relevância nacional. Conseqüentemente, os municípios selecionados também eram de grande importância, conferindo um grande peso nessa representatividade nacional.

A seleção de animais não seguiu nenhum critério, sendo considerados animais de ambos os sexos, de todas as faixas etárias e de diferentes raças. As coletas em cada região foram realizadas por conveniência, logo as amostras foram obtidas de equinos que desenvolviam diferentes funções em fazendas, sítios, haras, ou até mesmo em cavalos carroceiros.

As classificações climáticas a seguir foram estabelecidas de acordo com a Köppen e Geiger (CLIMATE, 2017).

Coordenadas geográficas:

- Região Norte (N):

Estado do Tocantins - Município de Araguaína (07° 11' 27'' latitude Sul; 48° 12' 25'' longitude Oeste; altitude: 22 metros ao nível do mar). Clima tropical - Aw, invernos secos e verões chuvosos, temperatura média anual de 26.0 °C e pluviosidade de 1828 mm.

- Região Nordeste (NE):

Estado da Bahia - Município de Salvador (12° 58' 13'' latitude Sul; 38° 30' 45'' longitude Oeste; altitude: 12 metros ao nível do mar). Clima tropical - Af, clima úmido ou superúmido, sem estação seca, temperatura média anual de 25.2 °C e pluviosidade de 1781 mm.

- Região Centro-Oeste (CO):

Estado do Distrito Federal - Município de Brasília (15° 46' 48'' latitude Sul; 47° 55' 45'' longitude Oeste; altitude: 1.130 metros ao nível do mar). Clima tropical - Aw, invernos secos e verões chuvosos, temperatura média anual de 21.1 °C e pluviosidade de 1668 mm.

- Região Sudeste (SE):

Estado do Rio de Janeiro - Município do Rio de Janeiro (22° 54' 13'' latitude Sul; 43° 12' 35'' longitude Oeste; altitude: 20 metros ao nível do mar). Clima tropical - Am, clima úmido ou subúmido com estação seca curta, temperatura média anual de 23.2 °C e pluviosidade de 1278 mm.

- Região Sul (S):

Estado do Rio Grande do Sul - Município de Porto Alegre (30° 01' 40'' latitude Sul; 51° 13'43'' longitude Oeste; altitude: 22 metros ao nível do mar). Clima subtropical - Cfa, com verões quentes, temperatura média anual de 19.5 °C e pluviosidade de 1397 mm.

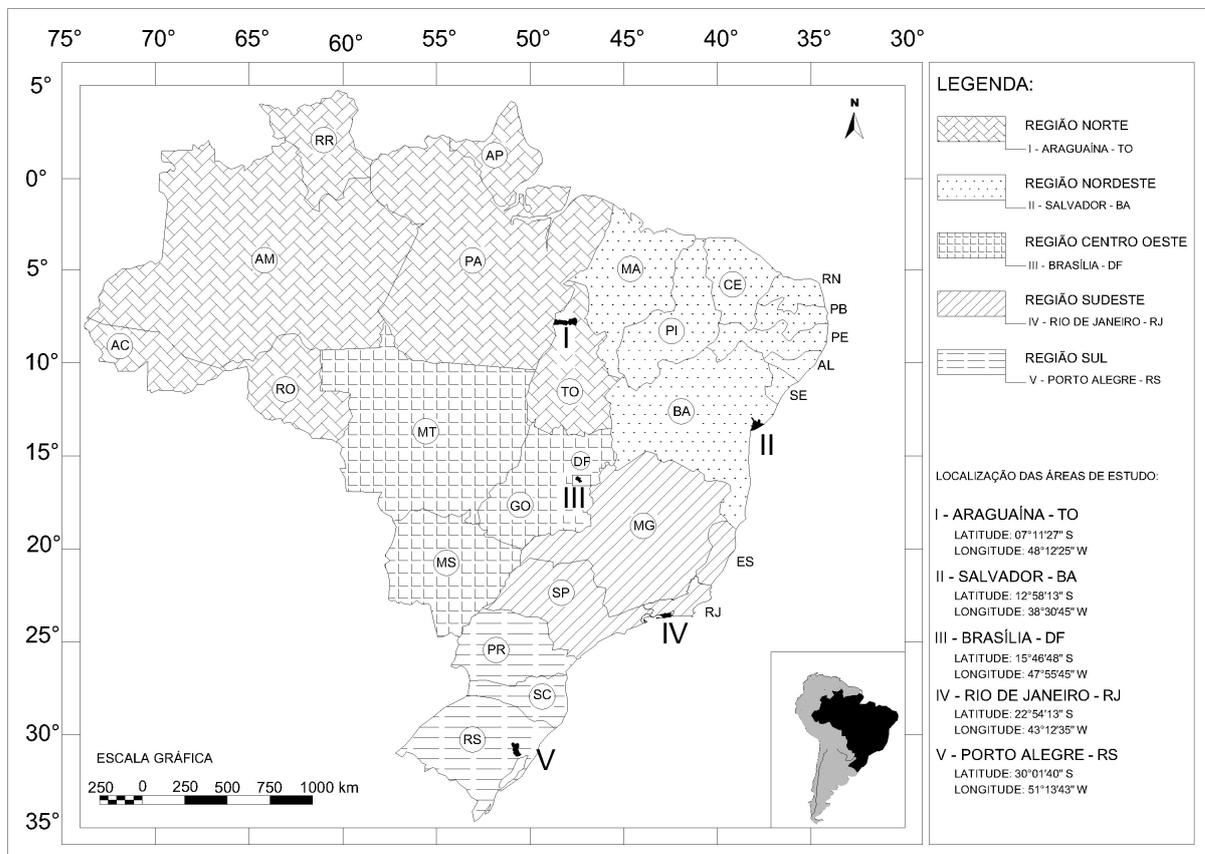


Figura 2. Mapa do Brasil destacando as diferentes regiões geográficas, estados e municípios de coleta.

3.2 Coleta e Envio de Amostras

As coletas de sangue foram realizadas em diferentes locais, por conveniência, nas regiões de estudo. A partir do consentimento dos proprietários, uma amostra de 5 mL de sangue foi coletada de cada equino, através de venopunção da jugular em tubos a vácuo, estéreis contendo ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) à 10%. Foram coletadas aproximadamente 50 amostras em cada região e, após a coleta, esses tubos foram devidamente identificados e acondicionados em recipiente térmico refrigerado até a chegada ao laboratório.

Todas as amostras de sangue foram mantidas a -20°C, até o momento de serem encaminhadas ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz (E.E.P.P. W.O. Neitz), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foram recebidas e manipuladas. Os tubos foram organizados, separados por região e mantidos a -80°C até o momento da extração de DNA. As amostras foram extraídas e testadas aos poucos, em baterias de 15 amostras, para evitar o desperdício de reagentes e materiais.

O uso dos animais envolvidos no trabalho foi previamente aprovado pelo CEUA/IV/UFRRJ (Comissão de Ética do Uso de Animais, Instituto de Veterinária), processo número 003/2014 (Anexo I). Todas as coletas foram realizadas por médicos veterinários com experiência na manipulação de animais.

3.3 Extração de DNA total

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada utilizando Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Esta etapa foi realizada a partir de 100 µL de cada amostra de sangue. Ao final, as amostras de DNA obtidas foram ressuspendidas em 100µL de Tampão AE (do próprio kit), e quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA). As amostras de DNA foram separadas em alíquotas, de forma que cada uma sofresse degelo poucas vezes, garantindo a integridade do DNA e a confiabilidade da técnica, e armazenadas a -80°C até o momento da utilização.

Tanto a extração de DNA, quanto o preparo das reações e a pipetagem das amostras foram realizadas em ambientes separados, evitando a ocorrência de contaminação. Além disso, ponteiras com filtro foram utilizadas em todas as etapas do estudo.

3.4 Detecção Molecular de *Theileria equi* utilizando a PCR em tempo real

A detecção molecular de *T. equi* foi realizada por meio do sistema TaqMan® de PCR em tempo real (qPCR) empregando os iniciadores, protocolo e condições de termociclagem segundo Kim et al. (2008). Para amplificação do fragmento de 85pb de DNA do gene *18S rRNA* foi utilizado um par de “primers” (oligonucleotídeos iniciadores): Be18SF (5'-GCGGTGTTTCGGTGATTCATA-3') e Be18SR (5'-TGATAGGTCAGAACTTGAA TGATACATC-3'), e uma sonda de hidrólise denominada Be18SP (5'-AAATTAGC GAATCGCATGGCTT-3'), marcada na extremidade 5' com um “Reporter Dye” 6-carboxyfluoresceína (FAM) e na extremidade 3' com o “Quencher Dye” 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA).

As reações foram realizadas em volume final de 20µL, no equipamento StepOne Plus® (Applied Biosystems), sendo compostas por: 1X de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 450nM de cada “primer” (Be18SF e Be18SR), 250nM da sonda (Be18SP) e 5µL de DNA total.

As condições de termociclagem foram: ciclo inicial de 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, e 45 ciclos a 95 °C por 20 segundos, seguidos de 55 °C por 1 minuto (KIM et al., 2008). As amostras com *Cq* (“quantification cycle”) inferior ou igual a 40 ciclos foram consideradas positivas e as amostras que apresentaram menor *Cq* foram selecionadas para a amplificação do gene e sequenciamento. Esta primeira etapa funcionou como uma triagem das amostras positivas.

Em cada placa da qPCR foram adicionados dois controles positivos e dois controles negativos, sendo o controle negativo composto por água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®) e para o controle positivo utilizou-se DNA de uma amostra de sangue de equino cronicamente infectado com a cepa Jaboticabal de *T. equi*. Quanto ao limite de detecção da técnica e a sensibilidade analítica, ambos foram verificados em estudo anterior realizado por Peckle et al. (2013).

3.5 Amplificação do gene *18S rRNA* de *Theileria equi* através de PCR convencional

Para a amplificação do fragmento de 1.600pb de DNA do gene *18S rRNA*, quinze amostras de cada região do Brasil que apresentaram menor *Cq* na reação de qPCR foram selecionadas para que as cinco melhores fossem sequenciadas ao final. O gene completo foi

amplificado utilizando a técnica de PCR descrita por Bhoora et al. (2009), com algumas modificações. A reação utilizou um par de “primers”: NBabesia1F (5'-AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT-3') e 18SRev-TB (5'-GAATAATTCACCGGATCACTCG-3').

Na reação foi utilizado um volume final de 25µL, sendo: 1X Tampão, 4mM de MgCl₂, 0,4mM de cada dNTP, 0,4µM de cada “primer” (NBabesia1F e 18SRev-TB), 1,5U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase e 3µL de DNA, completando o volume com água ultrapura.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf®) programado para desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72 °C por 7 minutos.

As reações foram feitas separadamente por região. A PCR foi realizada em tubos de 0,2mL, contendo sempre além das amostras um controle positivo (cepa Jaboticabal de *T. equi*) e um negativo, água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®).

3.5.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos de DNA amplificados (*amplicons*) a partir da PCR foram posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Agarose NA – Amersham Biosciences) em tampão TAE 1x. Um volume de 10µL dos produtos de PCR homogeneizados em 1,5µL de tampão de amostra foi inoculado em cada poço do gel. Como marcador de massa molecular, foi empregado o 100bp Plus DNA Ladder™ (Invitrogen®).

As eletroforeses foram conduzidas em cuba horizontal programada para corrida a 100 V (5V/cm), durante 60 minutos. Após as corridas, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4 µg/mL) e os produtos amplificados visualizados e fotografados sob a luz ultravioleta em transiluminador de UV (Electronic UV Transilluminator, L-PIX TOUCH).

3.5.2 Purificação do Produto da PCR

Após a confirmação da amplificação dos produtos no gel de agarose, as cinco amostras de cada região do Brasil que apresentaram uma banda mais expressiva no gel foram selecionadas para o sequenciamento.

Para isso uma nova reação de PCR segundo Bhoora et al. (2009) foi realizada, dessa vez em duplicata e com um volume final de 50 μ L. Todas as concentrações foram mantidas proporcionalmente na reação, bem como todo o programa de termociclagem que foi conservado.

Os *amplicons* resultantes foram submetidos ao processo de purificação com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, Madison, WI, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação dos produtos purificados pode ser estimada em gel de agarose a 2%, onde um volume de 5 μ L dos produtos purificados foram homogeneizados em 1,5 μ L de tampão de amostra. Como escala de massa molecular foi utilizado 4 μ L de Low DNA Mass™ Ladder (Invitrogen®).

3.6 Sequenciamento das Amostras

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método Sanger (SANGER et al., 1977) utilizando três pares de “primers” descritos no estudo de Bhoora et al. (2009): NBabesia1F e BT18S3R (CCTCTGACAGTTAAATACGAATGCCC), amplificou a parte final do segmento 5’; BT18S3F (GGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGG) e 18SRev-TB, amplificando a parte final do segmento 3’; BT18S2F (GGGTTCGATTCCGGAGAGGG) e BT18S2R (CCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCG) amplificando a parte interna do gene.

O sequenciamento foi realizado em dois locais distintos. Uma parte foi enviada ao Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL, USP) e outra parte foi sequenciada no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular da UFRRJ.

3.7 Análises do Sequenciamento

A qualidade dos cromatogramas obtidos no sequenciamento foi avaliada utilizando o programa BioEdit v7.2.6.1, e em seguida foi realizada a montagem das sequências para obter os *contigs* utilizando o programa CLC Genomics WorkBench v5.1. Uma avaliação de similaridade do gene *18S rRNA* com sequências de nucleotídeos de *T. equi* disponíveis no GenBank foi realizada utilizando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), e as novas sequências do estudo foram depositadas no GenBank.

As novas sequências do gene *18S rRNA* obtidas neste estudo foram alinhadas, utilizando o software *Clustal W* (1.6), ajustado manualmente para um conjunto de sequências do mesmo

comprimento, de 1409pb. Este conjunto de dados foi analisado e algumas anotações foram realizadas em relação as regiões mais variáveis dentre essas sequências das cinco regiões do Brasil. Baseado nos trabalhos de Bhoora et al. (2009) e Hadziavdic et al. (2014) foi possível identificar as regiões hipervariáveis. Para entender o grau de variação da sequência *18S rRNA* de *T. equi* foi realizada uma análise da entropia dos nucleotídeos das sequências alinhadas desse gene, sendo calculada pelo software BioEdit versão 7.0.9.0. A matriz de distância de nucleotídeos divergentes foi calculada pelo CLC Main Workbench v5.1, enquanto a diferença de pares de bases entre as novas sequências do presente estudo e a sequência utilizada como referência de *T. equi* (ID: Z15105) foi estimada usando o programa Mega 7.

Algumas análises filogenéticas, considerando o gene *18S rRNA* de *T. equi*, foram realizadas utilizando sequências deste parasito provenientes de amostras de todo o mundo disponíveis no GenBank. Toda a reconstrução filogenética foi inferida utilizando o método da Máxima Verossimilhança (Maximum likelihood – ML). O modelo utilizado para calcular a distância evolutiva foi selecionado através do *software* jModelTest 2.1.10 (DARRIBA et al., 2015), sendo o melhor modelo evolutivo o General Time Reversible Model (GTR). A confiança dos ramos das árvores foi avaliada pelo teste de Bootstrap com 1000 réplicas. Estas análises foram realizadas com o auxílio do programa Mega 7. Além disso, as sequências deste estudo com 100% de identidade e que pertencem a mesma região foram retiradas das análises.

Primeiramente, uma análise filogenética foi realizada utilizando apenas sequências do Brasil do gene *18S rRNA* de *T. equi* disponíveis no GenBank, que incluíam 13 sequências do estado do Mato Grosso do Sul, 12 sequências do Rio de Janeiro e 6 sequências do Rio Grande do Sul (Tabela 1), além das sequências deste estudo e 3 outras sequências como “outgrup”, *Theileria bicornis* (AF499604) e *Babesia caballi* (Z15104 e AY309955). Assim como foi feito com as sequências deste estudo, todas as sequências com 100% de identidade e que pertencem ao mesmo estado foram retiradas da análise. Todo esse grupo de sequências foi alinhado, alguns ajustes foram feitos manualmente e com isso um conjunto de dados de comprimento de 1.526 nucleotídeos foi analisado.

Tabela 1. Relação das sequências do gene *18S rRNA* de *Theileria equi* que foram utilizadas nas análises filogenéticas de acordo com o país de origem e código de acesso do GenBank.

País	GenBank	País	GenBank
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464019	Estados Unidos	JX177673
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464020	África do Sul	EU888903
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464021	África do Sul	EU888905
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464022	África do Sul	EU642507
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464023	África do Sul	EU642508
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464024	África do Sul	EU642510
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464025	África do Sul	EU642511
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464026	Sudão	AB515307
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464028	Sudão	AB515309
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464029	Sudão	AB515312
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464032	Sudão	AB515313
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464033	Sudão	AB515315
Brasil - Mato Grosso do Sul	KY464035	Quênia	KF597074
Brasil - Rio de Janeiro	KJ573370	Quênia	KF597076
Brasil - Rio de Janeiro	KJ573371	África do Sul	Z15105
Brasil - Rio de Janeiro	KJ573373	Suíça	KM046918
Brasil - Rio de Janeiro	KX722511	Suíça	KM046919
Brasil - Rio de Janeiro	KX722512	Suíça	KM046920
Brasil - Rio de Janeiro	KX722513	Suíça	KM046921
Brasil - Rio de Janeiro	KX722517	Suíça	KM046922
Brasil - Rio de Janeiro	KX722519	Espanha	AY150062
Brasil - Rio de Janeiro	KX722520	Espanha	AY150063
Brasil - Rio de Janeiro	KX722521	Espanha	AY150064
Brasil - Rio de Janeiro	KX722523	Espanha	DQ287951
Brasil - Rio de Janeiro	KX722525	Espanha	AY534882
Brasil - Rio Grande do Sul	KU240064	Israel	KX227619
Brasil - Rio Grande do Sul	KU240065	Israel	KX227623
Brasil - Rio Grande do Sul	KU240066	Israel	KX227629
Brasil - Rio Grande do Sul	KU240068	Israel	KX227630
Brasil - Rio Grande do Sul	KU240069	Israel	KX227641
Brasil - Rio Grande do Sul	KU240072	Índia	KP995259
México	JQ390047	Coréia do Sul	KM819520
Estados Unidos	JX177670	Coréia do Sul	HM229407
Estados Unidos	JX177671	Coréia do Sul	HM229408
Estados Unidos	JX177672	China	KF559357

Outra análise filogenética foi realizada levando em consideração o gene *18S rRNA* de diferentes espécies dos gêneros *Theileria* e *Babesia*. Foram utilizadas 11 sequências distintas do gênero *Theileria*, 16 sequências distintas do gênero *Babesia* (Tabela 2), as sequências

deste estudo, além de duas sequências do filo Apicomplexa como “outgroups”, *Plasmodium juxtannucleare* (AF463507) e *Toxoplasma gondii* (L37415). Esse conjunto de dados foi alinhado, ajustado manualmente e a análise foi realizada sobre um conjunto de sequências com 1.775 nucleotídeos.

Por fim, uma análise filogenética global do gene *18S rRNA* de *T. equi* foi realizada utilizando sequências deste parasito provenientes de amostras de todo o mundo disponíveis no GenBank. Além das sequências deste estudo, mais 31 sequências de *T. equi* do Brasil foram utilizadas e 39 sequências de diferentes países (Tabela 1): sendo 5 do continente Americano, 10 do continente Europeu, 14 do continente Africano e 10 do continente Asiático. Como “outgroup” foram utilizadas sequências de *Babesia caballi* (Z15104 e AY309955) e *Theileria bicornis* (AF499604). Todas as sequências foram alinhadas, ajustadas e um conjunto de dados de comprimento de 1.497 nucleotídeos foi analisado.

Tabela 2. Relação das sequências do gene *18S rRNA* das espécies de *Babesia* e *Theileria* que foram utilizadas na análise filogenética e o código de acesso do GenBank.

Espécie	GenBank	Espécie	GenBank
<i>Babesia equi</i> - África do Sul	Z15105	<i>Babesia canis</i>	AY272047
<i>Babesia equi</i> - Espanha	AY150062	<i>Babesia ovata</i>	AY603401
<i>Babesia equi</i> - Espanha	AY150063	<i>Babesia capreoli</i>	GQ304526
<i>Theileria equi</i> - México	JQ390047	<i>Babesia microti</i>	U09833
<i>Theileria equi</i> - África do Sul	EU642507	<i>Theileria sp. China</i>	AF081136
<i>Babesia caballi</i>	AY309955	<i>Theileria orientalis</i>	HM538200
<i>Babesia caballi</i>	Z15104	<i>Theileria mutans</i>	KU206313
<i>Babesia bicornis</i>	AF419313	<i>Theileria uilenbergi</i>	KJ188222
<i>Babesia bennetti</i>	DQ402155	<i>Babesia ovis</i>	AY150058
<i>Theileria bicornis</i>	AF499604	<i>Babesia bovis</i>	L19077
<i>Theileria lestoquardi</i>	AF081135	<i>Babesia gibsoni</i>	AY278443
<i>Theileria annulata</i>	M64243	<i>Babesia divergens</i>	Z48751
<i>Theileria parva</i>	AF013418	<i>Babesia bigemina</i>	X59605
<i>Theileria velifera</i>	AF097993		

4 RESULTADOS

4.1 Detecção molecular de *Theileria equi* e seleção das amostras

As amostras de sangue dos equinos respectivas a cada região brasileira foram testadas na qPCR para amplificação de um fragmento de 85pb do gene *18S rRNA* de *T. equi* (Figura 3).

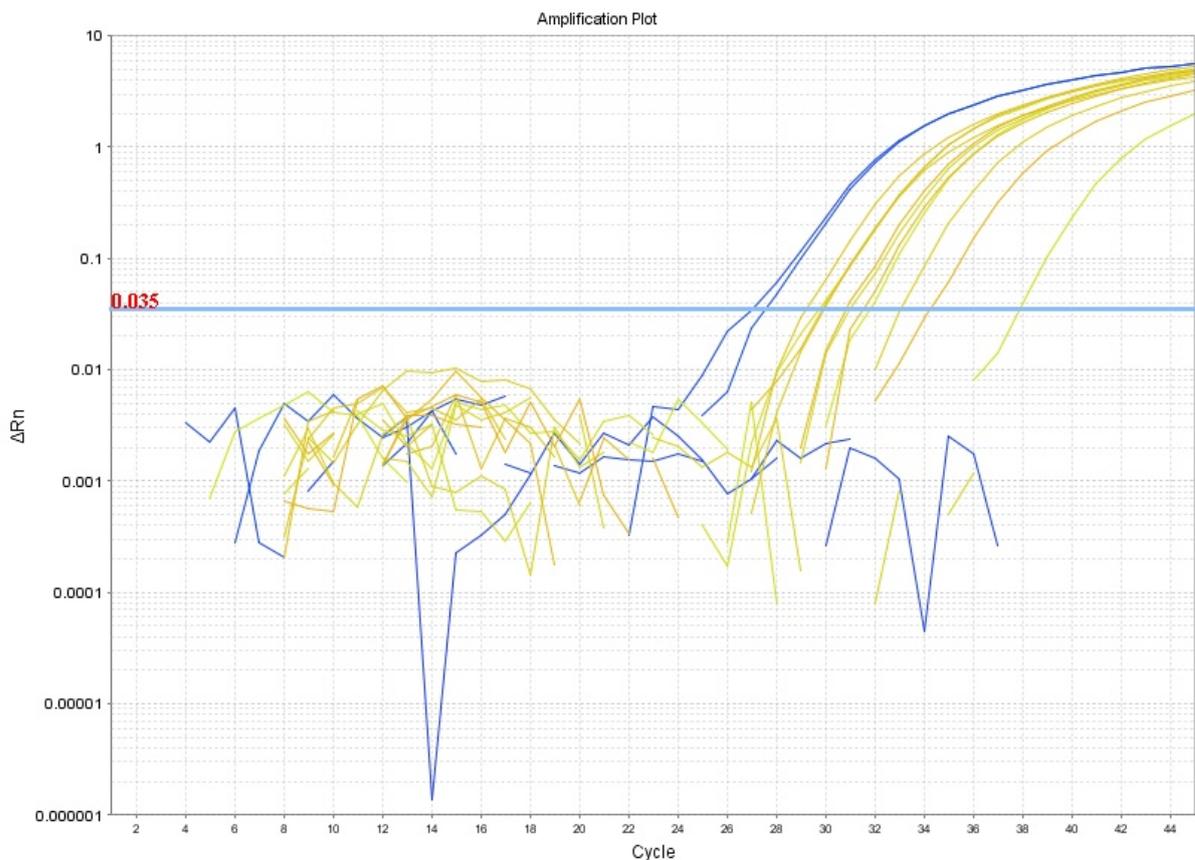


Figura 3. Gráfico de amplificação de um fragmento de 85pb do gene *18S rRNA* de *Theileria equi* obtidas na PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Curvas de amplificação na cor azul referem-se ao controle positivo, e em amarelo demonstram amostras consideradas positivas pela técnica.

Dessas amostras que apresentaram positividade na qPCR, as 15 amostras de cada região que apresentaram o menor Cq foram selecionadas para a PCR convencional, para amplificação do fragmento de 1.600 pb. Como este fragmento é bem mais extenso que o primeiro, nem todas as amostras positivas na qPCR apresentaram positividade na PCR convencional.

As amostras que amplificaram o gene *18S rRNA* na PCR convencional e apresentaram bandas com maior intensidade no gel (Figura 4) foram selecionadas para nova amplificação, purificação e posterior sequenciamento.

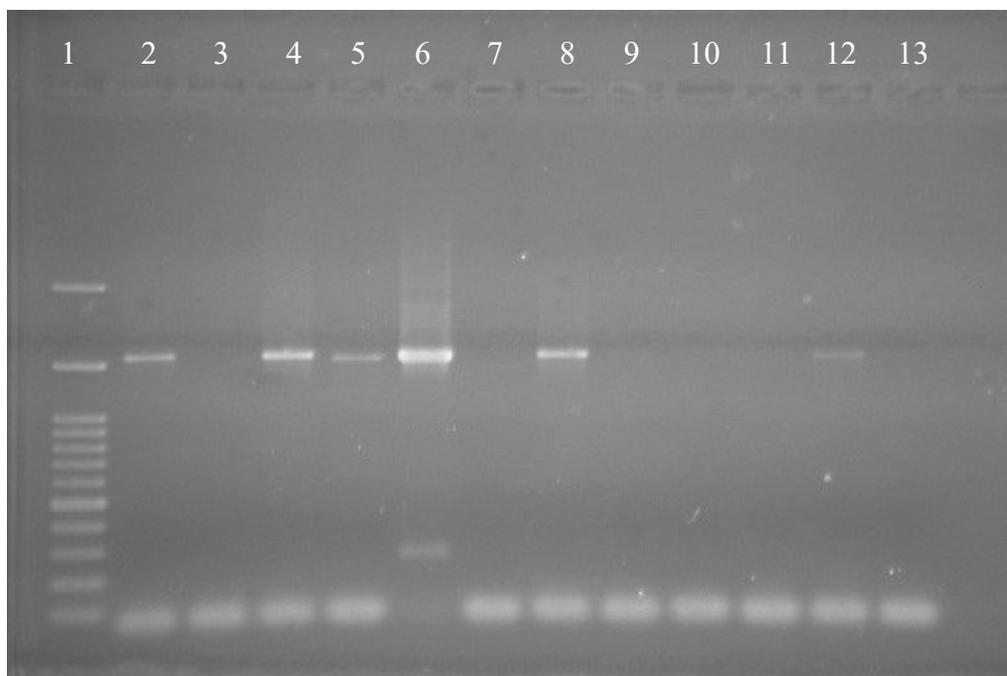


Figura 4. Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de 1.600pb do gene *18S rRNA* específico para *Theileria equi*. Poço: 1- Peso Molecular (*100bp Plus DNA Ladder*TM); 2- Controle positivo de *T. equi*; 3- Controle negativo; 4, 5, 6, 8, 12- amostras consideradas positivas para *T. equi*; 7, 9, 10, 11, 13: amostras consideradas negativas para *T. equi*.

As melhores amostras foram selecionadas e enviadas para o sequenciamento com os seis “primers” específicos para amplificação do gene *18S rRNA* de *T. equi*. Assim que os resultados do sequenciamento foram alcançados, os diferentes “contigs” foram montados, cada um com seu comprimento específico, e as 23 amostras deste estudo foram obtidas. Das 23 seqüências do estudo, 3 amostras pertenciam a região Norte, 5 amostras ao Nordeste, 5 amostras ao Centro-Oeste, 5 amostras ao Sudeste e 5 amostras a região Sul (Tabela 3). Todas essas foram consideradas como seqüências parciais do gene *18S rRNA* de *T. equi* e foram depositadas no GenBank sob números de acesso MG052895 a MG052917.

Todas as novas seqüências obtidas foram avaliadas por similaridade com seqüências do gene *18S rRNA* disponíveis no GenBank pela ferramenta BLAST, sendo possível afirmar que todas as amostras sequenciadas e manipuladas neste trabalho são de *T. equi*.

Tabela 3. Identificação das sequências deste estudo pela região do Brasil, estado e município de origem da amostra, tamanho do *contig* formado após o sequenciamento e código de acesso do GenBank.

Id da amostra	Estado	Município	Contig (pb)	GenBank
Brazil N1	Tocantins	Araguaína	1418	MG052895
Brazil N2	Tocantins	Araguaína	1464	MG052896
Brazil N3	Tocantins	Araguaína	1460	MG052897
Brazil NE1	Bahia	Salvador	1563	MG052898
Brazil NE2	Bahia	Salvador	1558	MG052899
Brazil NE3	Bahia	Salvador	1559	MG052900
Brazil NE4	Bahia	Salvador	1555	MG052901
Brazil NE5	Bahia	Salvador	1562	MG052902
Brazil MW1	Distrito Federal	Brasília	1449	MG052903
Brazil MW2	Distrito Federal	Brasília	1462	MG052904
Brazil MW3	Distrito Federal	Brasília	1453	MG052905
Brazil MW4	Distrito Federal	Brasília	1421	MG052906
Brazil MW5	Distrito Federal	Brasília	1418	MG052907
Brazil SE1	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	1449	MG052908
Brazil SE2	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	1409	MG052909
Brazil SE3	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	1405	MG052910
Brazil SE4	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	1424	MG052911
Brazil SE5	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	1431	MG052912
Brazil S1	Rio Grande do Sul	Porto Alegre	1461	MG052913
Brazil S2	Rio Grande do Sul	Porto Alegre	1417	MG052914
Brazil S3	Rio Grande do Sul	Porto Alegre	1404	MG052915
Brazil S4	Rio Grande do Sul	Porto Alegre	1405	MG052916
Brazil S5	Rio Grande do Sul	Porto Alegre	1407	MG052917

Id: Identificação; pb: pares de bases.

As amostras deste estudo foram alinhadas e padronizadas em um conjunto com comprimento de 1409 pb, tendo como referência a sequência de *T. equi* da África do Sul (ID: Z15105). Esta sequência de *T. equi* (ID: Z15105) é considerada a mais antiga e é utilizada por diversos autores como de referência. A partir desse conjunto de dados, pode-se observar que além de existirem algumas posições na sequência *18S rRNA* com polimorfismos pontuais (substituição, inserção ou deleção), existem ainda três regiões consideradas hipervariáveis. Tendo como base as anotações de Bhoora et al. (2009) e Hadziavdic et al. (2014), a região hipervariável V2 está contida entre as bases 63 e 75 (Tabela 4) com sete pontos que diferiram da sequência considerada como referência neste estudo. A região V4 é a mais hipervariável, encontra-se entre as bases 524 e 586 (Tabela 5) apresentando 22 pontos divergentes em

relação da sequência de *T. equi* da África do Sul. A região hipervariável V8 está localizada entre os nucleotídeos 1208 até o 1226 (Tabela 6) com 11 pontos de polimorfismo.

Tabela 4. Diferenças de nucleotídeos na região V2 do gene *18S rRNA* entre a sequência de referência de *Theileria equi* (ID: Z15105) e as amostras deste estudo.

Sequências	Posição dos Nucleotídeos						
	63	65	67	68	69	71	75
South África	C	C	G	G	C	G	A
Brazil N1	T	T	C	T	G	T	-
Brazil N2	T	T	C	T	G	T	-
Brazil N3	T	T	C	T	G	T	-
Brazil NE1	-	-	-	-	-	-	-
Brazil NE2	T	T	C	T	G	T	-
Brazil NE3	T	T	C	T	G	T	-
Brazil NE4	T	T	C	T	G	T	-
Brazil NE5	-	-	-	-	-	-	-
Brazil MW1	T	T	C	T	G	T	-
Brazil MW2	-	-	-	-	-	-	-
Brazil MW3	-	-	-	-	-	-	-
Brazil MW4	-	-	-	-	-	-	-
Brazil MW5	T	T	C	T	G	T	-
Brazil SE1	-	-	-	-	-	-	-
Brazil SE2	-	-	-	-	-	-	-
Brazil SE3	-	-	-	-	-	-	-
Brazil SE4	-	-	-	-	-	-	-
Brazil SE5	-	-	-	-	-	-	-
Brazil S1	T	T	C	T	G	T	-
Brazil S2	-	-	-	-	-	-	-
Brazil S3	-	-	-	-	-	-	-
Brazil S4	-	-	-	-	-	-	-
Brazil S5	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 5. Diferenças de nucleotídeos na região V4 do gene *18S rRNA* entre a sequência de referência de *Theileria equi* (ID: Z15105) e as amostras deste estudo.

Sequências	Posição dos Nucleotídeos																					
	524	530	531	534	536	538	542	544	550	551	558	559	566	573	574	576	577	578	579	580	583	586
South África	T	G	A	G	-	C	G	-	T	C	G	C	G	T	T	G	A	T	T	A	C	T
Brazil N1	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil N2	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil N3	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil NE1	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	T	T	A	-	-
Brazil NE2	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil NE3	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil NE4	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil NE5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	T	T	A	-	-
Brazil MW1	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil MW2	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	T	T	A	-	-
Brazil MW3	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	T	T	A	-	-
Brazil MW4	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil MW5	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil SE1	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil SE2	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil SE3	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil SE4	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	T	T	A	-	-
Brazil SE5	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil S1	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil S2	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	T	T	A	-	-
Brazil S3	A	A	T	T	T	-	A	A	G	T	A	T	-	C	A	-	-	-	-	-	T	G
Brazil S4	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	T	T	A	-	-
Brazil S5	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	T	T	A	-	-

Tabela 6. Diferenças de nucleotídeos na região V8 do gene *18S rRNA* entre a sequência de referência de *Theileria equi* (ID: Z15105) e as amostras deste estudo.

Sequências	Posição dos Nucleotídeos										
	1208	1209	1212	1215	1216	1217	1221	1222	1223	1224	1226
South África	G	A	C	G	G	T	A	T	T	T	C
Brazil N1	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil N2	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil N3	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil NE1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brazil NE2	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil NE3	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil NE4	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil NE5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brazil MW1	T	G	G	A	T	G	T	A	C	-	T
Brazil MW2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brazil MW3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brazil MW4	T	G	G	A	T	G	T	A	C	-	-
Brazil MW5	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil SE1	T	G	G	A	T	G	T	A	C	.	T
Brazil SE2	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil SE3	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil SE4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brazil SE5	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil S1	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brazil S3	T	G	G	A	T	G	T	A	C	A	T
Brazil S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brazil S5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Essas regiões hipervariáveis foram confirmadas pela análise de entropia das sequências (Figura 5), que mostrou alguns locais de alta entropia distribuídos ao longo de toda a sequência *18S rRNA*. Cabe ressaltar que quanto maior a entropia maior é a frequência de variação dos nucleotídeos em uma determinada posição. As três regiões hipervariáveis identificadas na sequência *18S rRNA* das amostras brasileiras de *T. equi* apresentaram um valor de entropia maior que 0,6 indicando uma alta probabilidade de variação genética nessas regiões.

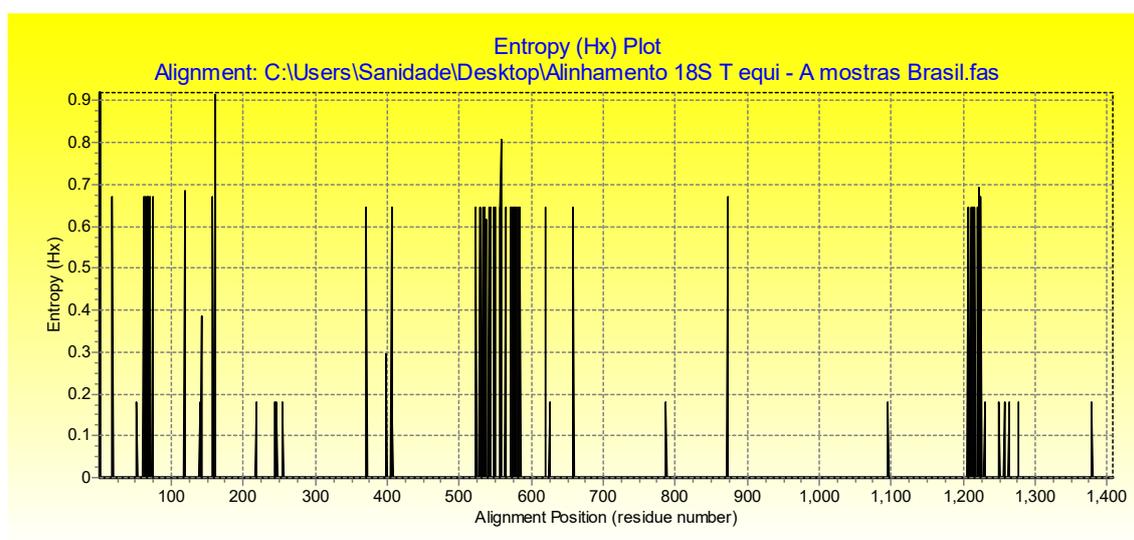


Figura 5. Entropia das sequências deste estudo do gene *18S rRNA* de *Theileria equi* com alinhamento ClustalW. O eixo X é a posição do nucleotídeo no gene, enquanto no eixo Y encontra-se o valor de entropia em cada posição.

Com a elaboração da matriz de similaridade e pela observação do número de nucleotídeos díspares entre as sequências (Figura 6), pode-se afirmar que existem 2 grupos de sequências totalmente idênticas entre si. O primeiro grupo que apresentou 100% de identidade entre si, sem nenhum nucleotídeo diferente, é composto por 8 sequências das diferentes regiões: todas as amostras da região Norte (N1, N2, N3), 3 amostras do Nordeste (NE2, NE3, NE4), 1 amostra do Centro-Oeste (MW5) e 1 amostra da região Sul (S1). Das amostras 100% idênticas foram consideradas apenas uma de cada região na análise filogenética, neste caso foram retiradas as amostras N2, N3, NE3 e NE4. O segundo grupo com 100% de identidade é composto por 4 sequências, sendo 2 amostras da região Centro-Oeste (MW2, MW3), 1 amostra do Sudeste (SE4) e 1 amostra da região Sul (S2). Deste grupo, apenas a amostra MW3 foi retirada da análise filogenética. Estes 2 grupos apresentam 96,5% de identidade entre si, ou seja, dos seus 1409 nucleotídeos, 49 foram diferentes.

A menor similaridade, 96,23%, foi encontrada entre as 8 sequências do primeiro grupo 100% idêntico e a amostra 5 da região Sul, apresentando 53 nucleotídeos díspares. Este grupo também divergiu da amostra 5 da região Nordeste em 51 nucleotídeos, apresentando 96,36% de identidade, e das amostras 1 da região Nordeste e 4 da região Sul em 50 nucleotídeos, apresentando 96,43% de identidade.

Considerando as 23 amostras deste estudo, pode-se afirmar que existem 13 sequências diferentes do *18S rRNA* de *T. equi* circulantes em equinos no Brasil.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
T. equi - BR N1	1	0	0	50	0	0	0	51	3	49	49	15	0	12	9	10	49	10	0	49	12	50	53
T. equi - BR N2	2	100,00	0	50	0	0	0	51	3	49	49	15	0	12	9	10	49	10	0	49	12	50	53
T. equi - BR N3	3	100,00	100,00	50	0	0	0	51	3	49	49	15	0	12	9	10	49	10	0	49	12	50	53
T. equi - BR NE1	4	96,43	96,43	96,43	50	50	50	3	49	1	1	40	50	44	43	43	1	43	50	1	40	2	8
T. equi - BR NE2	5	100,00	100,00	100,00	96,43	0	0	51	3	49	49	15	0	12	9	10	49	10	0	49	12	50	53
T. equi - BR NE3	6	100,00	100,00	100,00	96,43	100,00	0	51	3	49	49	15	0	12	9	10	49	10	0	49	12	50	53
T. equi - BR NE4	7	100,00	100,00	100,00	96,43	100,00	100,00	51	3	49	49	15	0	12	9	10	49	10	0	49	12	50	53
T. equi - BR NE5	8	96,36	96,36	96,36	99,79	96,36	96,36	96,36	50	4	4	41	51	45	44	44	4	44	51	4	41	5	11
T. equi - BR MW1	9	99,78	99,78	99,78	96,50	99,78	99,78	99,78	96,43	48	48	14	3	11	10	11	48	11	3	48	13	49	54
T. equi - BR MW2	10	96,50	96,50	96,50	99,93	96,50	96,50	96,50	99,71	96,58	0	39	49	43	42	42	0	42	49	0	39	1	7
T. equi - BR MW3	11	96,50	96,50	96,50	99,93	96,50	96,50	96,50	99,71	96,58	100,00	39	49	43	42	42	0	42	49	0	39	1	7
T. equi - BR MW4	12	98,93	98,93	98,93	97,15	98,93	98,93	98,93	97,08	99,00	97,22	15	7	6	9	39	9	15	39	9	40	45	
T. equi - BR MW5	13	100,00	100,00	100,00	96,43	100,00	100,00	100,00	96,36	99,78	96,50	96,50	98,93	12	9	10	49	10	0	49	12	50	53
T. equi - BR SE1	14	99,14	99,14	99,14	96,86	99,14	99,14	99,14	96,79	99,21	96,93	96,93	99,50	99,14	3	6	43	6	12	43	8	44	49
T. equi - BR SE2	15	99,36	99,36	99,36	96,93	99,36	99,36	99,36	96,86	99,28	97,00	97,00	99,57	99,36	99,79	3	42	3	9	42	5	43	48
T. equi - BR SE3	16	99,28	99,28	99,28	96,93	99,28	99,28	99,28	96,86	99,21	97,00	97,00	99,36	99,28	99,57	99,79	42	2	10	42	5	43	48
T. equi - BR SE4	17	96,50	96,50	96,50	99,93	96,50	96,50	96,50	99,71	96,58	100,00	100,00	97,22	96,50	96,93	97,00	97,00	42	49	0	39	1	7
T. equi - BR SE5	18	99,28	99,28	99,28	96,93	99,28	99,28	99,28	96,86	99,21	97,00	97,00	99,36	99,28	99,57	99,79	99,86	97,00	10	42	5	43	48
T. equi - BR S1	19	100,00	100,00	100,00	96,43	100,00	100,00	100,00	96,36	99,78	96,50	96,50	98,93	100,00	99,14	99,36	99,28	96,50	99,28	49	12	50	53
T. equi - BR S2	20	96,50	96,50	96,50	99,93	96,50	96,50	96,50	99,71	96,58	100,00	100,00	97,22	96,50	96,93	97,00	97,00	100,00	97,00	96,50	39	1	7
T. equi - BR S3	21	99,14	99,14	99,14	97,15	99,14	99,14	99,14	97,08	99,07	97,22	97,22	99,36	99,14	99,43	99,64	99,64	97,22	99,64	99,14	97,22	40	45
T. equi - BR S4	22	96,43	96,43	96,43	99,86	96,43	96,43	96,43	99,64	96,50	99,93	99,93	97,15	96,43	96,86	96,93	96,93	99,93	96,93	96,43	99,93	97,15	8
T. equi - BR S5	23	96,23	96,23	96,23	99,43	96,23	96,23	96,23	99,22	96,16	99,50	99,50	96,80	96,23	96,52	96,59	96,59	99,50	96,59	96,23	99,50	96,80	99,43

Figura 6. Matriz de similaridade e número de nucleotídeos díspares baseado no gene *18S rRNA* de *Theileria equi* das amostras deste estudo.

4.2 Análise filogenética do gene *18S rRNA* de *Theileria equi*

Na análise filogenética das sequências do Brasil do gene *18S rRNA* de *T. equi* (Figura 7), alinhando as 18 sequências deste estudo com 31 sequências de três estados (regiões) brasileiros, dois clados (A e C) se formaram. No clado A, apoiado com um Bootstrap de 75%, pode-se observar o agrupamento de 7 amostras deste estudo (NE1, NE5, MW2, SE4, S2, S4 e S5), mais 8 sequências do Mato Grosso do Sul (ID: KY464019, KY464020, KY464022, KY464023, KY464024, KY464026, KY464029 e KY464035), 5 do Rio Grande do Sul (ID: KU240064, KU240065, KU240068, KU240069 e KU240072) e 6 do Rio de Janeiro (ID: KX722517, KX722519, KX722520, KX722521, KJ573370 e KJ573373). O clado C, apoiado com um Bootstrap de 99%, é composto por 11 amostras deste estudo (N1, NE2, MW1, MW4, MW5, SE1, SE2, SE3, SE5, S1 e S3), 6 do Rio de Janeiro (ID: KX722511, KX722512, KX722513, KX722523, KX722525 e KJ573371), 5 amostras do Mato Grosso do Sul (ID: KY464021, KY464025, KY464028, KY464032 e KY464033) e apenas 1 sequência do Rio Grande do Sul (ID: KU240066). Pode-se observar que as amostras N1, S1, MW5 e NE2 deste estudo se agruparam em um nó com as sequências dos demais estados, enquanto que as demais sequências (SE1, SE2, SE3, SE5, MW1, MW4 e S3) se mantiveram em nós isolados.

Na análise filogenética apresentada na Figura 8, que envolve diferentes espécies dos gêneros *Theileria* e *Babesia* além das amostras deste estudo, ocorreu a formação de 3 grupos principais (1, 2 e 3). No grupo 1, apoiado com um Bootstrap de 93%, se apresentaram todas as sequências do gene *18S rRNA* de *T. equi*, sendo possível observar a formação de 3 clados (A, B e C). Os demais theilerídeos, descritos na Tabela 2, se agruparam no grupo 2, apoiado em um Bootstrap de 97%. No grupo 3 se agruparam os babesídeos (Tabela 2), apoiado em um Bootstrap de 87%. *Babesia bicornis* (AF419313), *Theileria bicornis* (AF499604) e *Babesia microti* (U09833) estão separadas de todos os agrupamentos por nós individuais, sendo denominadas de variantes únicas.

Ainda na Figura 8, pode-se observar no grupo 1, clado A (Bootstrap de 84%), o agrupamento das amostras NE1, NE5, MW2, SE4, S2, S4 e S5 com sequências de *B. equi* (= *T. equi*) da África do Sul (Z15105) e Espanha (AY150062 e AY150063). A amostra de *T. equi* da África do Sul (EU642507) se apresentou em um nó separado como representante do clado B. Em contrapartida, no clado C (Bootstrap de 100%), observou-se o agrupamento das demais amostras deste estudo com a sequência de *T. equi* do México (JQ390047).

Uma análise filogenética global baseada no gene *18S rRNA* de *T. equi* foi realizada utilizando sequências deste parasita provenientes de diversas regiões do mundo (Figura 9). Ao

todo 88 sequências de *T. equi* foram utilizadas, incluindo 18 sequências deste estudo e 70 sequências de diferentes países: sendo 36 do continente Americano, 10 do continente Europeu, 14 do continente Africano e 10 da Ásia. Esta reconstrução filogenética resultou em uma árvore com altos valores de Bootstrap que sustentaram 3 clados (A, B e C). O clado A, apoiado em um Bootstrap de 84%, contendo sete isolados deste estudo (NE1, NE5, MW2, SE4, S2, S4 e S5) que se agruparam com sequências da África do Sul (ID: Z15105 e EU642508), Israel (ID: KX227623 e KX227629), Espanha (ID: AY150062, AY150063 e AY150064), Estados Unidos (ID: JX177670, JX177671, JX177672 e JX177673), Índia (ID: KP995259), e Coreia do Sul (ID: KM819520). Neste clado também se agruparam outras sequências do Brasil, oriundas do estado do Rio de Janeiro (ID: KX722517, KX722519, KX722520, KX722521, KJ573370 e KJ573373), Mato Grosso do Sul (ID: KY464019, KY464020, KY464022, KY464023, KY464024, KY464026, KY464029 e KY464035) e Rio Grande do Sul (ID: KU240064, KU240065, KU240068, KU240069 e KU240072) (Figura 9).

O clado B, apoiado em um Bootstrap de 99%, agrupou sequências de *T. equi* da Suíça (ID: KM046918, KM046919, KM046920, KM046921 e KM046922), Espanha (ID: DQ287951 e AY534882), China (ID: KF559357) e Coreia do Sul (ID: HM229407 e HM229408), além de uma sequência da África do Sul (ID: EU642507) que formaram um grupo monofilético distinto (Figura 9). Sequências representando esse genótipo não foram detectadas em nenhuma amostra do Brasil ou do continente Americano. O terceiro clado (C), com Bootstrap de 97%, agrupou 11 sequências deste estudo (N1, NE2, MW1, MW4, MW5, SE1, SE2, SE3, SE5, S1 e S3), com sequências do Sudão (ID: AB515307, AB515309, AB515312, AB515313 e AB515315), Kenia (ID: KF597074 e KF597076), África do Sul (ID: EU888903, EU888905, EU642510 e EU642511), Israel (ID: KX227619, KX227630 e KX227641) e México (ID: JQ390047). Outras sequências do Brasil disponíveis no GenBank, como isolados do Rio de Janeiro (ID: KX722511, KX722512, KX722513, KX722523, KX722525 e KJ573371), Mato Grosso do Sul (ID: KY464021, KY464025, KY464028, KY464032 e KY464033) e Rio Grande do Sul (ID: KU240066) também agruparam-se neste clado. Amostras de *T. equi* de equinos de diferentes regiões do Brasil alocaram-se apenas nos clados A e C, sendo a maior parte das sequências deste estudo observadas no clado C.

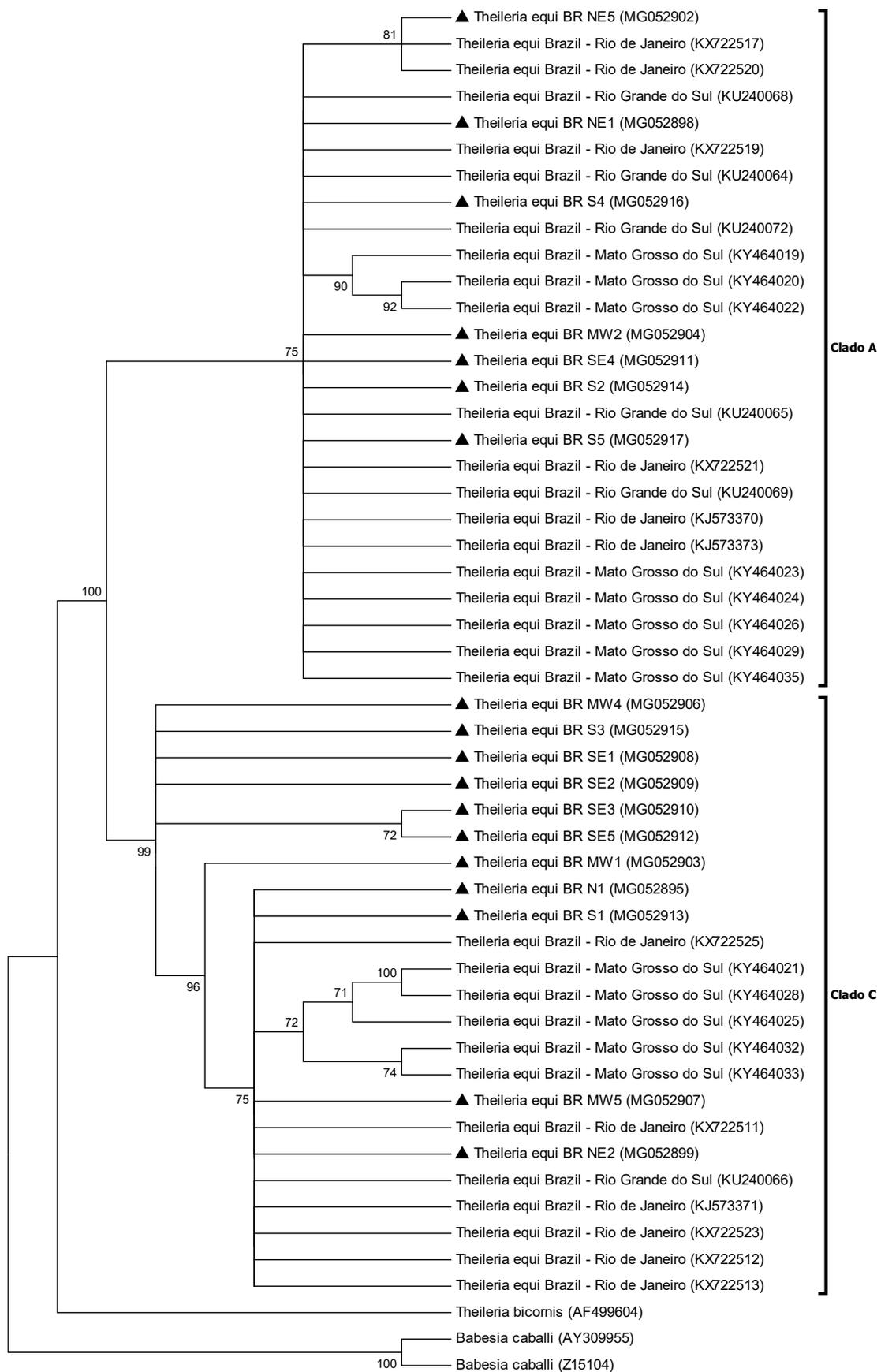


Figura 7. Árvore filogenética resultante da análise de sequências do Brasil do gene *18S rRNA* de *Theileria equi*. Os números apresentados nos nós da árvore indicam os valores de

Bootstrap que suportam os ramos. Os nomes das espécies estão descritos, seguidos da localidade e o número de acesso do GenBank em parênteses. As amostras obtidas nesse estudo estão destacadas com ▲. *Theileria bicornis* e duas sequências de *Babesia caballi* foram utilizadas como “outgroup”.

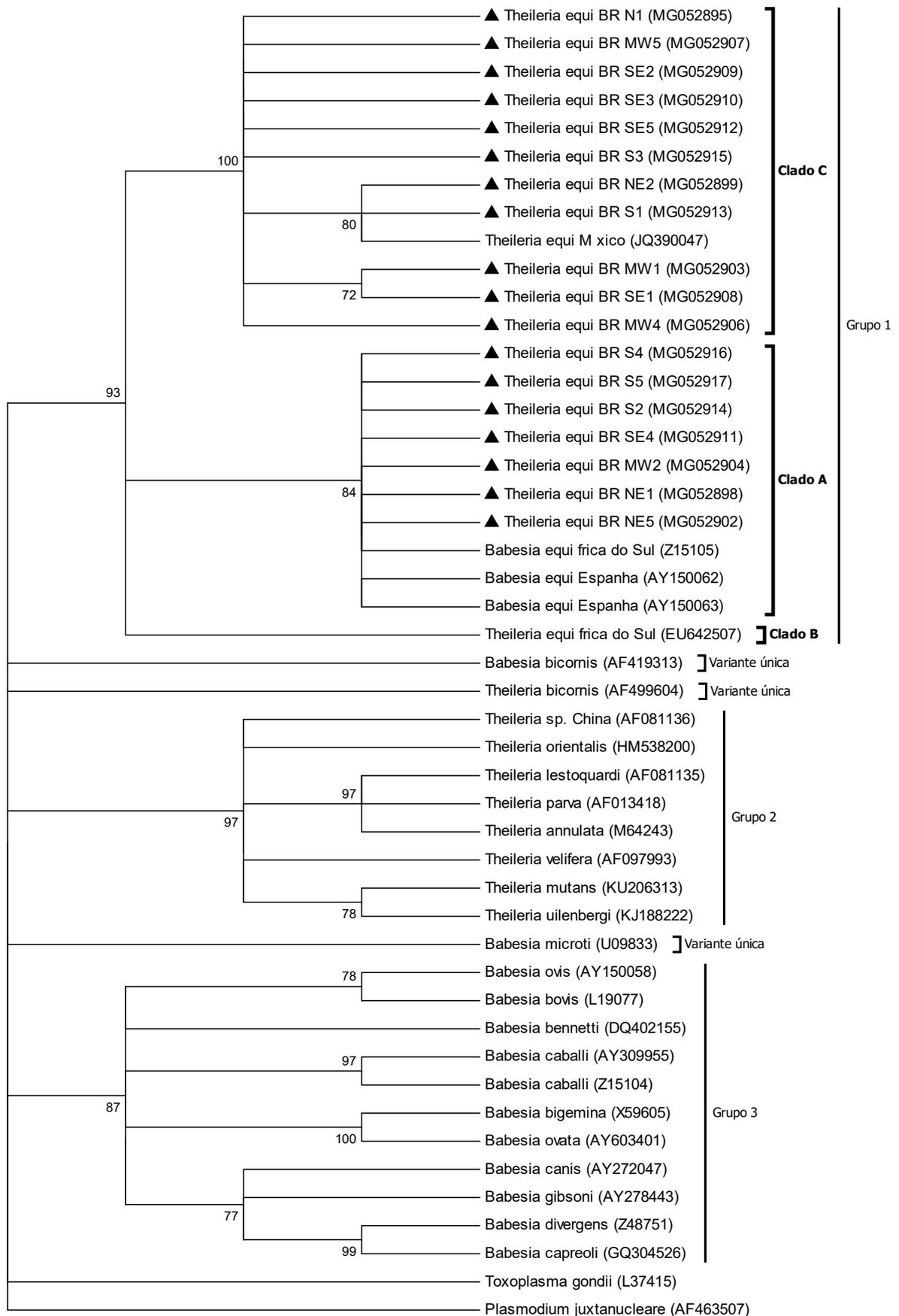


Figura 8. Árvore filogenética resultante da análise de diferentes espécies dos gêneros *Theileria* e *Babesia*, considerando o gene *18S rRNA*. Os números apresentados nos nós da

árvore indicam os valores de Bootstrap que suportam os ramos. Os nomes das espécies estão descritos, seguidos do número de acesso do GenBank em parênteses. As amostras obtidas nesse estudo estão destacadas com ▲. *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium juxtannucleare* foram utilizados como “outgroup”.

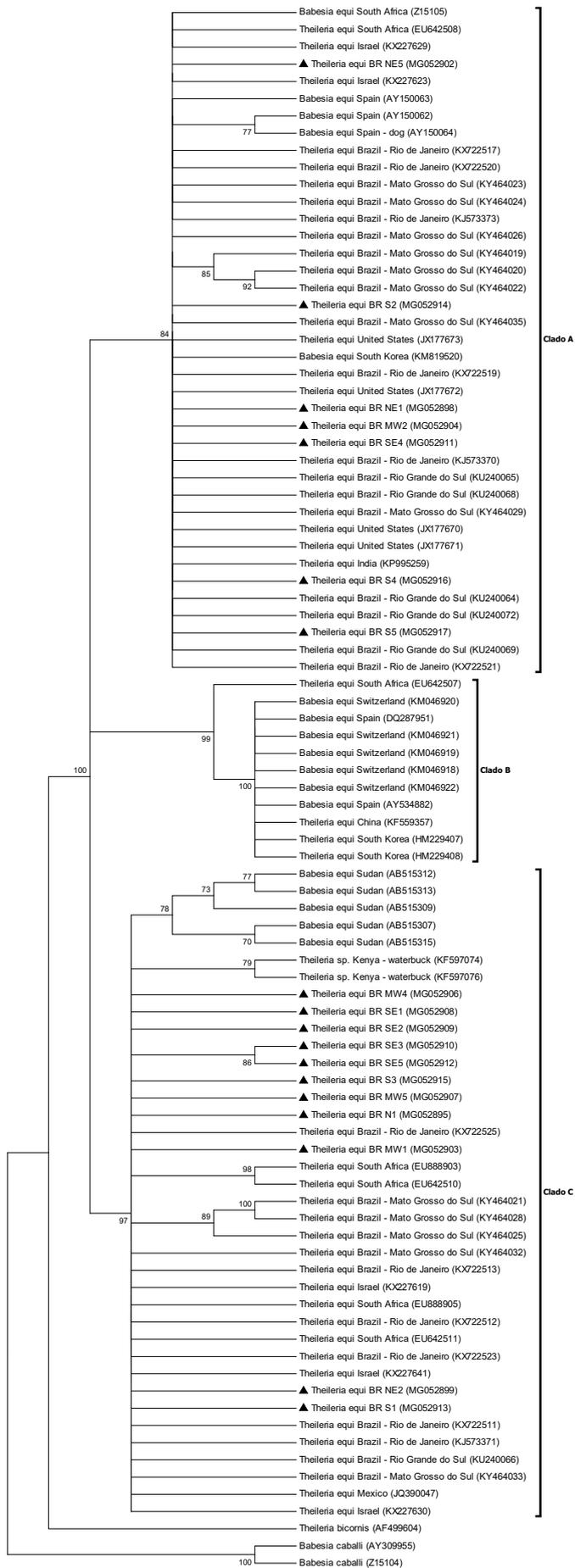


Figura 9. Árvore filogenética resultante da análise de sequências do mundo do gene *18S rRNA* de *Theileria equi*. Os números apresentados nos nós da árvore indicam os valores de Bootstrap que suportam os ramos. Os nomes das espécies estão descritos, seguidos da localidade e o número de acesso do GenBank em parênteses. As amostras obtidas nesse estudo estão destacadas com ▲. *Theileria bicornis* e duas sequências de *Babesia caballi* foram utilizadas como “outgroup”.

5 DISCUSSÃO

Até o momento, sabe-se que a circulação internacional de equinos portadores assintomáticos de agentes da piroplasmose equina representa um risco para a introdução da doença em regiões consideradas livres, como Austrália, Grã-Bretanha, Japão, Estados Unidos e Canadá. O Brasil é considerado um país endêmico para a piroplasmose equina e a circulação deste protozoário já foi apontada em todo o país. Desta forma, a detecção e a prevalência deste hemoparasito já foram abordadas em diversos estudos, revelando uma alta prevalência de *T. equi* no país (LINHARES, 1994; PFEIFER BARBOSA et al., 1995; BATTSETSEG et al., 2002; SANTOS et al., 2011; PECKLE et al., 2013). Contudo, este estudo é o primeiro a identificar as diferenças genótípicas em isolados de *T. equi* presente em equinos das cinco regiões geográficas do Brasil. As técnicas de biologia molecular têm provado ser muito úteis na detecção e identificação de diversas espécies de hemoparasitos, incluindo os gêneros *Theileria* e *Babesia* (CACCIO et al., 2000). Essas técnicas são baseadas em PCR espécie-específica, tendo como alvo principal o gene *18S rRNA* (CACCIO et al., 2000; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; RAMPERSAD et al., 2003), mas com seus protocolos de amplificação específicos para cada espécie de Piroplasmida.

Diversos estudos abordam a classificação filogenética e a existência de diferentes genótipos de *T. equi* circulantes pelo mundo (NAGORE et al., 2004; BHOORA et al., 2009; SALIM et al., 2010; HALL et al., 2013). Em sua maioria, estes trabalhos realizam a detecção e o sequenciamento do gene *18S rRNA*. É importante que, em um estudo sobre inferências genótípicas, o gene alvo tenha áreas conservadas e variáveis, para que a análise filogenética seja confiável. Por essa razão, o gene *18S rRNA* é ideal para o bom alinhamento das sequências, bem como para discriminação filogenética (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006). Em estudo realizado por Nagore et al. (2004), uma análise do gene *18S rRNA* com ênfase na região hipervariável V4 foi realizada e dois genótipos foram originalmente propostos para a espécie *T. equi*. Porém, a maioria dos estudos avalia o gene *18S rRNA* por completo (NAGORE et al., 2004; BHOORA et al., 2009; SALIM et al., 2010; HALL et al., 2013). Posteriormente, estudos desenvolvidos em outras regiões geográficas mostraram a existência de mais três genótipos, ampliando a diversidade intraespecífica de *T. equi* (BHOORA et al., 2009; SALIM et al., 2010; HALL et al., 2013; QABLAN et al., 2013; LIU et al., 2016).

Assim como já foi avaliado por Bhoora et al. (2009) na África do Sul, por Salim et al. (2010) no Sudão, por Hall et al. (2013) na América do Norte, por Qablan et al. (2013) na Jordania e por Liu et al. (2016) na Suíça, o presente estudo investigou a diversidade genética

de isolados geograficamente distintos de *T. equi* em equinos naturalmente infectados provenientes das cinco regiões do Brasil, realizando uma análise robusta das sequências brasileiras e comparando a variabilidade da sequência *18S rRNA* com outros isolados do mundo. Apesar da atual disponibilidade de sequências brasileiras do gene *18S rRNA* de *T. equi* no GenBank provenientes de três regiões diferentes, até o momento não foi realizada uma análise dos possíveis genótipos circulantes nas cinco regiões da federação que compõe o território brasileiro. O conhecimento a cerca dos genótipos de *T. equi* circulantes no Brasil é de grande importância para uma maior compreensão sobre a epidemiologia e a distribuição deste parasito não só no país, mas também em todo o continente.

Dentre as diversas amostras coletadas em todo o país, uma alta frequência de *T. equi* foi observada em todas as regiões estudadas, como já era esperado, afinal estudos asseguram a circulação deste protozoário em todo o Brasil (LINHARES, 1994; PFEIFER BARBOSA et al., 1995; BALDANI et al., 2008; KERBER et al., 2009; SANTOS et al., 2011; PECKLE et al., 2013). De maneira geral, a análise genética baseada no gene *18S rRNA* de amostras brasileiras de *T. equi* mostrou uma divergência clara e distinta dentre os isolados, ressaltando que dois genótipos diferentes foram encontrados no país, além da existência de treze sequências diferentes do gene *18S rRNA* de *T. equi*. Esta afirmação pode ser comprovada tanto pela análise da matriz de similaridade das sequências, que evidenciou uma distância genética de 3,77% (53 nucleotídeos díspares), quanto pela observação das árvores filogenéticas desenvolvidas, que agruparam as sequências deste estudo sucessivamente em clados distintos (A e C). Este achado é semelhante ao encontrado por Nagore et al. (2004) na Espanha e por Peckle et al. (2018) no Rio de Janeiro - Brasil, que pela análise do gene *18S rRNA* de *T. equi* evidenciaram a existência de pelo menos dois genótipos distintos desse parasito infectando cavalos nas suas áreas de estudo.

Em relação as regiões hipervariáveis encontradas, as regiões V2, V4 e V8 foram evidenciadas no gene *18S rRNA* de *T. equi* através da observação de polimorfismos entre as sequências agrupadas dessas regiões. A região mais variável do gene *18S rRNA* de *T. equi* observada nas sequências do presente estudo foi a região hipervariável V4, corroborando com achados de Bhoora et al. (2009) que considera essa região como um marcador genético de grande importância. Apoiando este achado, o gráfico de entropia (Figura 5) mostrou que existem três regiões hipervariáveis no gene, sendo a mais variável a região V4, que atingiu em alguns nucleotídeos um pico de entropia de quase 0,8. Neste estudo foram demonstrados 22 pontos de polimorfismo na região hipervariável V4, diferindo dos achados de Chae et al. (1999) que descreveu 15 pontos de polimorfismo nessa região para outros theilerídeos.

Acredita-se que as outras duas regiões variáveis localizadas entre os nucleotídeos 63-75 e 1208 –1226 sejam as regiões V2 e V8, respectivamente. Ambas as regiões foram inferidas através de uma estimativa pela contagem de nucleotídeos a partir da região V4, baseado na posição do alinhamento da sequência *18S rRNA* de *Saccharomyces cerevisiae* do banco de dados SILVA, segundo Hadziavdic et al. (2014). As regiões V2 e V8 apresentaram alta entropia, porém os picos não ultrapassaram 0,7. É importante ressaltar que as regiões V2 e V4 são vistas como adequadas para marcadores da biodiversidade (HADZIAVDIC et al., 2014).

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando os fragmentos quase completos do gene *18S rRNA* de *T. equi* obtidos nesse estudo, além de sequências completas disponíveis no GenBank. A árvore desenvolvida a partir do alinhamento de amostras exclusivamente brasileiras, com 49 sequências do gene das cinco regiões do país (Figura 7), evidenciou que existe uma diversidade genética entre as amostras do estudo assim como entre as amostras disponíveis do Brasil. O primeiro grupo de sequências 100% idênticas composto por 4 amostras (N1, NE2, MW5 e S1) se manteve no clado C em todas as árvores, enquanto o segundo grupo com 100% de identidade composto por 3 amostras (MW2, SE4 e S2) se manteve no clado A. Além dessas amostras, outras amostras deste estudo tiveram um comportamento semelhante em todas as árvores. Quatro amostras (NE1, NE5, S4 e S5) que apresentaram a menor porcentagem de similaridade com o grupo de 4 amostras 100% idênticas do clado C, se mantiveram em todas as árvores no clado A. Por outro lado, as amostras MW4, SE1, SE2, SE3, SE5 e S1, se mantiveram no clado C.

As análises apontaram a existência de duas variantes genéticas de *T. equi* nas amostras de sangue de cavalos no Brasil. Este achado difere do que já foi mostrado em outros países da América do Norte e na Suíça (HALL et al., 2013; LIU et al., 2016) cujos isolados avaliados pertenciam a apenas um grupo, apontando que apenas um genótipo do parasito circula nestas regiões. Por outro lado, na África do Sul e Jordania (BHOORA et al., 2009; QABLAN et al., 2013) circulam três genótipos diferentes e no Sudão (SALIM et al., 2010) quatro genótipos. No Brasil, em quase todas as regiões (Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul) foram obtidas amostras de equinos infectados pelos genótipos A e C. Apenas na região Norte, onde a circulação de equinos é bem inferior as outras regiões, foi observada a existência de um único genótipo, grupo C, levando em consideração que as amostras N1, N2 e N3 foram 100% idênticas. Com a grande extensão do território brasileiro, suas distintas características econômicas, climáticas e geográficas, não foi possível estabelecer uma relação entre os dois genótipos circulantes e as regiões geográficas.

Estas constatações feitas tanto no Brasil como em diferentes países evidenciam que diferentes genótipos de *T. equi* estão circulando em todo o mundo, e este fato pode ser explicado pela grande movimentação dos equinos dentro do mesmo país ou entre países. No caso do Brasil, com um dos maiores rebanhos mundiais e o crescente negócio equestre, a importação de animais e a exportação ou transporte internacional proporcionam uma alta rotatividade e contato com os diferentes genótipos. Além disso, competições nacionais favorecem a circulação dos animais entre as diferentes regiões do país.

Em relação a análise filogenética realizada entre as diferentes espécies dos gêneros *Theileria* e *Babesia* (Figura 8), 46 sequências foram alinhadas e ajustadas manualmente, incluindo os “outgroups”. Nesta árvore, foi possível observar a formação de 3 grupos, onde todas as espécies de *T. equi* se agruparam no grupo 1 (clados A, B e C), distante das demais theilerias (grupo 2) e babesias (grupo 3). *Theileria equi* ainda é um hemoparasito que levanta muitas discussões sobre sua real posição taxonômica (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006). Assim como foi observado no presente estudo, Lack et al. (2012) observaram em uma robusta análise filogenética baseada no gene *18S rRNA* dos gêneros *Theileria* e *Babesia* (principalmente) que os isolados de *T. equi* (clado II), não se agrupam com outros theilerídeos (clado III), nem com babesídeos (clado I), destacando uma posição taxonômica incerta. Este estudo ressaltou a posição conflitante desta espécie na árvore de Piroplasmida afirmando que sua posição relativa aos clados I e II não foi resolvida, embora o nó que unisse os clados I, II e III tenha sido fortemente apoiado nas análises Bayesianas e Parcimônia. Lack et al. (2012) observaram também que *Babesia microti* se destaca das demais Babesias assim como *Theileria/Babesia bicornis*, o que também foi observado no nosso estudo. Nagore et al. (2004), por sua vez, também realizaram uma análise filogenética de espécies de *Babesia* e *Theileria* utilizando sequências do gene *18S rRNA*. Neste estudo foi apresentado um agrupamento totalmente individual para os isolados de *T. equi*, sustentado por Bootstrap de 100%. Outro trabalho desenvolvido por Schnittger et al. (2012), suscitaram a possibilidade de *T. equi* não ser considerada nem uma *Theileria* nem uma *Babesia*.

Uma outra análise filogenética foi realizada, desta vez abordando sequências de *T. equi* provenientes de todo o mundo. Foram alinhadas 88 sequências dos quatro continentes - América, Europa, África e Ásia, gerando um conjunto de dados com 1.497pb. A formação de 3 clados principais, A, B e C, ficou evidente, estando apoiados em altos valores de “Bootstrap” (Figura 9). Essa afirmação corrobora com os achados de Bhoora et al. (2009), que observaram a formação de 3 grupos pela análise do gene *18S rDNA* de *T. equi*. Da mesma forma, Liu et al. (2016) analisaram as variantes deste gene na região de hibridação da sonda e

encontrou 3 grupos principais (clado A, B e C). Por outro lado, estudos de Hall et al. (2013) e Salim et al. (2010) observaram a formação de 4 grupos, A, B, C e D. Da mesma forma, Liu et al. (2016) e Qablan et al. (2013) encontraram mais um grupo (E) na análise, descrevendo cinco agrupamentos principais. O clado D descrito por Salim et al. (2010), contendo apenas sequências do Sudão, pode ser observado na reconstrução filogenética do presente estudo como um grupo monofilético dentro do clado C, sustentado por um valor de “Bootstrap” de 78%. Já o grupo E, como observado por Liu et al. (2016), pode ser visto dentro do clado B, composto por sequências da Espanha, Suíça, Coréia do Sul e China, com um “Bootstrap” de 100%.

No clado A, sequências de todos os continentes podem ser observadas além de algumas sequências deste estudo, estando ausente apenas a região Norte do Brasil. No clado B não foi observada nenhuma sequência do continente Americano. Enquanto que no clado C, nenhuma sequência do continente Europeu foi agrupada. Em relação as sequências deste estudo, com exceção do genótipo B, os outros dois genótipos de *T. equi* foram encontrados no Brasil, cladados A e C. Já que na análise foram consideradas sequências de todo mundo, o que se pode inferir é que não existe uma delimitação dos diferentes genótipos de *T. equi* entre regiões geográficas. Cada continente está representado com amostras de seus países em pelo menos dois cladados distintos, apontando mais uma vez que diferentes genótipos de *T. equi* estão circulando em todo o mundo.

Inferências distintas podem ser feitas a partir das abordagens propostas neste trabalho, porém nosso estudo não pode afirmar uma posição conclusiva para a espécie *T. equi*, semelhante a outros estudos (NAGORE et al., 2004; LACK et al., 2012; SCHNITTGER et al., 2012). Baseado nisso, pesquisadores suscitam a possibilidade desse hemoparasito pertencer a outro gênero. Embora o gene *18S rRNA* seja amplamente utilizado nessas inferências filogenéticas sobre *T. equi* e contenha informações relevantes, outros genes devem ser investigados paralelamente para uma análise mais precisa. A análise filogenética utilizando um único gene pode ser tendenciosa, afinal existe uma variação evolutiva dos genes de forma individual (YU et al., 2001).

Em suma, este estudo disponibilizou novas sequências do gene *18S rRNA* de *T. equi* circulantes nas cinco regiões do Brasil, além de contribuir com mais informações sobre a diversidade gênica deste parasito.

6 CONCLUSÕES

A caracterização molecular baseada na sequência *18S rRNA* mostra a existência de dois genótipos distintos de *Theileira equi* que infectam naturalmente equinos no Brasil. Estes genótipos se dividem em dois clados distintos, A e C, estando estes presentes em praticamente todas as cinco regiões da federação. Dentre as vinte e três amostras sequenciadas, existem 13 variantes da sequência *18S rRNA* de *T. equi* no país. A região hipervariável V4 é a mais variável entre as sequências brasileiras, no entanto, outras duas regiões na sequência *18S rRNA* de *T. equi*, V2 e V8, também foram caracterizadas. Este estudo, portanto, acrescenta importantes informações sobre a diversidade gênica de *T. equi* em equinos de todas as regiões do Brasil baseado na sequência *18S rRNA*.

7 REFERÊNCIAS

- ABEDI, V.; RAZMI, G.; SEIFI, H.; NAGHIBI, A. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses and ixodid ticks in Iran. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.239-244, 2014.
- ALLSOPP, M.T.E.P. The phylogeny of *Babesia*, *Theileria* and related parasites and the development of species-specific probes for diagnostic purposes. 1994. Tese (Doutorado). University of the Witwatersrand, Johannesburg, Johannesburg, South Africa.
- ALLSOPP, M.T.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D.T.; ALLSOPP, B.A. Phylogeny and evolution of the piroplasmids. **Parasitology**, v.108, p.147–152. 1994.
- ALLSOPP, M.T.E.P.; ALLSOPP, B.A. Molecular Sequence Evidence for the Reclassification of Some *Babesia* Species. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1081, p.509–517, 2006.
- ALTAY, D.; DUMANLI, N.; AKTAS, M. Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.1-2, p.161-5, jun. 2007.
- ASGARALI, Z.; COOMBS, D.K.; MOHAMMED, F.; CAMPBELL, M.D.; CAESAR, E. A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad. **Veterinary Parasitology**, v.144, n.1-2, p.167-71, mar 2007.
- BALDANI, C.D.; CANOLA, P.A.; NETO, J.C.L.; MACHADO, R.Z. In vitro culture, PCR, and nested PCR for the detection of *Theileria equi* in horses submitted to exercise. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 550-558, 2008.
- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F.G.; INOUE N.; ALHASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI T.; FUJISAKI K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.107, n.4, p.351-357, 2002.
- BHOORA, R.; FRANSSSEN, L.; OOSTHUIZEN, M.C.; GUTHRIE, A.J.; ZWEYGARTH, E.; PENZHORN, B.L.; JONGEJAN, F.; COLLINS, N.E. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v.159, p.112–120, 2009.
- BOTTEON, P.T.L.; MASSARD, C.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; LOSS, Z.G.; LINHARES, G.F.C. Soroprevalence de *Babesia equi* en tres diferentes sistemas de crianzade equinos. **Parasitologia Latino americana**, v. 57, n. 3-4, p. 141-145, 2002.
- BRAGA, M. S. C. O.; COSTA, F. N.; GOMES, D. R. M.; XAVIER, D. R.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; FRESCHI, C. R.; MACHADO, R. Z. Genetic diversity of piroplasmids species in equids from island of São Luís, northeastern Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 26, n.3, p.331-339, 2017.

BROWN, C.G. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. **Parassitologia**, v.32, n.1, p.23-31. Review, apr. 1990.

CACCIO, S.; CAMMA, C.; ONUMA, M.; SEVERINI, C. The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. **International Journal Parasitology**. v.30, p.1181–1185. 2000.

CHAE, J. S.; ALLSOPP, B.A.; WAGHELA, S.D.; PARK, J.; KAKUDA, T.; SUGIMOTO, C.; ALLSOPP, M.T.E.P.; WAGNER, G.G.; HOLMAN, P. A study of the systematics of *Theileria* spp. based upon small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology research**, v. 85, p. 877–883, 1999.

CHANSIRI, K.; KAWAZU, S.; KAMIO, T.; TERADA, Y.; FUJISAKI, K.; PHILIPPE, H.; SARATAPHAN, N. Molecular phylogenetic studies on *Theileria* parasites based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Vet. Parasitol.**, v.83, n.2, p.99-105, jun. 1999.

CLIMATE, Dados climáticos. Disponível em: <http://www.climate-data.org>. Acessado em 15 de novembro de 2017.

CLOUSE, T.; Gauthier, J.; HARRIS, R.; JAMES, A.; PORTACCI, K.; VOELKER, L. Equine piroplasmosis domestic pathways assessment 2011: Pathways assessment for the spread of the causative agents of equine piroplasmosis from the movement of a horse from a quarantined premises within the contiguous United States. United States Department of Agriculture - APHIS - National Center for Risk Analysis, 2011. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergingissues/downloads/epdomesticpathwaysfinalapril11.pdf. Acessado em 11 de março de 2018.

CNA, Confederação da Agricultura e Pecuária no Brasil, 2004. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos. Coletânea Estudos Gleba, 39, 68p.

COLLINS, N.E.; ALLSOPP, B.A. *Theileria parva* ribosomal internal transcribed spacer sequences exhibit extensive polymorphism and mosaic evolution application to the characterization of parasites from cattle and buffalo. **Parasitology**, v.118, p.541–551. 1999.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infeciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2. ed, Rio de Janeiro: Medsi, 1992.

COSTA, M.D. 2008. A Origem do cavalo no Brasil. **Revista Cavalos de Raça**, ano I, n 1.

CRIADO, A.; MARTINEZ, J.; BULING, A.; BARBA, J.C.; MERINO, S.; JEFFERIES, R.; IRWIN, P.J. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based consequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. **Veterinary Parasitology**, v.142, p.238–247. 2006.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. **Veterinary Parasitology**. v.113, p.189–201. 2003.

CRIADO-FORNELIO, A.; GÓNZALEZ-DEL-RÍO, M.A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. The “expanding universe” of piroplasms. **Veterinary Parasitology**, v.119, n.4, p.337–345, 2004.

CUNHA, C.W.; SILVA, S.S.; RODRIGUES, A.L.; GUERREIRO, G. Avaliação do Efeito da Esplenectomia em Equinos Portadores e Livres de *Babesia* spp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.2, p.157-160, 1997.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2015.

DE WALL, D.T.; HEERDEN, J.V. Equine Piroplasmosis. **Infectious Diseases of Livestock, USA**: Oxford University Press, 2 ed., p.425-432, 2004.

FRANCISCO, Wagner de Cerqueira e. "Regiões Brasileiras"; *Brasil Escola*. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/brasil/regiões-brasileiras.htm>>. Acesso em 17 de julho de 2017.

FREITAS, Eduardo de, 2015. "Brasil, país ou continente?"; *Brasil Escola*. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/brasil/brasil-pais-ou-continente.htm>>. Acesso em 17 de julho de 2017.

FRIEDHOFF, K.T. Die piroplasmen der equiden. Bedeutung für den internationalen Pferdeverkehr. **Berliner um Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.95, n.19, p.368-374, 1982.

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, p.23-52, 1988.

FRIEDHOFF, K.T.; TENTER, A.M.; MULLER, I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. **Revue Scientifique et Technique (International office of Epizootics)**, v.9, n.4, p.1187 – 1194, 1990.

GEORGES, K.C.; EZEOKOLIB, C.D.; SPARAGANOC, O.; PARGASSA, I.; CAMPBELL, M.; D'ABADIEA, R.; YABSLEY, M.J. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. **Veterinary Parasitology**, v.175, p.363–366, 2011.

GRAY, J.S. Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.296, p.131–136. 2006.

GUIDI, E.; PRADIER, S.; LEBERT, I.; LEBLOND, A. Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses. **Parasitol. Res.**, v.114, p.71–83, 2015.

GUIMARÃES, A.M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO; M.F.B.; CAMARGOS, E.R.S.; BOZZI, I.A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. **Parasitology Research**, v.60, p.69-74, 1998.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO, M.F.B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitol. Res.**, v.84, p.323–327. 1998.

HADZIAVDIC, K.; LEKANG, K.; LANZEN, A.; JONASSEN, I.; THOMPSON, E.M.; TROEDSSON, C. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. **PLoS ONE**, v.9, n.2. 2014.

- HALL, C.M.; BUSCH, J.D.; SCOLES, G.A.; PALMA-CAGLE, K.A.; UETI, M.W.; KAPPMAYER, L.S.; WAGNER, D.M. Genetic characterization of *Theileria equi* infecting horses in North America: evidence for a limited source of U.S. introductions. **Parasites and Vectors**, v.6, p.35, 2013.
- HIKOSAKA, K.; WATANABE, Y.; TSUJI, N.; KITA, K.; KISHINE, H.; ARISUE, N.; PALACPAC, N.M.; KAWAZU, S.; SAWAI, H.; HORII, T.; IGARASHI, I.; TANABE, K.. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. **Molecular Biology and Evolution**, v.27, p.1107–1116. 2010.
- HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.3, p.451-469, 2000.
- IBGE ISSN 0101-4234 Produção da Pecuaria Municipal, Rio de Janeiro, v.41, p.1-108, 2015.
- KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.1-8, 2009.
- KEIM, P.; VAN ERT, M.N.; PEARSON, T.; VOGLER, A.J.; HUYNH, L.Y.; WAGNER, D.M. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. **Infection, Genetics and Evolution**, v.4, n.3, p.205–213. 2004.
- KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.18, p.1–8. 2009.
- KIM, C.M.; BLANCO, L.B.C.; ALHASSAN, A.; ISEKI, H.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. **Veterinary Parasitology**, v.151, p.158–163, 2008.
- KNOWLES, Jr.D. Equine babesiosis (Piroplasmosis): a problem in the international movement of horses. **British Veterinary Journal**, v.52, n.2, p.123-126, 1996.
- KUMAR S.; GUPTA, A.K.; PAL, Y.; DWIVEDI, S.K. In-vivo therapeutic efficacy trial with artemisinin derivative, buparvaquone and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, n.11, p.1171-7, 2003.
- KUMAR, S.; YOKOYAMA, N.; KIM, J.Y.; BORK-MIMM, S.; INOUE, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C. *Theileria equi* merozoite antigen-2 interacts with actin molecule of equine erythrocyte during their asexual development. **Experimental Parasitology**, v.132, p.508–512, 2012.
- KUTTLER, K.L. World-wide impact of babeiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Raton: CRC Press, p.1-22, 1988.
- LACK, J.B.; REICHARD, M.V.; VAN DEN BUSSCHE, R.A. Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. **International Journal for Parasitology**, v.42, p.353–363. 2012.

LAVERAN, M. Contribution a l'étude de *Piroplasma equi*. **Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie**, v.53, p. 385-388, 1901.

LEVINE, L. D. Apicomplexa: The Piroplasm. In: __. **Veterinary Protozoology**, Iowa: Iowa State University Press, 414p. 1985.

LINHARES, G.F.C. **Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de eqüídeos, com ênfase à microrregião de Goiânia**, Goiás, Brasil. 1994. 105f. Tese (Doutorado em Ciência). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

LIU, Q.; MELI, M.L.; ZHANG, Y.; MEILI, T.; STIRN, M.; RIOND, B.; WEIBEL, B.; HOFMANN-LEHMANN, R. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene in *Theileria equi* from horses presented in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v. 221, p. 24-29, 2016.

MAHMOUD, M.S.; EL-EZZL, N.T.A.; ABDEL-SHAFY, S.; NASSAR, S.A.; EL NAMAKY, A.H.; KHALIL, W.K.B.; KNOWLES, D.; KAPPMAYER, L.; SILVA, M.G.; SUAREZ, C.E. Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. **Parasites & Vectors**, v.9, p.260, 2016.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do cavalo.

MARTIN, R. Equine piroplasmosis: the temporary importation of seropositive horses into Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.77, n.5, p.308-309, 1999.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasm: Cycle and sexual stages. **Advance in Parasitology**, v. 23, p. 37-103, 1984.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v. 84, p. 467-475, 1998.

MEYER, A.; TOD, T.C.; MIKKELSEN, N.T.; LIEB, B. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. **BMC Evolutionary Biology**, v.10, n.70, 2010.

MOLTMANN, U.G.; MEHLHORN, H.; SCHEIN, E.; REHBEIN, G., VOIGT, W.P.; ZWEYGARTH, E. Fine structure of *Babesia equi* Laveran, 1901 within lymphocytes and erythrocytes of horses: an in vivo and in vitro study. **Journal Parasitology**, v.69, p.111-120, 1983.

NAGORE, D.; GARCÍA-SANMARTÍN, J.; GARCÍA-PÉREZ, A.L.; JUSTE, R.A., HURTADO, A. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: Epidemiological survey and phylogenetic analysis. **Veterinary Parasitology**, v.123, n.1-2, p.41-54, 2004.

NAVARRETE, I.; SERRANO F.J. Babesiosis. In: CAMPILLO, M.C.; VASQUEZ, F.A.R.; FERNANDEZ, A.R.M.; ACEDO, M.C.S.; RODRIGUEZ, S.H.; LOPEZ-COZAR, I.N.; BAÑOS, P.D.; ROMERO, H.Q.; VARELA, M.C. **Parasitologia Veterinária**. Madrid: McGraw-Hill – Interamericana de España. p.587-592. 1999.

NEITZ, W.O. Classification, transmission and biology of piroplasms of domestic animals. **Annals New York Academic Science**, v.64, n.2, p.56-111, 1956.

NUTTALL, G.H.F.; STRICKLAND, C. On the occurrence of two species of parasites in equine “Piroplasmosis” or “Biliary Fever”. **Parasitology**, v.5, n.1, 1912.

OIE. Equine Piroplasmosis. In: **OIE Terrestrial Manual**. [s.l: s.n.]. p. 1–10. 2014

PASOLINI, M.P.; PAGANO, T.B.; COSTAGLIOLA, A.; DE BIASE, D.; LAMAGNA, B.; AULETTA, L.; FATONE, G.; GRECO, M.; COLUCCIA, P.; VENEZIANO, V.; PIROZZI, C.; RASO, G.M.; SANTORO, P.; MANNA, G.; SERENELLA, P.; PACIELLO, O. Inflammatory Myopathy in Horses With Chronic Piroplasmosis. **Veterinary Pathology**, v.55, n.1, p.133-143, 2018.

PHIPPS, L. P.; OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals Born and reared in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 154, n.17, p. 406-408, 2004.

PECKLE, M.; PIRES, M.S.; DOS SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.; DA SILVA, C.B.; VILELA, J.A.; SANTOS, H.A.; MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v.112, n.5 p.2017-2025, 2013.

PECKLE, M.; PIRES, M.S.; SILVA, C.B.D.; COSTA, R.L.D.; VITARI, G.L.V.; SENRA, M.V.X.; DIAS, R.J.P.; SANTOS, H.A.; MASSARD, C.L. Molecular characterization of *Theileria equi* in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.**, v.9, n.2, p.349-353, feb. 2018.

PFEIFER-BARBOSA, I. B.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K.T. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.58, n.1-2, p.1–8, 1995.

RADAKOVIC, M.; DAVITKOV, D.; BOROZAN, S.; STOJANOVIC, S.; STEVANOVIC, S.; KRSTIC, V.; STANIMIROVIC, Z. Oxidative stress and DNA damage in horses naturally infected with *Theileria equi*. **The Veterinary Journal**, v.217, p.112–118, 2016.

RAMPERSAD, J.; CESAR, E.; CAMPBELL, M.D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**, v.114, p.81–87. 2003.

REICHARD, M.V.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; MEINKOTH, J.H.; HOOVER, J.P.; KOCAN, A.A. A new species of *Cytauxzoon* from Pallas’ cat caught in Mongolia and commentson the systematic and taxonomy of piroplasmids. **Journal of Parasitology.**, v.91, p.420–426. 2005.

RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. Diagnóstico sorológico da babesiose equina por *Babesia equi* em Minas Gerais. In: 6º Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Bagé, p. 111, 1989.

RIBEIRO, M., SILVEIRA, J. DA, BASTOS, C. Failure of the *Amblyomma cajennense* nymph to become infected by *Theileria equi* after feeding on acute or chronically infected horses. **Experimental Parasitology**, v.128, p.324–327, 2011.

RIBEIRO, I.B.; CÂMARA, A.C.L.; BITTENCOURT, M.V.; MARÇOLA, T.G.; PALUDO, G.R.; SOTO-BLANCO, B. Detection of *Theileria equi* in spleen and blood of asymptomatic piroplasm carrier horses. **Acta Parasitologica**, v.58, n.2, p.218–222, 2013.

ROBERTS, E.D.; MOREHOUSE, L.G.; GAINER, J.H. and MCDANIEL, H.A. Equine piroplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 141, p. 1323-1329, 1962.

ROBERTS, L.S.; JANOVY, J. Parasitic Protozoa: Form, Function, and Classification. In: ____, **Foundations of Parasitology**, 7 ed., p.42-60. 2005.

RUEF, B.J.; WARD, T.J.; OXNER, C.R.; CONLEY, P.G.; BROWN, W.C.; RICE-FICHT, A.C. Phylogenetic analysis with newly characterized *Babesia bovis* hsp 70 and hsp 90 provides strong support for paraphyly within the piroplasms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.190, p.67–72. 2000.

SALIM, B.; BAKHEIT, M.A.; KAMAU, J.; NAKAMURA, I.; SUGIMOTO, C. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. **Parasitology Research**, v.106, n. 2, p.493–498, 2010.

SALIM, B.; BAKHEIT, M.A.; KAMAU, J.; SUGIMOTO, C. Current status of equine piroplasmosis in the Sudan. **Infection, Genetics and Evolution**, v.16, p.191-9, jun. 2013.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, n.12, p.5463–5467, 1977.

SANT, C.; D'ABADIE, R.; PARGASS, I.; BASU, A.K.; ASGARALI, Z.; CHARLES, R.A.; GEORGES, K.C. Prospective study investigating transplacental transmission of equine piroplasmosis in thoroughbred foals in Trinidad. **Veterinary Parasitology**, v.226, p.132–137. 2016.

SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.R.; SANTOS, H. A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; MORAES, L.M.B.; ALMEIDA, F.Q; BALDANI, C.D.; MACHADO; R. Z.; MASSARD; C.L. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p.235-241, 2011.

SCHEIN, E.; REHBEIN, G.; VOIGT, W.P.; ZWEYGARTH, E. *Babesia equi* (Laveran 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. **Tropenmedizin und Parasitologie, Stuttgart**, v.32, n.4, p.223-227, 1981.

SCHEIN, E. Equine babesioses. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRS Press, p.197-208. 1988.

SCHMID, N.; DEPLAZES, P.; HOBY, S.; RYSER-DEGIORGIS, M.P.; EDELHOFER, R.; MATHIS, A. *Babesia divergens*-like organisms from free-ranging chamois (*Rupicapra r.rupicapra*) and roe deer (*Capreolus c. capreolus*) are distinct from *B. divergens* of cattle origin – an epidemiological and molecular genetic investigation. **Veterinary Parasitology**, v.154, p.14–20. 2008.

- SCHNITTGER, L.; RODRIGUES, A.E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; MORRISON, D.A. *Babesia*: A world emerging. Infection. **Genetics and Evolution**, v.12, p. 1788–1809. 2012.
- SCOLES, G.A.; HUTCHESON, H.J.; SCHLATER, J.L.; HENNAGER, S.G.; PELZEL, A.M.; KNOWLES, D.P. Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* Ticks, Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, p.1903 – 1905, 2011.
- SCOLES, G. A.; UETI, M. W. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. **Parasites & Vectors**, v.6, n.306, 2013.
- SEIXAS, W. (2015). “Pecuária: O peso econômico do cavalo”; *DM/Economia*. Disponível em <<https://www.dm.com.br/economia/2015/08/pecuaria-o-peso-economico-do-cavalo.html>>. Acesso em 19 de julho de 2017.
- SIGRIST, B. Obertragung von *Babesia equi* durch *Hyalomma anatolicum anatolicum* und *Rhipicephalus turanicus*. 1983. 58f. Tese (Doutorado). Hannover School of Veterinary Medicine, Hannover.
- SLOBODA, M.; JIRKU, M.; LUKĚSOVÁ, D.; QABLAN, M.; BATSUKH, Z.; FIALA, I.; HOŘÍN, P.; MODRÝ, D.; LUKEŠ, J. A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-Eastern Mongolia. **Veterinary Parasitology**, v.179, n.1-3, p.246–249, 2011.
- SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigation into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. **USA Department Agriculture Bureau Animal Industry**, v.1, n.1, p.177-304, 1893.
- SOULSBY, E.J.L. Protozoos. In: _____. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias em los Animales Domésticos**. 7. ed. México: Nueva Editorial Interamericana, p.513-823. 1987.
- SUDAN, V.; JAISWAL, A.K.; SRIVASTAVA, A.; SAXENA, A.; SHANKER, D. A rare clinical presentation of transplacental transmission and subsequent abortion by *Babesia (Theileria) equi* in a mare. **Journal of Parasitic Diseases**, v.39, n.2, p.336–338, apr-jun. 2015.
- SUMBRIA, D.; SINGLA, L.D.; KUMAR, S.; SHARMA, A.; DAHIYA, R.K.; SETIA, R. Spatial distribution, risk factors and haemato-biochemical alterations associated with *Theileria equi* infected equids of Punjab (India) diagnosed by indirect ELISA and nested PCR. **Acta Tropica**, v.155, p.104–112, 2016.
- THOMPSON, P.H. Ticks as vectors of equine piroplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.155, p.454–457, 1969.
- UETI, M.W.; MEALEY, R.H.; KAPPMAYER, L.S.; WHITE, S.N.; KUMPULA-McWHIRTER, N.; PELZEL, A.M.; GRAUSE, J.F.; BUNN, T.O.; SCHWARTZ, A.; TRAUB-DARGATZ, J.L.; HENDRICKSON, A.; ESPY, B.; GUTHRIE, A.J.; FOWLER, W.K.; KNOWLES, D.P. Re-Emergence of the Apicomplexan *Theileria equi* in the United States: Elimination of Persistent Infection and Transmission Risk. **Plos One**, v.7, n.9, p.1-6, sep. 2012.
- UILENBERG, G. *Babesia* – a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.1-2, p.3-10, 2006.

USDA-APHIS. A Literature Review of Equine Piroplasmosis. p. 1–50, 2010.

VIEIRA, M. I. B.; COSTA, M. M.; OLIVEIRA, M. T.; GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Serological detection and molecular characterization of piroplasmids in equids in Brazil. **Acta Tropica**. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.028>. 2017.

WEILAND, G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Veterinary Parasitology**, v.20, p.43-48, 1986.

WISE, L.N.; KAPPEMEYER, L.S.; MEALEY, R.H.; KNOWLES, D.P. Review of Equine Piroplasmosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, p.1334–1346, 2013.

YU, X.J.; ZHANG, X.F.; MCBRIDE, J.W.; ZHANG, Y.; WALKER, D.H. Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and “*Ehrlichia platys*” to other *Ehrlichia* species determined by GroEL amino acid sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1143- 1146, 2001.

ZAPF, F.; SCHEIN, E. New findings in the development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the salivary glands of the vector ticks, *Hyalomma* species. **Parasitology Research**, v.80, p.543-548, 1994.

ZAUGG, J.L.; LANE, V.M. Evaluations of buparvaquone as a treatment for equine babesiosis (*Babesia equi*). **American Journal Veterinary Research**, v.50, n.5, p.782-785, 1989.

ZAUGG, J.L. Babesiosis. In: SMITH, B.P., **Large Animal Internal Medicine**. St. Louis, Missouri, USA: Mosby Inc. p.1051-1055. 2002.

ZWEYGARTH, E.; AHMED, J.S.; REHBEIN, G. The effect of halofuginone, welcome 993c, oxytetracycline and diminazene diacetate on *Babesia equi* infected lymphoblastoid cell cultures. **Journal of Parasitology**, v.70, p.542-544, 1984.

ANEXOS

Anexo I - Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas do uso de animal.



Seropédica 13 de julho de 2015

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 003/2014 intitulado "MECANISMOS DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO DE *Theileria equi* E *Babesia caballi* POR CARRAPATOS EM EQUINOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO." encaminhado pelo Professor (a) do do Departamento de Parasitologia Veterinária, Carlos Luiz Massard. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 13 de julho de 2015, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Outras informações:

Vigência do projeto: 08/2015 a 08/2017
Espécie/linhagem: Bovino / Coelho / Equídeo
Nº de animais: 2 / 20 / 4
Sexo: Machos e Fêmeas
Origem: Os equinos e bovinos pertencem ao plantel de animais da Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O.NEITZ – IV – UFRRJ; Os coelhos serão obtidos do Setor de Cunicultura do Instituto de Zootécnica/ UFRRJ.


Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV


Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coordenador CEUA-IV