

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

**TESE**

**Agentes da Piroplasmose equina: variabilidade genética de**  
*Theileria equi* **e** *Babesia caballi* **em equinos naturalmente**  
**infectados do estado do Rio de Janeiro e a dinâmica da**  
**infecção de** *Theileria equi* **em** *Rhipicephalus (Boophilus)*  
*microplus*

**Maristela Peckle Peixoto**

2017



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

**AGENTES DA PIROPLASMOSE EQUINA: VARIABILIDADE  
GENÉTICA DE *Theileria equi* E *Babesia caballi* EM EQUINOS  
NATURALMENTE INFECTADOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
E A DINÂMICA DA INFEÇÃO DE *Theileria equi* EM *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus***

**MARISTELA PECKLE PEIXOTO**

*Sob a orientação do professor*  
**Carlos Luiz Massard**

*e Co-orientação dos Doutores*  
**Huarrisson Azevedo Santos**  
**Marcus Sandes Pires**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora em**  
**Ciências**, no Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias,  
Área de Concentração Parasitologia  
Veterinária.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P377a Peixoto, Maristela Peckle, 1986-  
Agentes da Piroplasmose equina: variabilidade genética de Theileria equi e Babesia caballi em equinos naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro e a dinâmica da infecção de Theileria equi em Rhipicephalus (Boophilus) microplus. / Maristela Peckle Peixoto. - 2017.  
133 f.: il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.  
Coorientador: Huarrisson Azevedo Santos.  
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2017.

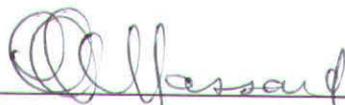
1. Diversidade genética. 2. Piroplasmose equina.  
3. Theileriose equina. 4. Transmissão transestadial.  
5. Transmissão transovariana. I. Massard, Carlos Luiz, 1947-, orient. II. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

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

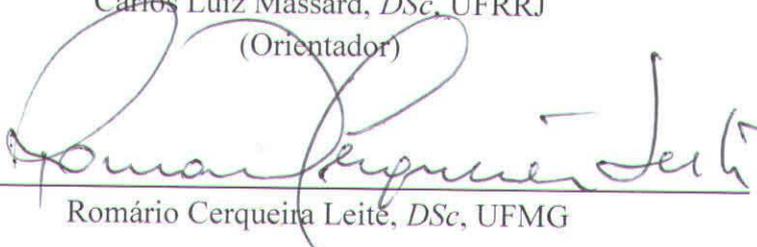
**MARISTELA PECKLE PEIXOTO**

Tese submetida para obtenção do grau de Doutora em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM: 22/02/17



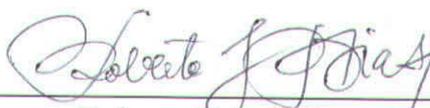
Carlos Luiz Massard, *DSc*, UFRRJ  
(Orientador)



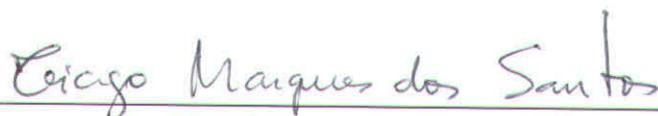
Romário Cerqueira Leite, *DSc*, UFMG



Marcelo Bahia Labruna, *DSc*, USP



Roberto Júnio Pedroso Dias, *DSc*, UFJF



Tiago Marques dos Santos, *DSc*, UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta obra Àquele que sempre me amparou e protegeu: Deus. Aos meus queridos pais: Gilnéa Peckle Peixoto e Carlos Alberto Dias Peixoto, os quais serei eternamente grata pelo esforço, dedicação e carinho. À minha irmã e companheira: Carla Peckle Peixoto pelo apoio. Ao meu querido sobrinho: Guilherme, pelos momentos de alegria. Aos amigos e familiares, que sempre estiveram comigo, me apoiando e incentivando em todas as etapas desta caminhada, compreendendo a minha ausência. Amo vocês!*

*“Se podes ser melhor do que és, é evidente que ainda não és tão bom como deves.”*  
Santo Agostinho



*“Sempre me rege, me guarda, me governa, me ilumina. Amém!”*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, e ao meu anjo da guarda, que sempre estiveram ao meu lado, me guiando e protegendo durante estes anos.

Aos meus pais, Carlos e Gilnéa, e a minha irmã, Carla, pelo apoio e amor, fundamentais para a concretização dos meus sonhos; aos meus padrinhos e demais familiares pelo incentivo.

Ao meu amor, Fábio Nicolau Gomes, que me acompanhou durante toda minha carreira acadêmica, me incentivando nos momentos de desânimo e compreendendo minha ausência. Um grande atleta, entusiasta pela vida e exímio informata, sempre me auxiliando nos problemas tecnológicos remotamente de onde estivesse no Brasil.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, minha segunda casa, a qual não me canso em admirar a beleza.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa durante o Doutorado e pelo suporte financeiro deste projeto. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Doutorado Sanduíche.

Ao meu orientador e “pai científico”, Prof. Dr. Carlos Luiz Massard, um exímio Parasitologista e pesquisador, que possui um “faro” científico único, por me apoiar e estar sempre presente, e por toda sua dedicação aos alunos e à esta Universidade.

Ao meu co-orientador e amigo, Prof. Dr. Huarrisson Azevedo Santos, grande idealizador e entusiasta na pesquisa científica, pela sua disponibilidade e humildade em compartilhar seu conhecimento.

Ao meu grande amigo e co-orientador Marcus Sandes Pires, pela excelente convivência em todos estes anos, “enfrentando” muitos problemas, mas também, tomando muito café, e dando muitas risadas. Teve um papel de grande importância em todas as etapas deste estudo.

Ao Prof. Dr. Argemiro Sanavria, por ter me guiado pelos caminhos da Parasitologia Animal e da pesquisa científica.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelos ensinamentos fundamentais para a realização desta obra, em especial a Prof<sup>ª</sup>. Teresa Cristina pela disponibilidade e auxílio e ao Prof. Douglas McIntoshi por suas contribuições em biologia molecular. Ao Professor Leandro Azevedo dos Santos (Departamento de Solos/IA) por suas contribuições em biologia molecular/clonagem e por sua disponibilidade.

À Prof. Dra. Cristiane Divan Baldani e suas alunas, Andresa Guimarães e Juliana Raimundo, pela excelente convivência, amizade e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal (DPA/IV-UFRRJ), minha casa por seis ótimos anos. E aos amigos Claudia Bezerra da Silva, Renata Lins da Costa, Gabriela Lopes Vivas Vitari e Ana Paula Martinez, que me acompanharam durante estes anos na realização deste trabalho, mas também tornaram a rotina laboratorial prazerosa e leve. À amiga Joice Vilela, que pertencia à equipe e em muito me auxiliou nas disseções e início da fase experimental. Aos estagiários e bolsistas Nelson Meireles, Larissa Amorim, Monique Davel, Tays Araujo e Sara Helena que sempre se dedicaram nas coletas de amostras biológicas e na lida com os animais experimentais. Agradeço muito a oportunidade de ter convivido com todos vocês, meus amigos! À Técnica Daniela Coelho e Josemar Gonçalves, por seu apoio dentro e fora do laboratório e ao funcionário Mauro Sergio Pereira Nunes pelo auxílio na lida diária com os animais experimentais. Aos amigos do LASAVE.

Agradeço ao Canadá, país que abriu as portas para meu aprendizado e concedeu todo o suporte financeiro na etapa deste estudo que envolveu o gene *rap-1* de *Babesia caballi*. Ao meu Orientador Alvin Gajadhar e Co-orientador Vladslav Lobanov, do Canadian Food Inspection Agency (CFIA), por me darem todo suporte necessário no tempo e que estive no Canadá, na ocasião do Doutorado Sanduíche. Profissionais sempre dispostos a ensinar e ajudar no que fosse necessário. À toda a equipe do CFIA, especialmente aos técnicos Patrick Fries, Garry MacDonald e Yunxiu Dai e aos pesquisadores Batol Al-Adhami e Brad Scandrett, pelo apoio com as questões laboratoriais e ótima convivência em âmbito profissional. À querida Rose Olsen, Marylin Kuhn e Brian Kuhn por serem meus “pais Canadenses” no tempo em que estive em Saskatoon, Saskatchewan. Exemplos de pessoas humanas, corretas e amorosas, as quais tive a oportunidade de conviver por seis lindos meses. E aos amigos, mais chegados que irmãos, Patrícia Tozatti, Vinícius Nonato Bezzon, Alessandra Fernandes e Raquel Romay que tornaram minha experiência em Saskatoon inesquecível!

À Dra. Jacenir dos Santos Mallet Pesquisadora responsável pelo Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, que nos abriu as portas para a realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth do IOC, FIOCRUZ, acreditou e nos deu todo o apoio necessário na realização desta etapa do estudo de *Theileria equi*. À Dra. Simone Freitas e ao técnico Roger Magno, pelo auxílio na análise das amostras.

À Pesquisadora Patricia Rosa de Oliveira, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP/ Rio Claro, pelo auxílio com a análise das imagens de MET.

Ao Professor Roberto Junio Pedroso Dias e ao Doutor Marcus Senra, da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo auxílio com as análises filogenéticas.

À equipe do Laboratório de Controle Microbiano (LCM), pela companhia, amizade e por terem concedido as teleógenas para o início da colônia.

Aos amigos queridos do PPGCV, em especial à Letícia Poblete, Fabiano Paschoal e Viviane Zeringotá, pelo companheirismo.

Às colegas de profissão e amigas, Viviane Garrido e Roberta Rose, pela oportunidade, confiança e aprendizado, fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Às colegas de profissão e amigas Dayanne Melo e Thalita Xavier, que moraram comigo durante alguns anos, pela excelente convivência, companheirismo e amizade.

Aos animais, principal motivo das minhas escolhas acadêmicas e minha grande paixão desde sempre, aos quais devo meu respeito e minha gratidão.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## BIOGRAFIA

Maristela Peckle Peixoto, filha de Gilnéa Peckle Peixoto e Carlos Alberto Dias Peixoto, nasceu em 27 de junho de 1986, na cidade de São João de Meriti, estado do Rio de Janeiro. Iniciou o ensino fundamental no Colégio Santa Maria, localizado em São João de Meriti, dando continuidade no Colégio Santo André, em São José do Rio Preto, São Paulo e retornando para o primeiro onde concluiu o ensino fundamental. Iniciou o Ensino Médio e Técnico em Administração de Empresas na FAETEC João Luiz do Nascimento, localizado em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, local onde concluiu o Ensino Médio em 2004.

No ano de 2006 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), concluindo o curso no segundo semestre de 2010.

Durante a graduação realizou estágios na área de Clínica médica no Hospital Veterinário de Grandes Animais (HVGGA), assim como no Laboratório de Doenças Parasitárias no Instituto de Veterinária, e Laboratório de criação de Dípteros da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O.Neitz, na UFRRJ. Participou de diversos projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública.

Entre os anos de 2007 e 2008, foi bolsista de Extensão Rural, trabalhando questões da etnobotânica sobre o uso de plantas medicinais na promoção da saúde animal em dois assentamentos rurais localizados em Seropédica.

Foi bolsista de Iniciação Científica (Pibic/Balcão - CNPq), entre os anos de 2009 e 2010. O projeto consistia no controle de *Haematobia irritans* utilizando-se compostos orgânicos e artificiais em sistema de produção convencional de bovinos de aptidão leiteira, localizado na Pesagro - EMBRAPA.

Fez estágio externo em laboratório de Patologia Clínica comercial, no Centro de Exames Laboratoriais Veterinários (CELV), por 1.140 horas, realizando exames coproparasitológicos, pesquisa de hemoparasitos e identificando ectoparasitos de importância Médico Veterinária.

Em março de 2011 ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Parasitologia Veterinária, ao nível de Mestrado, da UFRRJ, sendo contemplada com Bolsa do CNPq. Seu objetivo principal foi avaliar os fatores de risco associados à positividade de *Theileria equi* no rebanho de equinos do Rio de Janeiro. O grau de Mestre em Ciências Veterinárias foi alcançado em 2013.

Neste mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado no PPGCV com o projeto de realizar um estudo experimental de *Theileria equi* em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um estudo filogenético com o gene *18S rRNA* de *T. equi* e um estudo da variabilidade do gene *rap-1* de *Babesia caballi*, sendo contemplada com bolsa do CNPq. Durante os anos do curso de Doutorado, cursou diversas disciplinas como Bioinformática, na FIOCRUZ, “Bioinformatic Methods I” na University of Toronto e o “Ferramentas de bioinformática aplicadas às análises de sequências transcriptômicas”, no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC/Petrópolis).

No início de 2015, por excelência acadêmica, foi contemplada com a bolsa FAPERJ Nota 10. Em meados de 2015, foi contemplada pela CAPES com bolsa para ingressar no programa de Doutorado Sanduíche no Canadian Food Inspection Agency, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, sob supervisão de Dr. Alvin Gajadhar e Dr. Vladislav Lobanov, onde permaneceu por seis meses realizando um estudo da variabilidade do gene *rap-1* de *B. caballi* com amostras brasileiras.

Entre os anos de 2013 e 2017, participou de diversos projetos de dissertação e tese do laboratório de Hemoparasitos e Vetores, localizado na Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O.Neitz.

## RESUMO GERAL

PEIXOTO, Maristela Peckle. **Agentes da Piroplasmose equina: variabilidade genética de *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro e a dinâmica da infecção de *Theileria equi* em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** 2017. 133p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar molecularmente *Theileria equi* e *Babesia caballi* de amostras de equinos do Rio de Janeiro, bem como realizar um estudo da dinâmica da infecção de *T. equi* em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. No primeiro capítulo realizou-se a caracterização molecular de um fragmento do gene *rap-1* de *B. caballi* e a análise do grau de heterogeneidade do gene *18S rDNA* em *T. equi* em amostras de equinos naturalmente infectados, do estado do Rio de Janeiro. Foram obtidas vinte sequências do gene *18S rDNA* de *T. equi*. As análises filogenéticas foram realizadas baseadas no ARB-Silva. Para a caracterização molecular de um fragmento do gene *rap-1* de *B. caballi* foram utilizadas amostras positivas por cELISA e qPCR. Uma nested PCR foi desenvolvida para amplificar um fragmento do gene *rap-1*, e uma PCR convencional, para o gene completo. As sequências de aminoácidos e nucleotídeos sequenciados foram submetidas ao método Maximum-Likelihood. Na análise das sequências do *18S rDNA* de *T. equi*, doze diferentes isolados foram observados em equinos no estado do Rio de Janeiro, sendo agrupados em dois dos três clados formados (I, II). As sequências de *T. equi* se agrupam dentro de um clado diferente dos demais Theilerídeos. Uma das 23 sequências de aminoácidos do gene *rap-1* apresentou doze pontos de mutação. Na análise de agrupamentos, as amostras brasileiras agruparam no clado A, sendo estas analisadas como aminoácidos (152 aas) ou nucleotídeos (1244 pb). No segundo capítulo foram avaliados aspectos da dinâmica da infecção de *T. equi* em *R. (B.) microplus* alimentados em equino cronicamente infectado. Larvas de uma colônia livre de hemoparasitos foram utilizadas. Carrapatos e sangue do equino foram coletados de dois em dois dias. Os carrapatos foram dissecados e armazenados inteiros em “pools” de acordo com o dia pós-infestação, estágio evolutivo e gênero. Amostras de glândula salivar e ovário foram armazenados para Microscopia Eletrônica de Transmissão. As amostras foram testadas pela qPCR. Com relação aos carrapatos inteiros, mais de 90% das amostras foram positivas para *T. equi*. A carga parasitária média das amostras de carrapatos inteiros e glândulas salivares apresentaram aumento gradual com o avançar do período de alimentação. Das 45 amostras de glândula salivar, 77,78% foram positivas para *T. equi* e tiveram maior taxa de infecção no final do período experimental. Foi possível observar positividade em carrapatos recém emergidos, ninfas e adultos, indicando a ocorrência de transmissão transestadial. A positividade de amostras de ovários foi de 84,38%. A maior permanência de machos sobre o equino, associado à alta positividade deste tipo de amostra indicam que o macho pode ter participação significativa na transmissão. Visualizaram-se estruturas morfológicamente compatíveis com um piroplasma através de micrografia de transmissão em ovários e glândulas salivares de em *R. (B.) microplus*. A análise do gene *18S rDNA* de *T. equi* e do gene *rap-1* de *B. caballi* de amostras brasileiras demonstrou que diferentes isolados coexistem na mesma área. Experimentalmente, observou-se que *R. (B.) microplus* é capaz de se infectar com *T. equi* e que as formas multiplicam-se nas glândulas salivares e, possivelmente, em ovários.

**Palavras-chave:** Diversidade genética, piroplasmose equina, theileriose equina, transmissão transestadial, transmissão transovariana.

## GENERAL ABSTRACT

PEIXOTO, Maristela Peckle. **Equine Piroplasmosis: genetic diversity of *Theileria equi* and *Babesia caballi* of naturally infected horses from the state of Rio de Janeiro and the dynamics of *Theileria equi* infection in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2017. 133p. Thesis. (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2017.

This study aimed to perform the molecular characterization of the *B. caballi rap-1* gene and to analyze the degree of heterogeneity of the *T. equi 18S rDNA* gene of naturally infected horses in the state of Rio de Janeiro. Complete sequences of the *T. equi 18S rDNA* gene (n = 20) were obtained. The PCR products were cloned and sequenced. Phylogenetic analyzes were performed on ARB-Silva basis. For the molecular characterization of a fragment of the *B. caballi rap-1* gene, 32 cELISA and qPCR positive equine samples were used. A nested PCR was developed to amplify a fragment of the *rap-1* gene and a conventional PCR, aiming the amplification of the complete gene. The products were sequenced. Sequences were submitted to the Maximum-Likelihood reconstruction method with Poisson model and 1000 replicates. In the analysis of *T. equi*, twelve different isolates were observed in equines from the state of Rio de Janeiro and were grouped into two of the three clades formed (I, II), most of them grouped in clade I (70%, n = 14/20). The sequences of *T. equi* are grouped within a clade different from other Theilerids. It was possible to amplify a fragment of the *B. caballi rap-1* gene from 23 sequences using nested PCR, identified as single sequences. One of the sequences showed twelve mutation points. In cluster analysis, the Brazilian samples belonged to clade A, being analyzed as amino acids (152a) or nucleotides (1244 bp). The aim of the second chapter was to evaluate the dynamic of infection of *T. equi* in *R. (B.) microplus* fed in chronically infected horses. The larvae obtained from a hemoparasite-free colony were used in the infestation of an equine chronically infected by *T. equi*. Ticks and the horse blood were collected every two days. Ticks were dissected and stored in pools according to the post-infestation day, evolutionary stage and gender. Some of these specimens were stored entire. Salivary gland and ovary samples were stored properly for Transmission Electron Microscopy. Some stages, prior to ecdysis, were stored in B.O.D. to molt. Samples were tested by qPCR. Regarding to entire tick samples, more than 90% of the samples were positive for *T. equi*. The mean of parasite load in entire ticks and salivary glands presented gradual increasing with the progress of the feeding period. Of the 45 salivary gland samples, 77.78% were positive for *T. equi* and had a higher infection rate at the end of the experimental period. It was found freshly molted ticks positives for *T. equi* by qPCR, indicating transtadial transmission. 84,38% of *R. (B.) microplus* ovary samples were considered positives for *T. equi* by molecular tools. Males of *R. (B.) microplus* were found parasiting the equine for 60 days. This fact associated with the high positivity for *T. equi* indicates males as an epidemiologically important gender. Transmission micrographs revealed morphologic structures compatible with a Piroplasmid in the acini of salivary glands and ovaries. The phylogenetic analysis of the *T. equi 18S rDNA* gene and of *B. caballi rap-1* gene showed that different isolates co-exist in the same area in Rio de Janeiro, Brazil. Experimentally, it was possible to observe that *R. (B.) microplus* could be infected with *T. equi* and that the forms of development of this parasite are capable of multiply inside salivary glands and, possibly, ovaries.

**Keywords:** Genetic diversity, equine piroplasmosis, equine teileriosis, transtadial transmission, transovarian transmission.

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

A	Adenina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COMEP	Comitê de Ética na Pesquisa
Cq	“quantification cycle”
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
DPI	Dias pós infestação
dUTP	desoxiuridina trifosfato
dTTP	desoxitimina trifosfato
EDTA	ácido etileno-amino-tetracético
EP	erro padrão
EUA	Estados Unidos da América
FAM	6-carboxifluoresceína
G	Guanina
IC	Intervalo de Confiança
LHV	Laboratório de Hemoparasitos e Vetores
E.P.P.W.O. Neitz	Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz
Mab	Anticorpo monoclonal (“Monoclonal antibody”)
MPSp	“Major Piroplasms Surface Protein”
nPCR	nested PCR
P	p-valor
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	pares de base
PE	Piroplasmose equina
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
rDNA	ácido desoxirribonucleico ribossomal
RE	recém emergidos
RNA	ácido ribonucleico
SINA	“Silva Incremental Aligner”
TAMRA	tetrametilrodamina
Tm	temperatura de dissociação
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
µL	microlitro
°C	Celsius

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Nome, sequência, tamanho, temperatura de “Melting”, posição no gene e tamanho do produto amplificado dos “primers” desenhados para amplificação do gene *rap-1* completo de *Babesia caballi* em amostras brasileiras..... 21
- Tabela 2.** Nome, sequência, tamanho, temperatura de “Melting” e tamanho do produto amplificado dos “primers” desenhados para amplificação do gene *rap-1* completo de *Babesia caballi* em amostras brasileiras..... 22
- Tabela 3.** Amostras de sangue de equinos consideradas positivas para *Theileria equi* pelo método de PCR em tempo real segundo Kim et al. (2008), escolhidas para amplificação do gene *18S rDNA* completo à partir do ciclo de quantificação considerado baixo..... 25
- Tabela 4.** Número de animais positivos e negativos e percentual de positividade na PCR em tempo real e cELISA para *Babesia caballi*..... 31
- Tabela 5.** Porcentagem de identidade das sequências de aminoácidos preditos do gene *rap-1* de *Babesia caballi* e o número de pontos de mutação de aminoácidos não sinônima entre isolados do Brasil, Porto Rico, Egito, Israel e África do Sul em relação à amostra USDA..... 36
- Tabela 6.** Identificação da amostra neste estudo, local de origem da amostra, tamanho do *contig* após sequenciamento, número de identificação de depósito no GenBank e característica da sequência depositada..... 38

### CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Análise descritiva da carga de parasitos e o percentual de positividade obtidos a partir da detecção molecular de *Theileria equi* por qPCR, em amostras de “pools” de carrapatos inteiros da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de acordo com o estágio/gênero do artrópode..... 84
- Tabela 2.** Carga de parasitos obtidos a partir da detecção molecular por qPCR de *Theileria equi*, em amostras de “pools” de carrapatos inteiros da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* independente do gênero e do estágio de desenvolvimento do artrópode..... 85
- Tabela 3.** Carga média de parasitos obtidos a partir da detecção molecular por qPCR de *Theileria equi*, em amostras de “pools” de carrapatos inteiros ninfas, machos e fêmeas da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante o período de infestação experimental..... 86
- Tabela 4.** Análise descritiva dos valores da carga média de parasitos obtidos a partir do resultado da qPCR para o diagnóstico de *Theileria equi*, em amostras de “pools” de glândula salivar de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante os três períodos da infestação experimental..... 89

<b>Tabela 5.</b>	Análise descritiva dos valores da carga média de parasitos obtidos a partir da detecção molecular por qPCR de <i>Theileria equi</i> , em amostras de “pools” de intestino de carrapatos da espécie <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> durante o período de infestação experimental.....	90
<b>Tabela 6.</b>	Análise descritiva dos valores de carga parasitária obtidos a partir da detecção molecular por qPCR de <i>Theileria equi</i> , em amostras de “pools” de glândula salivar e intestino de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> em função do gênero do carrapato adulto durante o período experimental.....	92
<b>Tabela 7.</b>	Análise descritiva dos valores de carga parasitária obtidos a partir da detecção molecular por qPCR de <i>Theileria equi</i> , em amostras de “pools” de glândula salivar de fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> em função do período experimental.....	92
<b>Tabela 8.</b>	Análise descritiva dos valores médio da carga parasitária de <i>Theileria equi</i> obtidos a partir da detecção molecular por qPCR, em amostras de “pools” de ovários de carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> positivos durante o período de infestação experimental.....	100

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO I

- Quadro 1.** “Primers” utilizados no sequenciamento do gene *18S rDNA* completo, segundo Bhoora et al. (2009) ..... 28

### CAPÍTULO II

- Quadro 1.** Número de exemplares que compunham as amostras de carrapatos analisadas em “pools” para avaliação da capacidade de transmissão transtadial e transovariana de *Theileria equi* por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*..... 74
- Quadro 2.** Número de exemplares que compunham as amostras de carrapatos e tecidos analisadas em “pools” para avaliação da dinâmica de infecção de *Theileria equi* por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*..... 75

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I

- Figura 1.** Representação da posição dos pares de *primers* desenhados para amplificar sequências do gene *rap-1* de *Babesia caballi* de isolados brasileiros, baseado em isolados dos EUA e África do Sul..... 21
- Figura 2.** Representação da posição dos pares de “primers” segundo Bhoora et al. (2009) para amplificar sequências do gene *rap-1* de *Babesia caballi* de isolados brasileiros, baseado em isolado do USDA..... 22
- Figura 3.** Demonstração da técnica de cultivo e seleção de bactérias *Escherichia coli* transformadas após inserção do gene *18S rDNA* de *Theileria equi*. Em A, observam-se as colônias azuis, onde houve a expressão de  $\beta$ -galactosidase, e as colônias brancas, as quais contém o inserto esperado no plasmídeo. Em B, é possível observar a seleção das colônias brancas mais isoladas..... 27
- Figura 4.** Seis colônias de cada amostra foram selecionadas para crescimento, teste da presença do inserto e correta transformação da bactéria. Assim, cada colônia branca foi cultivada em separado em meio LB sólido e utilizada como *template* em uma PCR teste. Em A, adição das bactérias para reação de PCR teste no momento da seleção das colônias. Em B, seis colônias selecionadas da amostra n°15 após 48 horas de crescimento à 37 °C em estufa bacteriológica..... 28
- Figura 5.** Representação esquemática dos *primers* utilizados no sequenciamento do gene *18S rDNA* completo de *Theileria equi* de isolados brasileiros. Nas pontas 5' e 3', encontram-se os *primers* empregados na amplificação do gene completo..... 29
- Figura 6.** Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação obtidos a partir da utilização dos “primers” RAP1-F2/RAP1-R2 na segunda reação da nested PCR. Os “primers” utilizados na primeira reação foram RAP1-F1/RAP1-R1. PM: peso molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder; C-: controle negativo da reação; 1: amostra positiva RJ9; 2: amostra positiva RJ79; 3: amostra positiva RJ81; 4: amostra positiva RJ84. Todas as amostras foram testadas em duplicata. A seta indica o produto de amplificação com tamanho esperado de 482 pb..... 32
- Figura 7.** Dendograma de 15 sequências de nucleotídeos de um fragmento do gene *rap-1* de *Babesia caballi* através do método de Maximum Likelihood de reconstrução de árvore com distâncias de emparelhamento estimadas pelo modelo Tamura-Nei, com 1000 replicatas no teste de “Bootstrap”. No conjunto de dados final, utilizou-se 1244 pb..... 33
- Figura 8.** Dendograma de sequências de aminoácidos determinada a partir de um fragmento do gene *rap-1* de *Babesia caballi* através do método de Maximum likelihood de reconstrução de árvore com distâncias de emparelhamento estimadas pelo método de “Poisson”, com 1000 replicatas 34

no teste de “Bootstrap”. No conjunto de dados final utilizou-se 152 aminoácidos.....

- Figura 9.** Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação obtidos a partir do gene *18S rDNA* completo de *Theileria equi* nas colônias brancas selecionadas após transformação das células DH5 $\alpha$ . PM: 1Kb Plus Ladder (Thermo Scientific); 1.1-6.3: colônias testadas. A seta indica o produto de amplificação de aproximadamente 1600 pb..... 37
- Figura 10.** Gel de agarose (1,5%) com a confirmação da presença do inserto no DNA plasmidial da célula transformada de algumas das amostras testadas, demonstrando padrões de bandas de 765 pb, 1849 pb e 2009 pb (1, 2, 4, 5, 7) com o inserto na posição 5’-3’ e 765 pb, 1119 pb e 2739 pb (3, 6) com o inserto na posição 3’-5’. PM: 1Kb Plus Ladder (Thermo Scientific)..... 38
- Figura 11.** Árvore filogenética de máxima verossimilhança de Piroplasmida baseada na informação da sequência do gene *18S rDNA*. As sequências obtidas neste trabalho são apresentadas em negrito. Os valores de “Bootstrap” são apresentados perto dos nós da árvore. A barra representa uma substituição a cada 100 bases no alinhamento. *Cardiosporidium cionae* e *Nephromyces* sp. foram utilizados como “outgroups” para a raiz da árvore..... 41

## CAPITULO II

- Figura 1.** Formas morfológicas de *Theileria equi* no interior de eritrócitos no hospedeiro vertebrado. Em A, ilustração em prancha desenhada por Nuttall e Strickland (1912) mostrando as formas amebóides, redondas, em gota e em tétrede assumidas por *T. equi* durante a infecção no equino. Em B, a clássica tétrede de *T. equi* no interior de um eritrócito de equino cronicamente infectado (arquivo pessoal). Em C, micrografia eletrônica de transmissão de linfócito de equino infectado contendo merozoítos maduros e em desenvolvimento, segundo Mehlhorn; Schein (1998)..... 64
- Figura 2.** Imagens de formas evolutivas de *Theileria equi* no intestino do carrapato vetor segundo Mehlhorn; Schein (1998). Em A, gametas com alguns raios (“corpos raiados”). Em B, fusão de dois gametas formando o zigoto..... 64
- Figura 3.** Representação esquemática da formação do cineto dentro das células intestinais de carrapatos pós-alimentação em hospedeiro infectado com parasitos do gênero *Theileria*. O desenvolvimento do cineto resulta do crescimento do zigoto dentro do vacúolo. a: um zigoto; b: protusão do vacúolo adjacente ao núcleo; c: aparecimento de novas membranas; d: cineto formado. DK: cineto desenvolvendo; DW: organela com dupla membrana (mitocôndria?); FB: corpo filamentar; IIM: interrupção da membrana interna; IM: membrana interna; LM: membrana limitante; MN: micronema; OM: membrana externa; P: anel polar; PE: película; PP: anel polar posterior; RB: corpo residual; V: vacúolo; ZY: zigoto. Segundo Mehlhorn & Schein, 1985..... 65
- Figura 4.** Desenvolvimento de parasitos do gênero *Theileria* em ácidos da glândula

salivar de um carrapato infectado. e-f: o cineto maduro, após penetrar na célula hospedeira é imediatamente englobado pelo citoplasma. g: longas fitas de material nuclear são formadas. h: finalmente, o parasito divide-se em citômeros de vários tamanhos na superfície de cada esporozoítos, sendo transmitidos na próxima alimentação do carrapato vetor. Segundo Mehlhorn & Schein, 1985. BM: membrana basal; DH: citoplasma degenerado da célula hospedeira; DS: esporozoíto em desenvolvimento; ENH: núcleo aumentado da célula hospedeira; ER: retículo endoplasmático; HC: citoplasma célula hospedeira; IM: membrana interna; LH: membrana limitante da célula hospedeira; MIH: mitocôndria células hospedeira; MP: microporo; NH: núcleo da célula hospedeira; OM: membrana externa; P: anel polar; R: roptria; S: esporozoíto.....

66

**Figura 5.** Dinâmica do ciclo de vida de *Theileria equi* segundo Mehlhorn & Schein (1998). Em 1, inoculação do esporozoíto em equino livre de infecção; em 2-3, infecção de linfócito e primeira merogonia; em 4-5, infecção em eritrócitos e merogonia; em 6, microgametócitos/macrogametócitos; em 6, infecção do carrapato vetor pelos gametócitos durante o repasto sanguíneo; em 7-8-9-10-11, formação do zigoto (11) a partir de corpos raiados/microgametócito (7-10) e macrogametócito (6a-6b) no intestino do carrapato; Em 12-16, desenvolvimento do cineto móvel que deixa o intestino e ganha à hemolinfa; Em 17-18, penetração do cineto na glândula salivar e multiplicação por esporogonia, formando os esporozoítos, forma infectante para o equino.....

67

**Figura 6.** Representação esquemática das possíveis formas de transmissão da Piroplasmose equina ao hospedeiro vertebrado. Em A, legenda sobre os estágios de vida do carrapato vetor. Em B, transmissão intraestadial, onde a aquisição e transmissão do piroplasma ocorre no mesmo estágio do carrapato. Em C, a aquisição pelo carrapato ocorre em um estágio e a transmissão do protozoário ocorre no estágio seguinte, chamada de transmissão transestadial.....

68

**Figura 7.** Demonstração da distribuição das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* proveniente de colônia livre de hemoparasitos durante a infestação em equino cronicamente infectado por *Theileria equi*. Em A, infestação no dorso do equino; em B, infestação da crina.....

72

**Figura 8.** Esquema de coleta e métodos de avaliação da transmissão transestadial de *Theileria equi* por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas de colônia infectada. A= amostras submetidas à PCR em tempo real. RE= recém emergidas em B.O.D.....

73

**Figura 9.** Esquema de coleta e métodos de avaliação da possibilidade de transmissão transovariana de *Theileria equi* por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas de colônia infectada e transmissão transestadial na segunda geração da colônia infectada. A= amostras submetidas à PCR em tempo real. B= amostras submetidas à Microscopia Eletrônica de Transmissão.....

74

<b>Figura 10.</b>	Infestação de coelho da raça Nova Zelândia com larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> oriundas de colônia infectada por <i>Theileria equi</i> , segundo Neitz et al. (1971).....	75
<b>Figura 11.</b>	Dissecção de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> fêmea jovem. Em A, demonstração da fixação do ixodídeo rebatido em parafina preta. Em B, os órgãos internos do carrapato já em processo de separação. Seta branca: glândula salivar; ponta de seta: intestino; seta sem preenchimento: ovário imaturo.....	76
<b>Figura 12.</b>	Equino cronicamente infectado por <i>Theileria equi</i> apresentando reação de hipersensibilidade cutâneas dias após a infestação experimental por larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	81
<b>Figura 13</b>	Curva padrão obtida a partir de diluições decimais seriadas ( $10^5$ cópias até 10 cópias) do DNA plasmidial contendo a sequência da porção 18S do DNA ribossomal de <i>Theileira equi</i> . Em <b>A</b> – Curva padrão construída na presença do DNA total da glândula salivar do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> livre de infecção e do Controle Interno Exogeno (CIE). <b>B</b> = Curva padrão construída na presença do DNA total do carrapato inteiro <i>R.(B.) microplus</i> livre de infecção e do CIE. <b>C</b> = Curva padrão construída na presença do DNA total do ovário obtido do carrapato <i>R.(B.) microplus</i> livre de infecção e do CIE. <b>D</b> = Curva padrão construída na presença do DNA total do intestino obtido do carrapato <i>R.(B.) microplus</i> livre de infecção e do CIE. <b>E</b> = Curva padrão construídas apenas com o DNA plasmidial de <i>T. equi</i> na presença do CIE. <b>F</b> = Curva padrão construídas apenas com o DNA plasmidial de <i>T. equi</i> na ausência do CIE.....	83
<b>Figura 14.</b>	Frequência de positividade de amostras de glândula salivar (A) e intestino (B) de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> adultos para <i>Theileria equi</i> através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao gênero do carrapato. O teste exato de Fisher foi utilizado na comparação destas frequências de positividade.....	87
<b>Figura 15.</b>	Frequência de positividade de amostras de glândula salivar (A) e intestino (B) de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> adultos para <i>Theileria equi</i> através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao gênero e fase de desenvolvimento do carrapato. O teste exato de Fisher foi utilizado na comparação destas frequências de positividade.....	88
<b>Figura 16.</b>	Frequência de positividade de amostras de glândula salivar (A) e intestino (B) de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> do grupo adultos recém emergidos em B.O.D. e adultos para <i>Theileria equi</i> através da técnica de PCR em tempo real, em relação à fase de desenvolvimento do carrapato adulto. O teste exato de Fisher foi utilizado na comparação destas frequências de positividade.....	88
<b>Figura 17.</b>	Frequência de positividade de amostras de glândula salivar (A) e intestino (B) de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> adultos para <i>Theileria equi</i> através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao período ao período	89

	pós-infestação em dias. O teste exato de Fisher foi utilizado na comparação destas frequências de positividade.....	
<b>Figura 18.</b>	Frequência de positividade de amostras de glândula salivar de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> adultos machos (A) e fêmeas (B) para <i>Theileria equi</i> através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao período pós-infestação em dias. *quando o n amostral $\leq 5$ , o teste estatístico exato de Fisher não foi realizado.....	91
<b>Figura 19.</b>	Frequência de positividade de amostras de intestino de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> adultos machos (A) e fêmeas (B) para <i>Theileria equi</i> através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao período pós-infestação em dias. *quando o n amostral $\leq 5$ , o teste estatístico exato de Fisher não foi realizado.....	91
<b>Figura 20.</b>	Valores de Log da carga de parasitos média de <i>Theileria equi</i> das amostras de “pool” de glândula salivar e intestino de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> adulto pela técnica de PCR em tempo real, no decorrer do período experimental em dias.....	93
<b>Figura 21.</b>	Micrografias eletrônicas das glândulas salivares de ninfas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> no 11° dia pós-infestação, infectadas com <i>Theileria equi</i> . A: grupo de parasitos no interior de vacúolos parasitóforos em processo de divisão assexuada formando labirintos com o citoplasma na célula hospedeira. B: parasitos no interior de vacúolos parasitóforos na periferia das células acinares. C: corte transversal do parasito multinucleado. Esporoblastos de <i>T. equi</i> (cabeça de seta). Retículo endoplasmático (*); mitocôndrias (**)......	95
<b>Figura 22.</b>	Micrografia eletrônica das glândulas salivares de ninfas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> no 11° dia pós-infestação, infectadas com <i>Theileria equi</i> . Corte transversal dos parasitos na periferia do ácino da glândula salivar, evidenciando os labirintos formados pelo parasito em divisão na célula hospedeira (cabeça de seta).....	96
<b>Figura 23.</b>	Micrografia eletrônica do ácino da glândula salivar de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> macho coletado no 21° dia pós-infestação contendo formas evolutivas de <i>Theileria equi</i> em multiplicação no interior de célula no ácino tipo III (cabeça de seta). A: grupo de parasitos no interior de vesículas de secreção. B: parasitos no interior de vesículas de secreção em maior aumento.....	97
<b>Figura 24.</b>	Micrografia eletrônica do ácino da glândula salivar de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> macho coletado no 25° dia pós-infestação contendo as formas evolutivas de <i>Theileria equi</i> em multiplicação no interior de vesículas de secreção (cabeça de seta). A: grupo de parasitos no interior de vesículas de secreção. B: parasitos no interior de vesículas de secreção em maior aumento. C: vacúolos envolvidos por membrana dentro de algumas formas de <i>T. equi</i> (*)......	98
<b>Figura 25.</b>	Frequência de positividade de amostras de ovário de <i>Rhipicephalus</i>	

	<i>(Boophilus) microplus</i> para <i>Theileria equi</i> através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao período experimental.....	99
<b>Figura 26.</b>	Valores da carga média <i>Theileria equi</i> nas amostras de “pool” de ovário de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> pela técnica de PCR em tempo real, no decorrer do período experimental em dias.....	100
<b>Figura 27.</b>	Frequência de positividade de amostras de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> para <i>Theileria equi</i> através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao dia pós-postura (DPP) das fêmeas ingurgitadas.....	101
<b>Figura 28.</b>	Valores médios da carga de parasitos em amostras de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> positivas para <i>Theileria equi</i> pela técnica de PCR em tempo real, em relação ao dia pós-postura das fêmeas ingurgitadas.....	101
<b>Figura 29.</b>	Frequência de positividade de amostras de ovários e ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> para <i>Theileria equi</i> através da técnica de PCR em tempo real.....	102
<b>Figura 30.</b>	Frequência de positividade de amostras de ovário, ovos, larvas, ninfas e adultos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> para <i>Theileria equi</i> através da técnica de PCR em tempo real. Larvas, ninfas e adultos foram alimentados em coelhos e foram originados de ovos de colônia positiva.....	103
<b>Figura 31.</b>	Micrografia eletrônica do ovário de fêmea jovem de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> retirada do equino no 19° dia pós-infestação contendo formas evolutivas indicadas como <i>Theileria equi</i> (cabeça de seta) neste estudo. A: formas arredondadas e ovoides. B: formas alongadas. C: formas de multiplicação binária do parasito dentro de uma região de halo vacuolar. D: formas de multiplicação binária.....	104
<b>Figura 32.</b>	Micrografia eletrônica do ovário de fêmea jovem de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> retirada do equino no 25° dia pós-infestação contendo as formas evolutivas indicadas como <i>Theileria equi</i> (cabeça de seta) neste estudo. A: formas arredondadas e ovoides. B: parasito delimitado por região vacuolar e membrana interna (*). C: formas arredondadas, ovoides e alongadas do parasito, sendo a forma alongada apresentado área de constrição.....	106
<b>Figura 33.</b>	Micrografia eletrônica do ovário de fêmea jovem de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> retirada do equino no 33° dia pós-infestação contendo as formas evolutivas de <i>Theileria equi</i> . A: diversas formas de multiplicação do parasito dentro de vacúolos parasitóforos (cabeça de seta). B e C: detalhe do parasito dentro de vacúolos parasitóforos.....	107
<b>Figura 34.</b>	Micrografia eletrônica do ovário de fêmea jovem de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> retirada do equino no 33° dia pós-infestação contendo as formas evolutivas indicadas como <i>Theileria equi</i> neste estudo.	

A: diversas formas de multiplicação do parasito dentro de vacúolos parasitóforos e formas similares à esporozoítos fora dos vacúolos parasitóforos (cabeça de seta). B: diversas formas similares à esporozoítos em processo de maturação (cabeça de seta)..... 108

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>7</b>
Variabilidade genética de <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia caballi</i> em equinos naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	9
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
2.1 Perspectiva Histórica sobre a Piroplasmose Equina .....	12
2.2 Posição Taxonômica de <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia caballi</i> .....	13
2.3 Distribuição Geográfica e Prevalência da Piroplasmose Equina.....	14
2.4 Vetores de <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia caballi</i> no Brasil e no Mundo .....	15
2.5 Variabilidade genética de <i>Theileria equi</i> .....	16
2.6 Variabilidade genética de <i>Babesia caballi</i> baseada no gene <i>rap-1</i> .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 Estudo do gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> .....	19
3.1.1 Amostragem e coleta das amostras de sangue .....	19
3.1.2 Caracterização dos controles positivo e negativo .....	19
3.1.3 ELISA competitivo .....	19
3.1.4 Extração de DNA de amostras de sangue de equinos.....	19
3.1.5 Detecção de <i>Babesia caballi</i> por PCR em tempo real .....	20
3.1.6 Amplificação e sequenciamento do gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> .....	20
3.1.6.1 Escolha das sequências e desenho de “primers” para amplificação do gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> .....	20
3.1.6.2 Condições das reações de PCR para o gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> .....	22
3.1.7 Análise das sequências do gene <i>rap-1</i> .....	24
3.2 Estudo da diversidade genética de <i>Theileria equi</i> através do gene <i>18S rDNA</i> .....	25
3.2.1 Amostragem .....	25
3.2.2 Seleção das amostras positivas para sequenciamento do gene <i>18S rDNA</i> de <i>Theileria equi</i> .....	25
3.2.3 Extração de DNA das Amostras de sangue positivas para <i>Theileria equi</i> .....	26
3.2.4 Amostras Controles da PCR .....	26
3.2.5 Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene <i>18S rDNA</i> de <i>Theileria equi</i> .....	26
3.2.6 Análise de dados de sequenciamento .....	28
3.2.7 Princípios Éticos .....	30

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 Estudo do gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> .....	31
4.2 Estudo do gene <i>18S rDNA</i> de <i>Theileria equi</i> .....	37
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
5.1 Estudo do gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> .....	42
5.2 Estudo do gene <i>18S rDNA</i> de <i>Theileria equi</i> .....	43
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>57</b>
Dinâmica da infecção de <i>Theileria equi</i> em <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	57
RESUMO.....	57
ABSTRACT .....	579
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>62</b>
2.1 Piroplasmose equina e aspectos sobre a reposta do equino à infecção.....	62
2.2 Ciclo Biológico e morfologia de <i>Theileria equi</i> no equino e no carrapato vetor .....	63
2.2.1 No hospedeiro vertebrado.....	63
2.2.2 No hospedeiro invertebrado.....	64
2.3 As diferenças entre o ciclo de <i>Theileria equi</i> e outros piroplasmas .....	67
2.4 Tipos de transmissão de <i>Theileria equi</i> pelo carrapato vetor .....	68
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
3.1 Descrição do local do estudo .....	70
3.2 Princípios éticos da experimentação animal.....	70
3.3 Animais utilizados no estudo e manejo zootécnico .....	70
3.4 Obtenção de colônia de carrapatos livres de hemoparasitos.....	70
3.5 Dinâmica da infecção e transmissão de <i>Theileria equi</i> em <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> experimentalmente infectados .....	71
3.5.1 Obtenção de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> infectados por <i>Theileria equi</i> .....	71
3.5.2 Estudo da transmissão transestadial e transovariana de <i>Theileria equi</i> por <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	72
3.6 Coleta de amostras de sangue e avaliação da infecção por <i>Theileria equi</i> em equino cronicamente infectado.....	75
3.7 Detecção de <i>Theileria equi</i> em amostras de carrapatos, órgãos de carrapatos e sangue de equino .....	76
3.7.1 Dissecção dos intestinos, ovários e glândulas salivares dos carrapatos.....	76
3.7.2 Extração de DNA total.....	77

3.7.3	Reação de PCR em tempo real (qPCR) para detecção <i>Theileria equi</i> e quantificação da carga parasitária.....	77
3.7.4	Curva padrão da PCR em tempo real para quantificação de <i>Theileria equi</i> em amostras de sangue, carrapatos e tecidos.....	78
3.7.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão em órgãos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> infectados por <i>Theileria equi</i> .....	79
3.7.6	Boas práticas de laboratório e cuidados nas técnicas moleculares.....	79
3.8	Análise estatística.....	90
3.8.1	Análise da detecção de <i>Theileria equi</i> nos tecidos de carrapatos e carrapatos inteiros em função do período experimental.....	78
3.8.2	Análise da detecção de <i>Theileria equi</i> nos ovos de carrapatos em função do período de postura das teleóginas.....	78
3.8.3	Análise comparativa da detecção de <i>Theileria equi</i> nos ovos e ovários de carrapatos...78	
3.8.4	Análise da Curva padrão de sensibilidade da qPCR nas diferentes amostras estudadas.78	
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
4.1	Aspectos da infestação de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> em um equino cronicamente infectado por <i>Theileria equi</i> .....	81
4.2	Curva padrão da PCR em tempo real para quantificação de <i>Theileria equi</i> em amostras de carrapatos e tecidos.....	81
4.3	Detecção de <i>Theileria equi</i> em <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> em amostras de carrapatos inteiros durante o período experimental.....	84
4.4	Detecção de <i>Theileria equi</i> na glândula salivar e no intestino de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> adultos.....	84
4.5	Avaliação das glândulas salivares de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> durante infestação experimental através da Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	84
4.6	Avaliação dos ovários e ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> alimentados em equino cronicamente infectado por <i>Theileria equi</i> através da PCR em tempo real.....	99
4.7	Detecção molecular de <i>Theileria equi</i> na segunda geração de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> alimentados em hospedeiro não infectado.....	102
4.8	Detecção molecular de <i>Theileria equi</i> na segunda geração de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> alimentados em hospedeiro não infectado.....	103
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>109</b>
5.1	Aspectos da infestação de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> em equinos.....	109
5.2	Detecção de <i>Theileria equi</i> em glândula salivar, intestino e em carrapatos inteiros da espécie <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> por qPCR.....	110
5.3	Avaliação das glândulas salivares de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> durante infestação experimental através da Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	110
5.4	Detecção de <i>Theileria equi</i> em ovários e ovos de carrapatos inteiros da espécie <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> por qPCR e avaliação de ovário por Microscopia	

Eletrônica de Transmissão .....	110
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>117</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>
<b>8. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>123</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>125</b>
<b>Anexo I</b> – Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP .....	125
<b>Anexo II</b> – Posição dos “primers” desenhados para o gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> em relação às sequências completas do referido gene de amostras dos EUA e África do Sul, do nucleotídeo 1 ao 420.....	125
<b>Anexo III</b> – Posição dos “primers” desenhados para o gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> em relação às sequências completas do referido gene de amostras dos EUA e África do Sul, do nucleotídeo 771 ao 977.....	126
<b>Anexo IV</b> – Posição dos “primers” desenhados para o gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> em relação às sequências completas do referido gene de amostras dos EUA e África do Sul, do nucleotídeo 1401 ao 1479.....	127
<b>Anexo V</b> – Posição dos “primers” desenhados para o gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> em relação às sequências completas do referido gene de amostras dos EUA e África do Sul, do nucleotídeo 1611 ao 1825.....	128
<b>Anexo VI</b> – Matriz de similaridade e número de pontos de mutação de aminoácidos não sinônima baseada no fragmento de 152 aminoácidos do gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> das amostras do Brasil, Porto Rico, Egito, Israel e África do Sul.....	129
<b>Anexo VII</b> – Localização dos pontos de mutação nas sequências de aminoácidos do gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> deste estudo em relação à sequência dos EUA (BAA83725.1). As sequências do presente estudo se posicionaram entre o 94° e o 246° aminoácidos .....	130
<b>Anexo VIII</b> – Localização dos pontos de mutação nas sequências de aminoácidos do gene <i>rap-1</i> de <i>Babesia caballi</i> deste estudo em relação à sequência dos EUA (BAA83725.1). As sequências do presente estudo se posicionaram entre o 94° e o 246° aminoácidos. Continuação.....	131
<b>Anexo IX</b> – Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas da experimentação animal.....	132
<b>Anexo X</b> - Protocolo modificado do Kit de Extração Dneasy Blood and Tissue Kit – Qiagen utilizado em amostras de carrapatos inteiros, tecidos de carrapatos e ovos.....	133

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

A piroplasmose equina é uma enfermidade causada por protozoários intracelulares obrigatórios que infectam, de forma geral, eritrócitos de equinos (FRIEDHOFF; SOULE, 1996; SCHEIN, 1988). Esta doença pode ser dificilmente diagnosticada, devido aos aspectos clínicos apresentados que são variáveis e inespecíficos (ROTHSCHILD, 2013). Seus sintomas incluem desde febre aguda, inapetência e mal-estar, a anemia e icterícia, morte súbita, ou perda crônica de peso e baixa tolerância ao exercício físico. Existem descrições de piroplasmose acometendo equinos, burros, mulas e zebras e, recentemente, foi relatada em camelos (ZWEYGARTH et al., 2002; SLOBODA et al., 2011; KAPPMEYER et al., 2012; ROTHSCHILD, 2013). Um dos principais entraves causados pela piroplasmose equina é o impedimento no movimento internacional de cavalos, uma vez que os animais positivos são proibidos de entrar em países considerados livres da doença (FRIEDHOFF; TENTER; MÜLLER, 1990b; KNOWLES, 1996).

As famílias que compõe a ordem Piroplasmida são Theileriidae e Babesiidae e podem ser representadas por duas espécies que acometem equinos: *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn & Schein, 1998 e *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912). Os carrapatos são considerados os vetores biológicos destes agentes para equinos na natureza (UILENBERG, 1995; FRIEDHOFF; SOULE, 1996). O ciclo de vida de *T. equi* é bifásico em equinos, com um período de desenvolvimento intraleucocítico (esquizogonia pré-eritrocítica) seguido por uma parasitemia eritrocítica que causa quadro sintomatológico agudo e em alguns casos doença hemolítica (RAMSAY et al., 2013). Enquanto que os parasitos pertencentes ao gênero *Babesia* são definidos como parasitos que, uma vez no hospedeiro vertebrado, invadem diretamente dentro de células sanguíneas vermelhas (UILENBERG, 2006).

Apesar de haver descrições da participação de carrapatos do gênero *Rhipicephalus*, *Dermacentor* e *Hyalomma* na transmissão de *B. caballi* (UILENBERG, 2006), no Brasil a espécie *Dermacentor nitens* é indicada como o principal vetor (PFEIFER et al., 1992; LINHARES, 1994; PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; MUJICA, 2002). Estudos experimentais indicam o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é descrito como o vetor biológico de *T. equi* na América do Sul (STILLER; COAN, 1995; GUIMARÃES et al., 1998; UETI et al., 2005, 2008). Contudo, não está claro se a transmissão natural de *T. equi* é realizada por este ixodídeo, já que este processo requer o movimento do carrapato entre hospedeiros infectados e susceptíveis e *R. (B.) microplus* é um carrapato tipicamente monoxeno, comumente encontrado em bovinos. Esta espécie também pode ser encontrada em equinos à campo, com menor frequência do que é encontrada nos bovinos, seu hospedeiro de eleição (SCOLES; UETI, 2015). Alguns autores relatam que esta frequência pode ser baixa, mesmo nos casos em que os equinos compartilhem o pasto com bovinos (PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; HEUCHERT et al., 1999; TEGLAS et al., 2005).

A transmissão transestadial de *T. equi* por carrapatos vetores é um processo conhecido, enquanto a transmissão transovariana permanece em controvérsia (UILENBERG, 2006; UETI et al., 2008). Desta forma, a real participação desta espécie de carrapato no ciclo natural de transmissão de *T. equi* permanece indefinida (SCOLES; UETI, 2015). Por essa razão outros estudos utilizando distintas metodologias, incluindo estudos experimentais e microscopia eletrônica de transmissão, buscam evidências de que *R. (B.) microplus* é de fato o vetor natural de *T. equi* no Brasil (GUIMARÃES et al., 1998a; GUIMARÃES et al., 1998b).

Os testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) determinam a presença do organismo de interesse através da amplificação e detecção de frações específicas do ácido desoxirribonucleico (DNA) (WISE et al., 2013). Os genes *rap-1* e *18S rDNA* têm sido alvos tanto para o diagnóstico molecular, como para estudos de variabilidade e caracterização

genética de animais com a piroplasmose equina (DEL PINO et al., 2016; KIZILARSLAN et al., 2015; PECKLE et al., 2013; QABLAN et al., 2013). O gene *rap-1* de *B. caballi*, importante alvo por codificar uma proteína utilizada em testes sorológicos associado à roptria 1 (RAP-1) (OIE, 2014), já foi analisado em animais naturalmente infectados no Brasil, contudo ainda são considerados estudos preliminares (HEIM et al., 2007; MACHADO et al., 2012). Enquanto que para *T. equi* no Brasil, considera-se uma lacuna a ser preenchida o estudo sobre o gene *18S rDNA*, alvo utilizado em diversos outros estudos de diversidade e sistemática de *T. equi* (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006; BHOORA et al., 2009; ROS-GARCÍA et al., 2013). Além disso, o gene *18S rDNA* de *T. equi* tem se mostrado com considerável grau de heterogeneidade em isolados deste parasito oriundos de diferentes regiões do mundo (BHOORA et al., 2009; NAGORE et al., 2004), sendo as regiões variáveis deste gene frequentemente utilizadas para estudos filogenéticos.

Em virtude do exposto, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular de *B. caballi* obtida de equinos naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro, Brasil e relacionar estes achados à técnica de diagnóstico sorológico considerado padrão-ouro pela OIE. Além disso, a análise do grau de heterogeneidade do gene *18S rDNA* de *T. equi* em amostras do Brasil oriundas de duas regiões geográficas do estado do Rio de Janeiro também foi um dos objetivos desse estudo, bem como a comparação com outros isolados do mundo. Este estudo também teve por objetivo avaliar a capacidade de infecção de *T. equi* em *R. (B.) microplus* alimentados em equino cronicamente infectado, analisando posteriormente a carga parasitária de *T. equi* em órgãos de *R. (B.) microplus* e carrapatos inteiros. A partir desta etapa experimental, investigou-se a presença de *T. equi* em diferentes órgãos dos carrapatos utilizados nesse estudo. O último objetivo deste trabalho foi de avaliar a possibilidade de transmissão transtadial e transovariana de *T. equi* por *R. (B.) microplus* após alimentação em hospedeiros não infectados.

# **CAPÍTULO I**

## **VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Theileria equi* E *Babesia caballi* EM EQUINOS NATURALMENTE INFECTADOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

## RESUMO

PEIXOTO, Maristela Peckle. **Variabilidade Genética de *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro**. 2017. 56p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Estudos indicam uma diversidade genética dos agentes da piroplasmose equina nas diversas regiões do mundo. Os objetivos deste estudo foram realizar a caracterização molecular de um fragmento do gene *rap-1* de *B. caballi* e analisar o grau de heterogeneidade do gene *18S rDNA* em *T. equi* de equinos naturalmente infectados, no estado do Rio de Janeiro. Foram obtidas sequências completas do gene *18S rDNA* de *T. equi*, a partir de vinte equinos naturalmente infectados. Os produtos da PCR foram clonados e sequenciados. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando um conjunto de sequências de *18S rDNA* de *T. equi* e de outros organismos relacionados da base ARB-Silva. O alinhamento das sequências foi realizado com base na estrutura secundária. Para a caracterização molecular de um fragmento do gene *rap-1* de *B. caballi* foram utilizadas 430 amostras de equinos do estado do Rio de Janeiro. Para o diagnóstico deste agente nos animais foi realizado um ensaio sorológico (cELISA) e molecular (qPCR). Das amostras positivas foram realizados dois protocolos : uma nested PCR desenvolvida para amplificar, aproximadamente, 482 pb do gene *rap-1* e uma PCR convencional, visando a amplificação do gene completo, sendo os produtos sequenciados. As sequências foram alinhadas utilizando-se ClustalW, e o alinhamento foi submetido ao método de reconstrução Maximum-Likelihood com distâncias moleculares estimadas pelo modelo de Poisson, utilizando-se 1000 repetições. Na análise de *T. equi*, doze diferentes isolados foram observados em equinos no estado do Rio de Janeiro, sendo agrupados em dois dos três clados formados (I, II), sendo a maioria das sequências deste estudo agrupadas no clado I (70%; n=14/20). Todas as sequências de *T. equi* se agrupam dentro de um clado diferente dos demais Theilerídeos. Foi possível amplificar um fragmento de 482 pb do gene *rap-1* de *B. caballi* através da nested PCR a partir de trinta e duas amostras positivas, sendo vinte e três, identificadas como sequências únicas. Após tradução e análise de agrupamentos das sequências de *B. caballi* obtidas no estudo, observou-se que a identidade entre estas amostras e amostras dos EUA variou de 99,7% a 96,7%; e de 79,9% e 82,3%, com isolados da África. Na análise de agrupamentos, as amostras brasileiras pertenceram ao clado A, sendo estas analisadas como aminoácidos ou nucleotídeos, sequências de 1244 pb ou 152 aas. A variação da sequência do gene *rap-1* de *B. caballi* entre os países reforça que a caracterização molecular deste gene deve ser realizada antes da utilização do kit cELISA ou técnicas de PCR para fins de diagnóstico e de movimento internacional de equinos.

**Palavras-chave:** Diversidade genética, piroplasmose equina, theileriose equina, heterogeneidade genética, hemoparasito.

## ABSTRACT

PEIXOTO, Maristela Peckle. **Genetic diversity of *Theileria equi* and *Babesia caballi* of naturally infected horses from the state of Rio de Janeiro.** 2017. 56p. Thesis. (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2017.

This study aimed to perform the molecular characterization of the *B. caballi rap-1* gene and to analyze the degree of heterogeneity of the *T. equi 18S rDNA* gene of naturally infected horses in the state of Rio de Janeiro. Complete sequences of the *T. equi 18S rDNA* gene (n = 20) were obtained. The PCR products were cloned and sequenced. Phylogenetic analyzes were performed on ARB-Silva basis. For the molecular characterization of a fragment of the *B. caballi rap-1* gene, 32 cELISA and qPCR positive equine samples were used. A nested PCR was developed to amplify a fragment of the *rap-1* gene and a conventional PCR, aiming the amplification of the complete gene. The products were sequenced. Sequences were submitted to the Maximum-Likelihood reconstruction method with Poisson model and 1000 replicates. In the analysis of *T. equi*, twelve different isolates were observed in equines from the state of Rio de Janeiro and were grouped into two of the three clades formed (I, II), most of them grouped in clade I (70%, n = 14/20). The sequences of *T. equi* are grouped within a clade different from other Theilerids. It was possible to amplify a fragment of the *B. caballi rap-1* gene from 23 sequences using nested PCR, identified as single sequences. One of the sequences showed twelve mutation points. After the translation to aminoacids, *B. caballi rap-1* aminoacid sequences presented an identity of 99.7% to 96.7% between USA isolates and 79.9% to 82.3% to South Africa isolates. In cluster analysis, the Brazilian samples belonged to clade A, being analyzed as amino acids (152a) or nucleotides (1244 bp). The phylogenetic analysis of the *T. equi 18S rDNA* gene and of *B. caballi rap-1* gene showed that different isolates co-exist in the same area in Rio de Janeiro, Brazil.

**Keywords:** Genetic diversity, equine piroplasmosis, equine teileriosis, transestadial transmission, transovarian transmission.

## 1 INTRODUÇÃO

Perdas econômicas constantes ocorrem na indústria equina devido a doenças infecciosas, incluindo a piroplasmose equina (PE). Esta doença acomete equinos, burros, mulas e zebras e, recentemente, foi relatada em camelos (SLOBODA et al., 2011). A piroplasmose equina é considerada o principal impedimento no movimento internacional de cavalos, uma vez que os animais PE-positivos são proibidos de entrar em países considerados livres da doença (FRIEDHOFF; TENTER; MÜLLER, 1990b; KNOWLES, 1996).

*Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn & Schein, 1998 e *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912), os agentes etiológicos da PE, são protozoários intracelulares obrigatórios que infectam eritrócitos de equinos (SCHEIN, 1988; FRIEDHOFF; SOULE, 1996). Os carrapatos são considerados os vetores biológicos destes agentes para equinos na natureza (UILENBERG, 1995; FRIEDHOFF; SOULE, 1996). O principal vetor da *B. caballi* no Brasil é o carrapato *D. nitens* (PFEIFER et al., 1992; LINHARES, 1994; PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; MUJICA, 2002). No caso de *T. equi*, o carrapato *R. (B.) microplus* é o vetor biológico na América do Sul, indicado por estudos experimentais (GUIMARÃES; LIMA; RIBEIRO, 1998; STILLER; COAN, 1995; UETI et al., 2005, 2008). No entanto, não está claro se a transmissão natural de *T. equi* é realizada por este ixodídeo, já que este processo requer o movimento do carrapato entre hospedeiros infectados e susceptíveis e o *R. (B.) microplus* é um carrapato monoxeno. Além disso, a transmissão transovariana parece não ocorrer (UETI et al., 2008).

A variabilidade do gene *rap-1* de *B. caballi* e do *18S rDNA* de *T. equi* tem sido estudada em equinos naturalmente infectados de diversas partes do mundo. No Brasil, existem poucos estudos e ainda preliminares a respeito do gene *rap-1* de *B. caballi* (HEIM et al., 2007; MACHADO et al., 2012) e nenhum estudo sobre o *18S rDNA* de *T. equi*. O conhecimento sobre a diversidade genética do gene *rap-1* é importante já que esse gene codifica uma proteína associada à roptria 1 (*RAP-1*) que é utilizada em testes sorológicos padrão-ouro de diagnóstico para *B. caballi* (OIE, 2014). Por outro lado, o gene *18S rDNA* é utilizado em estudos de diversidade e sistemática de *T. equi* (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006; BHOORA et al., 2009; ROS-GARCÍA et al., 2013), além de ser um marcador muito utilizado no diagnóstico molecular deste agente etiológico em estudos epidemiológicos (PECKLE et al., 2013; QABLAN et al., 2013; KIZILARSLAN et al., 2015; DEL PINO et al., 2016).

A Organização Internacional de Epizootias (OIE) recomenda as técnicas de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA) como testes regulamentares para o diagnóstico de PE (FRIEDHOFF; SOULE, 1996; IKADAI et al., 2002; OIE, 2014). O cELISA para *B. caballi* utiliza o antígeno recombinante representado pela proteína *RAP-1* (KAPPMAYER et al., 1999). O método baseia-se na inibição específica da ligação de um anticorpo monoclonal (MAb) em anticorpos séricos de equídeos infectados. Infelizmente, o epítipo da proteína *RAP-1* reconhecida pelo MAb parece ser diferente em alguns isolados de *B. caballi* de diversas áreas geográficas e por este motivo, o cELISA não foi capaz de detectar equinos infectados na África do Sul e Egito (BHOORA et al., 2010a; MAHMOUD et al., 2016).

Neste contexto, o primeiro objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular de um fragmento gene *rap-1* de *B. caballi* obtido de equinos naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro, Brasil e relacionar o nível de concordância destes achados à técnica de diagnóstico sorológico cELISA, preconizada pela OIE como padrão-ouro para o diagnóstico da piroplasmose equina.

Com relação à posição taxonômica de *T. equi*, desde 1984, Mehlhorn e Schein destacam evidências fenotípicas para classificação deste agente em um gênero diferente de

*Theileria* e *Babesia*. Estes autores acreditam que *T. equi* não faça transmissão transovariana, já que não observaram a reprodução de esporocinetos do protozoário em ovócitos de carrapatos, sendo similar ao que ocorre com protozoários do gênero *Theileria*. Outras características que levaram a reclassificação deste parasito para o gênero *Theileria* foram a esquizogonia em linfócitos e a resistência a fármacos babesicidas (MEHLHORN; SCHEIN, 1998). Entretanto, a morfologia da fase eritrocitária de *T. equi* é semelhante a de *Babesia* spp., bem como seus gametas. Mesmo com estas características, a sistemática de *T. equi* ainda hoje divide opiniões (MEHLHORN; SCHEIN, 1998; ALLSOPP; ALLSOPP, 2006; KAPPMAYER et al., 2012).

O gene *18S rDNA* é um alvo muito utilizado para avaliar incertezas fenotípicas, pois nele encontra-se a maior parte da informação filogenética disponível para os gêneros *Theileria* e *Babesia*. Com relação à taxa de evolução gênica, a substituição de nucleotídeos é considerada baixa e não há nenhuma evidência de transferência lateral de genes entre linhagens (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006). Apesar deste fato, o gene *18S rDNA* de *T. equi* tem se mostrado com considerável grau de heterogeneidade em isolados deste parasito oriundos de diferentes regiões do mundo (BHOORA et al., 2009; NAGORE et al., 2004), sendo as regiões variáveis deste gene frequentemente utilizadas para estudos filogenéticos.

A existência de variação na sequência do gene *18S rDNA* de *T. equi* pode dificultar a padronização de técnicas moleculares de diagnóstico que utilizam este gene como alvo. Este fato pode ser exemplificado pelo estudo não publicado realizado por Bhoora, o qual relatou no trabalho de 2009, que vários ensaios moleculares de PCR baseados no gene *18S rDNA* não foram capazes de detectar os parasitos em amostras de sangue de equino positivas para *T. equi* da África do Sul.

Assim, o segundo objetivo deste estudo foi realizar uma análise filogenética baseada no gene *18S rDNA* de *T. equi* em amostras do Brasil oriundas de duas regiões geográficas do estado do Rio de Janeiro, bem como compará-las com outros isolados do mundo, e destacar os diferentes genótipos por análise filogenética.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Perspectiva Histórica sobre a Piroplasmose Equina

Os protozários causadores da Piroplasmose equina (PE) foram primeiro descritos no início do século vinte. A PE, antes de 1901, era referida como malária, pois os sinais clínicos observados em equinos de Pretoria, na África do Sul, eram similares aos observados em humanos infectados pelo gênero *Plasmodium* (THEILER, 1903 apud USDA, 2010). Além disso, PE já foi chamada de febre antrax, febre biliosa hemoglobínica, febre biliar e malária equina (ROBERTS et al., 1962). Laveran foi o primeiro a descrever um protozoário em forma de pêra conhecido como piroplasma, denominando-o *Piroplasma equi* (LAVERAN, 1901 apud USDA, 2010).

Em 1902, Arnold Theiler tentou transmitir *P. equi* inoculando sangue de um equino doente em um equino livre. Como não obteve sucesso na transmissão, Theiler reportou que a doença não parecia ser de contágio direto e pensou na possibilidade do agente necessitar de um carrapato vetor para se tornar infectivo (THEILER, 1902 apud USDA, 2010). Foi a primeira vez que o carrapato foi associado à transmissão do agente da PE.

França, em 1909, observou que as formas de multiplicação de *P. equi* não condiziam com as do gênero *Piroplasma*, pois não ocorriam em pares e formavam distintas formas em “Cruz de Malta”, reclassificando o protozoário para o gênero *Nuttallia*. Alguns anos depois, Nuttall e Strickland (1912) propuseram que a PE era causada na verdade por dois hematozoários distintos, denominando o segundo de *Piroplasma caballi*.

O primeiro grande surto da PE conhecido mundialmente ocorreu na Flórida, EUA, no início da década de 60. Este surto teve como agente etiológico *B. caballi*, tanto nas amostras obtidas a partir de sangue venoso por punção de veia jugular, quanto por esfregaço de ponta de orelha dos 136 equinos testados por microscopia direta. De todas as lâminas analisadas, 17 animais apresentaram merozoítos de *B. caballi* em eritrócitos (SIPPEL et al., 1962). No mesmo período já era sabido que a maioria dos cavalos na África do Sul que não ficavam estabulados eram portadores da PE, mas raramente desenvolveram sinais de doença, porque eles eram imunes. No entanto, 50 casos de PE foram reportados ainda nesta década, em equinos Puro Sangue Inglês estabulados submetidos a tratamento contra carrapatos (RETIEF, 1964). Retief, em 1964, sugeriu que o surto ocorreu pois equinos sob tratamento carrapaticida não desenvolvem imunidade aos agentes da PE e por isso, estão susceptíveis à infecções. No mesmo trabalho, o autor associou a imunidade de potros à PE por transferência de anticorpos verticalmente via colostro.

Na Flórida, o surto de *B. caballi* perdurou. De 1961 a setembro de 1963, foram detectados 141 casos de EP em 103 instalações criadoras de equinos, com base na identificação direta através de esfregaço sanguíneo. Grande parte dos casos foram associados ao carrapato tropical dos equinos, *D. nitens* (STRICKLAND; GERRISH, 1964). Em 1964, uma infecção mista de *B. caballi* e *T. equi*, que anteriormente era descrito como *Babesia equi*, foi encontrado no sangue de um cavalo na Flórida (RISTIC, 1964), e em 1965 uma infecção de *T. equi* foi descoberta em um animal no mesmo estado (KNOWLES et al., 1966). Em 1969, os casos de PE foram identificados em outros cinco estados dos EUA (TAYLOR et al., 1969). Todos os casos *B. caballi* fora da Flórida ocorreram em equinos vindos da Flórida, Porto Rico ou Ilhas Virgens dos EUA (COFFMAN, 1997; TAYLOR et al., 1969).

Esta foi uma década muito importante nos estudos sobre a doença, desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e discussão sobre a proibição no trânsito de animais infectados. Desde o primeiro surto, uma força tarefa foi instalada na Flórida na tentativa de impedir novas ocorrências. O Programa de Controle da PE da Flórida envolvia o diagnóstico dos agentes em

equinos, vigilância na população de carrapatos, quarentena para animais positivos para PE e tratamento de casos positivos, casos suspeitos e animais infestados por carrapatos. Animais PE-positivos eram identificados com uma tatuagem no lábio, que incluiu um P e um número atribuído (Departamento de Estado da Flórida, 1962). De 1962 à 1971, 1.150 equinos PE-positivos foram identificados na Flórida, e 40 cavalos PE-positivos foram encontrados em outros Estados (COFFMAN, 1997). De 1974 a 1984, apenas 15 novos casos de PE foram diagnosticados na Flórida. Isso porque o sistema de vigilância da PE e de carrapatos, além do programa de tratamento operou até 1988 (COFFMAN, 1997).

O teste oficial para a importação de equídeos nos EUA começou em outubro de 1970, testando os animais para a presença de anticorpos anti-PE utilizando o teste de Fixação de Complemento (CFT). Em 1994, O Código Administrativo do Estado da Flórida exigiu que todos os equinos vindos de áreas endêmicas para PE testassem negativos para ambos, *B. caballi* e *T. equi*, antes do embarque para a Flórida, além de ser obrigatório colocar o animal em quarentena e testar o sangue do equino novamente entre 30 e 60 dias após o ingresso. O CFT foi usado como teste de entrada oficial para cavalos importados até agosto de 2005, quando o Ensaio Imunoenzimático Competitivo (cELISA) foi implementado como teste oficial (USDA, 2010). Além deste, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) também foi recomendada pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) como teste diagnóstico oficial para o transporte internacional de equinos (OIE, 2014).

## 2.2 Posição Taxonômica de *Theileria equi* e *Babesia caballi*

A espécie *Theileria equi* está inserida na seguinte posição taxonômica (MEHLHORN; SCHEIN, 1998):

Domínio: EUKARYOTA Chatton, 1925  
Reino: CHROMISTA Caval.-Sm. (1981)  
Superfilo: ALVEOLATA Cavalier-Smith, 1991  
Filo: MIOZOA Cavalier-Smith, 1987  
Infrafilo: APICOMPLEXA Levine, 1970  
Classe: COCCIDIOMORPHEA 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 espécie *Babesia caballi* está inserida na seguinte posição taxonômica (NUTTALL; STRICKLAND, 1912):

Domínio: EUKARYOTA Chatton, 1925  
Reino: CHROMISTA Caval.-Sm. (1981)  
Superfilo: ALVEOLATA Cavalier-Smith, 1991  
Filo: MIOZOA Cavalier-Smith, 1987  
Infrafilo: APICOMPLEXA Levine, 1970  
Classe: COCCIDIOMORPHEA Doflein, 1901  
Ordem: PIROPLASMIDA Wenyon, 1926  
Família: BABESIIDAE Poche, 1913  
Gênero: *Babesia* Starcovici, 1893  
Espécie: *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912)

### 2.3 Distribuição Geográfica e Prevalência da Piroplasmose Equina

Em geral, a distribuição geográfica de *B. caballi* e *T. equi* são semelhantes e incluem a maior parte das regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (SCHEIN, 1988; USDA, 2010) sendo países endêmicos os que possuem a população equina associada a carrapatos vetores competentes. Infecções por *T. equi* são mais frequentes que infecções por *B. caballi* na maioria das regiões do mundo onde a PE é endêmica (DE WAAL, 1992; FRIEDHOFF; TENTER; MÜLLER, 1990a; HEUCHERT et al., 1999; ABEDI et al., 2014; BARTOLOMÉ DEL PINO et al., 2016) Áreas completamente livres da PE são escassas e há uma estimativa que somente 10% da população mundial de equinos habitam estas regiões (USDA, 2010).

Na América do Norte, o Canadá é considerado não endêmico, com alguns casos esporádicos de PE em seu histórico, como em 1987. Já os EUA foram marcados por diversos surtos de PE, principalmente no estado da Flórida. Em 2008, um surto ocorreu na Flórida devido à equinos importados do México para corrida ilegal de cavalos (WISE et al., 2013). Já em 2009, o surto foi provocado por *T. equi* em 400 equinos no Texas (UETI et al., 2012). Este país continua em constante monitoramento, obtendo o “status” de “piroplasmosis-free” desde 2009 (WISE, 2014). Ambos os países são não endêmicos para PE, sendo que os EUA passam por medidas de fiscalização e controle rigorosas, já que este país foi palco de diversos surtos da PE e possui os carrapatos vetores potenciais à disseminação da doença no país.

Na América Central e do Sul, diversos países são considerados endêmicos para PE. Nestes países, a presença dos carrapatos vetores é constante devido ao clima tipicamente tropical e, portanto, a transmissão da doença é de difícil controle. Os agentes da PE já foram encontrados em Porto Rico, nas Ilhas Virgens dos EUA, no México e em Cuba na América Central e no Brasil, Colômbia, Venezuela e Chile, na América do Sul (USDA, 2010). Em um estudo de 1996, Friedhoff e Soulè consideraram que as regiões do sul da Argentina e do Chile são as áreas consideradas livres nesta parte do continente americano. É muito provável que os outros países e regiões da América do Sul sejam endêmicos para PE, mas até a data, faltam estudos para embasar esta hipótese.

Na América do Sul, em Trindade e Tobago, a soroprevalência de *T. equi* foi de 33,3%, enquanto *B. caballi* foi de 68,8% utilizando a RIFI como técnica de diagnóstico (ASGARALI et al., 2007). Na Venezuela, 70,6% dos animais testados foram positivos pelo ELISA para *B. caballi* e 50,3%, para *T. equi* (MUJICA et al., 2011).

No Brasil, a soropositividade encontrada para *T. equi* em amostras de São Paulo e Mato Grosso do Sul foi de 37%, e 27% para *B. caballi* (KERBER et al., 1999). A positividade de equinos para *T. equi* no Brasil é em torno de 90%, seja por diagnóstico molecular ou sorológico (LINHARES, 1994; PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; BATTSETSEG et al., 2002; SANTOS et al., 2011; PECKLE et al., 2013). Já para *B. caballi*, 62,5% de soropositividade foi encontrada nos animais do Rio de Janeiro por Pfeifer-Barbosa et al. (1995) e 93,6% por Bittencourt et al. (1997). Heim et al. (2007) em Minas Gerais, observou uma soroprevalência de 83% para *B. caballi*, e 12,5% de positividade através de ferramenta molecular.

Na Ásia, em um estudo conduzido no Iran, por Abedi et al. (2014), 48% dos 100 equinos amostrados foram considerados positivos para *T. equi* através da RIFI e 45%, através de um multiplex PCR. Já para *B. caballi*, somente 3% dos equinos reagiram na RIFI e nenhum pode ser detectado pela biologia molecular. Na Jordânia, 14,6% dos equinos testaram positivos pelo cELISA para *T. equi* e nenhum para *B. caballi* (ABUTARBUSH et al., 2012). Na Turquia, Sevinc et al. (2008) observou uma soroprevalência de 16,21% para *T. equi* e 0,83% para *B. caballi* em 481 soros de equinos. Da mesma forma, em Israel, a positividade para *T. equi* variou de 33,7% e 29,4%, pelas técnicas cELISA e RIFI, respectivamente

(SHKAP et al., 1998). Esta região asiática é endêmica para *T. equi*, sendo os casos de *B. caballi* esporádicos.

A PE é endêmica no leste europeu, e já foi registrada em Portugal, Bélgica, Rússia, França e Itália (FRIEDHOFF et al., 1990). Na Itália, a soropositividade foi de 12,4% para *T. equi* e 17,9% para *B. caballi* (MORETTI et al., 2010). Na Espanha, 40% e 28,3%, foram as frequências de soropositividade para *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente (CAMACHO et al., 2005). García-Bocanegra et al. (2013) observaram soroprevalência de 56,1% para *T. equi* e 13,2% para *B. caballi*.

Finalmente, na África do Sul, a positividade foi de 83% e 70% para *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente pela RIFI (BHOORA et al., 2010b). No Sudão, 63,5% dos equinos testados foram positivos para *T. equi* e 4,4%, para *B. caballi*, através de ELISA (SALIM et al., 2008).

## 2.4 Vetores de *Theileria equi* e *Babesia caballi* no Brasil e no Mundo

Mais de vinte espécies de carrapatos são indicadas como transmissoras de *Theileria equi* no mundo, pertencentes à cinco gêneros de ixodídeos: *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes* (SCOLES E UETI, 2015). No continente Americano, *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) e *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887) Murrell & Barker (2003) são os vetores identificados como transmissores de *T. equi* (GUIMARÃES et al., 1998a; UETI et al., 2005, 2008). No entanto, a vigilância sobre os carrapatos que ocorreu durante o surto de *T. equi* no Texas, EUA, permitiu a identificação de um novo vetor deste agente na América do Norte: *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). *Amblyomma cajennense* está presente mais ao sudeste do Texas e do México e mostrou-se um vetor competente de *T. equi* (SCOLES et al., 2011). Outras formas de transmissão relatadas são a iatrogênica, transplacentária e congênita (SANTOS; SANTOS; MASSARD, 2008).

Em relação ao *R. (B.) microplus*, em condições experimentais, foram identificados esporoblastos e esquizontes de *T. equi* nas glândulas salivares (GUIMARÃES et al., 1998a). Posteriormente, a transmissão transtadial de *T. equi* foi demonstrada por Guimarães et al. (1998b). Ueti et al. (2005; 2008) comprovaram a participação de *R. (B.) microplus* como transmissor experimental de *T. equi* nas modalidades transtadial e intraestadial. Também demonstraram que equinos cronicamente infectados são competentes reservatórios para infecção de carrapatos vetores de *T. equi*. No entanto, a participação do carrapato *R. (B.) microplus* como vetor na cadeia epidemiológica da theileriose equina é duvidosa, já que os equinos são hospedeiros alternativos dessa espécie de carrapato. Conseqüentemente, a presença deste carrapato em equinos depende do contato com bovinos, hospedeiros primários, nas condições de pastagens consorciadas em que ambas espécies são criadas juntas (HEUCHERT et al., 1999; LABRUNA et al., 2001). Além disso, *R. (B.) microplus* é um carrapato monoxeno e a transmissão transovariana de parasitos do gênero *Theileria* até o momento não foi detectada. Dessa forma, sua importância epidemiológica tem sido questionada (HEUCHERT et al., 1999; KERBER et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

A transmissão experimental de *T. equi* não se mostrou efetiva por ixodídeos da espécie *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (DENNIG, 1988) e *A. cajennense* (DENNIG, 1988; RIBEIRO et al., 2011). Entretanto, Kerber et al. (2009) observaram uma associação significativa entre a abundância de *A. cajennense* sobre os equinos e a presença de anticorpos contra *T. equi*. Em estudo realizado no Texas por Scoles et al. (2011), demonstraram que *A. cajennense* adquire a infecção por *T. equi* enquanto se alimenta em equinos infectados e transmite intraestadialmente quando se alimenta em equinos não infectados. Vale destacar que, no Brasil, as principais espécies de carrapatos que parasitam equinos são *D. nitens* e *A.*

*cajennense* (= *A. sculptum*) (LABRUNA et al., 2001; SOUZA; SERRA-FREIRE, 1992), contudo, até o presente momento, não foi demonstrado a participação destes artrópodes como possíveis vetores, sob condições naturais ou experimentais no país.

Em relação à transmissão de *B. caballi*, estão indicados como vetores as espécies de carrapatos *Dermacentor marginatus*, *D. silvarum*, *D. nitens*, *D. nutalli*, *D. reticulatus* e *Hyalomma marginatum*, no continente Europeu e Asiático (FRIEDHOFF et al., 1990). Além destas, são espécies competentes *Rhipicephalus evertsi* e *Hyalomma truncatum*, como transmissores no continente Africano (DE WAAL et al., 1990).

Nas Américas, as espécies descritas como vetores competentes são *D. nitens*, *D. albipictus* e *D. variabilis* (SCOLES; UETI, 2015). O primeiro registro da transmissão de *B. caballi* por *D. nitens* em países americanos foi realizado em equídeos no estado da Flórida, nos Estados Unidos (ROBY; ANTHONY, 1963). Em seguida, Holbrook e Frerichs (1968) observaram pela primeira vez as formas de multiplicação do protozoário em amostras de hemolinfa e tecidos de *D. nitens* e sua capacidade de transmissão transovariana do agente.

No Brasil, a transmissão de *B. caballi* está associada à carrapatos *D. nitens* (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; PFEIFER-BARBOSA, 1993; LINHARES, 1994; MUJICA, 2002). Em estudo epidemiológico, Kerber et al. (2009) observaram associação de *B. caballi* com alto nível de infestação dos equinos por *D. nitens*. Além disso, a transmissão deste protozoário por *D. nitens* de forma transovariana já foi relatada por diversos autores (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; LINHARES, 1994; PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; MUJICA, 2002). Desta forma, não há dúvidas sobre a participação deste vetor na cadeia epidemiológica de transmissão de *B. caballi* para equinos no Brasil.

## 2.5 Variabilidade genética de *Theileria equi*

Embora bem fundamentada a mudança taxonômica de *Babesia equi* para *Theileria equi*, proposta por Mehlhorn e Shein (1998) a mais de quinze anos atrás, atualmente alguns estudos questionam o verdadeiro posicionamento deste táxon, principalmente em virtude de investigações moleculares mais detalhadas (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006; KAPPMAYER et al., 2012).

Na época, os autores propuseram esta mudança em virtude de aspectos biológicos observados neste protozoário, que não condiziam com características presentes no gênero *Babesia*. Dentre estas características, destacam-se: o desenvolvimento pré-eritrocítico deste piroplasma em linfócitos de hospedeiros vertebrados, diferentemente do gênero *Babesia*, que ocorre exclusivamente em eritrócitos; a migração dos cinetos exclusivamente para as glândulas salivares do hospedeiro invertebrado, e também o pequeno tamanho das formas intraeritrocíticas (MELHORN; SHEIN, 1998). No entanto, embora até o momento esta classificação tenha sido bem aceita pela comunidade científica, esta não é totalmente suportada por estudos filogenéticos (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006; KAPPMAYER et al., 2012).

A classificação de membros da família de Theileriidae leva em consideração aspectos da biologia e da morfologia do parasito, dos hospedeiros vertebrados, da patologia da doença, dos carrapatos vetores, da origem geográfica, e, mais recentemente, dos marcadores moleculares, como a “Major Piroplasms Surface Protein” (MPSPs) do piroplasma e a pequena subunidade ribossomal (SSU rRNA) (CHAE et al., 1999; GUBBELS et al., 2000). Contudo, a posição filogenética de *T. equi* baseada no gene SSU rRNA aloca esta espécie como um clado irmão dos theilerídeos na maioria das árvores filogenéticas, suportados por baixo valor de Bootstrap, sendo um ancestral comum das outras espécies de *Theileria* (CRIADO-FORNELIO et al., 2003) ou das espécies de *Babesia* (ALLSOPP et al., 1994). A análise de

proteínas de *T. equi* indicou que sua posição filogenética é um táxon irmão de *Theileria* spp. e sugere a alocação deste agente em outro gênero (KAPPMAYER et al., 2012). A alocação de *T. equi* em um clado separado de outros theilerídeos foi observado também utilizando-se diferentes abordagens filogenéticas por outros autores (ALLSOPP et al., 1994; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; LACK et al., 2012; SCHNITTGER et al., 2012). Portanto, a posição taxonômica de *T. equi* permanece sendo discutida por diversos autores.

O gene RNA ribossômico da subunidade menor (*18S rDNA*) é uma região altamente conservada do genoma e é análogo a região 16S em organismos procariotos. Os genes nucleares ribossomais rRNA têm se mostrado alvos apropriados na identificação de espécies (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006; BHOORA et al., 2009; KATZER et al., 1998). Devido a seus altos níveis de conservação, o gene *18S rDNA* é aceito como um marcador molecular amplamente utilizado para a caracterização, classificação taxonômica e análise filogenética e tem sido sequenciado em diferentes organismos, resultando em uma grande base de dados para a comparações de sequências (CHAE et al., 1999; GUBBELS et al., 2000). Assim, o gene *18S rDNA* tem sido utilizado no estudo da heterogeneidade de sequências em algumas espécies de protozoários de regiões diferentes do mundo (BHOORA et al., 2009; CRIADO-FORNELIO et al., 2004).

Embora o gene *18S rDNA* tenha um alto grau de conservação nos gêneros *Babesia* e *Theileria*, recomenda-se a utilização do gene completo, para se assegurar que a variação genética, presente nos diferentes isolados, não esteja subestimada (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; BHOORA et al., 2009). Sabe-se que este marcador molecular pode possuir até nove regiões com elevada variação gênica (HADZIAVDIC et al., 2014), sendo a região hipervariável V4 já descrita e estudada para *T. equi* (BHOORA et al., 2009). Este fato favorece a sua utilização como um importante marcador para estudos de diversidade genética (UETI et al., 2003). Isso é confirmado quando se observa a presença de variantes de *T. equi* que até o momento, foram detectadas somente em equinos da Europa e África (BHOORA et al., 2009; NAGORE et al., 2004; SALIM et al., 2010). Este gene também possui regiões conservadas, que podem ser utilizadas para estudos de ferramentas de diagnóstico de *T. equi* (BHOORA et al., 2010b; KIM et al., 2008) e que facilitam o alinhamento através das ferramentas de bioinformática. Além disso, o genoma de parasitos do Filo Apicomplexa, como a *Theileria parva*, pode conter 4800 cópias do gene *18S rDNA*, o que facilita sua detecção e estudo (TORRES-MACHORRO et al., 2010).

## 2.6 Variabilidade genética de *Babesia caballi* baseada no gene *rap-1*

*Babesia caballi* é considerada uma “babésia” clássica e, portanto, seu gênero não é foco de investigação ou proposta de mudança, como *T. equi*. No caso deste agente da PE, o principal motivo de investigação é a discordância no diagnóstico sorológico pelo cELISA, verificado em animais positivos provenientes de diferentes países.

O cELISA comercial, *Babesia caballi* Antibody Test Kit (VMRD Inc., Pullman, WA, EUA), foi desenvolvido utilizando uma proteína recombinante associada à roptria (*RAP-1*) de *B. caballi* (KAPPMAYER et al., 1999). A invasão de parasitos do gênero *Babesia* nas células hospedeiras envolve descarga de conteúdos de roptria com a participação da proteína associada à roptria -1 (*RAP-1*), a qual acredita-se que desempenhe um papel essencial na invasão, fixação e expansão do parasito na célula hospedeira (SAM-YELLOWE, 1996; SUAREZ et al., 1993). A expressão da proteína *RAP-1* pode ser detectada em diversos estágios do protozoário, incluindo os merozoítos e esporozoítos (SUAREZ et al., 2003).

O gene *rap-1* completo de *B. caballi* foi sequenciado a partir do cDNA, contendo 1943 pb, com a fase de leitura aberta (“open reading frame”) de 1467 pb delimitada por um códon

de iniciação na posição 119° (ATG) e terminando no códon de terminação (TAG) na posição 1586° (id: AF092736). A fase de leitura aberta que codifica uma proteína de 488 aminoácidos possui massa molecular aproximada de 60 KDa (KAPPMAYER et al., 1999).

O cELISA mostrou-se eficaz na detecção da exposição ao parasito em equinos da América do Norte e da América do Sul, Europa e alguns países da África (KAPPMAYER et al., 1999) e, portanto, foi utilizado como o método principal de detecção de exposição à *B. caballi* em muitos estudos (GARCÍA-BOCANEGRA et al., 2013; KOUAM et al., 2010; SEVINC et al., 2008). Além disso, é um dos testes adotados pela OIE (Organização Internacional de Epizootias) como teste padrão ouro no diagnóstico oficial para *B. caballi* (USDA, 2010). No entanto, um estudo realizado na África do Sul mostrou que o cELISA não foi capaz de detectar anticorpos anti-*B. caballi* em equinos infectados pelo agente, demonstrando uma possível heterogeneidade no gene *rap-1* de *B. caballi* (BHOORA et al., 2010a). O mesmo ocorreu em um estudo conduzido em Israel, com uma amostragem de 273 animais e 9,3% de positividade através de PCR, somente um animal positivo foi detectado pelo cELISA (RAPOPORT et al., 2014).

No Egito, nenhum animal positivo para *B. caballi* foi detectado pelo cELISA (MAHMOUD et al., 2016). Curiosamente, não foi observado extensivo polimorfismo na sequência de aminoácidos predita a partir de região do gene *rap-1* de *B. caballi* de isolados do Egito em relação ao isolado do USDA (United States Department of Agriculture), utilizado como sequência de referência (AF092736). Esta região do gene *rap-1* contém o epítipo da célula B definido pelo anticorpo monoclonal que foi utilizado no teste pelos autores do Egito (MAHMOUD et al., 2016).

Embora o cELISA tenha sido aprovado pela OIE, o ensaio é demorado e requer equipamentos e instalações laboratoriais especiais (KAPPMAYER et al., 1999; OIE, 2014). Além disso, o baixo rendimento da proteína *RAP-1* recombinante produzida por um sistema de expressão bacteriano limita a sua aplicação no diagnóstico (IKADAI et al., 2000). Em estudo realizado por Terkawi et al. (2012), somente a região C-terminal do gene *rap-1* foi clonada e expressa para melhorar a produtividade do antígeno alvo e depois validada para testes de diagnósticos sorológicos. A produtividade aumentou em pelo menos 10 vezes em comparação com a proteína *RAP-1* de comprimento total, possivelmente devido à natureza hidrofóbica da porção N-terminal (TERKAWI et al., 2012).

A estrutura, conformação e regulação da transcrição são características ainda desconhecidas para o gene *rap-1* de *B. caballi*. No caso de *Babesia bigemina* sabe-se que a regulação transcricional e pós-transcricional afeta a expressão de genes *rap-1* distintos (SUAREZ et al., 2003) e que o locus do gene *rap-1* de *B. bigemina* contém uma organização complexa com pelo menos três classes diferentes de genes relacionados. No caso de *Babesia bovis*, o locus do *rap-1* contém dois genes *rap-1*, agrupados em “tandem”, separados por uma região intergênica de 1,1 Kb (*rap-1 $\alpha$*  e *rap-1 $\beta$* ) (SUAREZ et al., 1998b), a qual faz parte da regulação de sua transcrição (SUAREZ et al., 2004). No entanto, mesmo para os piroplasmas de importância na bovinocultura, pouco se sabe sobre como a expressão do gene *rap-1* é controlada durante o ciclo de invasão celular, replicação e saída da célula (SUAREZ et al., 2003).

Portanto, existe ainda uma lacuna no conhecimento sobre este gene, e sobre os fatores que interferem de fato na não-detecção de animais positivos para *B. caballi* pelo cELISA em alguns países.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Estudo do gene *rap-1* de *Babesia caballi*

#### 3.1.1 Amostragem e coleta das amostras de sangue

De outubro de 2013 a novembro de 2014, propriedades criadoras de equinos foram visitadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quatrocentos e Trinta (n = 430) amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular em um sistema à vácuo utilizando-se dois tipos diferentes de tubos: um contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e outro com substância ativadora de coágulo, ambos de 5 mL.

As amostras foram armazenadas a 4°C durante o transporte. Ao chegar no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, as amostras foram aliquotadas em tubos de polipropileno e armazenadas a -80 °C até serem analisadas. O soro foi obtido após centrifugação a 2500 xg durante 10 minutos.

#### 3.1.2 Caracterização dos controles positivo e negativo

O sangue total e soro de um equino infectado para *B. caballi*, utilizado como amostra padrão para o desenvolvimento de testes de diagnóstico, foram cedidas pelo “National Veterinary Services Laboratories”, “United States Department of Agriculture” (USDA - Ames, IA, USA) por intermédio do “Centre for Food-borne and Animal Parasitology” (CFAP) e foram utilizadas como controle positivo para as técnicas de PCR e cELISA.

Já o sangue total e soro de um equino livre para *B. caballi* e *T. equi*, utilizado como controle negativo para as reações de PCR e cELISA, foi gentilmente cedido pelo “Western College of Veterinary Medicine”, “University of Saskatchewan”, Saskatoon, Canadá para a realização deste estudo, já que o Canadá é considerado área livre de PE em toda a sua extensão. Este controle negativo foi denominado “no template control” (NTC). Além deste, água ultrapura, do tipo I, foi utilizada também como controle negativo.

#### 3.1.3 ELISA competitivo

Amostras de soro de equinos foram analisadas utilizando o Kit *Babesia caballi* *Antibody Test Kit* (VMRD Inc., Pullman, WA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Esta técnica foi realizada no “Centre for Food-borne and Animal Parasitology” (CFAP), “Canadian Food Inspection Agency”.

Os valores de densidade óptica foram obtidos utilizando o leitor de microplacas SpectraMax 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). O teste foi considerado positivo quando o valor de inibição foi  $\geq 40\%$ .

#### 3.1.4 Extração de DNA de amostras de sangue de equinos

O DNA total foi extraído a partir de 200  $\mu$ L de sangue contendo EDTA utilizando o *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com um protocolo modificado desenvolvido pelo CFAP. Além das amostras, em cada bateria de extração, um NTC e uma água ultrapura utilizada como amostra, foram extraídos e testados posteriormente

pela PCR como controles desta etapa.

Resumidamente, as amostras de sangue foram transferidas para tubos contendo 600 µl de tampão de lise RBC (Qiagen). Homogeneizou-se por inversão várias vezes, seguido por 5 minutos de incubação à temperatura ambiente e um breve vórtex. Depois de uma breve agitação em vórtex, os tubos foram centrifugados a 17000 × g durante 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O volume restante foi ajustado para cerca de 200 µl com água livre de nucleases (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). O pelete foi cuidadosamente ressuspensão e processado de acordo com o protocolo do kit, exceto uma etapa adicional de duas lavagens consecutivas na coluna de sílica com tampão AW1. As amostras de DNA foram armazenadas à -20°C até à sua utilização. A concentração de DNA foi medida utilizando espectofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

As amostras de DNA foram padronizadas na concentração de 60 ng/µL. Com o objetivo de evitar contaminação, a extração de DNA foi realizada em ambiente separado das outras etapas da PCR.

### **3.1.5 Detecção de *Babesia caballi* por PCR em tempo real**

A detecção do gene de *18S rDNA* de *B. caballi* pela PCR em tempo real (qPCR) foi realizada como descrito por Bhoora et al. (2010a). Brevemente, foram utilizados os “primers” Bc\_18SF402 (5'-GTAATTGGAATGATGGCGACTTAA-3') e Bc\_18SR496 (5'-CGCTAT TGGAGCTGGAATTACC-3'), e a sonda Bc\_18SP (5'-6-FAM-CCTCGCCAGAGTAA-MGB-3') na amplificação de um fragmento de 95 pb do gene *18S rDNA* de *B. caballi*. O ensaio da qPCR foi realizado utilizando o equipamento CFX96 Real-Time PCR Detection (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). O volume total da reação foi de 20 µl, sendo 1X de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,9 mM de cada “primer”, 0,25 mM da sonda TaqMan MGB e aproximadamente, 120 ng/µL de DNA das amostras de equinos. As condições de termociclagem foram: ativação da DNA polimerase a 95 °C por 20 s, seguido de 45 ciclos de 1 s a 95 °C e 20 s a 60 °C. As amostras com valores de Cq inferiores a 40 ciclos foram consideradas positivas para *B. caballi*.

Os controles negativos, positivos das reações de PCR e NTC descritos no ítem 3.1.2, foram pipetados dentro e fora da cabine de segurança biológica, e incluídos em duplicata em cada placa. O preparo da reação e a pipetagem das amostras contendo DNA foram realizados em capela de fluxo laminar distintas, esterilizadas com luz UV (ultravioleta) imediatamente antes de cada reação. Ponteiras com filtro foram utilizadas em todas as etapas do estudo.

O controle interno exógeno não foi utilizado neste ensaio de qPCR, cuja proposta foi apenas uma triagem dos animais positivos e não a quantificação da carga parasitária.

### **3.1.6 Amplificação e sequenciamento do gene *rap-1* de *Babesia caballi***

#### **3.1.6.1 Escolha das sequências e desenho de “primers” para amplificação do gene *rap-1* de *Babesia caballi***

Sequências completas do gene *rap-1* de *B. caballi* foram selecionadas em base de dados públicos (GenBank) para o desenho de “primers” capazes de amplificar o gene completo em isolados brasileiros. As sequências escolhidas foram de três isolados dos EUA (ID: AB017700.1; AF092736.1; EU669865.1) e três isolados da África do Sul (ID: GQ871778.1; GQ871779.1; GQ871780.1).

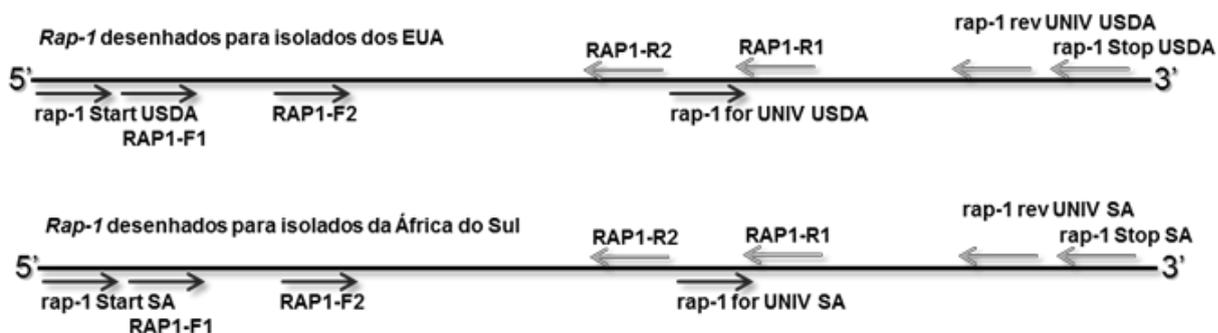
Após esta etapa, as sequências selecionadas foram alinhadas pelo método ClustalW no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). O gene *rap-1* completo de *B. caballi* apresentou inúmeros pontos de polimorfismo entre as sequências dos EUA e África do Sul (BHOORA et al., 2010a). Então, seis pares de “primers” foram manualmente desenhados, baseando-se no alinhamento das sequências, com o objetivo de amplificar o gene *rap-1* completo de *B. caballi* de isolados brasileiros.

Para tal, dois pares de “primers”, *rap-1* Start USDA - *rap-1* Stop USDA e *rap-1* for UNIV USDA - *rap-1* rev UNIV USDA, foram desenhados baseados no gene completo dos EUA; outros dois pares, *rap-1* Start SA - *rap-1* Stop SA e *rap-1* for UNIV SA - *rap-1* rev UNIV SA, foram desenhados baseados nas sequências da África do Sul; e outros dois pares de “primers” baseados em ambas as sequências, dos EUA e da África do Sul, denominados RAP1-F1 e RAP1-R1 foram utilizados para amplificar um fragmento de 899 pb na primeira reação, ao passo que RAP1-F2 e RAP1-R2 foram utilizados na segunda rodada de amplificação para produzir um fragmento de 482 pb usando 2 µl do primeiro produto de amplificação como molde (Tabela 1; Figura 1). A posição dos “primers” no gene *rap-1* está demonstrada no ANEXO II ao V, através do alinhamento das sequências utilizadas para o desenho (exceto: EU669865.1 e GQ871778.1).

**Tabela 1.** Nome, sequência, tamanho, temperatura de “Melting”, posição no gene e tamanho do produto amplificado dos “primers” desenhados para amplificação do gene *rap-1* completo de *Babesia caballi* em amostras brasileiras

Nome	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)	Posição no gene	Tamanho do produto (pb)
<i>rap-1</i> Start SA	ATG AGG TGY TCT GCC GGT TC	20	62-64	119-139	1772
<i>rap-1</i> Stop SA	CTA GGA TAA GGC AGA CTC ATA GTT G	25	72	1866-1891	
<i>rap-1</i> for UNIV SA	TCG CGT ATG GTA GTG AAG AGA C	22	66	955-977	858
<i>rap-1</i> rev UNIV SA	GCT GAC CTC CTC CAA GGT R G	20	64-66	1793-1813	
<i>rap-1</i> Start USDA	ATG AGG TGT TCT GCG AGT TC	20	60	119-139	1834
<i>rap-1</i> Stop USDA	CTA GAG TGC AAC CGA GCA ATG	24	64	1929-1953	
<i>rap-1</i> for UNIV USDA	GCG TTT CTC CCT TAT GGT AGT G	22	66	948-970	852
<i>rap-1</i> rev UNIV USDA	AGG GTG GGC TGC TGA ATA AC	20	62	1780-1800	
RAP1-F1	TTT TY G GCG CCC TCT TGC	18	56-58	141-159	899
RAP1-R1	TCA GCT TCA TGT ACC ACT TCT TAT AC	26	72	1014-1040	
RAP1-F2	TAC CAA CCR CTG ACC CTT C	19	58-60	473-492	482
RAP1-R2	AAA CGC TY C GCA AAC TTG G	19	56-58	936-955	

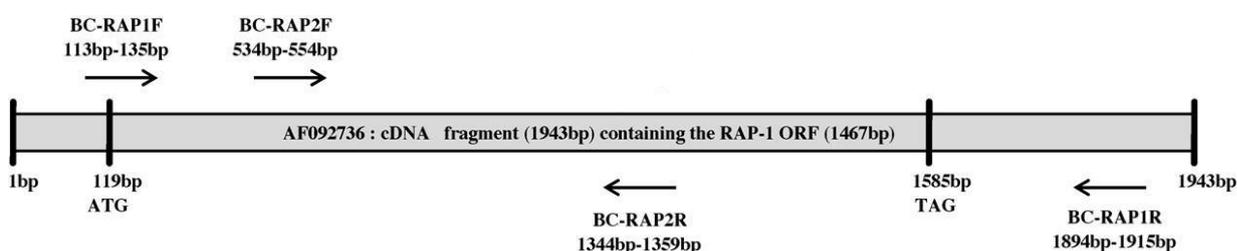
Tm: Temperatura de *Melting* calculada no programa Oligo Analyzer® levando em consideração somente o conteúdo de CG e AT dos “primers”; pb: par de base.



**Figura 1.** Representação da posição dos pares de “primers” desenhados para amplificar sequências do gene *rap-1* de *Babesia caballi* de isolados brasileiros, baseado em isolados dos EUA e África do Sul.

Como o sequenciamento pelo método Sanger é eficiente para 700 até 900 pb, os “primers” foram desenhados na extremidade 5’, meio do gene e extremidade 3’, possibilitando a total cobertura do gene *rap-1* de *B. caballi*. Em seguida, os “primers” foram testados no programa Oligo Analyzer 1.5 para observação das características físicas (temperatura de *Melting*, percentual de CG) e químicas (“self-annealing”, “hairpin loop”, “primer-dimer”). A especificidade foi testada através da ferramenta primer-Blast.

Além da abordagem do desenho de “primers” para amplificação do gene *rap-1* completo de *B. caballi*, foi realizada a amplificação do gene a partir de reação de PCR desenvolvida por Bhoora et al. (2009). Para esta reação os “primers” BC-RAP1F e BC-RAP1R foram utilizados na tentativa de amplificação do gene *rap-1* completo de *B. caballi*. Para o sequenciamento, além deste par de “primers”, os oligos BC-RAP2F e BC-RAP2R também foram utilizados na tentativa de montagem do gene completo (Figura 2).



**Figura 2.** Representação da posição dos pares de “primers” segundo Bhoora et al. (2009) para amplificar seqüências do gene *rap-1* de *Babesia caballi* de isolados brasileiros, baseado em isolado do USDA.

### 3.1.6.2 Condições das reações de PCR para o gene *rap-1* de *Babesia caballi*

Os primeiros quatro pares de “primers” foram testados da seguinte forma: uma primeira reação foi realizada com todas as possíveis combinações dos “primers” que amplificam o gene *rap-1* completo (*rap-1* Start USDA com *rap-1* Stop USDA; *rap-1* Start USDA com *rap-1* Stop SA; *rap-1* Start SA com *rap-1* Stop USDA; *rap-1* Start SA com *rap-1* Stop SA). Uma segunda reação nested, foi realizada com a combinação dos seguintes “primers”: *rap-1* for UNIV USDA com *rap-1* rev UNIV USDA; *rap-1* for UNIV USDA com *rap-1* rev UNIV SA; *rap-1* for UNIV SA com *rap-1* rev UNIV USDA; *rap-1* for UNIV SA com *rap-1* rev UNIV AS (Tabela 2).

**Tabela 2.** Nome, seqüência, tamanho, temperatura de “Melting” e tamanho do produto amplificado dos “primers” desenhados para amplificação do gene *rap-1* completo de *Babesia caballi* em amostras brasileiras

"Primers" Primeira Reação			"Primers" Segunda Reação		
Nome		Tamanho esperado	Nome		Tamanho esperado
<i>rap-1</i> (F) Start USDA		≈1800 pb	<i>rap-1</i> for UNIV USDA		≈860 pb
<i>rap-1</i> (R) Stop USDA			<i>rap-1</i> rev UNIV USDA		
<i>rap-1</i> (F) Start USDA		≈1800 pb	<i>rap-1</i> for UNIV USDA		≈860 pb
<i>rap-1</i> (R) Stop AS			<i>rap-1</i> rev UNIV AS		
<i>rap-1</i> (F) Start AS		≈1800 pb	<i>rap-1</i> for UNIV AS		≈860 pb
<i>rap-1</i> (R) Stop USDA			<i>rap-1</i> rev UNIV USDA		

**Tabela 2.** Continuação.

"Primers" Primeira Reação			"Primers" Segunda Reação		
Nome		Tamanho esperado	Nome		Tamanho esperado
<i>rap-1</i> (F) Start AS		≈1800 pb	<i>rap-1</i> for UNIV AS		≈860 pb
<i>rap-1</i> (R) Stop AS			<i>rap-1</i> rev UNIV AS		
RAP1-F1*		≈899 pb	RAP1-F2*		≈482 pb
RAP1-R1*			RAP1-R2*		

\*Desenhado a partir de ambas as sequências. F= “forward”; R= “reverse”; AS= África do Sul; USDA= “United States Department of Agriculture”.

A primeira e a segunda reação tiveram um volume final de 50 µL, contendo: 200 µM de cada dNTP (dNTP Mix, Qiagen), 0,2 µM de cada “primer”, 1 U da polimerase Phusion High-Fidelity DNA (Thermo Scientific) em tampão Phusion HF à 1X e 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>. Na primeira reação, 180 ng do DNA de equino foi utilizado e na segunda, 2 µL do produto de PCR da primeira reação foi utilizado como molde.

Foi estabelecida uma condição de termociclagem genérica utilizando o sistema “Touchdown” para a primeira reação, iniciando com desnaturação à 98 °C por 2 min, seguido de 9 ciclos com desnaturação à 98 °C por 10 seg, anelamento com temperatura iniciando em 65 °C e caindo 0,5 °C a cada ciclo por 1 min e extensão à 72 °C por 1 min. Em seguida, por mais 24 ciclos, à 98 °C por 10 seg, 60 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e extensão final à 72 °C por 2 min. Já a segunda ocorreu à 98 °C por 2 min, seguido de 25 ciclos à 98 °C por 10 seg, 62 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e extensão final à 72 °C por 2 min.

As reações de nested PCR, com os “primers” RAP1-F1/RAP1-R1 e RAP1-F2/RAP1-R2, foram realizadas em duplicata. Um volume final de 50 µL continha 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada “primer”, e 1 U da Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (Thermo Scientific) em tampão Phusion HF à 1X. A quantidade de DNA aplicada em cada reação foi de 180 ng, aproximadamente.

As condições de termociclagem de ambos os ciclos de amplificação foram de 2 min a 98°C, depois 10 ciclos a 98°C/10s, 65°C/30s e 72 °C/30s, onde a temperatura de anelamento foi diminuindo 0,5 °C por ciclo. Mais 25 ciclos a 98°C/10s, 60°C/30s e 72 °C/30s foi adicionado as condições de termociclagem. A extensão final foi à 72 °C por 2 min.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. A corrida eletroforética foi de 60 minutos à 100V (5V/cm) em tampão TBE (Tris, ácido bórico e EDTA). Em seguida, os géis foram revelados em SyBr Gold 1X (Thermo Scientific) e visualizados em fotodocumentador Gel Doc XR+ System (Bio-Rad Laboratories).

Os produtos amplificados pela nPCR com os “primers” RAP1-F2 e RAP1-R2 foram purificados a partir de gel de agarose à 1,5% com o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) segundo o protocolo do fabricante e armazenados a -20°C até a sua utilização. As marcações das bandas no gel foram feitas sob luz UV de baixa intensidade. Em seguida, a excisão das bandas foi realizada com a luz UV apagada, no intuito de evitar degradação do DNA exposto. As sequências de nucleotídeos dos produtos da nPCR foram sequenciadas nas duas direções com os mesmos “primers” da nPCR pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). O sequenciamento foi realizado no “Plant Biotechnology Institute of the National Research Council” (Saskatoon, Canadá).

Com relação à reação de PCR desenvolvida por Bhoora et al. (2009) para amplificação do gene *rap-1* completo de *B. caballi*, o volume final utilizado foi de 25 µL contendo: 2,5 µL do tampão da PCR (10mM Tris-Cl; pH=8,3; 50mM KCl, Invitrogen®), 4 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub> - 50 mM, Invitrogen®), 0,4 mM de cada nucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e

dCTP-100mM) (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,4 µM dos “primers” BC-RAP1F e BC-RAP1R, 1,0 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>) e 3 µL de DNA total (180 ng/µL). Água livre de Nuclease (Ambion<sup>®</sup>) foi usada como controle negativo.

As condições da termociclagem foram: 95 ° C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 59°C por 1,5 min, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram purificados a partir de gel de agarose 1,5% e sequenciados pelo método Sanger no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia Animal (UFRRJ) e no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL, USP). O sequenciamento da mesma amostra com os “primers” BC-RAP1F/BC-RAP1R e BC-RAP2F/BC-RAP2R foi realizado para assegurar uma maior cobertura de sequenciamento.

### 3.1.7 Análise das sequências do gene *rap-1*

Os cromatogramas das sequências foram analisados, editados e montados em “contigs” utilizando o programa Clone Manager Professional 9.4 (Sci-Ed Software, EUA). Este programa também foi utilizado para gerar sequências de aminoácidos à partir de nucleotídeos.

O algoritmo “Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> foi utilizado para identificar sequências similares em bases de dados públicas (ALTSCHUL et al., 1990). As análises de agrupamentos foram realizadas utilizando 23 sequências únicas de isolados brasileiros de *B. caballi* gerados por este estudo com outras sequências anteriormente depositadas de isolados do USDA (AB017700), de Porto Rico (EU669865), bem como 3 sequências da África do Sul (GQ871778, GQ871779, GQ871780), 5 sequências de Israel (KF059875, KF059876, KF059877, KF059878, KF059879), e 3 sequências do Egito (KR811095, KR811096, KR811097). A sequência do gene *rap-1* de *Babesia bovis* (AF030059) foi utilizada como um “outgroup”.

As sequências de nucleotídeos deste estudo com tamanho inferior à 500pb foram traduzidas individualmente para aminoácidos no programa Clone Manager 9.0 através de recurso para processar moléculas e determinar aminoácidos. Na tradução de sequências depositadas, de nucleotídeo para aminoácidos, o CDS (“Coding sequence”) do GenBank foi levado em consideração. Após tradução das sequências foi realizado um alinhamento múltiplo das sequências através da ferramenta Clustal W e matrix BLOSUM. Todos os parâmetros foram mantidos na configuração padrão, no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013).

O alinhamento das sequências dos polipeptídeos determinados a partir do gene *rap-1* foi submetido à análise de sequências pelo método Maximum likelihood com distâncias entre pares estimados pelo modelo de Poisson. A análise de Bootstrap com 1000 repetições foi utilizada para testar os agrupamentos formados em cada modelo de reconstrução. Apenas os agrupamentos suportados por valores de Bootstrap acima de 80% foram considerados. Esta análise foi realizada através do programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). A escolha do modelo evolutivo foi realizada a partir de testes no programa CLC Main Workbench.

A amostra que apresentou o menor grau de identidade (id = 9) da sequência em comparação com o isolado do USDA (AB017700) e que apresentou picos duplos em várias bases na análise do cromatograma foi utilizada para amplificação de um fragmento do gene *rap-1* de *B. caballi* com a utilização da enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>). Esta enzima adiciona a cauda poli-A, necessária para a clonagem através do sistema pGEM-T<sup>®</sup> Easy Vector (Promega, Madison, WI, EUA). Em seguida, o DNA plasmidial de quatro

clones propagados de *E. coli* transformadas foi extraído utilizando o QIAprep spin Miniprep Kit (Qiagen) e a área do inserto foi sequenciada em ambos sentidos. As sequências de nucleotídeos destes clones também foram transformadas em aminoácidos e incluídas na análise de agrupamento e similaridade.

A sequência do gene *rap-1* parcial de *B. caballi* amplificado através da reação de Bhoora et al. (2009) foi analisada, editada e montada utilizando o programa Clone Manager Professional 9.4 (Sci-Ed Software, EUA). O alinhamento das sequências de nucleotídeos foi realizado pelo método ClustalW e submetido à análise de agrupamento pelo método de Maximum likelihood, com distâncias entre pares estimados pelo modelo Tamura-Nei. A escolha do modelo evolutivo foi baseada em teste dos dados realizado no programa CLC Main Workbench.

### 3.2 Estudo da diversidade genética de *Theileria equi* através do gene *18S rDNA*

#### 3.2.1 Amostragem

As coletas de sangue de equino foram realizadas nos municípios de Petrópolis e Seropédica, estado do Rio de Janeiro, Brasil. As amostras utilizadas neste estudo foram provenientes de um estudo epidemiológico realizado anteriormente, onde foram coletadas 314 amostras de sangue de equinos, sendo 173 de Petrópolis e 141 de Seropédica (PECKLE et al., 2013).

No município de Seropédica, 91% (n=128/141) dos equinos apresentaram o DNA alvo de *T. equi* através da qPCR com alvo no gene *18S rDNA*. Já em Petrópolis foi observada uma positividade de 72% (n=125/173) (PECKLE et al., 2013). Este estudo foi utilizado como triagem de amostras de sangue de equino positivas para *T. equi*.

#### 3.2.2 Seleção das amostras positivas para sequenciamento do gene *18S rDNA* de *Theileria equi*

A escolha das amostras para amplificação do gene *18S rDNA* de *T. equi* foi realizada da seguinte forma: foram selecionadas 10 (dez) amostras positivas do município de Seropédica e outras 10 (dez) amostras positivas do município de Petrópolis com os valores de Cq mais baixos, obtidos pela técnica de qPCR. Ou seja, as amostras que continham a maior quantidade de DNA alvo de *T. equi* dentro do grupo de amostras consideradas positivas foram selecionadas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Amostras de sangue de equinos consideradas positivas para *Theileria equi* pelo método de PCR em tempo real segundo Kim et al. (2008), escolhidas para amplificação do gene *18S rDNA* completo à partir do ciclo de quantificação considerado baixo.

Seleção das amostras de <i>Theileria equi</i>					
Petrópolis			Seropédica		
ID	Cq M	NA	ID	Cq M	NA
186	34.56	359	62	32.22	1875
195	28.10	34100	325	31.33	3510
198	25.24	255004	337	29.08	17022

**Tabela 3.** Continuação.

Seleção das amostras de <i>Theileria equi</i>						
Petrópolis			Seropédica			
ID	Cq M	NA	ID	Cq M	NA	
202	26.16	133343	339	35.49	188	
248	29.25	15108	348	27.32	58799	
295	32.90	1158	447	30.16	8007	
296	30.83	4978	478	29.99	9006	
297	30.69	5485	496	30.46	6445	
298	29.99	8986	506	28.37	28195	
319	32.78	1260	525	28.67	22777	

ID: identificação da amostra no banco de dados; Cq M: ciclo de quantificação médio; NA: número de alvos aproximados estimados por curva padrão com eficiência de 97,65% segundo Peckle et al. (2013).

Foram selecionadas amostras de ambos os municípios, pois estes pertencem à regiões geográficas distintas dentro do estado do Rio de Janeiro, que possuem diferenças significativas com relação à temperatura média anual, pluviometria, tipo de clima, e também no manejo dos animais (PECKLE et al., 2013), visando a obtenção de isolados de *T. equi* com maior variabilidade genética.

### 3.2.3 Extração de DNA das amostras de sangue positivas para *Theileria equi*

De cada amostra de sangue foi extraído o DNA a partir de 300  $\mu$ L de sangue total, através do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega<sup>®</sup>, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraído do sangue foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop<sup>®</sup> ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA), padronizadas na concentração de 100 ng/ $\mu$ L em um total de três alíquotas, a partir da diluição em solução de Tris-EDTA, e armazenadas a -80°C até o momento da realização da técnica de PCR.

### 3.2.4 Amostras Controles da PCR

O controle positivo utilizado na reação foi obtido a partir da extração de DNA de uma amostra de sangue de um equino infectado cronicamente com a cepa Jaboticabal/UNESP de *Theileria equi*. O Cq do controle positivo utilizado nas reações variou de 27 à 28 ciclos na qPCR realizada com alvo no *18S rDNA* em estudo prévio (PECKLE et al., 2013), sendo aproximadamente 10.000 o número de cópias do alvo nesta amostra. O controle negativo utilizado foi composto por água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion<sup>®</sup>).

### 3.2.5 Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene *18S rDNA* de *Theileria equi*

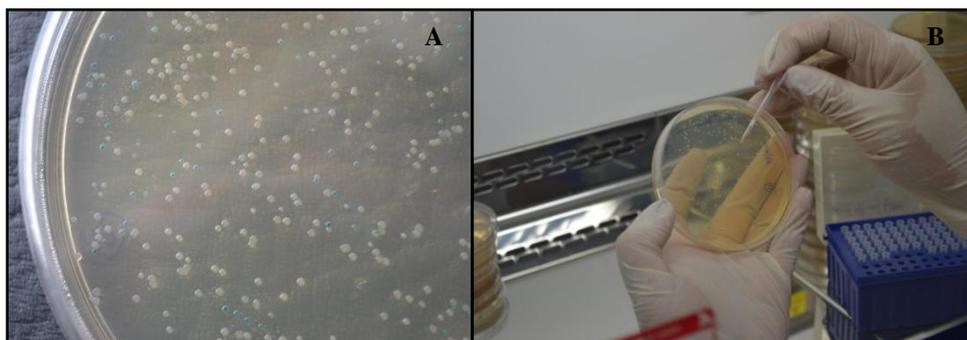
O gene completo *18S rDNA* de *T. equi* foi amplificado seguindo a metodologia descrita por Bhoora et al. (2010b). Brevemente, os “primers” NBabies1F e 18SRev-TB

foram utilizados em uma primeira PCR para amplificar o gene *18S rDNA* completo, de aproximadamente 1600 pb das 20 amostras de DNA de sangue de equinos positivos para *T. equi*. Brevemente, a amplificação do gene nas amostras positivas descritas foi realizada com volume final de 25 µL contendo: 1 X de Amplitaq Gold 360 PCR Master Mix 1 X (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 0,2 µM de cada “primer” (NBabesia1F e 18SRev-TB) e aproximadamente 180ng de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial à 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos à 94 °C por 30 seg, 60 °C por 45 seg e 72 °C por 1 min, e uma extensão final à 72 °C por 7 min.

Em seguida, os produtos de amplificação foram clonados em plasmídeo pGEM-T® Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA) no Laboratório de Nutrição de Plantas, Instituto de Agronomia, que possui Certificado de Qualidade em Biossegurança -CQB (processo n° 01200.005374/1996-71), no qual é permitido trabalhar com Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), como a *Escherichia coli*.

Brevemente, o DNA alvo de *T. equi* amplificado por PCR foi inserido em um plasmídeo vetor (pGEM-T® Easy Vector), em um processo chamado de “Ligação”. Em seguida, realizou-se a “Transformação” de células competentes *E. coli* DH5α, através de eletroporação (1700 V). Após a eletroporação, o meio SOC foi adicionado e todo conteúdo da cubeta foi vertido para um tubo falcon para crescimento da célula competente transformada, em estufa agitadora por 1h e 30min (37 °C a 150 rpm). 200 µL deste meio foi plaqueado com auxílio da alça de Drigalski em meio LB sólido com adição de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) à 40 µg/mL, IPTG (isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo) na concentração de 0,5 mM e Ampicilina à 0,1 mg/mL. O IPTG induz a produção de enzima β-galactosidase pelo gene LacZ, que degrada o substrato X-gal formando um produto de cor azul (colônias azuis). Após a adição do fragmento exógeno no plasmídeo, introduzindo-o na região do gene LacZ, a enzima β-galactosidase não é produzida, originando colônias de cor branca. Estas últimas são o alvo de escolha, já que representam as células transformadas.

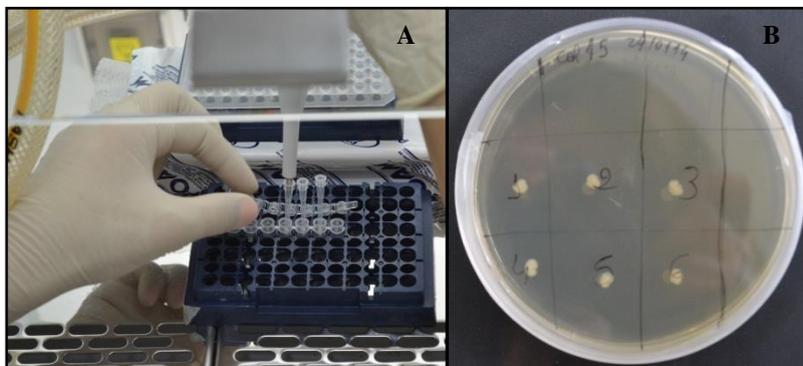
Com a superfície do meio completamente seco, as placas foram fechadas e deixadas em estufa bacteriológica à 37 °C, “overnight”. No dia seguinte, as colônias brancas mais isoladas e únicas, foram selecionadas para crescimento (Figura 3).



**Figura 3.** Demonstração da técnica de cultivo e seleção de bactérias *Escherichia coli* transformadas após inserção do gene *18S rDNA* de *Theileria equi*. Em A, observam-se as colônias azuis, onde houve a expressão de β-galactosidase, e as colônias brancas, as quais contém o inserto esperado no plasmídeo. Em B, é possível observar a seleção das colônias brancas mais isoladas.

Seis colônias brancas foram selecionadas para cada amostra, plaqueadas em uma “placa espelho” contendo meio LB sólido com adição de Ampicilina (0,1 mg/mL) (Figura 4B)

e testadas em reação de PCR para a presença do inserto, com os mesmos “primers” e condições utilizadas na amplificação inicial do DNA alvo de *T. equi* (Figura 4A). Colônias azuis foram adicionadas na PCR como controle negativo da reação.



**Figura 4.** Seis colônias de cada amostra foram selecionadas para crescimento, teste da presença do inserto e correta transformação da bactéria. Assim, cada colônia branca foi cultivada em separado em meio LB sólido e utilizada como *template* em uma PCR teste. Em A, adição das bactérias para reação de PCR teste no momento da seleção das colônias. Em B, seis colônias selecionadas da amostra n°15 após 48 horas de crescimento à 37 °C em estufa bacteriológica.

As colônias que testaram positivas na PCR realizada, foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido com Ampicilina (0,1 mg/mL), para crescimento em estufa agitadora à 37 °C, 140 rpm, *overnight*. A extração do DNA plasmidial das bactérias transformadas foi realizada utilizando o kit Plasmid QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) segundo recomendações do fabricante.

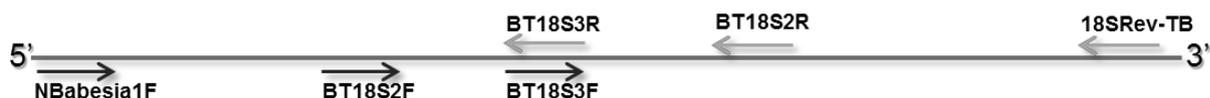
Após a extração do DNA plasmidial, procedeu-se a digestão pela enzima de restrição FastDigest Alw26I (Thermo Scientific) como método para confirmar mais uma vez a inserção e verificar a orientação do gene *18S rDNA* no plasmídio das células DH5 $\alpha$  transformadas. A digestão pela enzima FastDigest Alw26I foi realizada segundo orientações do fabricante e foram esperados fragmentos com 765 pb, 2009 pb e 1849 pb, aproximadamente.

Após confirmação, o DNA plasmidial do clone de cada amostra foi sequenciado com seis diferentes “primers” na empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). O sequenciamento foi repetido para algumas amostras que apresentaram qualidade ruim nos cromatogramas, no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os seis “primers” enviados para sequenciamento foram: NBabesia1F, BT18S3R, BT18S3F, 18SRev-TB, BT18S2F e BT18S2R (BHOORA et al., 2009) (Quadro 1; Figura 5). O sequenciamento da mesma amostra com diferentes “primers” foi realizado para assegurar uma maior cobertura de sequenciamento e confiabilidade dos dados na montagem dos “contigs”.

**Quadro 1.** “Primers” utilizados no sequenciamento do gene *18S rDNA* completo, segundo Bhoora et al. (2009).

### Quadro 1. Continuação.

Nome	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)	Posição no gene
NBabesia1F	AAG CCA TGC ATG TCT AAG TAT AAG CTT TT	29	57	1
18SRev-TB	GAA TAA TTC ACC GGA TCA CTC G	22	61	1568
BT18S2F	GGG TTC GAT TCC GGA GAG GG	20	60,3	357
BT18S2R	CCC GTG TTG AGT CAA ATT AAG CCG	24	60,1	1135
BT18S3F	GGG CAT TCG TAT TTA ACT GTC AGA GG	26	59,2	784
BT18S3R	CCT CTG ACA GTT AAA TAC GAA TGC CC	26	59,2	809



**Figura 5.** Representação esquemática dos “primers” utilizados no sequenciamento do gene *18S rDNA* completo de *Theileria equi* de isolados brasileiros. Nas pontas 5’ e 3’, encontram-se os “primers” empregados na amplificação do gene completo.

### 3.2.6 Análise de dados de sequenciamento

Os eletroferogramas foram analisados, editados e montados em *contigs* utilizando o programa DNA Baser Sequence Assembly 3.0 (Heracle BioSoft SRL, Romania). BLASTn foi utilizado para identificar sequências similares em bases de dados públicas (ALTSCHUL et al., 1990).

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se um conjunto de sequências genéticas do *18S rDNA* de Piropasmida exportadas da base de dados ARB-Silva (QUAST et al., 2013), que incluíram as 20 sequências deste estudo, 48 sequências de *T. equi* (“ingroup”), 8 sequências de outros agentes da família Theileriidae, 8 sequências de Babesiidae e 2 outros agentes do filo Apicomplexa (“outgroup”). O alinhamento das sequências foi realizado no SINA (“Silva Incremental Aligner”) (PRUESSE et al., 2012) e todas as manipulações subsequentes do conjunto de dados foram realizadas no programa ARB (LUDWIG et al., 2004), e estas manipulações incluíram inspeções manuais para a remoção de locais não alinhados e colunas com lacunas (“gaps”).

O conjunto de dados foi então aparado para produzir um conjunto de dados de mesmo comprimento, de 1202 caracteres. O melhor modelo evolutivo foi então selecionado usando o programa jModelTest\_2.1.4 (DARRIBA et al., 2015). A análise de máxima verossimilhança (ML) foi então realizada utilizando PhyML v3.0 (GUINDON et al., 2010) com o modelo de substituição de nucleotídeos GTR + G + I. A confiabilidade dos ramos internos foi avaliada pelo método não paramétrico “Bootstrap” com 1000 pseudo-replicatas. A tabela de distância genética foi calculada utilizando o programa ARB (LUDWIG et al., 2004). Da mesma forma, foram calculadas as distâncias intergrupos, intragrupos e as distâncias globais.

As vinte novas sequências do *18S rDNA* de *T. equi* obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank sob os seguintes números de acesso: KX722511 à KX722525, KJ573370, KJ573371, KJ573372.2, KJ573373.2 e KJ573374.2 (Tabela 6/Resultados).

### **3.2.7 Princípios Éticos**

A coleta de material biológico foi aprovada pela Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (COMEP/UFRRJ), processo número 23083.001257/2012-53 (protocolo N°201/2012) (ANEXO I).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Estudo do gene *rap-1* de *Babesia caballi*

A produção de anticorpos em resposta à infecção por *Babesia caballi* foi detectada pelo cELISA no soro de 58,74% (n = 252/429) dos equinos amostrados do Rio de Janeiro, Brasil. O fragmento do *18S rDNA* deste parasito foi detectado por qPCR no sangue total de 7,92% (n = 34/429) dos animais, com valores médios de Cq variando de 29,60 à 39,89. Todos os animais que apresentaram resultados positivos para *B. caballi* por qPCR também foram positivos pelo cELISA (Tabela 4).

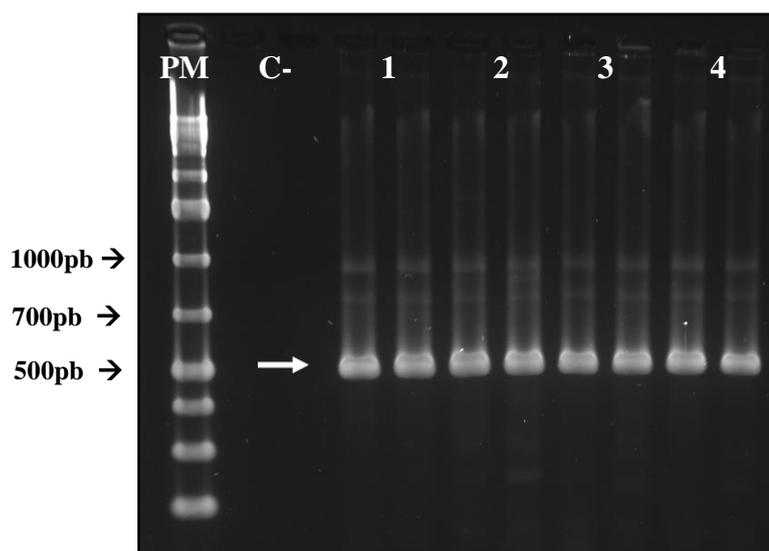
**Tabela 4.** Número de animais positivos e negativos e percentual de positividade na PCR em tempo real e cELISA para *Babesia caballi*

Testes de Diagnóstico		cELISA		TOTAL
		(+)	(-)	
qPCR	(+)	34 (7,92%)	0 (0%)	34
	(-)	218 (50,81%)	177 (41,26%)	395
TOTAL		252	177	429 (100%)

Os primeiros quatro pares de “primers” desenhados para amplificar a sequência completa do gene *rap-1* de *B. caballi* de amostras brasileiras (*rap-1* Start USDA - *rap-1* Stop USDA e *rap-1* for UNIV USDA - *rap-1* rev UNIV USDA, *rap-1* Start SA - *rap-1* Stop SA e *rap-1* for UNIV SA - *rap-1* rev UNIV SA), resultaram em ampliações inespecíficas. Dessa forma, procedeu-se a extração e purificação das bandas de tamanho esperado ou bandas resultantes de amplificação intensa. No entanto, os resultados do sequenciamento não apresentaram cromatogramas com qualidade satisfatória. É importante ressaltar que, todas as tentativas de amplificação da porção N-terminal do gene *rap-1* de *B. caballi* resultaram em fragmentos de tamanhos não esperados e quando sequenciados geraram cromatogramas de baixa qualidade, que não foram conclusivos.

As amostras dos equinos positivas para *B. caballi*, tanto pela qPCR quanto pelo cELISA foram utilizadas na amplificação do fragmento de 482 pb do gene *rap-1* através da nPCR desenvolvida neste estudo (Figura 6). O fragmento desejado foi amplificado em 32 das 34 amostras positivas. Após sequenciamento, foi recuperado um fragmento de 456 pb. Através da análise das sequências destas 32 amostras, foram identificadas 24 sequências não idênticas para o fragmento do gene *rap-1* amplificado. Uma das sequências foi removida da análise devido à má qualidade do cromatograma (id = 72).

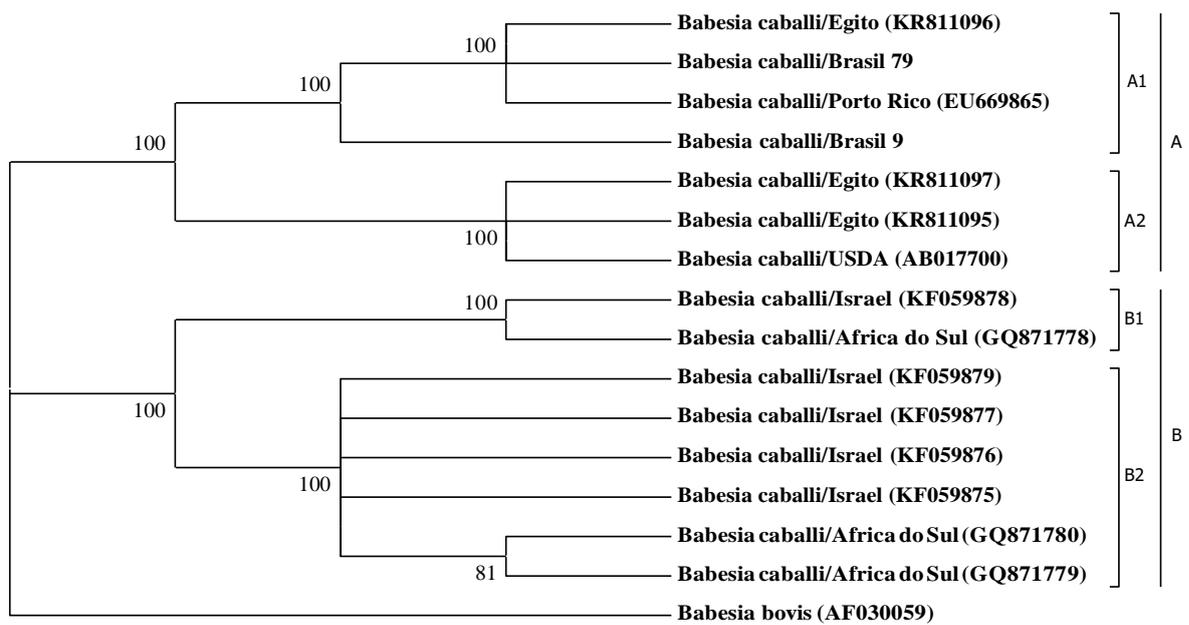
A amostra de *B. caballi* do Brasil que apresentou menor identidade em relação ao isolado USDA (id = 9), após clonagem, produziu quatro clones distintos que também foram adicionados nas análises de agrupamentos.



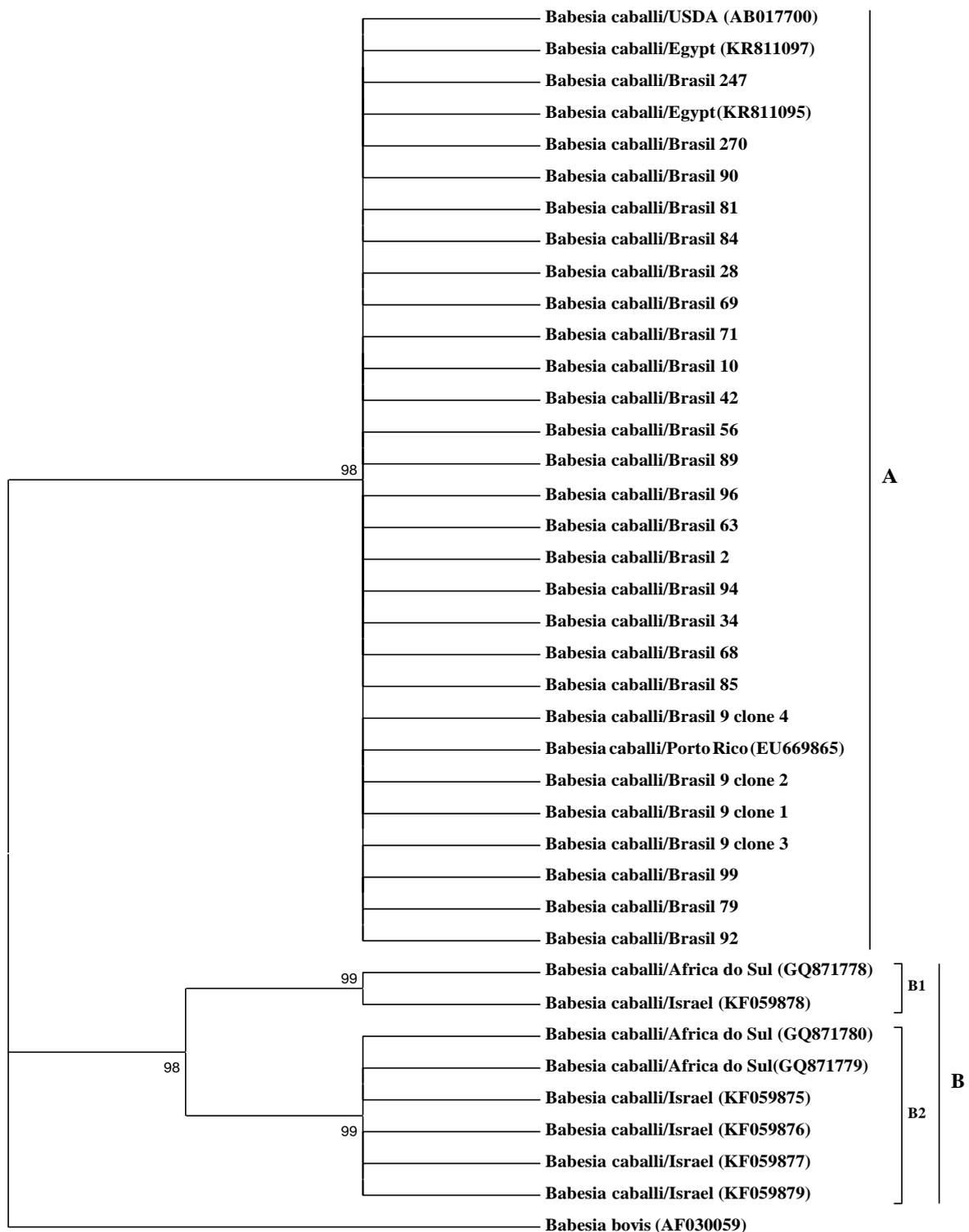
**Figura 6.** Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação obtidos a partir da utilização dos “primers” RAP1-F2/RAP1-R2 na segunda reação da nested PCR. Os “primers” utilizados na primeira reação foram RAP1-F1/RAP1-R1. PM: peso molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder; C-: controle negativo da reação; 1: amostra positiva RJ9; 2: amostra positiva RJ79; 3: amostra positiva RJ81; 4: amostra positiva RJ84. Todas as amostras foram testadas em duplicata. A seta indica o produto de amplificação com tamanho esperado de 482 pb.

A análise de agrupamento de sequências de 152 aminoácidos determinados a partir de 457 pb do gene *rap-1* de *B. caballi*, proporcionou uma árvore com alto suporte nos nós (Figura 8). Ao total foram identificados dois cladogramas bem distintos. No primeiro clado (A) estão todos os isolados brasileiros, juntamente com isolados do USDA, Porto Rico e os isolados do Egito. Isolados da África do Sul e Israel ficaram agrupados no segundo clado bem suportado, com alto valor de “Bootstrap” (B).

Na tentativa de amplificação do gene *rap-1* completo segundo Bhoora et al. (2009), foi possível sequenciar um fragmento de 1244 pb nas amostras 9 e 79. Com relação à porção final do gene *rap-1* (3’), mais uma vez, não se obteve sucesso no sequenciamento. Na análise de agrupamento pelo método de Maximum Likelihood, da mesma forma, não houve diferença entre a formação dos grupos, que consistiram em clado A1, contendo os dois isolados brasileiros, Porto Rico e um isolado do Egito; A2, contendo dois isolados do Egito e o isolado do USDA. Isolados da África do Sul e Israel separaram-se em outro clado, B, dividido em B1 e B2 (Figura 7).



**Figura 7.** Dendrograma de 15 sequências de nucleotídeos de um fragmento do gene *rap-1* de *Babesia caballi* através do método de Maximum Likelihood de reconstrução de árvore com distâncias de emparelhamento estimadas pelo modelo Tamura-Nei, com 1000 replicatas no teste de “Bootstrap”. No conjunto de dados final, utilizou-se 1244 pb.



**Figura 8.** Dendrograma de seqüências de aminoácidos determinada a partir de um fragmento do gene *rap-1* de *Babesia caballi* através do método de Maximum likelihood de reconstrução de árvore com distâncias de emparelhamento estimadas pelo método de “Poisson”, com 1000 replicatas no teste de “Bootstrap”. No conjunto de dados final utilizou-se 152 aminoácidos.

O fragmento do gene *rap-1* a partir da amostra Brasil 9 foi idêntico à do isolado de Porto Rico, os quais tiveram 96,7% de identidade em comparação com a sequência utilizada como referência (USDA - AB017700) (SCHWINT et al., 2009). Esta amostra teve a menor identidade dentre todas as amostras de *B. caballi* sequenciadas neste estudo e, também, apresentou um cromatograma com picos duplos em muitas posições, gerando dúvidas na montagem do *contig*. Após clonagem e sequenciamento, quatro clones da amostra Brasil 9 não foram considerados idênticos entre si através da matriz de identidade (ANEXO VI).

Em relação à isolados da África do Sul, estes apresentaram similaridade de 79,9% (GQ871778) e 82,3% (GQ871779, GQ871780) em relação ao isolado USDA (ID: AB017700). Sequências depositadas oriundas de Israel, também tiveram uma baixa similaridade em relação à sequência de referência, sendo estas 76,8% (KF059875; KF059876; KF059877; KF059879) e 78,1% (KF059878) (Tabela 6).

O comprimento total do alinhamento de sequências de aminoácidos após o corte foi de 152 aminoácidos. Na sequência mais heterogênea deste estudo, Brasil 9 – clone 2, foram observados doze pontos de substituições não sinônimas e três pontos de substituições sinônimas. Esta foi também a sequência com a menor identidade em relação à estirpe USDA. Dentre as quatro sequências dos clones, o número de pontos de mutação não sinônimas foram de 9, 12, 10 e 9, respectivamente. Amostras de número 90, 247 e 270 mostraram apenas um ponto de mutação em relação à estirpe USDA e, conseqüentemente, estas sequências tiveram a identidade mais próxima, 99,7% (Tabela 5). A localização dos pontos de mutação de aminoácidos estão demonstradas no ANEXO VII.

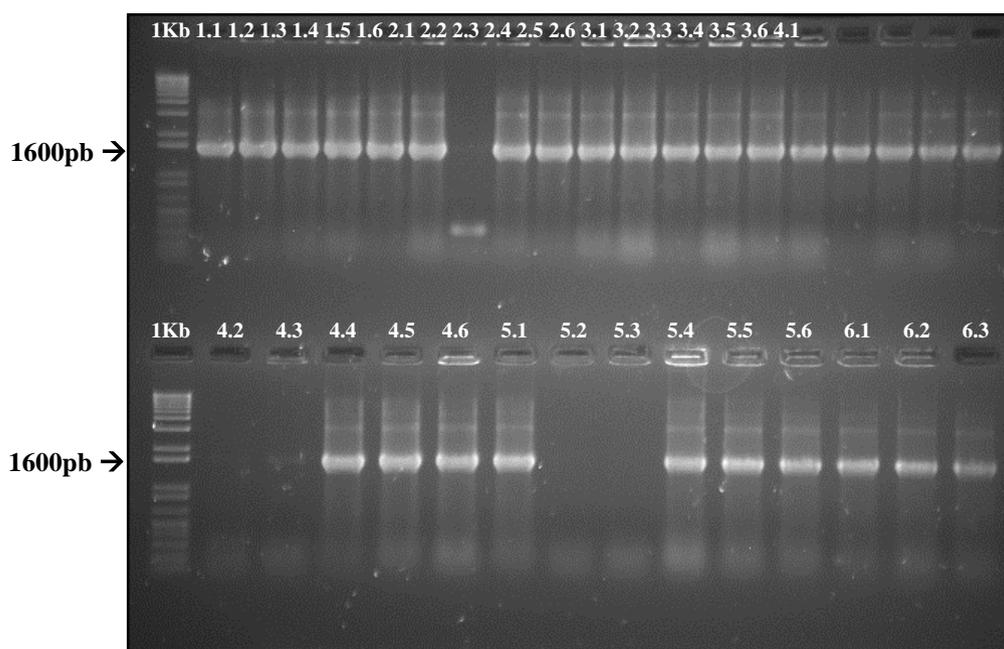
**Tabela 5.** Porcentagem de identidade das sequências de aminoácidos preditos do gene *rap-1* de *Babesia caballi* e o número de pontos de mutação de aminoácidos não sinônima entre isolados do Brasil, Porto Rico, Egito, Israel e África do Sul em relação à amostra USDA.

Sequências	% de identidade	Pontos de Mutação	Referência
	US DA(AB017700)		
USDA(AB017700)	100	0	Ikadai et al., 1999
Brasil 2	96,6	5	Este estudo
Brasil 9 clone 1	94,0	9	
Brasil 9 clone 2	92,0	12	
Brasil 9 clone 3	93,3	10	
Brasil 9 clone 4	94,0	9	
Brasil 10	96,6	5	
Brasil 28	98,0	3	
Brasil 34	96,6	5	
Brasil 42	97,3	4	
Brasil 56	96,6	5	
Brasil 63	98,0	3	
Brasil 68	96,6	5	
Brasil 69	98,0	3	
Brasil 71	98,0	3	
Brasil 79	93,3	10	
Brasil 81	98,6	2	
Brasil 84	98,6	2	
Brasil 85	95,3	7	
Brasil 89	97,3	4	
Brasil 90	99,3	1	
Brasil 92	93,3	10	
Brasil 94	97,3	4	
Brasil 96	98,0	3	
Brasil 99	93,3	10	
Brasil 247	99,3	1	
Brasil 270	99,3	1	
Porto Rico (EU669865)	92,0	12	Schwint et al., 2009
Egito (KR811095)	99,3	1	M ahmoud et al., 2016
Egito (KR811096)	90,7	14	
Egito (KR811097)	98,6	2	
Israel (KF059875)	76,8	35	Rapoport et al., 2014
Israel (KF059876)	76,8	35	
Israel (KF059877)	76,8	35	
Israel (KF059878)	78,1	33	
Israel (KF059879)	76,8	35	
África do Sul (GQ871779)	78,1	33	Bhoora et al., 2010b
África do Sul (GQ871780)	76,1	36	
África do Sul (GQ871778)	76,1	36	

#### 4.2 Estudo do gene *18S rDNA* de *Theileria equi*

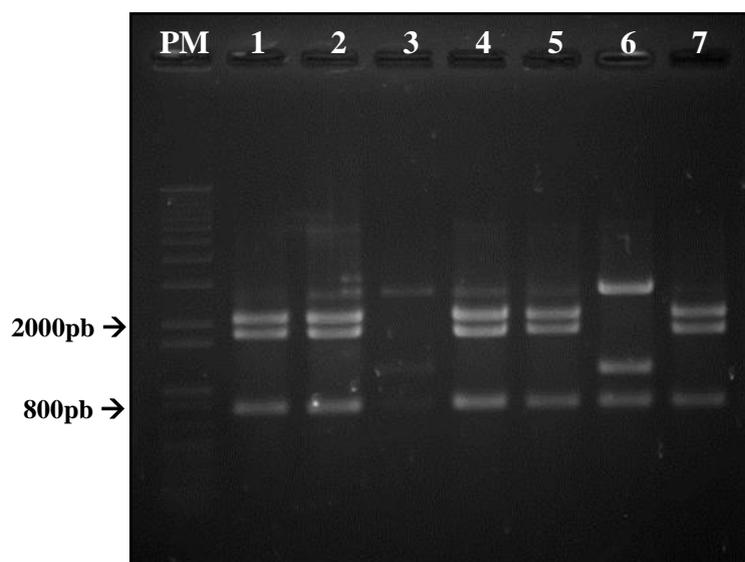
Das 20 amostras testadas para amplificação do gene *18S rDNA* completo de *T. equi*, todas apresentaram o fragmento esperado na PCR.

Após a transformação das células DH5 $\alpha$  com o gene *18S rDNA* de *T. equi* com o inserto, as seis colônias brancas selecionadas de cada amostra foram testadas pela PCR para confirmar a presença do inserto. Na figura 9, podemos observar que nem todas as colônias selecionadas levaram à amplificação do gene *18S rDNA* esperado de *T. equi*. As colônias negativas na PCR foram descartadas por não conterem o alvo esperado.



**Figura 9.** Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação obtidos a partir do gene *18S rDNA* completo de *Theileria equi* nas colônias brancas selecionadas após transformação das células DH5 $\alpha$ . PM: 1Kb Plus Ladder (Thermo Scientific); 1.1-6.3: colônias testadas. A seta indica o produto de amplificação de aproximadamente 1600 pb.

Outro procedimento realizado para confirmar a transformação da bactéria com o inserto foi a digestão por enzima de restrição Alw26I, realizada após extração do DNA plasmidial. Através do padrão de bandas revelado em gel de agarose 1,5%, corado com Brometo de etídio, foi possível observar que algumas amostras tiveram o inserto inserido na posição 5'-3' e outras, na posição 3'-5'. O padrão de bandas observado com a inserção do fragmento de DNA na posição 5'-3' foi de 765 pb, 1849 pb e 2009 pb. Já na posição 3'-5' foi de 765 pb, 1119 pb e 2739 pb (Figura 10).



**Figura 10.** Gel de agarose (1,5%) com a confirmação da presença do inserto no DNA plasmidial da célula transformada de algumas das amostras testadas, demonstrando padrões de bandas de 765 pb, 1849 pb e 2009 pb (1, 2, 4, 5, 7) com o inserto na posição 5'-3' e 765 pb, 1119 pb e 2739 pb (3, 6) com o inserto na posição 3'-5'. PM: 1Kb Plus Ladder (Thermo Scientific).

Selecionados os clones ótimos, o DNA plasmidial foi enviado ao sequenciamento com seis “primers” específicos para o gene *18S rDNA* de *T. equi*. A montagem do gene e formação de um único *contig* por amostra foi realizada no programa DNABaser, e culminou em fragmentos de tamanhos variados. Das 20 seqüências analisadas, 11 foram depositadas como gene *18S rDNA* completo (RJ1, RJ5, RJ6, RJ7, RJ9, RJ10, RJ11, RJ12, RJ13, RJ4, RJ17), e 9 como seqüências parciais (demais) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Identificação da amostra neste estudo, local de origem da amostra, tamanho do *contig* após sequenciamento, número de identificação de depósito no GenBank e característica da seqüência depositada.

<b>Id amostra</b>	<b>Município</b>	<b>Contig (pb)</b>	<b>GenBank ID</b>	<b>Status</b>
RJ1	Petrópolis	1586	KX722511.1	Completa
RJ2	Petrópolis	1498	KJ573370.1	Parcial
RJ3	Petrópolis	1366	KX722524.1	Parcial
RJ4	Petrópolis	1471	KJ573371.1	Parcial
RJ5	Petrópolis	1586	KX722512.1	Completa
RJ6	Petrópolis	1586	KX722513.1	Completa
RJ7	Petrópolis	1586	KX722514.1	Completa
RJ8	Petrópolis	1585	KX722515.1	Completa
RJ9	Petrópolis	1586	KX722516.1	Completa
RJ10	Petrópolis	1586	KX722517.1	Completa
RJ11	Seropédica	1586	KX722518.1	Completa
RJ12	Seropédica	1586	KX722519.1	Completa

<b><u>Id amostra</u></b>	<b><u>Município</u></b>	<b><u>Contig (pb)</u></b>	<b><u>GenBank ID</u></b>	<b><u>Status</u></b>
RJ13	Seropédica	1586	KX722520.1	Completa
RJ14	Seropédica	1586	KX722521.1	Completa
RJ15	Seropédica	1475	KJ573372.2	Parcial
RJ16	Seropédica	1533	KX722522.1	Parcial
RJ17	Seropédica	1586	KX722523.1	Completa
RJ18	Seropédica	1531	KX722525.1	Parcial
RJ19	Seropédica	1460	KJ573373.2	Parcial
RJ20	Seropédica	1385	KJ573374.2	Parcial

Das 20 amostras sequenciadas neste estudo, seis da região de Petrópolis (n = 6/10) e outras seis do município de Seropédica (n = 6/10) foram consideradas sequências únicas no Brasil. As sequências RJ2 e RJ6 apresentaram 100% de identidade entre si, bem como o grupo de amostras RJ3, RJ7, RJ8, RJ9, RJ11, RJ15, RJ16 e RJ20.

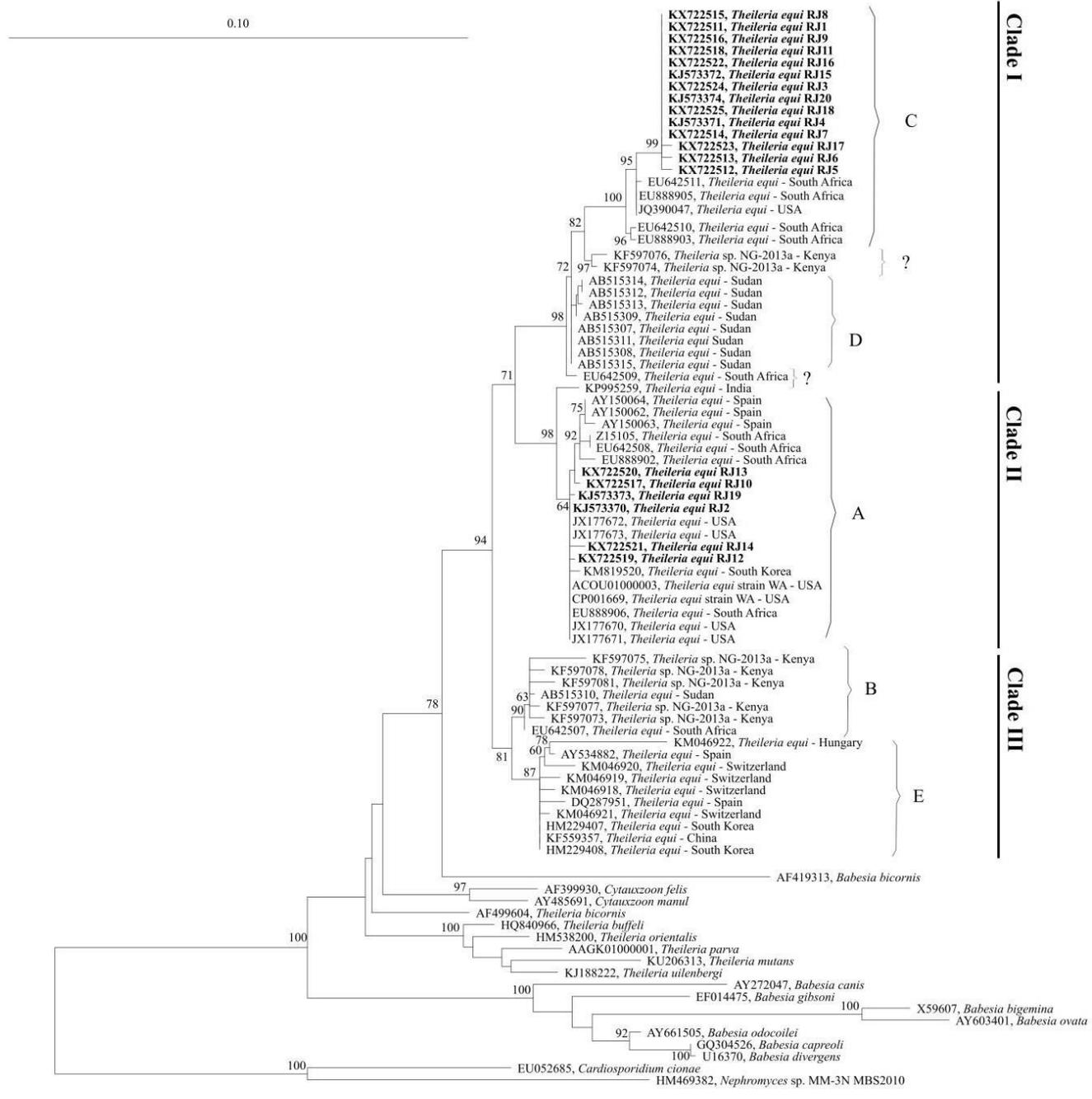
Dentre todas as amostras analisadas, doze foram depositadas como sequências completas do gene *18S rDNA* de *T. equi* e outras oito foram sequências depositadas como sequências parciais (Tabela 6). Entre nossas amostras, haviam doze diferentes sequências do *18S rDNA* de *T. equi* circulando em equinos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. O valor de identidade mais baixo entre estas sequências foi de 95,8%, entre RJ12 e RJ17. Em contrapartida, RJ2 e RJ6 apresentaram 100% de identidade entre si, e um grupo composto por RJ3 e RJ7, RJ8, RJ9, RJ11, RJ15, RJ16 e RJ20 exibiram o mesmo resultado.

Na análise filogenética apresentada na Figura 12, foram utilizadas 68 sequências do gene do *18S rDNA* de *T. equi*. Vinte sequências foram do Brasil, estado do Rio de Janeiro (deste estudo), e 48 foram de outros países. As menores distâncias (d = 0,0) foram observadas entre a sequência RJ2 e seis sequências dos EUA (JX177670 a JX177673, ACOU01000003 e CP001669) e uma da África do Sul (EU888906). As distâncias entre as sequências dos EUA e a RJ12 e RJ13 também foram muito baixas (d = 0,1). Em contraste, a sequência KM046922 da Hungria foi considerada a mais distante dentre as do Brasil, com uma distância que variou de 3,6 a 4,2 em relação a todas as sequências do Rio de Janeiro. Após o alinhamento das sequências de *T. equi* (n = 68), foi possível observar ampla variação na região hipervariável V4.

Neste estudo, os clados monofiléticos com 2% de divergência evolutiva entre clados e alto valor de “Bootstrap” foram considerados genótipos distintos. Para evitar equívocos em relação à nomenclatura dos genótipos, chamamos os grupos de I, II e III. As distâncias médias intragrupos foram inferiores a 1% para os clados I (d = 0,8%) e II (d = 0,3%). No clado III, a distância média entre as sequências foi de aproximadamente 1,1%.

A reconstrução filogenética resultou em uma árvore com altos valores de “Bootstrap” que apoiaram os clados (Figura 12). As sequências do *18S rDNA* de *T. equi* analisadas neste estudo foram agrupadas em três clados bem suportados, isto é, clados I, II e III. As sequências deste estudo agruparam nos clados I e II, sendo a maioria das sequências observadas no clado I (70%, n = 14/20). As frequências das sequências observadas no grupo I também foram maiores para ambos os municípios. No clado I, 14 sequências do Brasil agruparam-se com sequências da África do Sul, Sudão, Quênia e Estados Unidos. No clado II, encontramos as outras seis sequências brasileiras, juntamente com sequências da África do Sul, Espanha, Índia, Coreia do Sul e Estados Unidos. No clado III, as sequências do Quênia, Sudão, Hungria, Espanha, Suíça, Coreia do Sul, China e África do Sul se agruparam (Figura 11).

Em geral, todas as sequências do *18S rDNA* de *T. equi* agruparam dentro de um ramo diferente dos Theilerídeos. Organismos do gênero *Cytauxzoon* agruparam entre eles e os outros organismos do gênero *Theileria*. *Babesia bicornis* pareceu ser um clado irmão de *T. equi*, apoiado por um “Bootstrap” de 78%.



**Figura 11.** Árvore filogenética de máxima verossimilhança de Piroplasmida baseada na informação da sequência do gene *18S rDNA*. As sequências obtidas neste trabalho são apresentadas em negrito. Os valores de “Bootstrap” são apresentados perto dos nós da árvore. A barra representa uma substituição a cada 100 bases no alinhamento. *Cardiosporidium cionae* e *Nephromyces* sp. foram utilizados como “outgroups” para a raiz da árvore.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo do gene *rap-1* de *Babesia caballi*

O Brasil é considerado endêmico para EP, assim como outros países da América do Sul (BARBOSA et al., 1995; FRIEDHOFF; SOULE, 1996; KERBER; FERREIRA; PEREIRA, 1999; PECKLE et al., 2013). No presente estudo, a positividade dos equinos testados para *B. caballi* foram 58,74% (n = 253/429) e 7,92% (n = 34/429), usando métodos sorológicos e moleculares, respectivamente. Um estudo anterior realizado por Heim et al. (2007), no sudeste do Brasil teve um resultado semelhante, apresentando uma taxa de infecção de 83% usando métodos sorológicos e 12,5%, utilizando métodos moleculares. Mesmo em outro país, a discrepância de prevalência utilizando sorologia e métodos moleculares já foi reportada, onde os valores correspondentes foram de 65,7% e 19,1%, respectivamente (RÜEGG et al., 2007).

A diferença entre as taxas de positividade em equinos com base em técnicas sorológicas e moleculares ocorre porque, para *B. caballi*, um resultado soropositivo não implica que o animal esteja albergando o parasito na circulação sanguínea, pois a persistência esperada deste hemoparasito no organismo dos equinos a partir da infecção é de 1 a 4 anos (RÜEGG et al., 2008). Por conseguinte, o desaparecimento de anticorpos ocorre após a depuração do parasito e assim, a probabilidade da positividade de *B. caballi* em equinos diminui com a idade (RÜEGG et al., 2008).

A cELISA desenvolvido utilizando anticorpo monoclonal (MAb) para uma proteína recombinante do complexo apical associada à roptria (*RAP-1*) foi eficaz para detectar anticorpos anti-*B. caballi* em amostras de soro de equinos de 21 países, incluindo os animais da América do Norte e América do Sul, Europa, África do Sul e Qatar (KAPPMAYER et al., 1999). No entanto, as diferenças nas sequências de genes *rap-1* encontrados em equinos da África do Sul e Israel destacam que este gene pode variar de acordo com a região geográfica (BHOORA et al., 2010a; RAPOPORT et al., 2014). Este fato pode afetar os resultados do cELISA, usado como teste recomendado para o movimento internacional de equinos (OIE, 2014). Em estirpes do Egito, o MAb do teste cELISA fracassou em se ligar à proteína *RAP-1* de amostras positivas para *B. caballi*. Este fato permanece desconhecido (MAHMOUD et al., 2016).

Neste estudo, a caracterização molecular do fragmento do gene *rap-1* mostrou que as estirpes de *B. caballi* do Brasil agruparam com sequências de Porto Rico e dos EUA. Além disso, a identidade observada em amostras brasileiras é realmente próxima ao isolado USDA. Estes resultados indicam que os anticorpos produzidos em equinos pela exposição à estirpes de *B. caballi* oriundas do Brasil são, provavelmente, detectados pelo kit cELISA de forma eficiente. Além disso, técnicas moleculares de diagnóstico desenvolvidas com base no gene *rap-1* de isolados americanos podem ser mais confiáveis para detecção de isolados brasileiros de *B. caballi* do que desenhos de técnicas baseadas em sequências de *rap-1* da África do Sul e Israel (BATTSETSEG et al., 2001; BHOORA et al., 2010a).

A família de genes *rap-1* das babesias são regulados por mecanismos de transcrição e pós-transcrição e são expressos nos diversos estágios de vida do parasito. No caso de *Babesia bigemina*, uma grande babesia como *B. caballi*, os genes *rap-1a* estão distribuídos em *tandem* em cinco cópias, todas separadas por uma região intergênica (IG) que, supõe-se regular a expressão do gene. Para cada gene *rap-1a*, existe uma cópia do gene *rap-1b*. E, finalmente, na região 3'terminal do locus, existe uma cópia do gene *rap-1b* e *rap-1c*, que possuem uma média de 27% de identidade em relação ao gene *rap-1a* (SUAREZ et al., 2003, 2004). No estudo de Suarez et al. (2003), *rap-1a* produziu o maior número de transcritos em relação à

outros genes da mesma família, mesmo que os outros tenham sido mais abundantes. Os cinco genes *rap-1a* de *B. bigemina* arranjados em tandem, pertencem a quatro classes dimórficas que diferem discretamente em polimorfismos de aminoácidos. Já *rap-1b*, mesmo sendo mais abundante, não demonstrou polimorfismos e sua expressão não foi detectada.

Ainda não existem dados com relação a estrutura do locus *rap-1* de *B. caballi*. É possível que a amostra número 9 (RJ9) deste estudo, quando clonada, tenha produzido clones de diferentes cópias do gene *rap-1* com pequeno grau de polimorfismo entre as cópias, como também foi observado no caso de *B. bigemina* (SUAREZ et al., 2003). No entanto, por hora, observou-se somente que os pontos de mutação das sequências brasileiras se repetem entre si, dando confiança aos resultados observados. Todas as amostras sequenciadas (n=22) para o gene *rap-1* resultaram em um polipeptídeo “in frame”, o que demonstra que a transcrição ocorre normalmente, o que demonstra que não se tratam de pseudogenes. Neste sentido, serão necessários estudos direcionados a caracterização do gene *rap-1* de *B. caballi* com o objetivo de descrever a sua estrutura, organização, número de cópias e os mecanismos de regulação da sua expressão em nível de transcrição e tradução.

## 5.2 Estudo do gene *18S rDNA* de *Theileria equi*

Até o momento, estudos sobre o gene *18S rDNA* completo de *T. equi* não haviam sido realizados com sequências oriundas do Brasil. A partir deste estudo foi possível observar diferenças genéticas entre os diferentes isolados obtidos de equinos naturalmente infectados de duas regiões geográficas distintas, no estado do Rio de Janeiro, e também diferenças entre outros genótipos de *T. equi*, observados em outros países.

Para obter-se uma estimativa da biodiversidade a partir de um marcador molecular, é importante que o gene ou área do genoma seja suficientemente variável para a análise filogenética. Neste aspecto, um marcador comum é a pequena subunidade do gene RNA ribossômico (*SSU rRNA*), cuja sequência e a estrutura contém nove regiões altamente variáveis, denominadas V1 à V9 (HADZIAVDIC et al., 2014). Este gene tem várias características favoráveis que o levou a ser amplamente utilizado para separar organismos ao nível de gênero. O primeiro fator é que o *18S rDNA* tem regiões conservadas e variáveis, sendo as conservadas ideais para o alinhamento de sequências de forma satisfatória e as regiões variáveis boas para discriminação filogenética (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006).

Neste estudo, utilizando fragmentos completos ou parciais expressivos do gene *18S rDNA* de *T. equi*, foi possível supor com precisão que todas as sequências estão agrupadas em três clados principais, denominados I, II e III. Estes achados são semelhantes aos de Bhoora et al. (2009) que obtiveram três grupos a partir de uma análise cladística do gene *18S rDNA* de *T. equi* em um conjunto de dados de 25 sequências.

Qablan et al. (2013) e Liu et al. (2016) agruparam seu conjunto de dados do gene *18S rDNA* de *T. equi* em cinco grupos denominados de A à E. Embora Liu et al. (2016) encontraram cinco grupos, estes autores encontraram três grupos principais ao analisar a região de anelamento da sonda. Outros estudos demonstraram o agrupamento de sequências de *T. equi* em quatro grupos, de A à D (SALIM et al., 2010, HALL et al., 2013). Sem utilizar os critérios de uma distância evolutiva de 2%, o conjunto de dados deste estudo teria agrupado em sete clados, cinco dos quais foram demonstrados em estudos anteriores (QABLAN et al., 2013; LIU et al., 2016), além de dois novos clados. Este paralelo é ilustrado na Figura 11 A-E, e os dois novos grupos são representados com pontos de interrogação. O aumento do número de novas sequências *T. equi* depositadas em bases de dados aumenta o número de genótipos propostos. No entanto, uma clara divisão dos três genótipos distintos foi recuperada com precisão, mesmo com o uso de um grande número de sequências.

Essas diferenças de agrupamento podem estar diretamente relacionadas às sequências que foram selecionadas para a análise filogenética, seus comprimentos, os métodos de alinhamento e as inferências filogenéticas utilizadas. Além disso, em alguns estudos as divisões são consideradas artificiais e, portanto, não refletem divergência evolutiva. Neste estudo, a análise filogenética foi conduzida utilizando o alinhamento baseado na estrutura secundária da sequência do gene *18S rDNA*. Embora estratégias de alinhamento sejam apenas hipóteses, o uso da estrutura secundária de *18S rDNA* produz um alinhamento que está mais próximo do alinhamento real em termos de homologia (MORRISON; ELLIS, 1997). Em contraste, outros algoritmos, como o método de ClustalW, usam similaridade de sequência como critério de alinhamento, o que não garante homologia ótima de sequências (MORRISON; ELLIS, 1997). Adicionalmente, este estudo foi conduzido com base em sequências de comprimentos maiores, o que resultou num conjunto de dados de 1202 pb após “trimagem”, com 68 sequências do gene *18S rDNA* de *T. equi* de dez países diferentes. A baixa diversidade intraespecífica das amostras do estudo demonstra que as sequências que se agruparam eram verdadeiramente semelhantes entre si.

Neste estudo, 12 amostras de *T. equi* do estado do Rio de Janeiro, Brasil, foram únicas e agruparam em dois genótipos, I e II. Em ambos os municípios, Petrópolis e Seropédica, houve animais que foram naturalmente infectados com os genótipos I e II. Embora se saiba que cada um desses municípios pertence a uma região geográfica e climática distinta no estado do Rio de Janeiro, não foi possível estabelecer relações exatas entre as diferenças na ocorrência das variantes e os aspectos geográficos e climáticos presentes nesses municípios. Estudos têm demonstrado que distintos isolados de *T. equi* coexistem nas mesmas regiões geográficas. Na África do Sul, foram observadas sequências genéticas heterogêneas do *18S rDNA* de *T. equi* em equinos (BHOORA et al., 2009) e zebras (BHOORA et al., 2010). Foram identificadas 11 e 10 sequências distintas do gene *18S rDNA* de *T. equi* no Sudão e na Jordânia, respectivamente (SALIM et al., 2010; QABLAN et al., 2013). Embora estes estudos tenham demonstrado diferentes resultados de agrupamento, todos eles exibem pelo menos uma sequência que está intimamente relacionada com outros isolados circulantes no mundo. Este fato demonstra a dispersão de genótipos distintos de *T. equi* nos diferentes continentes. A diversidade genética de *T. equi* pode ser um resultado da recombinação genética durante a reprodução sexual dentro dos vetores ixodídeos ou uma questão do movimento internacional de equinos.

Particularmente no caso do Brasil, essa variação nas sequências do gene do *18S rDNA* de *T. equi* pode estar relacionada à história da chegada dos equinos no país e ao movimento de negócios equestres. Na última década, a importação de cavalos para o Brasil envolveu mais de dez países da Europa, América do Norte e Ásia (FAO, 2006). O negócio equestre levou ao movimento mundial de equinos, o que tende a homogeneizar as populações de *T. equi*, removendo os padrões biogeográficos. Outro aspecto importante a respeito da variação genotípica de *T. equi* são os carrapatos vetores, que carregam as formas de reprodução sexuada deste protozoário. Dados experimentais indicam que *R. (B.) microplus* é o vetor de theileriose equina no país (GUIMARÃES et al., 1998a). No entanto, os equinos não são o hospedeiro de predileção desta espécie de carrapato. Estudos epidemiológicos sugerem que *Amblyomma sculptum* (anteriormente denominado *A. cajennense*) poderia ser o vetor de *T. equi* em equinos no Brasil (KERBER et al., 2009; PECKLE et al., 2013). No entanto, esta hipótese não pode ser confirmada para ninfas de *A. sculptum* no Brasil (RIBEIRO et al., 2011). No Texas, *A. cajennense* (ou *Amblyomma mixtum* segundo Navas et al., 2014), adquiriu a infecção e foi capaz de transmitir intrastadialmente *T. equi* de forma natural (SCOLES et al., 2011). Assim, o vetor de *T. equi* em equinos no Brasil ainda não foi determinado. Considerando todos os possíveis vetores no mundo, o polimorfismo genético

observado em *T. equi* pode também ser um reflexo do uso de diferentes hospedeiros invertebrados em seu ciclo de vida.

Algumas espécies de hematozoários apresentam divergência na sua posição filogenética, que é o caso de *T. equi* e *Cytauxzoon felis* (ALLSOPP; ALLSOPP, 2006). Allsopp e Allsopp (2006) observaram em uma análise filogenética baseada no gene *18S rDNA* dos gêneros *Theileria*, *Cytauxzoon* e *Babesia* que os isolados de *T. equi* não se agrupam com outros Theilerídeos. No entanto, o mesmo estudo não inferiu que *T. equi* pertence a outro gênero, pois o clado não foi bem suportado pelo baixo valor de “Bootstrap”. Utilizando a estrutura secundária de *18S rDNA* para o alinhamento e análise Bayesiana, Schnittger et al. (2012) levantou a possibilidade de que *T. equi* não deveria ser considerada nem *Theileria sensu stricto* (s.s.) nem *Babesia* s.s.. Similar à topologia de árvore deste estudo, esses autores demonstraram que *T. equi* e *B. bicornis* poderiam juntos representar um grupo monofilético.

Em uma análise anterior realizada neste estudo (dados não demonstrados) utilizando o mesmo conjunto de dados de sequências que Lack et al. (2012) e outras sequências depositadas na base de dados ARB-Silva, não foi possível determinar uma posição conclusiva para *T. equi* e *Theileria* e *Babesia* não foram recuperados como gêneros monofiléticos. Esses resultados são semelhantes aos de outros estudos (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; LACK et al., 2012; SCHNITTGER et al., 2012). A instabilidade da topologia da árvore filogenética de *T. equi*, que está associada a várias características biológicas e morfológicas, diverge de outros parasitos do mesmo gênero e levanta uma discussão sobre a possibilidade de que esse organismo pertença a outro gênero (ALLSOPP et al., 1994; ALLSOPP; ALLSOPP, 2006; KAPPMAYER et al., 2012; LACK et al., 2012). Embora o gene *18S rDNA* tenha sido utilizado para fins filogenéticos em Piroplasmida (LACK et al., 2012; SCHNITTGER et al., 2012), uma árvore de um único gene não pode ser considerada como uma análise conclusiva da posição filogenética dos Piroplasmas. Neste contexto, um conjunto de marcadores moleculares deve ser usado em uma árvore “multilocus” para elucidar a filogenia sistemática ou interna de Piroplasmida e, conseqüentemente, *T. equi*.

Concluindo, este estudo relatou 12 sequências do gene *18S rDNA* diferentes de *T. equi* que estão circulando no estado do Rio de Janeiro, Brasil, e as dividiu em dois clados, I e II. O estudo da heterogeneidade do gene *18S rDNA* de *T. equi* pode fornecer informações relevantes sobre o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico molecular. Além disso, este estudo forneceu dados preliminares sobre a classificação taxonômica de *T. equi*, com base no gene *18S rDNA*, fato que permanece indefinido. Buscando uma melhor compreensão da posição taxonômica correta deste organismo, seria interessante usar uma abordagem multigênica para a inferência filogenética desse organismo em estudos futuros.

## 6 CONCLUSÕES

As sequências de aminoácidos deduzidas do gene *rap-1* de *Babesia caballi* presentes em equinos naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro, Brasil, estão agrupadas em um único clado (A), juntamente com isolados presentes nos EUA, Porto Rico e Egito.

As amostras brasileiras do gene *rap-1* de *B. caballi* possuem de 92% a 99,3% de identidade gênica com a cepa dos EUA/USDA (AB017700).

Os anticorpos produzidos em equinos pela exposição à estirpes de *B. caballi* oriundas do Brasil são detectados pelo kit cELISA de forma eficiente.

Técnicas moleculares de diagnóstico desenvolvidas com base no gene *rap-1* de isolados americanos são mais confiáveis para detecção de isolados brasileiros de *B. caballi* do que desenhos de técnicas baseadas em sequências de *rap-1* da África do Sul e Israel.

Dentre vinte amostras sequenciadas, existem 12 variantes do gene *18S rDNA* de *Theileria equi*, presentes em equinos naturalmente infectados no estado do Rio de Janeiro, Brasil, divididas em dois clados, I e II.

O agrupamento de *T. equi*, baseado no gene *18S rDNA*, é bem suportado e distinto de outras espécies de *Theileria* e/ou *Babesia*, reforçando a vertente sobre uma classificação taxonômica incerta para este hemoparasito.

A utilização de outros genes-alvos para o estudo filogenético de *T. equi* é necessário, visando um melhor entendimento da correta posição taxonômica deste organismo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, n.1, p. 239-244, 2014.
- ABUTARBUSH, S.M.; ALQAWASMEH, D.M.; MUKBEL, R.M.; AL-MAJALI, A.M. Equine Babesiosis: Seroprevalence, Risk Factors and Comparison of Different Diagnostic Methods in Jordan. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 1, p. 72–78, 2012.
- ALLSOPP, M.T.E.A.; CAVALIER-SMITH, T; DE WAAL, D.T.; ALLSOPP, B.A. Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, v. 108 ( Pt 2, 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.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- 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, p.167–171, 2007.
- BARBOSA, I. P.; BÖSE, R.; PEYMAN, B.; FRIENDHOFF, 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.
- BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; JOSE, R.B.L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in the *Dermacentor nuttalli* adult tick. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.384–386, 2001.
- 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.; FRANSSEN, 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.
- BHOORA, R.; QUAN, M.; ZWEYGARTH, E.; GUTHRIE, A.J.; PRINSLOO, S.A.; COLLINS, N.E. Sequence heterogeneity in the gene encoding the rhoptry-associated protein-1 (RAP-1) of *Babesia caballi* isolates from South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 3-4, p. 279–288, 2010a.
- BHOORA, R.; QUAN, M.; FRANSSEN, L.; BUTLER, C.M.; VAN DER KOLK, J.H.;

GUTHRIE, A.J.; ZWEYGARTH, E.; JONGEJAN, F.; COLLINS, N.E. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3-4, p. 201–211, 2010b.

BHOORA, R.; BUSS, P.; GUTHRIE, A.J.; PENZHORN, B.L.; COLLINS, N.E.. Genetic diversity of piroplasms in plains zebra (*Equus quagga burchellii*) and Cape mountain zebra (*Equus zebra zebra*) in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 145–149, 2010c.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L. Aspectos Epidemiológicos da babesiose equina na Microregião Fluminense do Grande Rio-Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 13- 17, 1997.

CAMACHO, A.T.; GUITIAN, F.J.; PALLAS, E.; GESTAL, J.J.; OLMEDA, A.S. HABELA, M.A.; TELFORD, S.R.; SPIELMAN, A. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. **Tropical Animal Health and Production**, v.37, n.4, p.293-302, 2005.

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.

COFFMAN, L. M. Equine piroplasmiasis. **United States Animal Health Association Proceedings**, p. 253–259, 1997.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 3, p. 173–194, 2003.

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

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

DE WAAL, D. T. The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.57, n.1, p.99-100, 1990.

DE WAAL, T. Equine piroplasmiasis: a review. **British Veterinary Journal**, v.148, n.1, p.6–14, 1992.

BARTOLOMÉ DEL PINO, L.E.; NARDINI, R.; VENEZIANO, V.; IACOPONI, F.; CERSINE, A.; AUTORINO, G.L.; BUONO, F.; SCICLUNA, M.T. *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Central-Southern Italy: Sero-molecular survey and associated risk factors. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 462–469, 2016.

DENNIG, F. **Unsuccessful attempts at transmission of *Babesia equi* by *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense***. 1988. 122p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária),

Hannover Veterinary College, 1988.

Florida Department of State. Florida Administrative Code, Rule 5C-14.005. 1962. Acesso em 04 de janeiro de 2017 <<http://www.flrules.org/gateway/ChapterHome.asp?Chapter=5C-14>>

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.

PFEIFER, I.B.; FRIEDHOFF, K.T.; MASSARD, C.L.; LINHARES, G.F.C. Diagnosis of natural infection with *Babesia caballi* (Nuttal & Strickland, 1910) in horses and *Anocentor nitens* (Neumann, 1898) in Itaguaí, Rio de Janeiro, Brazil. Arquivo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p. 105-107, 1992.

FRIEDHOFF, K. T.; SOULE, C. An account on equine babesioses. **Rev Sci Tech**, v. 15, p. 1191–1201, 1996.

GARCÍA-BOCANEGRA, I.; ARENAS-MONTES, A.; HERNÁNDEZ, E.; ADASZEK, L.; CARBONERO, A.; ALMERÍA, S.; JAÉN-TÉLLEZ, J.A.; GUTIÉRREZ-PALOMINO, P.; ARENAS, A. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 2, p. 172–178, 2013.

GUBBELS, M. J.; HONG, Y.; WEIDE, M.; QI, B.; NIJMAN, I.J.; GUANGYUAN, L.; JONGEJAN, F. Molecular characterization of the *Theileria buffeli/orientalis* group. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 8, p. 943–952, 2000.

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, 1998a.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.84, n.4, p.323-327, 1998b.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.D.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

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

HEIM, A.; PASSOS, L.F.; RIBEIRO, M.F.B.; COSTA-JÚNIOR, L.; BASTOS, C.V.; CABRAL, D.D.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology Research**, v. 102, n. 1, p. 63–68, 2007.

HEUCHERT, C.M.S.; GIULLI, V.; ATHAIDE, D.F., BOSE, R.; FRIEDHOFF, K.T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 1–11, 1999.

HOLBROOK, A.A.; FRERICHS, W.N. Equine piroplasmiasis. **Proceedings, Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v. 72, p. 220-222, 1968.

IKADAI, H.; NAGAI, A.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; TSUGIHIKO, K.; TSUJI, N.; OYAMADA, T.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* infections in Japan. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v.64, n.4, p.325-328, 2002.

KAPPMAYER, L. S.; PERRYMAN, L.E.; HINES, S.A.; BASZLER, T.V.; KATZ, J.B.; HENNAGER, S.G.; KNOWLES, D.P. Detection of Equine Antibodies to *Babesia caballi* by Recombinant *B. caballi* Rhoptry-Associated Protein 1 in a Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2285–2290, 1999.

KAPPMAYER, L.S.; THIAGARAJAN, M.; HERNDON, D.R.; RAMSAY, J.D.; CALER, E.; DIKENG, A.; GILLESPIE, J.J. LAU, A.O.T.; ROALSON, E.H.; SILVA, J.C.; SILVA, M.G.; SUAREZ, C.E.; UETI, M.W.; NENE, V.M.; MEALEY, R.H.; KNOWLES, D.; BRAYTON, K.A. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 603, 2012.

KATZER, F.; MCKELLAR, S.; KIRVAR, E.; SHIELS, B. Phylogenetic analysis of *Theileria* and *Babesia equi* in relation to the establishment of parasite populations within novel host species and the development of diagnostic tests. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 33–44, 1998.

KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; PEREIRA, M.C. Control of equine piroplasmiasis in Brazil. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 66, n. 2, p. 123–127, 1999.

KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of equine Piroplasmiasis 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.

KIM, C.; 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, n. 2-4, p. 158–163, 2008.

KIZILARSLAN, F.; YILDIRIM, A.; DUZLU, O.; INCI, A.; ONDER, Z.; CILOGLU, A. Molecular Detection and Characterization of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Horses (*Equus ferus caballus*) in Turkey. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 10, p. 830–835, 2015.

KNOWLES, D. P. Control of *Babesia equi* parasitemia. **Parasitology Today**, v. 12, n. 5, p. 195–198, 1996.

KNOWLES, R.C, MATHIS, R.M.; BRYANT, J.E.; WILLERS, K.H. Equine piroplasmiasis. **Journal of America Veterinary Medical Association**, v. 148, p. 407–410, 1966.

KOUAM, M.K.; KANTZOURA, V.; MASOUKA, P.M.; GAJADHAR, A.A.; THEODOROPOULOS, G. Genetic diversity of equine piroplasms in Greece with a note on speciation within *Theileria* genotypes (*T. equi* and *T. equi*-like). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 963–968, 2010.

LABRUNA, M.B.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; DE WALL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.97, n.1, p.1-14, 2001.

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.

LINHARES, G. F. C. **Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de eqüídeos, com ênfase à microrregião de Goiânia, Goiás, Brasil.** [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1994.

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.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR; BUCHNER, A. LAI, T.; STEPII, S.; JOBB, G.; FÖSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A.W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A.; LISS, T.; LÜßMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A.; SCHLEIFER, K. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 4, p. 1363-1371, 2004

MACHADO, R. Z.; TOLEDO, C.Z.P.; TEIXEIRA, M.C.A.; ANDRE, M.R.; FRESCHI, C.R.; SAMPAIO, P.H. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 461–465, 2012.

MAHMOUD, M.S.; EL-EZZ, N.T.A.; ABDEL-SHAFY, S.; NASSAR, S.A.; NAMAKY, A.H.E.; 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, n. 260, p. 1–10, 2016.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v.23, n.1, p.37-103, 1984.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p. 467–475, 1998.

MORETTI, A.; MANGILI, V.; SALVATORI, R.; MARESCA, C.; SCOCCIA, E.; TORINA, A.; MORETTA, I.; GABRIELLI, S.; TAMPIERI, M.P.; PIETROBELLI, M. Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: A preliminary study. **Veterinary Journal**, v. 184, n. 3, p. 346–350, 2010.

MORRISON, D.A.; ELLIS, J.T. Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of *18S rRNAs* of apicomplexa. **Molecular Biology and Evolution**, v.

14, n. 4, p. 428-441, 1997.

MUJICA, F.F.; ; PERRONE, T.; FORLANO, M.; CORONADO, A.; MELÉNDEZ, R.D.; BARRIOS, N.; ÁLVAREZ, R.; GRANDA, F. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1-2, p. 180–183, 2011.

MUJICA, L.F.F. **Babesia caballi (Nuttall & Strickland, 1912): patogenia, transmissão e alterações hemocitárias no carrapato Anocentor nitens (Neumann, 1897), vetor biológico nas Américas.** [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Tese, 2002.

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.

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, p. 5–96, 1912.

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

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.

PFEIFER BARBOSA, I. B.; FRIEDHOFF, K.T.; MASSARD, C.L.; LINHARES, G.F.C. Diagnosis of natural infection with *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1910) in horses and *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) in Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 105–107, 1992.

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.

PFEIFER, I.B.B. Estudos epidemiológicos sobre infecções com *Babesia equi* e *Babesia caballi* no Brasil. Tese Med. Vet, Escola Med. Vet., Hannover, Alemanha, Tese, 1993.

PRUESSE, E.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. **Bioinformatics**, v. 28, n. 14, p. 1823–1829, 2012.

QABLAN, M.A.; OBORNÍK, M.; PETRŽELKOVÁ, K.J.; SLOBODA, M. Infections by *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Jordanian equids: epidemiology and genetic diversity. **Parasitology**, v. 140, n. 9, p. 1096–1103, 2013.

RAPOPORT, A.; AHARONSON-RAZ, K.; BERLIN, D.; TAL, S.; GOTTLIEB, Y.; KLEMENT, E.; STEINMAN, A. Molecular characterization of the *Babesia caballi rap-1* gene and epidemiological survey in horses in Israel. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 23, p. 115–120, 2014.

RETIEF, G.P. A comparison of equine piroplasmosis in South Africa and the United States.

**Journal of America Veterinary Medical Association**, v. 145, p. 912–916, 1964.

RIBEIRO, M.F.B.; SILVEIRA, J.D.A.; BASTOS, C.V. Failure of the *Amblyomma cajennense* nymph to become infected by *Theileria equi* after feeding on acute or chronically infected horses. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 324–327, 2011.

RISTIC, M. et al. Equine piroplasmosis—a mixed strain of *Piroplasma caballi* and *Piroplasma equi* isolated in Florida and studied by fluorescent-antibody technique. **America Journal Veterinary Research**, v. 25, p. 15–23, 1964.

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

ROBY, T.O.; ANTHONY, D.W. Transmission of Equine Piroplasmosis by *Dermacentor nitens* Neumann. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 142, n. 7, 1963.

ROS-GARCÍA, A.; M'GHIRBI, Y.; HURTADO, A.; BOUATTOUR, A. Prevalence and genetic diversity of piroplasm species in horses and ticks from Tunisia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 17, n. April, p. 33–37, 2013.

ROTHSCHILD, C.; KNOWLES, D. Equine Infectious Diseases. In: SAUNDERS, L. M. (Ed.). **Equine piroplasmosis**. Sellon DC ed. St. Louis, MO: Elsevier, p. 465–473. 2007.

ROTHSCHILD, C. Equine Piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, n.1, p. 497-508, 2013.

RÜEGG, S. R.; TORGERSON, P.; DEPLAZES, P.; MATHIS A. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 7, p. 939–947, 2007.

RÜEGG, S.R.; HEINZMANN, D.; BARBOUR, A.D.; TORGERSON, P.R. Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 555–565, 2008.

RÜEGG, S.R.; TORGERSON, P.; DEPLAZES, P.; MATHIS, A. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. **Parasitology**, v. 134, p. 939–947, 2007.

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.O.M.; Hassan, S.M.; BAKHEIT, M.A.; ALHASSAM, A.; IGARASHI, I.; KARANIS, P.; ABDELRAHMAN, M.B. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. **Parasitology Research**, v. 103, n. 5, p. 1145–1150, 2008.

SAM-YELLOWE, T. Y. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. **Parasitology Today**, v. 12, p. 308–331, 1996.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

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.

SANTOS, T.M.; SANTOS, H.A.; MASSARD, C.L. Diagnóstico molecular de babesiose congênita em potros neonatos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p.348-350, 2008.

SCHEIN, E. Equine babesiosis. In: M, R. (Ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Florida: CRC, Boca Raton, 1988. p. 197–208.

SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A.R.; 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, DONALD P. Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* ticks, Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1903–1905, 2011.

SCOLES, G. A.; UETI, M. W. Vector Ecology of Equine Piroplasmosis. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 561–580, 2015.

SEVINC, F.; MADEN, M.; KUMAS, C.; SEVINC, M.; EKICI. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 156, n. 3-4, p. 173–177, 2008.

SHKAP, V.; COHEN, I.; LEBOVITZ, B.; SAVITSKY, AVNI, G.; SHOFER, S.; GIGER, U.; KAPPEMEYER, L.; PIPANO, E.; KNOWLES, D. Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. 4, p. 251–259, 1998.

SIPPEL, W.L. Equine piroplasmosis in the United States. **Journal of America Veterinary Medical Association**, v. 141, p. 694–698, 1962.

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.

SOUZA, A.P.; SERRA-FREIRE, N. Variação sazonal dos estádios adultos de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, como parasitas de cavalos, no município de Itaguaí, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 31–34, 1992.

STILLER, D.; COAN, M.E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 97–108, 1995.

STRICKLAND, R.K. .; GERRISH, R.R. Distribution of the tropical horse tick in the United States, with notes on associated cases of equine piroplasmosis. **Journal of America**

**Veterinary Medical Association**, v. 144, p. 875–878, 1964.

SUAREZ, C.E. Palmer, G.H.; Hines, S.A.; McElwain, T.F. Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 3511–3517, 1993.

SUAREZ, C.E.; Palmer, G.H.; Hotzel, I.; Hines, S.A.; McElwain, T.F. Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis rap-1* multigene locus. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 215–224, 1998a.

SUAREZ, C.E.; Palmer, G.H.; Hotzel, I.; McElwain, T.F. Sequence and Functional Analysis of the Intergenic Regions Separating Babesial *Rhoptry-Associated Protein-1 (rap-1)* Genes. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 189–194, 1998b.

SUAREZ, C.E.; PALMER, G.H.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; HINES, S.A.; HÖTZEL, I.; MCELWAIN, T.F. Organization, transcription, and expression of *rhoptry associated protein* genes in the *Babesia bigemina rap-1* locus. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 101–112, 2003.

SUAREZ, C.E.; PALMER, H.G.; LEROITH, T.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; CRABB, B.; MCELWAIN, T.F. Intergenic regions in the *rhoptry associated protein-1 (rap-1)* locus promote exogenous gene expression in *Babesia bovis*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1177–1184, 2004.

TAMURA, K. STECHER, G.; PETERSON, D. FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TAYLOR, W.M.; BRYANT, J.E.; ANDERSON, J.B.; WILLERS, K.H. Equine piroplasmiasis in the United States—a review. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 155, p. 915–919, 1969.

TORRES-MACHORRO, A.L.; HERNÁNDEZ, R.; CEVALLOS, A.M.; LÓPEZ-VILASEÑOR, I. Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? **Microbiology Reviews**, v. 34, p. 59–86, 2010.

UETI, M. W.; PALMER, G.H.; KAPPMAYER, L.S.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, D.P. Expression of Equine Merozoite Antigen 2 during Development of *Babesia equi* in the Midgut and Salivary Gland of the Vector Tick *Boophilus microplus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5803–5809, 2003.

UETI, W.M.; PALMER, G.H.; KAPPMAYER, L.S.; STATFIELD, M.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, P.D. Ability of vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p.3755–3759, 2005.

UETI, W.M.; PALMER, G.H.; SCOLES, G.A.; KAPPMAYER, L.S.; KNOWLES, P.D. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. **Infection and Immunity**, v.76, n.8, p.3525–3529, 2008.

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, A.H.; Espy, B.; GUTHRIE, A.J.; FOWLER, K.W.; KNOWLES, D. 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. 5–10, 2012.

UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases on world animal health. **Vet. Parasitol.**, v. 57, p. 19–41, 1995.

UILENBERG, G. Babesia-A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3–10, 2006.

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

WISE, L. N.; KAPPMAYER, R. H.; MEALEY; KNOWLES, D. P. Review of Equine Piroplasmiasis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1334–1346, 2013.

WISE, L. N. et al. Equine Piroplasmiasis. v. 30, p. 677–693, 2014.

## **CAPÍTULO II**

### **DINÂMICA DA INFECÇÃO DE *Theileria equi* EM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

## RESUMO

PEIXOTO, Maristela Peckle. **Dinâmica da infecção de *Theileria equi* em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2017. 66p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

No Brasil, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é a espécie de carrapato indicada como vetor de *T. equi* à equinos livres da infecção. No entanto, existe ainda uma lacuna sobre o comportamento do vetor infectando equinos, como ele se infecta, multiplica e transmite o patógeno para os animais. No segundo capítulo deste estudo foram avaliados aspectos da dinâmica da infecção de *T. equi* em *R. (B.) microplus* alimentados em equino cronicamente infectado. Larvas de uma colônia livre de hemoparasitos foram utilizadas. Carrapatos e sangue do equino foram coletados de dois em dois dias. Os carrapatos foram dissecados e armazenados inteiros em “pools” de acordo com o dia pós-infestação, estágio evolutivo e gênero. Amostras de glândula salivar e ovário foram armazenados para Microscopia Eletrônica de Transmissão. As amostras foram testadas pela qPCR. Com relação aos carrapatos inteiros, mais de 90% das amostras foram positivas para *T. equi*. A carga parasitária média das amostras de carrapatos inteiros e glândulas salivares apresentaram aumento gradual com o avançar do período de alimentação. Das 45 amostras de glândula salivar, 77,78% foram positivas para *T. equi* e tiveram maior taxa de infecção no final do período experimental. Foi possível observar positividade em carrapatos recém emergidos, ninfas e adultos, indicando a ocorrência de transmissão transtadiária. A positividade de amostras de ovários foi de 84,38%. A maior permanência de machos sobre o equino, associado à alta positividade deste tipo de amostra indicam que o macho pode ter participação significativa na transmissão. Visualizaram-se estruturas morfológicamente compatíveis com um piroplasma através de micrografia de transmissão em ovários e glândulas salivares de em *R. (B.) microplus*. Experimentalmente, observou-se que *R. (B.) microplus* é capaz de se infectar com *T. equi*, transmitir o patógeno transtadiariamente e que as formas multiplicam-se em glândulas salivares e, possivelmente, em ovários, suscitando a possibilidade de transmissão transovariana de *T. equi* em *R. (B.) microplus*.

**Palavras-chaves:** transmissão transtadiária, transmissão transovariana, theileriose equina, dinâmica da infecção, PCR em tempo real.

## ABSTRACT

PEIXOTO, Maristela Peckle. **Dynamics of *Theileria equi* infection in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2017. 66p. Thesis. (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2017.

The aim of the second chapter was to evaluate the dynamic of infection of *T. equi* in *R. (B.) microplus* fed in chronically infected horses. The larvae obtained from a hemoparasite-free colony were used in the infestation of an equine chronically infected by *T. equi*. Ticks and the horse blood were collected every two days. Ticks were dissected and stored in pools according to the pos-infestation day, evolutionary stage and gender. Some of these specimens were stored entire. Salivary gland and ovary samples were stored properly for Transmission Electron Microscopy. Some stages, prior to ecdysis, were stored in B.O.D. to molt. Samples were tested by qPCR. Regarding to entire tick samples, more than 90% of the samples were positive for *T. equi*. The mean of parasite load in entire ticks and salivary glands presented gradual increasing with the progress of the feeding period. Of the 45 salivary gland samples, 77.78% were positive for *T. equi* and had a higher infection rate at the end of the experimental period. It was found freshly molted ticks positives for *T. equi* by qPCR, indicating transtadial transmission. 84.38% of *R. (B.) microplus* ovary samples were considered positives for *T. equi* by molecular tools. Males of *R. (B.) microplus* were found parasiting the equine for 60 days. This fact associated with the high positivity for *T. equi* indicates males as an epidemiologically important gender. Transmission micrographs revealed morphologic structures compatible with a Piroplasmid in the acini of salivary glands and ovaries. Experimently, it was possible to observe that *R. (B.) microplus* could be infected with *T. equi* and that the forms of development of this parasite are capable of multiply inside salivary glands and, possibly, ovaries. Also, it was shown that *T. equi* is capable of be transmited transtadially by *R. (B.) microplus*.

**Keywords:** Genetic diversity, equine piroplasmosis, equine teileriosis, transtadial transmission, transovarian transmission.

## 1 INTRODUÇÃO

Os gêneros *Theileria* e *Babesia* pertencem a ordem Piroplasmida. Estes protozoários são patogênicos para equinos, bovinos, ovinos, caprinos e ocasionalmente, para o homem, e levam à doenças conhecidas como theileriose e babesiose. Igualmente, podem ser denominadas piroplasmose e os sinais clínicos mais comuns são febre, letargia, icterícia, hematuria, hepato e esplenomegalia. Estes agentes levam à perdas econômicas significativas, principalmente nos países próximos aos trópicos, inclusive no Brasil.

Os hematozoários desta ordem são transmitidos por um amplo espectro de espécies de carrapatos ixodídeos, e embora haja descrição de muitos dos vetores das diferentes espécies de *Theileria* e *Babesia*, seus ciclos de vida continuam não conhecidos completamente. Além disso, o estudo dificultado pelo tamanho reduzido destes protozoários e o ciclo de vida complexo, remete à dúvidas sobre a posição sistemática dos piroplasmas, como no caso de *Theileria equi* (ALLSOPP & ALLSOPP, 2006).

*Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn e Schein 1998, é um dos agentes da piroplasmose equina, sendo anteriormente denominada *Piroplasma equi* Laveran 1901, *Nuttallia equi* França 1909, *Babesia equi* e, atualmente, é aceita pela comunidade científica como um theilerídeo por apresentar-se como “Cruz de Malta” em eritrócitos, pela primeira esquizogonia ser realizada em linfócitos, pela incapacidade de ser transmitida de forma transovariana e pela resistência à fármacos babesicidas convencionais (MEHLHORN; SCHEIN, 1998; UETI et al., 2008). No entanto, a discussão sobre qual o gênero mais adequado para alocar *T. equi* é atual, principalmente com relação à estudos filogenéticos envolvendo o gene *18S rDNA* (ALLSOPP et al., 1994; ALLSOPP & ALLSOPP, 2006; LACK et al., 2012; SCHNITTGER et al., 2012).

Em condições naturais, *T. equi* e *B. caballi* são transmitidos por carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes*, perfazendo mais de vinte espécies (THOMPSON, 1969; COLES & UETI, 2015). No Brasil, as espécies de carrapatos indicadas como vetores na transmissão de *T. equi* e *B. caballi* são *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (GUIMARÃES et al., 1998a) e *Dermacentor nitens* (MUJICA, 2004), respectivamente. Em relação ao *R. (B.) microplus*, os equinos são hospedeiros secundários, consequentemente, o parasitismo em equinos depende da presença de bovinos, hospedeiros primários, nas condições de pastagens consorciadas em que ambas as espécies são criadas juntas (HEUCHERT et al., 1999; LABRUNA et al., 2001). O fato deste carrapato ser monoxeno e o único indicado na transmissão de *T. equi* para equinos no Brasil até o momento (GUIMARÃES et al., 1998a; RIBEIRO et al., 2011), associado à alta prevalência deste hematozoário no rebanho de equinos nacional, levanta questionamentos sobre a importância epidemiológica do *R. (B.) microplus* e sobre as possíveis formas de transmissão de *T. equi* por este carrapato.

Em condições experimentais, foram identificados esporoblastos e esquizontes de *T. equi* em glândulas salivares de *R. (B.) microplus* (GUIMARÃES et al., 1998a) e, posteriormente, a transmissão transtadial de *T. equi* foi comprovada através da infestação de ninfas de *R. (B.) microplus* em potros com elevada parasitemia seguido da infecção de equinos não infectados por adultos (GUIMARÃES et al., 1998b). Utilizando nested PCR (BATTSETSEG et al., 2002) detectaram DNA de *T. equi* e *B. caballi* em ovos de *R. (B.) microplus* naturalmente infectados, procedentes do Brasil, sugerindo a possibilidade de ambos protozoários serem transmitidos via transovariana e transtadial pelo carrapato vetor. Posteriormente, Ueti et al. (2005; 2008) comprovaram a participação de *R. (B.) microplus* como transmissor biológico de *T. equi* nas modalidades transtadial e intraestadial. Também demonstraram que equinos cronicamente infectados e com baixa parasitemia são competentes reservatórios para infecção de carrapatos vetores de *T. equi*.

A PE é considerada o principal impedimento no transporte internacional de equinos e esta restrição não se limita somente aos equinos na fase aguda da infecção, mas estende-se aos cronicamente infectados, detectados por ensaios sorológicos (KNOWLES et al., 1992; SHKAP et al., 1998). Portanto, é necessário implementar medidas de controle desta doença mais eficazes, e para tal, é fundamental conhecer o comportamento do vetor, como ele se infecta, multiplica e transmite o patógeno.

Neste aspecto, o objetivo deste estudo foi: avaliar a capacidade de infecção de *T. equi* em *R. (B.) microplus* alimentados em equino cronicamente infectado através de técnicas moleculares; avaliar a capacidade de transmissão transestadial de *T. equi* por *R. (B.) microplus*; avaliar a possibilidade de transmissão transovariana de *T. equi* em *R. (B.) microplus*; avaliar a possibilidade da transmissão transestadial de *T. equi* em uma nova geração de *R. (B.) microplus* oriunda de colônia infectada; caracterizar a morfologia de *T. equi* em diferentes órgãos e estágios de desenvolvimento de *R. (B.) microplus* quando alimentados em equino cronicamente infectado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Piroplasmose equina e aspectos sobre a reposta do equino à infecção

A piropasmose equina (PE) é uma doença que acomete equídeos e apresenta, na fase aguda da doença, características clínicas como febre, anemia, icterícia, hemoglobinúria e fraqueza (DE WALL, 1990; 1992). A infecção clinicamente inaparente pode ocorrer, e os dados indicam que o risco de doença clínica aumenta em animais não imunes, como os equinos residentes em áreas livres da doença, e em infestações com densidade alta de carrapatos. Os agentes etiológicos responsáveis por esta enfermidade são os hematozoários *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn e Schein (1998) e *Babesia caballi* (Nuttall e Strickland, 1912). Além da fase aguda da doença, caracterizada pela sintomatologia clínica no hospedeiro vertebrado, os equinos podem se tornar cronicamente infectados por toda a vida e funcionar como reservatórios mamíferos dos agentes da PE para carrapatos vetores (SCHEIN, 1988; UETI et al., 2005).

No hospedeiro vertebrado, a invasão inicial de *T. equi* é diferente de *Babesia caballi*, cujos esporozoítos invadem diretamente os eritrócitos. Em *T. equi*, os esporozoítos podem invadir linfócitos T e B, monócitos e macrófagos (RAMSAY et al., 2013). O tropismo leucocitário de *T. equi* se sobrepõe tanto ao de *Theileria annulata*, quanto ao de *Theileria parva*, cujos esporozoítos só infectam linfócitos. Isto sugere que as respostas imunitárias protetoras estimuladas no hospedeiro vertebrado para estes dois theilerídeos, devem ser fatores de proteção importantes também contra *T. equi* (RAMSAY et al., 2013).

Os esporozoítos se desenvolvem em grandes esquizontes nas células de defesa e transformam-se em merozoítos, que são liberados para invadir eritrócitos. Os merozoítos se reproduzem assexuadamente nos eritrócitos levando à sua ruptura (WISE et al., 2014). Em um hospedeiro que não possui imunidade contra *T. equi*, ou seja, que reside em área livre deste hemoparasito, a infecção de merozoítos em eritrócitos provoca a lise destas células resultando em graus variados de anemia hemolítica intravascular. Os eritrócitos não parasitados também são removidos da circulação por macrófagos esplênicos (extravascular), mas a causa deste fenômeno é desconhecida. Alterações na coagulação, como a diminuição da contagem de plaquetas e tempo de coagulação prolongado também são relatados na fase aguda da doença (ZOBBA et al., 2008). Essas alterações ocorrem durante o período de incubação, que varia de 12 a 19 dias para *T. equi*, ou logo após este (DE WAAL, 1992), e coincidem com o pico de febre e eritrólise.

Em todos os casos em que o equino sobrevive à fase aguda da doença, ele se torna portador crônico e, quando são re-expostos ao parasito, os equinos se tornam resistentes à doença (SCHEIN, 1988), mas atualmente o mecanismo de resistência é desconhecido. No entanto, acredita-se que é a resposta imune adaptativa que desempenha este papel já que, em infecção experimental em potros com síndrome grave de imunodeficiência combinada, que não possuem linfócitos T e B funcionais, resultou em infecção fulminante e morte dos animais (KNOWLES, 1994). A resistência à doença clínica adquirida por equinos após a infecção é resultado da estimulação contínua da imunidade pelo parasito persistente, mas os mecanismos exatos envolvidos são desconhecidos (AHRMED, 2002).

Altos títulos de anticorpos sozinhos, não são capazes de eliminar hemoparasitos, mas estão associados à redução da replicação do parasito ou à redução da parasitemia no organismo (BROWN et al., 1999; CHEN et al., 2000). Após a lise dos eritrócitos infectados, os parasitos são acessíveis aos anticorpos e aos diversos mecanismos da resposta imune. Os mecanismos de proteção associados com anticorpos incluem a neutralização de parasitos

extracelulares, bloqueando a entrada de parasitos nas células ou a opsonização de eritrócitos infectados e a lise de organismos ou de células infectadas (CAVINATO et al., 2001). No caso de *T. equi*, EMA-1 é uma proteína de superfície imunodominante que induz a primeira resposta de anticorpos mensurável em equinos durante o controle da parasitemia aguda (KNOWLES et al., 1994). Os equinos soro-convergem dentro de 7 a 11 dias após a infecção natural e os níveis de pico são entre 30 a 45 dias (WISE et al., 2014).

## 2.2 Ciclo biológico e morfologia de *Theileria equi* no equino e no carrapato vetor

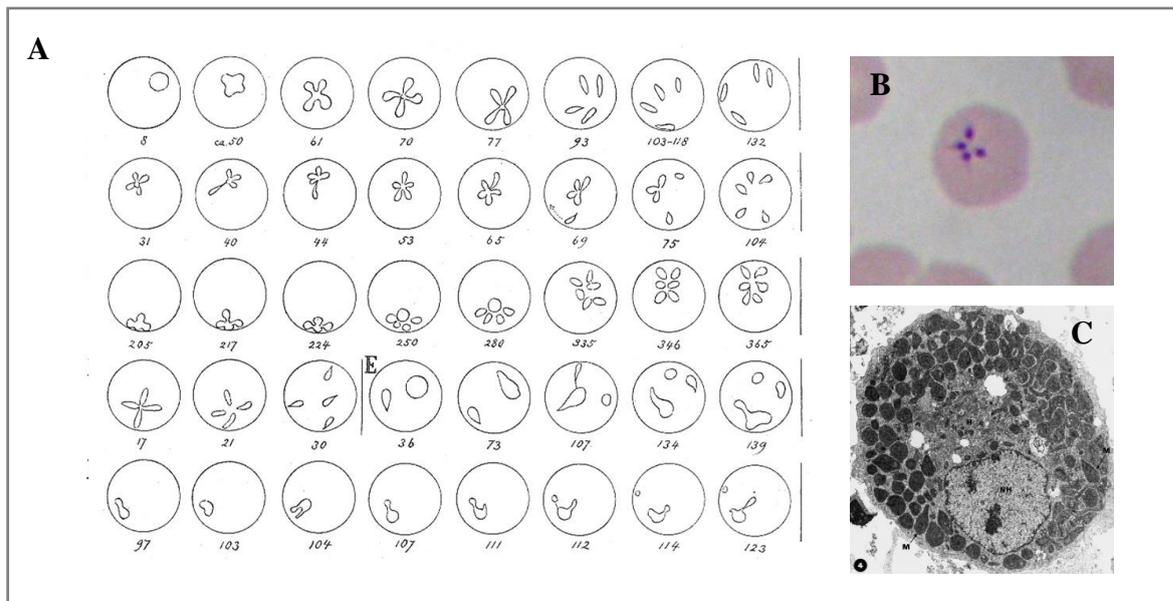
### 2.2.1 No hospedeiro vertebrado

O ciclo biológico de *T. equi* é complexo e pode variar em função das espécies de carrapatos envolvidos. No hospedeiro vertebrado, os esporozoítos de *T. equi* são inoculados através da saliva de carrapatos vetores. Estas formas infectantes, uma vez na corrente sanguínea, são capazes de penetrar e formar grandes macroesquizontes e microesquizontes em linfócitos de equinos, durante um processo denominado esquizogonia (MEHLHORN; SCHEIN, 1998) (Figura 1C).

A primeira esquizogonia de *T. equi* no hospedeiro vertebrado se dá em linfócitos (SCHEIN et al., 1981; MOLTMANN et al., 1983; MEHLHORN & SCHEIN, 1984; MEHLHORN & SCHEIN, 1998). Recentemente, em um estudo *in vitro*, a esquizogonia de *T. equi* foi também observada em monócitos e macrófagos, revelando certa promiscuidade do parasito na infecção de células sanguíneas (RAMSAY et al., 2013). Estas formas do parasito resultam em cerca de 200 merozoítos por célula infectada, cada um medindo aproximadamente 1,5-2  $\mu\text{m}$  de comprimento. Não existem evidências de que as células mononucleares continuem a ser infectadas pelo parasito após a infecção em eritrócitos (RAMSAY et al., 2013).

Os merozoítos resultantes da primeira esquizogonia em células mononucleares, invadem eritrócitos e reproduzem-se por divisão binária longitudinal (merogonia), tornando-se piriformes e medindo aproximadamente 2-3  $\mu\text{m}$ . Em eritrócitos, a divisão assexuada pode dar origem a quatro formas, medindo aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  que aparecem como uma "Cruz de Malta" (Figura 1B). As formas intra-eritrocíticas de *T. equi* mais frequentes são a "Cruz de Malta", porém a forma amebóide ou em anel com cerca de 2  $\mu\text{m}$  de comprimento também são visualizadas (RETIEF, 1964) (Figura 1A). Os eritrócitos se rompem após o processo de merogonia, lançando novos merozoítos na circulação sanguínea. Estes adentram em novos eritrócitos e continuam a replicar-se assexuadamente. Alguns merozoítos, eventualmente, tornam-se esféricos, os quais são denominados gametócitos. Estas formas são ingeridas pelo carrapato vetor durante o repasto sanguíneo e dão continuidade ao ciclo no hospedeiro invertebrado (MEHLHORN & SCHEIN, 1998).

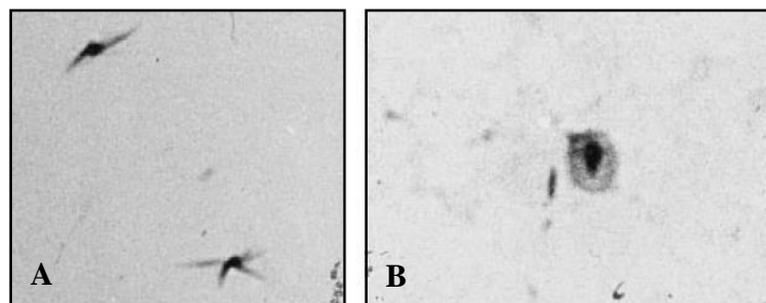
As primeiras pranchas desenhadas de *Theileria equi* e *Babesia caballi* em eritrócitos datam de 1912, por Nuttall e Strickland. Estes autores descreveram *T. equi* (= *Nuttallia equi*), como um hemoparasito de tamanho pequeno, medindo entre 1 e 1,4  $\mu\text{m}$ , de formato amebóide frequente, podendo assumir também formas ovais, arredondadas e piriformes. O formato piriforme deste protozoário foi observado como forma transitória. Durante algumas horas, *N. equi* foi observado como um grande protozoário intraeritrocítico de formato amebóide ou piriforme e logo em seguida, ao cessar a movimentação, se torna arredondado (Figura 1A).



**Figura 1.** Formas morfológicas de *Theileria equi* no interior de eritrócitos no hospedeiro vertebrado. Em A, ilustração em prancha desenhada por Nuttall e Strickland (1912) mostrando as formas amebóides, redondas, em gota e em tétrede assumidas por *T. equi* durante a infecção no equino. Em B, a clássica tétrede de *T. equi* no interior de um eritrócito de equino cronicamente infectado (arquivo pessoal). Em C, micrografia eletrônica de transmissão de linfócito de equino infectado contendo merozoítos maduros e em desenvolvimento, segundo Mehlhorn; Schein (1998).

## 2.2.2 No hospedeiro invertebrado

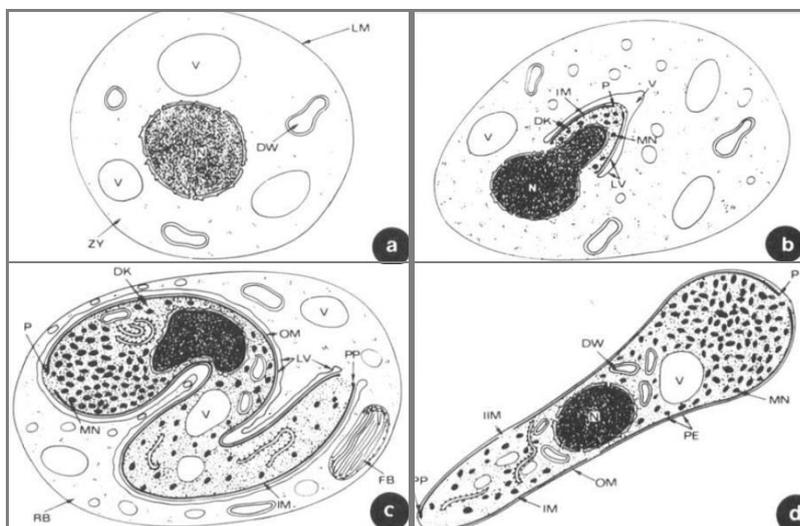
Quando um carrapato vetor ingere os gametócitos, estes crescem no intestino médio do carrapato, e alguns formam os "corpos raiados", cuja estrutura é multinucleada e formada por projeções da membrana (Figura 2A). Os "corpos raiados" (5-6  $\mu\text{m}$ ) são considerados os microgametas, pois aparecem 5 dias após alimentação do carrapato em hospedeiro infectado e parecem sofrer divisão, levando a formação de estruturas similares a gametas uninucleados (2-3  $\mu\text{m}$ ) (MEHLHORN; SCHEIN, 1985). Já as estruturas arredondadas que não formam protrusões e parecem não dividir-se são considerados os macrogametas (1,5-2,5  $\mu\text{m}$ ) (MEHLHORN; SCHEIN, 1985; 1998). No período de 4-6 dias após a ingestão dos gametas, estes fundem-se formando o zigoto (4-6  $\mu\text{m}$ ) (reprodução sexuada) (MEHLHORN & SCHEIN, 1998) (Figura 2B).



**Figura 2.** Imagens de formas evolutivas de *Theileria equi* no intestino do carrapato vetor segundo Mehlhorn; Schein (1998). Em A, gametas com alguns raios (“corpos raiados”). Em B, fusão de dois gametas formando o zigoto.

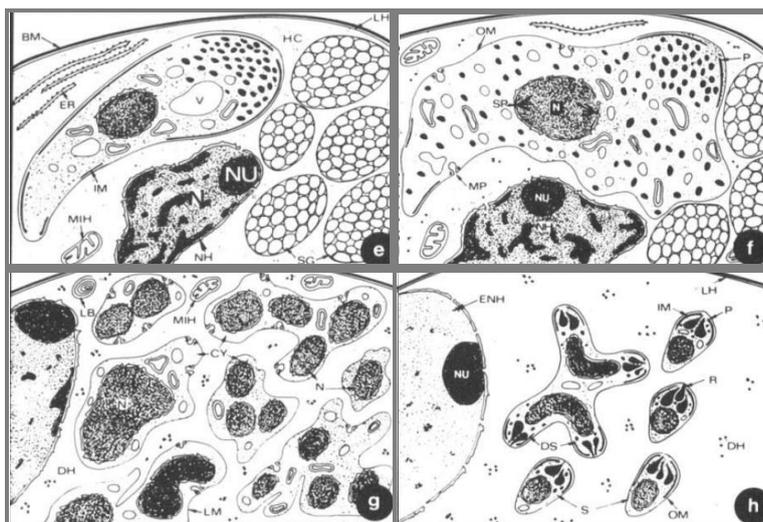
Os zigotos são formados por uma única membrana e não possuem microporos. Seu citoplasma é denso e contém algumas organelas parecidas com micronemas, além de largos vacúolos eletrodensos (1-2  $\mu\text{m}$ ). O núcleo geralmente é encontrado na periferia (3  $\mu\text{m}$ ). Em estágios mais desenvolvidos, o citoplasma e o núcleo do zigoto formam uma protrusão no vacúolo adjacente ao núcleo. A partir deste processo são observados o anel polar, roptrias e micronemas (0,8-0,18  $\mu\text{m}$ ). O conóide nunca é observado no polo apical (MEHLHORN; SCHEIN, 1985) (Figura 3a-c).

Dentro do zigoto, somente um cineto móvel é formado, que mais tarde irá penetrar do intestino médio do carrapato seguindo para a hemolinfa. Cinetos são observados na hemolinfa do ixodídeo 5-7 dias após alimentação em hospedeiro infectado e geralmente persistem por 6-9 dias (MEHLHORN; SCHEIN, 1985; 1998). Os cinetos diferenciados são circundados por uma película típica e os microporos não são observados. Microtúbulos, ancorados no anel polar, alongam-se por quase metade da célula. O núcleo (3-5  $\mu\text{m}$ ) localiza-se na região central ou próximo ao polo apical. Numerosos micronemas são observados por toda a extensão do cineto, mas principalmente no polo apical. Vacúolos de 1-2  $\mu\text{m}$  estão presentes no citoplasma. Algumas estruturas com paredes duplas, parecidas com mitocôndrias, são observadas. O retículo endoplasmático é observado com padrão espiral no polo posterior. Em cinetos que já iniciaram o processo de divisão celular, podem ser observados mais de três núcleos (MEHLHORN; SCHEIN, 1985) (Figura 3d).



**Figura 3.** Representação esquemática da formação do cineto dentro das células intestinais de carrapatos pós-alimentação em hospedeiro infectado com parasitos do gênero *Theileria*. O desenvolvimento do cineto resulta do crescimento do zigoto dentro do vacúolo. a: um zigoto; b: protrusão do vacúolo adjacente ao núcleo; c: aparecimento de novas membranas; d: cineto formado. DK: cineto desenvolvendo; DW: organela com dupla membrana (mitocôndria?); FB: corpo filamentar; IIM: interrupção da membrana interna; IM: membrana interna; LM: membrana limitante; MN: micronema; OM: membrana externa; P: anel polar; PE: película; PP: anel polar posterior; RB: corpo residual; V: vacúolo; ZY: zigoto. Segundo Mehlhorn & Schein, 1985.

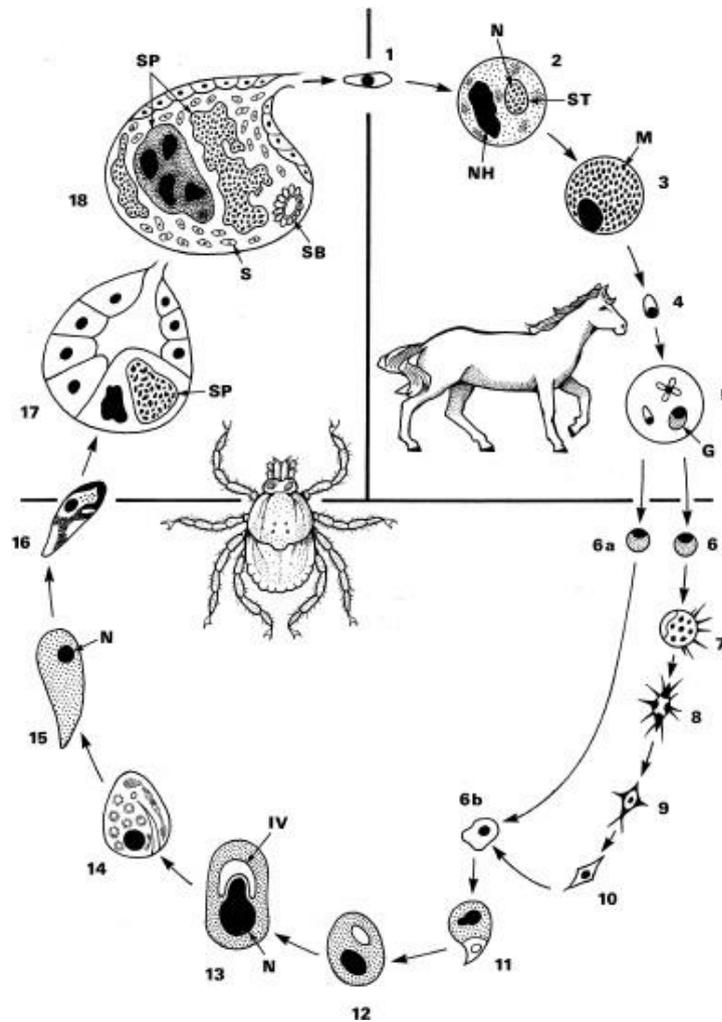
Em seguida, estes cinetos invadem as células “d”, “e” e “f” dos ácinos tipo III das glândulas salivares, 7-8 dias após fixação no hospedeiro (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). A penetração do cineto nos ácinos da glândula salivar só é possível após a muda do carrapato (MEHLHORN & SCHEIN, 1985). Nas células da glândula salivar, esporontes (forma jovem), esporoblastos (forma intermediária) e esporozoítos (forma infectante) são formados em um processo denominado esporogonia (GUIMARÃES et al., 1998a). Não há migração de cinetos para outros órgãos do vetor que não as glândulas salivares no caso de parasitos do gênero *Theileria* (MEHLHORN & SCHEIN, 1985) (Figura 4e-h).



**Figura 4.** Desenvolvimento de parasitos do gênero *Theileria* em ácinos da glândula salivar de um carrapato infectado. e-f: o cineto maduro, após penetrar na célula hospedeira é imediatamente englobado pelo citoplasma. g: longas fitas de material nuclear são formadas. h: finalmente, o parasito divide-se em citômeros de vários tamanhos na superfície de cada esporozoítos, sendo transmitidos na próxima alimentação do carrapato vetor. Segundo Mehlhorn & Schein, 1985. BM: membrana basal; DH: citoplasma degenerado da célula hospedeira; DS: esporozoítos em desenvolvimento; ENH: núcleo aumentado da célula hospedeira; ER: retículo endoplasmático; HC: citoplasma célula hospedeira; IM: membrana interna; LH: membrana limitante da célula hospedeira; MIH: mitocôndria células hospedeira; MP: microporo; NH: núcleo da célula hospedeira; OM: membrana externa; P: anel polar; R: roptria; S: esporozoítos.

A formação de esporozoítos à partir de esporontes, requer um certo período de alimentação dos carrapatos. Assim, pode-se dizer que os carrapatos não são capazes de transmitir parasitos imediatamente após o início da alimentação. Isso ocorre pois durante a muda, as glândulas salivares tornam-se reduzidas, sendo necessária nova alimentação para o desenvolvimento destas e conseqüentemente, do parasito na sua forma madura (MEHLHORN & SCHEIN, 1985). Em espécies de *Hyalomma*, este período foi de 1 a 5 dias (MOLTMANN et al., 1983, ZAPF & SCHEIN, 1994) e em *R. (B.) microplus*, esporozoítos foram observados entre dois e cinco dias de alimentação do carrapato em coelhos (GUIMARÃES et al., 1998a).

De forma geral, desde o início do ciclo de *T. equi*, pode-se dizer que a formação de esporozoítos ocorre no carrapato vetor entre 6 a 24 dias de alimentação (MEHLHORN & SCHEIN, 1998) (Figura 5).



**Figura 5.** Dinâmica do ciclo de vida de *Theileria equi* segundo Mehlhorn & Schein (1998). Em 1, inoculação do esporozoíto em equino livre de infecção; em 2-3, infecção de linfócito e primeira merogonia; em 4-5, infecção em eritrócitos e merogonia; em 6, microgametócitos/macrogametócitos; em 6, infecção do carrapato vetor pelos gametócitos durante o repasto sanguíneo; em 7-8-9-10-11, formação do zigoto (11) a partir de corpos raiados/microgametócito (7-10) e macrogametócito (6a-6b) no intestino do carrapato; Em 12-16, desenvolvimento do cineto móvel que deixa o intestino e ganha à hemolinfa; Em 17-18, penetração do cineto na glândula salivar e multiplicação por esporogonia, formando os esporozoítos, forma infectante para o equino.

### 2.3 As diferenças entre o ciclo de *Theileria equi* e outros piroplasmas

No trato digestivo dos carrapatos, os gametócitos desenvolvem em gametas masculino e feminino, que se fundem para formar zigotos. No caso de parasitos do gênero *Babesia*, após a formação dos zigotos e desenvolvimento dos cinetos, estes invadem não só a hemolinfa, como também numerosos tecidos e órgãos dos carrapatos, incluindo os ovários, mas não, inicialmente, as glândulas salivares. Neste caso, piroplasmas do gênero *Babesia* podem ser transmitidos de forma transovariana para a próxima geração de carrapatos, e o desenvolvimento da forma infectante para equídeos pode ocorrer nas glândulas salivares do carrapato imaturo e adultos (ROTHSCHILD; KNOWLES, 2007; UILENBERG, 2006). A transmissão transovariana de *B. caballi* pelo *D. nitens*, por exemplo, é epidemiologicamente

significativa na medida que os carrapatos funcionam como um reservatório adicional para transmissão, além dos equinos naturalmente infectados (ROTHSCHILD; KNOWLES, 2007).

Em *Theileria*, os zigotos não se multiplicam, mas transformam-se em cinetos e invadem a hemolinfa do carrapato e seguem rumo às glândulas salivares. Não há invasão de outros órgãos, e nenhuma passagem através dos ovários e dos ovos. Os cinetos de theilerídeos são muito maiores, mas menos numerosos do que os vermículos ou cinetos de *Babesia*. Quando os cinetos de *Theileria* invadem as glândulas salivares e o carrapato vetor se alimenta em um novo hospedeiro vertebrado, ocorre esporogonia e maturação dos esporozoítos nas glândulas e a transmissão ocorre pela inoculação de formas do parasito na saliva (MEHLHORN; SCHEIN, 1998; UILENBERG, 2006; ROTHSCHILD; KNOWLES, 2007). Isso quer dizer que quando a larva se infecta a ninfa transmite, e quando a ninfa se infecta, o adulto transmite. As larvas não são consideradas transmissoras (UILENBERG, 2006).

Uma característica comum aos gêneros *Babesia* e *Theileria* é o fato do carrapato vetor precisar amadurecer os esporozoítos nas glândulas salivares por alguns dias após fixação. Ou seja, a transmissão destes piroplasmas não ocorre imediatamente ao repasto sanguíneo do carrapato vetor (UILENBERG, 2006).

Os parasitos do gênero *Babesia* não formam pigmento na célula parasitada, o que os distingue de gêneros como *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Aparentemente, as babesias são capazes de digerir hemoglobina, não deixando resíduos na célula hospedeira. No caso do gênero *Theileria*, algumas espécies não conseguem digerir a hemoglobina completamente. Em infecções causadas por *Theileria velifera*, *T. separata* e *T. buffeli* uma substância semelhante à hemoglobina foi observada no citoplasma de eritrócitos (UILENBERG, 2006). Em células parasitadas por *T. equi*, resíduos de digestão da hemoglobina não são observados (UILENBERG, 2006).

## 2.4 Tipos de transmissão de *Theileria equi* pelo carrapato vetor

Em busca de medidas de controle mais eficazes para a theileriose equina, o conhecimento sobre os mecanismos de transmissão do patógeno pelo carrapato vetor se fazem necessários. Neste aspecto, existem três tipos de transmissão com relação às doenças transmitidas por carrapatos. São elas a transmissão transestadial, a transmissão intraestadial e a transmissão transovariana (Figura 6).

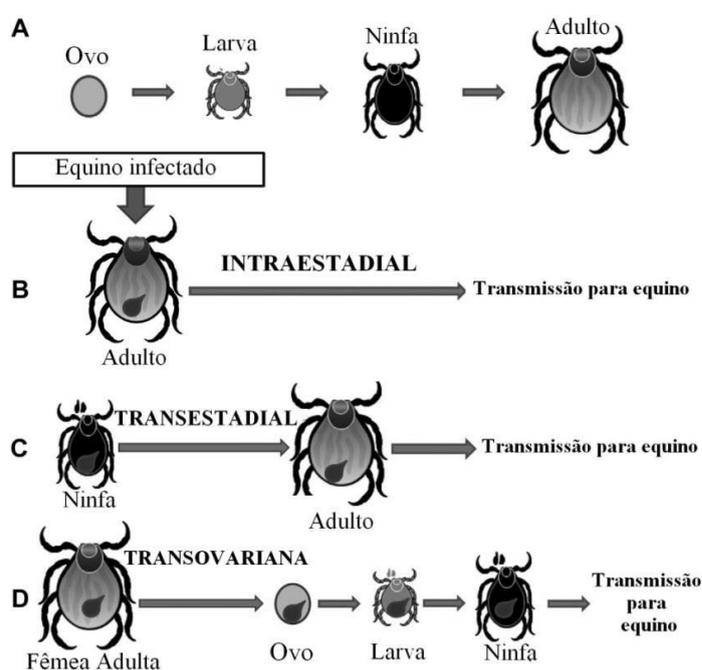
O tipo de transmissão mais documentado de *T. equi* pelo carrapato vetor é a transmissão transestadial (STILLER et al., 2002; UETI et al., 2005; 2008). Esta transmissão ocorre quando os cinetos invadem as glândulas salivares, o carrapato vetor sofre muda de estágio e se alimenta em um novo hospedeiro vertebrado. Neste caso, a esporogonia ocorre e culmina na produção de milhares de esporozoítos nas glândulas salivares, que são as formas infectantes. Estas formas são inoculadas no hospedeiro livre, ocorrendo a transmissão. Na prática, quer dizer que o carrapato vetor se infecta com *T. equi* em um estágio e transmite no próximo estágio de vida (MEHLHORN & SCHEIN, 1985; UETI et al., 2008). Após a transmissão das formas infectantes para um hospedeiro vertebrado, o carrapato perde a sua infecção (UILENBERG, 2006).

As experiências de transmissão transestadial tiveram sucesso com os carrapatos *Rhipicephalus turanicus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* (SIGRIST, 1983) e *R. (B.) microplus* (STILLER et al., 2002; UETI et al., 2008). Em um estudo realizado por Ueti et al. (2005), *R. (B.) microplus* alimentados como ninfa em equino cronicamente infectado por *T. equi*, tiveram uma taxa de infecção nas glândulas salivares entre 7-50% dos carrapatos testados.

A transmissão intraestadial ocorre quando há a transmissão de um patógeno pelo mesmo estágio do carrapato que se infectou. Neste caso, é necessário que o carrapato se alimente em um hospedeiro infectado, se desprenda e em seguida, realize o repasto sanguíneo em um hospedeiro livre, transmitindo o agente etiológico. Este tipo de transmissão é descrita para *T. equi*, sendo os carrapatos vetores testados machos de *D. variabilis* (STILLER et al., 2002) e *R. (B.) microplus* machos (UETI et al., 2008).

O terceiro tipo de transmissão, denominado transovariana, ocorre quando o agente etiológico é capaz de infectar os ovários da fêmea do carrapato vetor, ovos e consequentemente, as larvas que emergiram destes. É possível que as formas infectantes permaneçam infectivas por várias gerações do ixodídeo (WISE et al., 2014).

A transmissão transovariana é relatada em piroplasmas do gênero *Babesia* (BONNET et al., 2007; HOWELL et al., 2007). No caso dos theilerídeos, a transmissão transovariana não ocorre. No entanto, Battsetseg et al. (2002) observaram a presença do DNA de *T. equi* em 43% das amostras de ovos e 62,5% das larvas de *D. nuttalli* após infecção experimental desta espécie de carrapato e sugeriu que a transmissão transovariana possa ocorrer. Ikadai et al. (2007) observaram a presença do DNA de *T. equi* em amostras de ovos e larvas oriundos de fêmeas infectadas de *Haemaphysalis longicornis* no Japão, indicando que a transmissão transovariana ocorreu. Ueti et al. (2008) também observou a positividade de *T. equi* em massas de ovos de *R. (B.) microplus*, porém a transmissão para equinos livres com larvas provenientes de massas positivas de ovos, não ocorreu. Em *R. turanicus* e *H. a. anatolicum* a tentativa de transmissão transovariana de *T. equi* também falhou (SIGRIST, 1983). A falha na transmissão transovariana também ocorreu com *D. variabilis* e *A. cajennense* (SCOLES & UETI, 2013).



**Figura 6.** Representação esquemática das possíveis formas de transmissão da Piroplasmose equina ao hospedeiro vertebrado. Em A, legenda sobre os estágios de vida do carrapato vetor. Em B, transmissão intraestadial, onde a aquisição e transmissão do piroplasma ocorre no mesmo estágio do carrapato. Em C, a aquisição pelo carrapato ocorre em um estágio e a transmissão do protozoário ocorre no estágio seguinte, chamada de transmissão transestadial. Em D, representação da transmissão transovariana, quando a fêmea adquire a infecção e o protozoário ganha os ovários, ovócitos e ovos, sendo transmitido por gerações do carrapato vetor. Figura adaptada de Wise et al. (2014).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Descrição do local do estudo

A etapa experimental deste estudo foi realizada na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio Janeiro (UFRRJ), que está localizada no município de Seropédica, Rio de Janeiro. A UFRRJ está situada entre os paralelos 22°41' 22°45' de latitude sul e os meridianos 43°38' 43°42' de longitude oeste de Greenwich, a 33 metros de altitude, apresentando um clima tipicamente tropical semi-úmido, classificado como Aw pelo Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007).

### 3.2 Princípios éticos da experimentação animal

O uso dos animais envolvidos no trabalho foi previamente aprovada pelo CEUA/IV/UFRRJ (Comissão de Ética no Uso de Animais, Instituto de Veterinária), processo número 003/2014 (ANEXO IX). Todos os procedimentos foram realizados por médicos veterinários com experiência na manipulação de animais para fins de pesquisa.

### 3.3 Animais utilizados no estudo e manejo zootécnico

Neste estudo, foram utilizados um bovino da raça holandesa, fêmea, de aproximadamente 1 ano de idade, livre de hemoparasitos e um equino, macho, de 15 anos de idade, da raça Mangalarga Marchador, cronicamente infectado por *T. equi* e esplenectomizado há mais de dez anos, sendo ambos utilizados para a manutenção da colônia de carrapatos da espécie *R. (B.) microplus*. Além disso, dois coelhos brancos da raça Nova Zelândia, de três semanas de idade foram utilizados como hospedeiros não infectados por agentes da Piroplasmose equina.

Os animais de grande porte foram mantidos em baias individuais e isoladas, sendo devidamente submetidos ao manejo sanitário e zootécnico adequados, alimentados com volumoso do tipo feno (tifton/napier/alfafa), ração concentrada comercial, sal mineral e água fresca *ad libitum*. Os coelhos foram mantidos em gaiolas próprias para a espécie, alimentados com ração comercial, capim verde e alfafa, além de água fresca *ad libitum*. Todos receberam o manejo e a inspeção diária durante todo o período experimental de 33 dias.

### 3.4 Obtenção de colônia de carrapatos livres de hemoparasitos

Para o início da colônia, 60 teleógenas de *R. (B.) microplus* foram obtidas de colônia controlada, cedidas pela equipe do Laboratório de Controle Microbiano/DPA/IV/UFRRJ. Estas fêmeas foram mantidas em câmara climatizada tipo “Biochemical Oxygen Demand” (B.O.D.) à temperatura de 27 °C ( $\pm 1$  °C) e umidade relativa superior à 80%, para realização da postura (BECHARA et al., 1995; DAEMON, 1985; DAVEY et al., 1984; BITTENCOURT et al., 1990; GLÓRIA et al., 1993; BARREIRA, 2001). Apenas as posturas das teleógenas das primeiras 24 horas foram separadas (GUIMARÃES et al., 1998a), pesadas

e transferidas para seringas descartáveis estéreis adaptadas (DAEMON, 1985), as quais foram mantidas em B.O.D., nas mesmas condições descritas anteriormente, para incubação e eclosão das larvas.

As larvas eclodidas, com 15 dias de jejum, foram utilizadas na infestação de um bovino hígado. Para isso, este animal foi tratado com o carrapaticida Deltametrina, através de banho de aspersão com auxílio de bomba costal de 10 mL do produto (25 g) diluído em 10 L de água, sendo toda a solução utilizada no banho do animal em questão visando eliminar a presença de quaisquer ectoparasitos. Da mesma forma, visando eliminar possíveis hemoparasitos dos gêneros *Anaplasma* e *Babesia*, foi utilizado um tratamento com Dipropionato de Imidocarb 120 mg/mL, solução injetável, na dose de 1 mL para cada 50 Kg de peso vivo e Oxitetraciclina 200 mg/mL, solução injetável, na dose de 1 mL para cada 10 Kg de peso vivo. Ambos medicamentos injetáveis foram administrados em dose única por via subcutânea, conforme tratamento preconizado para estes agentes nesta espécie animal.

Respeitando o período residual do produto carrapaticida de 14 dias, a novilha foi infestada com larvas maduras provenientes de 1g de ovos de colônia negativa e controlada. Após 21 dias da infestação, as fêmeas teleógenas provenientes desta infestação foram coletadas do solo, lavadas em solução de hipoclorito de sódio 1%, secas em papel toalha, pesadas em balança de precisão, acondicionadas em placas de Petri e mantidas em B.O.D, conforme procedimento anteriormente descrito.

Apenas as posturas das teleógenas das primeiras 24 horas foram separadas (GUIMARÃES et al., 1998a), pesadas e transferidas para seringas descartáveis estéreis adaptadas (DAEMON, 1985), as quais foram mantidas em B.O.D., nas mesmas condições descritas anteriormente, para incubação e eclosão das larvas. As larvas foram utilizadas na infestação de equino cronicamente infectado por *T. equi*, 10-14 dias após eclosão. Antes da infestação do equino, uma amostragem desta postura (100 ovos), obtida de teleógenas oriundas do bovino tratado foi analisada quanto a sua negatividade para *T. equi* através de PCR em tempo real (qPCR) (KIM et al., 2008).

### **3.5 Dinâmica da infecção e transmissão de *Theileria equi* em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* experimentalmente infectados**

#### **3.5.1 Obtenção de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infectados por *Theileria equi***

Um equino cronicamente infectado por *T. equi* com confirmação diagnóstica pelo exame de esfregaço sanguíneo corado pelo método de Giemsa, e qPCR (KIM et al., 2008) foi utilizado na obtenção de *R. (B.) microplus* infectados pelo hematozoário. O referido animal foi experimentalmente infectado com a amostra Jaboticabal de *T. equi* (GenBank ID: DQ250541.1) (BALDANI et al., 2007) e teve seu baço removido quando ainda jovem. Desta forma, a parasitemia de *T. equi* foi considerada crônica e estável durante todo período experimental (Cq médio = 27,5; carga de parasitos =  $10^3$ ).

Anterior à experimentação, o animal foi tratado com produto carrapaticida de base Deltametrina (Butox® P CE 25, MSD Animal Health), na dosagem e forma de administração preconizadas pelo fabricante. Este tratamento foi realizado 30 dias antes do início da infestação. No intervalo entre o tratamento e a infestação, o controle de carrapatos foi realizado de forma manual, através de rasqueamento e inspeção visual, com especial atenção aos pavilhões auriculares, fossas nasais e região perianal.

O equino foi infestado com 80.000 larvas de *R. (B.) microplus* provenientes de colônias livres de hemoparasitos. A infestação foi realizada ao longo do dorso e na crina do animal (Figura 7).



**Figura 7.** Demonstração da distribuição das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* proveniente de colônia livre de hemoparasitos durante a infestação em equino cronicamente infectado por *Theileria equi*. Em A, infestação no dorso do equino; em B, infestação da crina.

A infestação experimental no equino foi acompanhada por até 60 dias após o início da fase experimental (primeiro dia pós-infestação; 1ºDPI). Embora se tenha observado os carrapatos a partir do 1ºDPI, a coleta e análise dos dados foi realizada a partir do quinto dia pós infestação (DPI), sendo coletados aproximadamente 60 espécimes de carrapatos, de dois em dois dias, até 33 DPI (período de queda das teleóginas do animal infestado). Após a coleta dos carrapatos no equino, os mesmos foram higienizados em solução de hipoclorito à 1% durante um minuto, secos em papel toalha e separados quanto ao estágio evolutivo e gênero no respectivo dia pós-infestação (DPI).

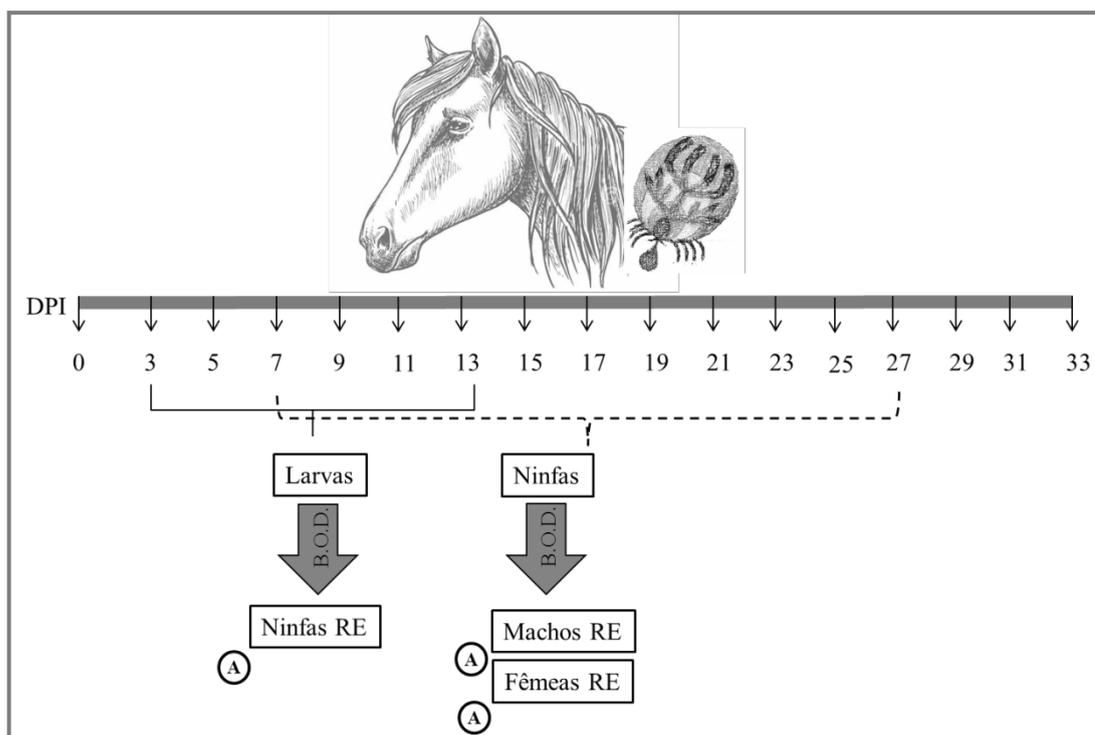
### 3.5.2 Estudo da transmissão transtadiária e transovariana de *Theileria equi* por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Larvas ingurgitadas alimentadas no equino cronicamente infectado por *T. equi* foram acondicionadas em câmara climatizada à 27 °C ( $\pm 1$  °C) até completarem a ecdise para ninfas, sendo estas denominadas ninfas recém emergidas em B.O.D. Ninfas ingurgitadas foram acondicionadas em câmara climatizada à 27 °C ( $\pm 1$  °C) até completarem a ecdise para adultos, sendo estes denominados machos e fêmeas recém emergidos em B.O.D. As fêmeas ingurgitadas foram acondicionadas em placas de Petri e incubadas sob as mesmas condições anteriores para a obtenção de ovos, e posteriormente larvas, os quais foram utilizados para o estudo da capacidade de transmissão transovariana.

A capacidade de transmissão transtadiária de *T. equi* por *R. (B.) microplus* foi avaliada em ninfas recém emergidas e machos e fêmeas recém emergidos. Detalhadamente, larvas de carrapatos foram alimentadas em equino infectado até seu ingurgitamento (3-13 DPI), momento no qual foram cuidadosamente removidas e mantidas em câmara climatizada à 27 °C ( $\pm 1$  °C) e umidade relativa superior à 80% até completarem a ecdise para ninfas (ninfas recém emergidas em B.O.D.). Ninfas, alimentadas desde a fase larval até seu ingurgitamento (7-27 DPI), foram cuidadosamente removidas e mantidas em câmara climatizada à 27 °C ( $\pm 1$

°C) e umidade relativa superior à 80% até completarem a ecdise para adultos recém emergidos em B.O.D.

Após a muda, os espécimes foram dispostos em “pools”, por estágio evolutivo, gênero e dia de coleta (Quadro 2), e armazenados à -80 °C, para posterior extração de DNA e detecção molecular de *T. equi* por qPCR para determinar a infecção e possível capacidade de transmissão transtetadial (UETI et al., 2005). Um esquema desta etapa experimental está representado na Figura 8.



**Figura 8.** Esquema de coleta e métodos de avaliação da transmissão transtetadial de *Theileria equi* por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas de colônia infectada. A= amostras submetidas à PCR em tempo real. RE= recém emergidos em B.O.D.

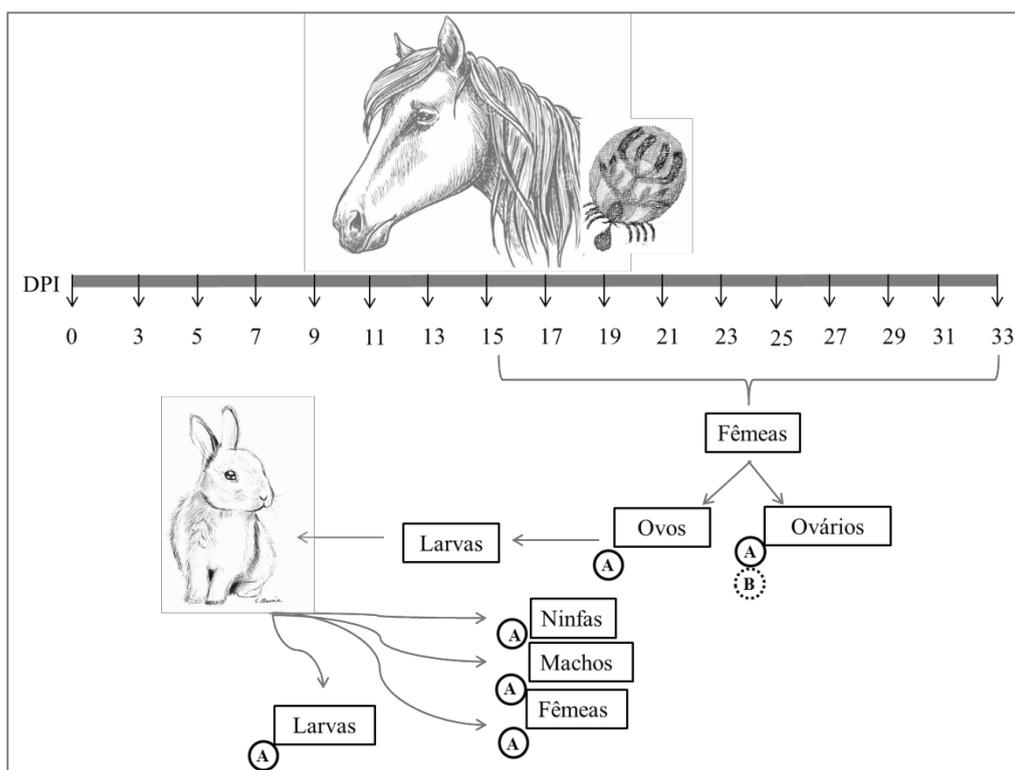
Para testar a possibilidade de transmissão transovariana de *T. equi* por fêmeas de *R. (B.) microplus* e sua descendência, os ovários das fêmeas, os ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas, bem como as larvas eclodidas destes ovos (BATTSETSEG et al., 2002) foram armazenadas em “pools” (Quadro 1) para posterior detecção molecular por qPCR (KIM et al., 2008). Cem larvas oriundas de colônia de carrapatos alimentados em equino cronicamente infectado por *T. equi* foram alimentadas em coelhos, utilizando-se toucas de tecido de algodão nas orelhas dos animais, fixados com pasta Unna e esparadrapo, segundo a metodologia descrita por Neitz et al. (1971) (Figura 10). O esquema da coleta de amostras para a verificação da transmissão transovariana e transmissão transtetadial na segunda geração da colônia infectada por *T. equi* está representado na Figura 9.

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi utilizada para avaliar a morfologia das formas evolutivas de *T. equi* em amostras de glândula salivar de ninfas (11° DPI) e machos (21° e 25° DPI), na avaliação da transmissão transtetadial. Para avaliar a possibilidade de transmissão transovariana, a MET foi utilizada para observar a morfologia das formas evolutivas de *T. equi* em amostras de ovários de fêmeas coletadas no 21°, 25° e 33° DPI.

As amostras de ovários foram testadas também através de *nested* PCR para *Babesia caballi* (BATTSETSEG et al., 2001), e através de PCR convencional para *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (LINHARES et al., 2002) no intuito de aumentar a confiabilidade dos dados de positividade de *T. equi* por técnicas moleculares e por imagem.

**Quadro 1.** Número de exemplares que compunham as amostras de carrapatos analisadas em “pools” para avaliação da capacidade de transmissão transtestadial e transovariana de *Theileria equi* por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

CATEGORIA	nº espécimes /“pool”
Ninfas (2ª geração)	5
Fêmeas e machos (2ª geração)	3-5
Fêmeas para dissecação (ovários)	3-5
Ovos (fêmeas infectadas)	100 ovos
Larvas (ovos infectados)	20 larvas



**Figura 9.** Esquema de coleta e métodos de avaliação da possibilidade de transmissão transovariana de *Theileria equi* por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas de colônia infectada e transmissão transtestadial na segunda geração da colônia infectada. A= amostras submetidas à PCR em tempo real. B= amostras submetidas à Microscopia Eletrônica de Transmissão.



**Figura 10.** Infestação de coelho da raça Nova Zelândia com larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas de colônia infectada por *Theileria equi*, segundo Neitz et al. (1971).

A pesquisa de *T. equi* foi realizada nos exemplares de carrapatos inteiros (larvas, ninfas, machos e fêmeas) e em tecidos dissecados (glândula salivar e intestino) de adultos, ao longo da fase de vida parasitária de aproximadamente 33 dias. Os exemplares de carrapatos coletados foram divididos em dois grupos. Um grupo, composto por carrapatos inteiros, foram coletados e dispostos em “pools”, de acordo com o dia de coleta pós-infestação, estágio e gênero (Quadro 2). O outro grupo de espécimes foi dissecado, sendo as glândulas salivares e intestinos armazenados em “pools”, por dia pós-infestação, estágio e gênero (Quadro 2). As amostras de carrapatos inteiros e órgão de carrapatos foram armazenadas à -80 °C, até o momento da extração de DNA.

**Quadro 2.** Número de exemplares que compunham as amostras de carrapatos e tecidos analisadas em “pools” para avaliação da dinâmica de infecção de *Theileria equi* por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

CATEGORIA	n° espécimes /“pool”
Larvas	20
Ninfas	5
Machos adultos	3-5
Fêmeas adultas	3-5
Fêmeas semi-ingurgitadas	2-3
Ovos	100 ovos
Tecidos (glândula salivar, intestino)	2-5

### 3.6 Coleta de amostras de sangue e avaliação da infecção por *Theileria equi* em equino cronicamente infectado

Para a avaliação da dinâmica de infecção de *T. equi* em *R. (B.) microplus*, o sangue do equino cronicamente infectado foi coletado a cada dois dias em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), através da punção da veia jugular em sistema à vácuo. A coleta de sangue do equino foi realizada juntamente com a coleta dos carrapatos, etapa descrita no item anterior. Estas amostras foram testadas pela qPCR no intuito de quantificar a carga parasitária e determinar o “status” da infecção nas amostras durante todo o período da fase de vida parasitária.

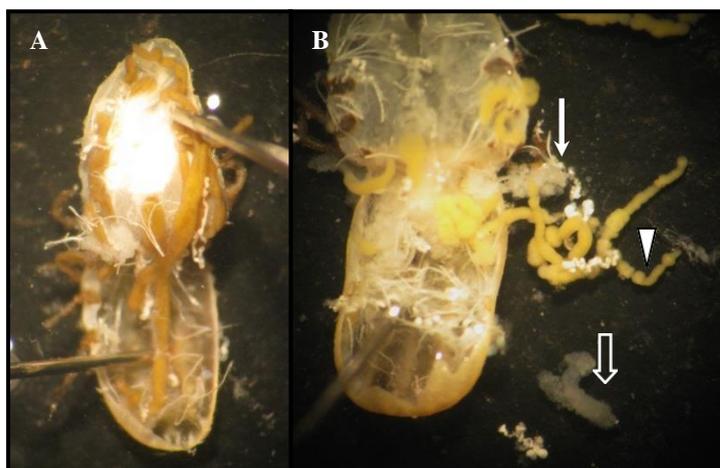
Durante o período da fase de vida parasitária do carrapato sobre o equino, exames clínicos foram realizados nos animais com regularidade e o hematócrito foi mensurado logo após coleta de sangue. Além da avaliação clínica, os animais foram inspecionados para a presença de carrapatos pelo menos uma vez por mês como avaliação de rotina.

### 3.7 Detecção de *Theileria equi* em amostras de carrapatos, órgãos de carrapatos e sangue de equino

#### 3.7.1 Dissecção dos intestinos, ovários e glândulas salivares dos carrapatos

Após o processo de higienização dos espécimes de carrapatos coletados, ninfas e adultos, fêmeas e machos de *R. (B.) microplus*, foram submetidos ao processo de dissecção, onde o intestino, as glândulas salivares e os ovários (fêmeas) foram separados e armazenados em “pools” (Quadros 1 e 2).

Na dissecção, os espécimes foram fixados um a um em placas de Petri contendo parafina preta, no intuito de aumentar o contraste (Figura 11). A incisão no sulco marginal foi realizada, contornando totalmente o idiossoma, com auxílio de tesoura oftálmica de ponta fina e pinças entomológicas, sob microscópio estereoscópico (LED SMZ 445, Nikon). Após o tegumento ser rebatido para melhor visualização das estruturas internas, a cavidade exposta foi banhada em solução fisiológica estéril 0,9% à 6 °C, já que a temperatura baixa mantém os órgãos mais consistentes, possibilitando a separação e a obtenção dos órgãos individualmente. Estes procedimentos foram realizados conforme protocolo adaptado de Edwards et al. (2009). Todos os órgãos foram lavados por três vezes em solução fisiológica estéril 0,9% gelada antes do armazenamento.



**Figura 11.** Dissecção de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fêmea jovem. Em A, demonstração da fixação do ixodídeo rebatido em parafina preta. Em B, os órgãos internos do

carrapato já em processo de separação. Seta branca: glândula salivar; ponta de seta: intestino; seta sem preenchimento: ovário imaturo.

Alguns órgãos foram armazenados em tubos de polipropileno de 1,5 mL contendo solução salina estéril 0,9% e mantidos congelados à -80 °C para posterior extração de DNA. Outros foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0.1M, pH 7.2) e mantidos neste tampão para a técnica de MET. As amostras de órgãos eram de tamanho muito reduzido e foram armazenadas em 1,0 mL do tampão.

### 3.7.2 Extração de DNA total

Para iniciar a extração de DNA das amostras de “pools” de órgãos dos ixodídeos coletados durante a fase experimental, a solução salina estéril foi removida por pipetagem e a maceração dos tecidos foi realizada em tubo de polipropileno de 1,5 mL com auxílio de ponteira de 1 mL queimada na extremidade. Já as amostras de “pools” de ovos, larvas, ninfas e adultos íntegros foram armazenados em tubos de polipropileno de 2,0 mL, onde foram maceradas com bastão de vidro estéril.

Em todas as amostras de “pools” de carrapatos inteiros e “pools” de órgãos de carrapatos, o kit comercial Dneasy Blood and Tissue (Qiagen®, Hilden, Germany) foi utilizado para a extração do DNA conforme as recomendações do fabricante. No entanto, foram feitas algumas adaptações no intuito de adequar a eficiência de extração do kit a este tipo de amostra (ANEXO X).

Após a extração de DNA, as amostras foram armazenadas em tubos de polipropileno de 0,6 mL à -20 °C, em alíquotas de 25 µL padronizadas a aproximadamente 30 ng/µl, para posterior realização da técnica de qPCR. O DNA total foi estocado à -80°C para análises futuras.

A extração de DNA do sangue do equino cronicamente infectado por *T. equi* foi realizada utilizando o mesmo protocolo descrito no primeiro capítulo, item 3.2.3, sobre o estudo da diversidade genética de *T. equi* através do gene *18S rDNA*. A concentração do DNA foi padronizada à 100 ng/µL.

### 3.7.3 Reação de PCR em tempo real (qPCR) para detecção *Theileria equi* e quantificação da carga parasitária

A detecção de *T. equi* foi realizada através do sistema de detecção utilizando sonda de hidrólise (TaqMan®, Applied Biosystems) da qPCR no aparelho StepOne Plus® (Applied Biosystems) para amplificação de um fragmento de 81 pb do gene *18S rDNA* (KIM et al., 2008).

Foi utilizado um par de “primers” Be18SF (5’-GCGGTGTTTCGGTGATT CATA-3’) e Be18SR (5’-TGATAGGTCAGAACTTGAATGATACATC-3’) e uma sonda fluorescente Be18SP (5’FAM-AATTAGCGAATCGCATGGCTT-TAMRA3’) marcada na extremidade 5’ com um *ReporterDye6*-carboxyfluoresceína (FAM) e na extremidade 3’ com o *QuencherDye6*-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA) (KIM et al., 2008). As reações foram realizadas em duplicata em placas diferentes, com volume final de reação de 12 µL, contendo: 1X de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA), 450 nM de cada “primer”, 250 nM da sonda e aproximadamente 90 ng de DNA total. As condições de termociclagem foram: 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).

Dois controles positivos, oriundos de amostra de sangue de equino positivo – cepa

Jaboticabal/UNESP com  $10^{4,57}$  alvos aproximadamente do gene *18S rDNA* e dois controles negativos foram adicionados em cada placa de reação, sendo um controle negativo composto por água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®) pipetado na área de preparo da reação e outro na área de pipetagem das amostras.

### **3.7.4 Curva padrão da PCR em tempo real para quantificação de *Theileria equi* em amostras de sangue, carrapatos e tecidos**

A sensibilidade analítica do ensaio foi determinada pela avaliação de diluições decimais seriadas do gene *18S rDNA* clonado em plasmídeo pGEM-T® Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA). A concentração do DNA plasmidial foi mensurada em fluorômetro Qubit® (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA) e sua pureza foi avaliada em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, EUA). A concentração do DNA plasmidial serviu de base para o cálculo do número de cópias do gene.

Para determinar a precisão das réplicas na qPCR, foi confeccionada uma curva padrão composta por cinco pontos, plotando-se o número de cópias do plasmídeo pelos valores do Ciclo de Quantificação (Cq) de cada réplica. A partir desta, o coeficiente de correlação foi calculado. Para determinar a eficiência da qPCR foram confeccionadas curvas de sensibilidade analítica, plotando-se o “Reporter” normalizado ( $\Delta R_n$ ) pelos valores de Cq.

A eficiência da reação de qPCR e a sensibilidade analítica foram avaliadas com e sem a adição de 1  $\mu$ L de DNA de carrapato inteiro, 1  $\mu$ L do DNA de “pool” de glândula salivar, 1  $\mu$ L do DNA de “pool” de intestino e 1  $\mu$ L do DNA de “pool” de ovário em reação contendo controle interno exógeno (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents VIC™ Probe). Todos os tecidos foram padronizados na concentração de aproximadamente 30 ng/ $\mu$ l. Este controle interno com sonda marcada com o “reporter dye” VIC™ e “quencher” MGB, foi adicionado na reação de acordo com as instruções do fabricante, com o objetivo de detectar a presença de inibidores nas reações de qPCR, como também no sentido de avaliar o impacto da utilização do controle na detecção do DNA de *T. equi* e na eficiência da reação. Além disso, as reações também foram analisadas na ausência do controle interno exógeno, e a diferença estatística de ambos os ensaios foi avaliada (“Kruscall-Wallis”, a 5% de significância). Todas as amostras de DNA de carrapatos e órgãos utilizados para a avaliação da eficiência da reação e da sensibilidade analítica da técnica foram adquiridas a partir de colônia livres de hemoparasitos.

A linha que determina o limite de detecção foi padronizada entre as placas e manualmente alocada de acordo com o “Threshold” automático da curva com controle interno exógeno e DNA plasmidial. As amostras com o Cq inferior ou igual a 40 ciclos foram consideradas positivas.

### **3.7.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão em órgãos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infectados por *Theileria equi***

As amostras (glândulas salivares e ovários) de *R. (B.) microplus* foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0.1M, pH 7.2) por no mínimo 4 horas. Em seguida, foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão e depois desidratadas em séries crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e 100%). Posteriormente a desidratação, as amostras foram incluídas em resina Epon em moldes flexíveis, devidamente identificados. Em seguida, os blocos contendo o material infiltrado foram levados à estufa para a polimerização e secagem completa da resina (GROSS et al., 2014). Cortes ultrafinos

foram feitos e posicionados sobre uma grade de cobre e depois contrastados em acetato de uranila 5% e citrato de chumbo, seguindo-se observação em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol JEM 1011 da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth do IOC, FIOCRUZ.

Medições foram realizadas diretamente das imagens obtidas do MET, com o auxílio do “software” de análise Semafore. As formas evolutivas de *T. equi* foram procuradas nos diferentes cortes examinados de glândulas salivares e ovários. O comprimento total e a largura total foram mensurados.

O processamento das amostras até a etapa da polimerização foi realizado no laboratório no Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, sob supervisão e auxílio da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacenir Reis dos Santos Mallet.

### **3.7.6 Boas práticas de laboratório e cuidados nas técnicas moleculares**

O Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da EPPWON/IV/UFRRJ dispõe de áreas específicas para cada etapa do processo de detecção molecular de hemoparasitas de interesse em Medicina Veterinária. As áreas são dispostas da seguinte forma: área de extração de DNA, área de preparo das reações, área da PCR e área de eletroforese, e seguem um único fluxo de passagem. Além da parte estrutural, o uso de ponteiras com filtro foi empregado em todas as etapas do estudo. Luvas descartáveis e jalecos descartáveis específicos de cada área foram utilizados como equipamento de proteção individual (EPI).

Cada amostra foi testada pela qPCR pelo menos duas vezes, em placas distintas e a amplitude média de seus C<sub>q</sub> foi observada.

## **3.8 Análise estatística**

### **3.8.1 Análise da detecção de *Theileria equi* nos tecidos de carrapatos e carrapatos inteiros em função do período experimental**

Ao longo de todo o período experimental, amostras de DNA carrapatos inteiros e de órgão destes artrópodes foram avaliados quanto à frequência de positividade e a carga parasitária média de *T. equi*. Durante o estudo, as análises foram realizadas de acordo com o dia pós-infestação (DPI), sendo cinco períodos experimentais destacados (5 a 9DPI, 11 a 15DPI, 17 a 21DPI, 23 a 27DPI e 29 a 33DPI). Os valores das taxas de infecção e da carga parasitária média de *T. equi* nos carrapatos inteiros foram comparados em função destes períodos selecionados. Com relação aos órgãos dos carrapatos, foi realizada esta mesma análise comparativa somente em três destes períodos experimentais (17 a 21DPI, 23 a 27DPI e 29 a 33DPI). Em ambos os tipos de amostra de pools de DNA (carrapatos inteiros e órgãos), a comparação foi realizada para os diferentes estágios de desenvolvimento e de gêneros dos exemplares.

Para avaliar a normalidade dos dados das cargas parasitárias, utilizou-se o teste “Lilliefors”, a 5% de significância. Quando os dados apresentaram distribuição normal (paramétrico), foi realizado a ANOVA, através do “teste F”, seguido pelo pós-teste “Tukey”, a 5% de significância. Quando os dados não apresentaram normalidade (não paramétrico), utilizou-se a análise de “Kruskal-Wallis”, seguido do teste “Dunn”, a 5% de significância.

A frequência de positividade do total de “pools” dos diferentes tecidos avaliados (glândula salivar e intestino) foi calculada de acordo com o período experimental estabelecido

(17 a 21 DPI; 23 a 27 DPI e 29 a 33 DPI), em função do gênero do carrapato (macho e fêmea) e do seu estágio de desenvolvimento (freshly molted adult ticks or adult ticks). Estas frequências foram comparadas através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de significância.

Quando o número de observações foi igual ou inferior a 5 “pools”, os testes estatísticos não foram realizados, seja com relação à análise de frequência ou análise de variância da carga média de parasitos. Nestes casos, os dados foram plotados com o objetivo somente de realizar uma análise exploratória dos dados.

Além disso, para avaliação da eficiência da utilização do controle interno nas reações da qPCR, os resultados obtidos dos valores médios de C<sub>q</sub> presentes nas reações com e sem o controle interno exógeno foram comparados através do teste Kruscall-wallis a 5% de significância.

Todas as análises foram realizadas através do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

### **3.8.2 Análise da detecção de *Theileria equi* nos ovos de carrapatos em função do período de postura das teleóginas**

A frequência de positividade de amostras de “ovos” foi analisada em função do período de postura das teleóginas em dias (3DPP, 6 DPP e 9 DPP), através do teste Exato de Fisher em nível de 5% de significância. Os valores médios de C<sub>q</sub> obtidos dos ovos foram comparados também em função do período de postura, através da análise de “Kruscall-Wallis”, seguido do teste “Dunn”, a 5% de significância.

### **3.8.3 Análise comparativa da detecção de *Theileria equi* nos ovos e ovários de carrapatos**

Uma análise comparativa entre os valores médios de carga de parasitos de “pools” de ovários e “pools” de ovos também foi realizada, sendo comparados através do teste “Mann-Whitney” (não paramétrico), a 5% de significância. Ainda com relação à esses dois tipos de amostras, as frequências de positividade foram comparadas através do teste teste Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

### **3.8.4 Análise da curva padrão de sensibilidade da qPCR nas diferentes amostras estudadas**

Os valores médios de C<sub>q</sub> obtidos dos cinco pontos de diluição da curva padrão da qPCR para a detecção de *T. equi* nas amostras de sangue e carrapatos (carrapato inteiro, glândula salivar, intestino e ovário) foram comparados entre si, com e sem a presença de controle interno exógeno na reação.

Da mesma forma, como no item 3.8.1, avaliou-se a normalidade dos dados com o teste “Lilliefors”, a 5% de significância. Quando os dados apresentaram distribuição normal (paramétrico), foi realizado a ANOVA, através do “teste F”, seguido pelo pós-teste “Tukey”, a 5% de significância. Quando os dados não apresentaram normalidade (não paramétrico), utilizou-se a análise de “Kruscall-Wallis”, seguido do teste “Dunn”, a 5% de significância.

## 4 RESULTADOS

### 41 Aspectos da infestação de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em um equino cronicamente infectado por *Theileria equi*

Em relação a infestação experimental foi observado que, após três dias da infestação, o animal apresentou uma reação de hipersensibilidade na derme, com a formação de múltiplas erupções cutâneas (Figura 12). Pequenas áreas de alopecia apareceram sobre algumas das erupções cutâneas alguns dias depois do início da reação alérgica. Durante a coleta das larvas ingurgitadas, foi possível observar que, muitas apresentaram-se mortas e envoltas em exsudato seroso.



**Figura 12.** Equino cronicamente infectado por *Theileria equi* apresentando reação de hipersensibilidade cutâneas dias após a infestação experimental por larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

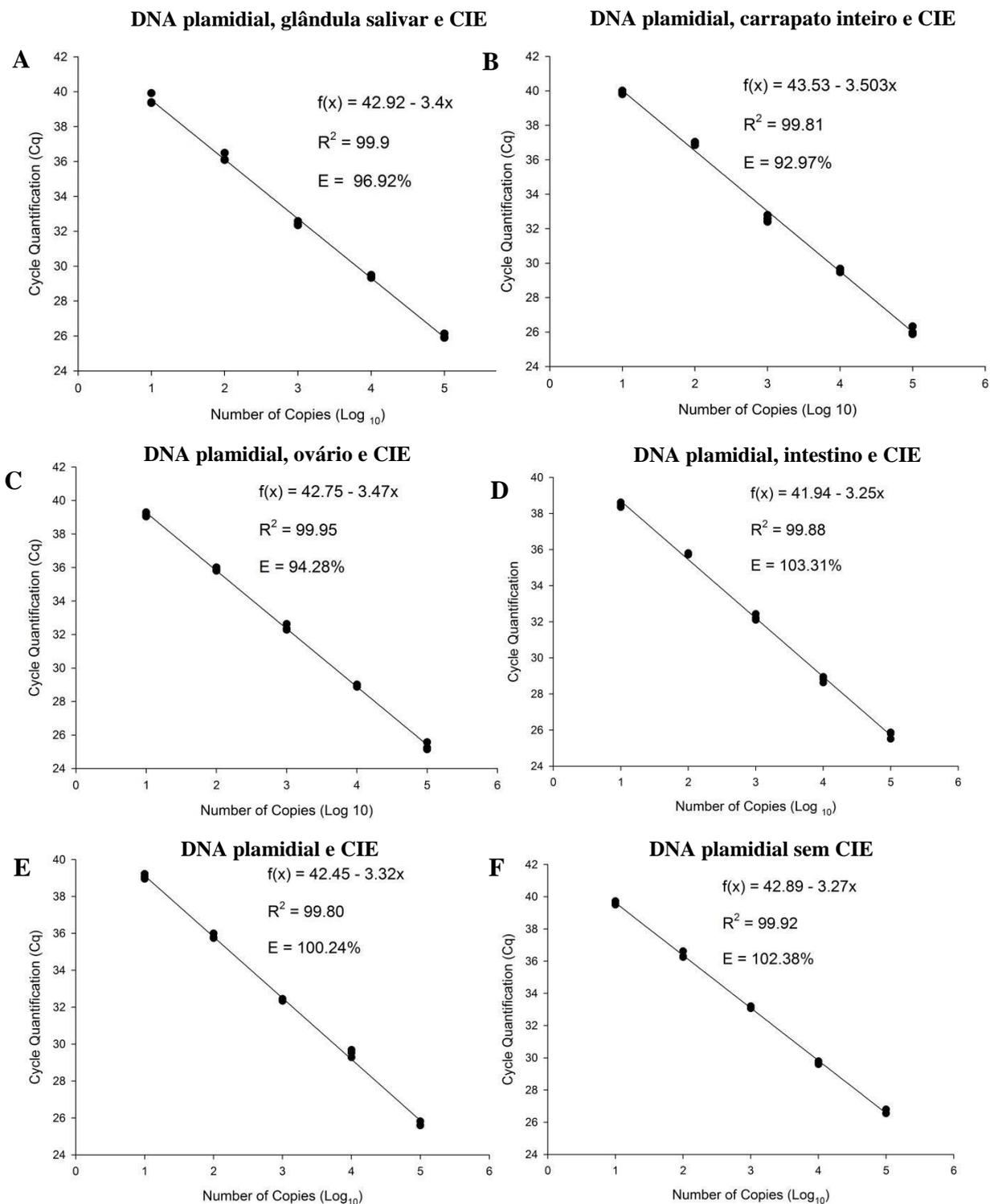
Com relação ao estágio evolutivo de *R. (B.) microplus*, larvas ingurgitadas foram observadas sobre o animal entre 3 e 13 dias pós-infestação (DPI). Ninfas foram encontradas sobre o animal entre os dias 7 e 27 pós-infestação. Machos foram observados entre os dias 17 e 60 DPI, e fêmeas entre o 13° e 35° DPI, embora a maior parte das teleóginas tenha sido obtida até 33° DPI. Outro achado foi a observação de que muitas teleóginas apresentaram o peso médio reduzido.

### 42 Curva padrão da PCR em tempo real para quantificação de *Theileria equi* em amostras de carrapatos e tecidos

As curvas padrão da PCR em tempo real de carrapatos e tecidos para quantificação de *T. equi* tiveram o coeficiente de correlação de três repetições das cinco diluições testadas, de 99%, o que significa que todos os ensaios de curva padrão apresentaram alta reprodutibilidade em todos os pontos de diluição testados. O limite de detecção da qPCR foi de 10 cópias do

DNA plasmidial em todas as condições testadas (Figura 13). A eficiência da reação qPCR variou de 96,92% quando a curva foi construída na presença de DNA da glândula salivar de carrapatos livres de infecção, 92,97% quando a curva foi construída na presença de DNA do carrapato inteiro, 94,28% na presença do DNA do ovário, 103,31% na presença do DNA do intestino, 100,24% quando a curva foi construída apenas com o DNA plasmidial e o controle interno e finalmente 102,38% quando a curva foi construída apenas com o DNA plasmidial. Em nenhuma das curvas construídas a presença do DNA dos tecidos do carrapato fez com que o C<sub>q</sub> do controle interno da reação sofresse alteração, sendo observado este fato em todas as diluições testadas. Dessa forma, as diferenças nas eficiências da qPCR observadas nas curvas padrões construídas na presença do DNA de intestino e carrapato inteiro, pode ser principalmente atribuída à características da própria amostra.

Houve variação mínima nos resultados dos ensaios individuais para o controle positivo em todas as placas da qPCR (coeficiente de variabilidade de 1,2% ou amplitude de variação). Isso demonstra que a eficiência das reações de qPCR não variou mesmo quando as reações foram realizadas em placas diferentes ou até mesmo em dias diferentes. Não houve diferença entre os valores de C<sub>q</sub> da curva com o controle interno e sem o controle interno.



**Figura 13.** Curva padrão obtida a partir de diluições decimais seriadas ( $10^5$  cópias até 10 cópias) do DNA plasmidial contendo a sequência da porção 18S do DNA ribossomal de *Theileira equi*. Em **A** – Curva padrão construída na presença do DNA total da glândula salivar do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* livre de infecção e do Controle Interno Exogeno (CIE). **B** = Curva padrão construída na presença do DNA total do carrapato inteiro *R.(B.) microplus* livre de infecção e do CIE. **C** = Curva padrão construída na presença do DNA total do ovário obtido do carrapato *R.(B.) microplus* livre de infecção e do CIE. **D** = Curva padrão construída na presença do DNA total do intestino obtido do carrapato *R.(B.) microplus*

livre de infecção e do CIE. **E** = Curva padrão construídas apenas com o DNA plasmidial de *T. equi* na presença do CIE. **F** = Curva padrão construídas apenas com o DNA plasmidial de *T. equi* na ausência do CIE.

### 43 Detecção de *Theileria equi* em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em amostras de carrapatos inteiros durante o período experimental

Foram testados pela qPCR para *T. equi* um total de 94 “pools” de amostras de carrapatos inteiros, sendo 9 “pools” de larvas, 19 “pools” de ninfas, 41 “pools” de fêmeas e 26 “pools” de machos. Foi observado que destes “pools” 88,8% (n = 8/9) das larvas, 94,7% (n = 18/19) das ninfas, 95,1% (n = 39/41) dos carrapatos fêmeas e 92,3% dos machos (n = 24/26) foram consideradas positivas pela técnica de qPCR, sem diferença significativa (P>0,05). Embora a taxa de infecção tenha apresentado pouca variação neste tipo de amostra, foi observado diferença significativa entre os diferentes estágios de desenvolvimento e a carga parasitária média, tendo os machos maior carga em relação a ninfas e larvas (P<0,05) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise descritiva da carga de parasitos e o percentual de positividade obtidos a partir da detecção molecular de *Theileria equi* por qPCR, em amostras de “pools” de carrapatos inteiros da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de acordo com o estágio/gênero do artrópode.

Estágio	N	$\bar{x}$	%	Md	DP	EP	Mín	Máx
Larva	8	10 <sup>4.817</sup> c	88,8 <sup>A</sup> (8/9)	10 <sup>2.775</sup>	10 <sup>5.263</sup>	10 <sup>4.812</sup>	10 <sup>1.467</sup>	10 <sup>5.715</sup>
Ninfa	18	10 <sup>5.077</sup> bc	94,7 <sup>A</sup> (18/19)	10 <sup>3.733</sup>	10 <sup>5.319</sup>	10 <sup>4.692</sup>	10 <sup>1.070</sup>	10 <sup>5.800</sup>
Macho	24	10 <sup>6.228</sup> a	92,3 <sup>A</sup> (24/26)	10 <sup>5.413</sup>	10 <sup>6.466</sup>	10 <sup>5.776</sup>	10 <sup>1.713</sup>	10 <sup>7.118</sup>
Fêmea	39	10 <sup>5.903</sup> ab	95,1 <sup>A</sup> (39/41)	10 <sup>4.585</sup>	10 <sup>6.260</sup>	10 <sup>5.464</sup>	10 <sup>1.128</sup>	10 <sup>6.845</sup>

DPI: dias pós-infestação; N: número de observações;  $\bar{x}$ : média aritmética; Md: mediana; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín: mínimo; Máx: máximo. <sup>a</sup>Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste Kruskal-Wallis a 5% de significância (p<0,05). <sup>A</sup>Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.

Dentre as amostras de carrapatos inteiros (n = 94), 15 amostras foram carrapatos recém emergidos (RE), ou seja, realizaram ecdise em B.O.D. Dentre as ninfas (n = 19), quatro foram ninfas RE e destas, uma amostra foi considerada negativa para *T. equi*. Embora tenha sido obtido um baixo número amostral, observou-se que a taxa de infecção transestadial de larva para ninfas foi de 75% (n = 3/4). Da mesma forma, em relação aos machos (n = 26), quatro foram machos RE, sendo uma amostra negativa pela qPCR. Dentre as 41 amostras de fêmeas, sete foram amostras RE, sendo uma considerada negativa para *T. equi*. Portanto, a taxa de infecção transestadial de *T. equi* de ninfas para fêmeas foi de 85,71% (n = 6/7). Dentro desta observação, é possível destacar que a amostra considerada negativa dentre as ninfas e fêmeas foi uma amostra RE, ou seja, carrapatos que não haviam realizado o repasto sanguíneo. Nos machos, uma das amostras negativas dentre as duas, foi proveniente de ixodídeos RE.

Foi observado diferença significativa entre os valores médios da carga de parasitos dos carrapatos inteiros em função dos cinco períodos do ciclo de vida parasitário do carrapato

avaliados, na presente pesquisa ( $P < 0,05$ ). Desta forma, é possível demonstrar que independente do estágio de desenvolvimento do carrapato, a carga média de parasitos destes exemplares tende a aumentar com o avanço do ciclo do carrapato sobre o equino (Tabela 2). Contudo, este resultado não foi observado ao se avaliar a carga média de parasitos obtidos da análise do sangue do equino nos diferentes períodos da fase experimental ( $P > 0,05$ ), evidenciando uma estabilidade na infecção do equino durante todo o período de infestação. O valor médio da carga de parasitos/  $\mu$ l de sangue do equino infectado se manteve estável durante todo o período de avaliação do ciclo de vida parasitário do carrapato sobre o equino. No primeiro período, entre 5 e 9 DPI, a média da carga foi de  $10^{4.693}$ , seguido da avaliação nos dias 11 a 15 DPI, cuja média de carga foi de  $10^{4.908}$ . Entre os dias 17 a 21 DPI a média foi de  $10^{4.683}$ . No quarto período, entre os dias 23 a 27 DPI, a média foi de  $10^{4.577}$  e no último período experimental, a média foi de  $10^{4.655}$ . Desta forma, foi observada uma ligeira flutuação da carga parasitária de *T. equi* no sangue do equino cronicamente infectado apesar da infestação por *R. (B.) microplus*.

**Tabela 2.** Carga de parasitos obtidos a partir da detecção molecular por qPCR de *Theileria equi*, em amostras de “pools” de carrapatos inteiros da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* independente do gênero e do estágio de desenvolvimento do artrópode.

DPI	N	$\bar{x}$	Md	DP	EP	Mín	Máx
5 a 9	10	$10^{2.699}$ <sub>c</sub>	$10^{2.412}$	$10^{2.825}$	$10^{2.326}$	$10^{1.068}$	$10^{3.309}$
11 a 15	12	$10^{4.750}$ <sub>bc</sub>	$10^{3.284}$	$10^{5.173}$	$10^{4.634}$	$10^{1.658}$	$10^{5.715}$
17 a 21	21	$10^{5.651}$ <sub>ab</sub>	$10^{4.640}$	$10^{6.041}$	$10^{5.382}$	$10^{1.713}$	$10^{6.636}$
23 a 27	33	$10^{6.204}$ <sub>a</sub>	$10^{5.603}$	$10^{6.454}$	$10^{5.695}$	$10^{1.127}$	$10^{7.117}$
29 a 33	13	$10^{5.953}$ <sub>ab</sub>	$10^{4.686}$	$10^{6.220}$	$10^{5.664}$	$10^{3.418}$	$10^{6.742}$

DPI: dias pós-infestação; N: número de observações;  $\bar{x}$ : média aritmética; Md: mediana; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín: mínimo; Máx: máximo. \*Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste Kruskal-Wallis a 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

A carga média de *T. equi* nos carrapatos inteiros aumentou em função do estágio de desenvolvimento e de acordo com o período do ciclo do carrapato sobre o equino. Esse aumento é significativo ( $P < 0,05$ ) quando analisamos o estágio de ninfa, separadamente em relação aos períodos avaliados durante a fase parasitária do carrapato sobre o equino. Foi possível observar que houve um aumento da carga média de parasitos entre o primeiro (5 a 9 DPI) e o terceiro (17 a 21 DPI) período experimental nas amostras de ninfa ( $C_1 = 10^{2.555}$ ;  $C_3 = 10^{5.400}$ ). Contudo, este achado não foi observado quando analisados os espécimes na fase adulta. Não foi observada diferença significativa entre a carga média de parasitos dos machos e das fêmeas, nos três períodos experimentais analisados (Tabela 3). Em relação as amostras de larvas, não foi possível avaliar a carga parasitária média em relação aos períodos observados devido ao n amostral reduzido (11 a 15 DPI: n=2).

**Tabela 3.** Carga média de parasitos obtidos a partir da detecção molecular por qPCR de *Theileria equi*, em amostras de “pools” de carrapatos inteiros ninfas, machos e fêmeas da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante o período de infestação experimental.

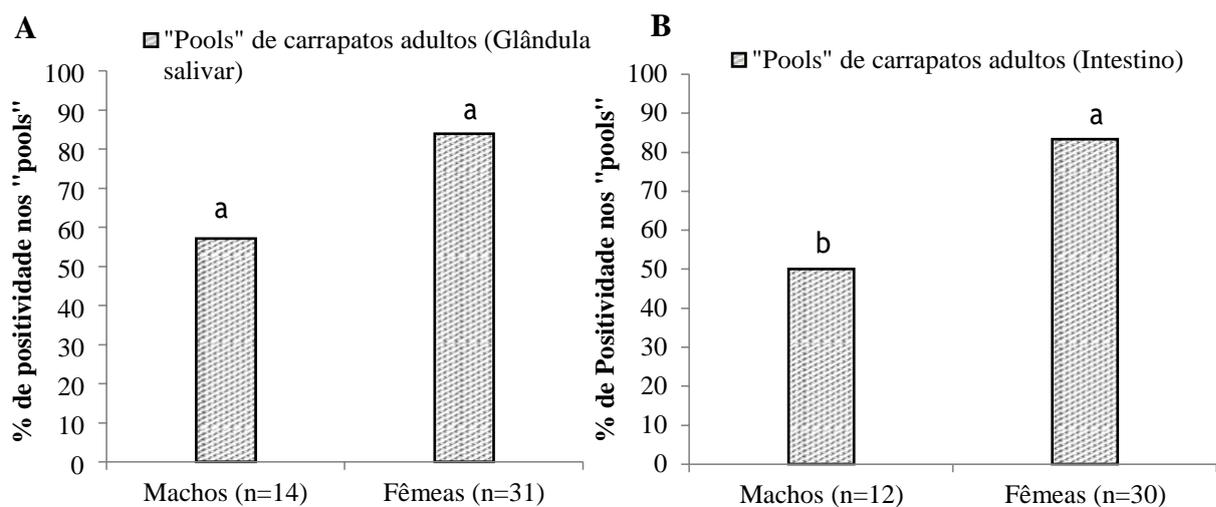
DPI	N	$\bar{x}$	Md	DP	EP	Mín	Máx
<b>Ninfas</b>							
5 a 9 DPI	4	10 <sup>2.555</sup> <sub>a</sub>	10 <sup>2.032</sup>	10 <sup>2.758</sup>	10 <sup>2.457</sup>	10 <sup>1.068</sup>	10 <sup>3.083</sup>
11 a 15 DPI	8	10 <sup>4.235</sup> <sub>ab</sub>	10 <sup>3.184</sup>	10 <sup>4.590</sup>	10 <sup>4.139</sup>	10 <sup>1.658</sup>	10 <sup>5.053</sup>
17 a 21 DPI	4	10 <sup>5.400</sup> <sub>b</sub>	10 <sup>5.201</sup>	10 <sup>5.416</sup>	10 <sup>5.115</sup>	10 <sup>4.746</sup>	10 <sup>5.800</sup>
23 a 27 DPI	2	--	--	--	--	--	--
<b>Machos</b>							
17 a 21 DPI	6	10 <sup>6.094</sup> <sub>a</sub>	10 <sup>4.746</sup>	10 <sup>6.285</sup>	10 <sup>5.896</sup>	10 <sup>1.713</sup>	10 <sup>6.636</sup>
23 a 27 DPI	11	10 <sup>6.307</sup> <sub>a</sub>	10 <sup>5.634</sup>	10 <sup>6.586</sup>	10 <sup>6.065</sup>	10 <sup>2.260</sup>	10 <sup>7.117</sup>
29 a 33 DPI	7	10 <sup>6.188</sup> <sub>a</sub>	10 <sup>5.472</sup>	10 <sup>6.323</sup>	10 <sup>5.900</sup>	10 <sup>3.418</sup>	10 <sup>6.742</sup>
<b>Fêmeas</b>							
11 a 15 DPI	2	--	--	--	--	--	--
17 a 21 DPI	11	10 <sup>4.937</sup> <sub>a</sub>	10 <sup>4.526</sup>	10 <sup>5.220</sup>	10 <sup>4.699</sup>	10 <sup>2.215</sup>	10 <sup>5.758</sup>
23 a 27 DPI	20	10 <sup>6.167</sup> <sub>a</sub>	10 <sup>5.498</sup>	10 <sup>6.374</sup>	10 <sup>5.724</sup>	10 <sup>1.127</sup>	10 <sup>6.844</sup>
29 a 33 DPI	6	10 <sup>5.155</sup> <sub>a</sub>	10 <sup>4.512</sup>	10 <sup>5.433</sup>	10 <sup>5.044</sup>	10 <sup>4.187</sup>	10 <sup>5.842</sup>

DPI: dias pós-infestação; N: número de observações;  $\bar{x}$ : média aritmética; Md: mediana. DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín: mínimo; Máx: máximo. <sup>a</sup>Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste Kruskal-Wallis a 5% de significância (p<0,05).

#### 44 Detecção de *Theileria equi* na glândula salivar e no intestino de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* adultos

Amostras de “pools” de glândula salivar de *R. (B.) microplus* adultos totalizaram 45, sendo 14 amostras de glândula salivar de machos e 31 amostras de fêmeas. Dentre as amostras de machos, 64,29% (n=9/14) foram consideradas positivas pela qPCR. Já nas amostras de fêmeas, 83,87% (n=26/31) foram positivas para *T. equi*. Embora com valores bem distintos, não foi possível diferença estatística significativa entre a frequência de positividade das amostras de machos e fêmeas analisadas (Figura 14-A).

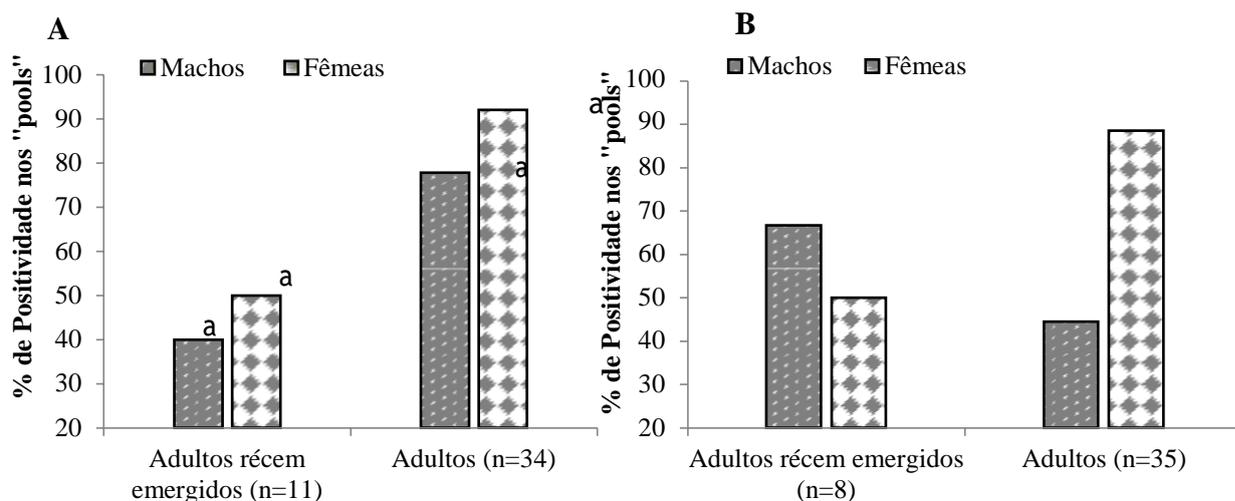
Ao total, foram analisadas 42 amostras de “pools” de intestino de *R. (B.) microplus* adultos, sendo 12 amostras de intestino de machos e 30 amostras de fêmeas. Dentre as amostras de machos, 50% (n = 6/12) foram consideradas positivas pela qPCR. Já nas amostras de fêmeas, 83,30% (n = 25/30) foram positivas para *T. equi*. Houve diferença estatística significativa entre a frequência de positividade das amostras de intestinos de machos e fêmeas amostradas (Figura 14-B). O número total de amostras de intestino destes carrapatos foi menor que o número de amostras de glândula salivar, devido a fragilidade deste tecido e a dificuldade na remoção e separação deste órgão durante a dissecação do artrópode.



**Figura 14.** Frequência de positividade de amostras de glândula salivar (A) e intestino (B) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* adultos para *Theileria equi* através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao gênero do carrapato. O teste exato de Fisher foi utilizado na comparação destas frequências de positividade.

As amostras de glândula salivar de machos e fêmeas foram divididas em dois grupos: adultos (machos e fêmeas) (n=34) e adultos recém emergidos (RE) (machos RE e fêmeas RE em B.O.D.) (n=11). Dentre os machos (n=14), cinco amostras foram glândula salivar de machos RE, sendo 40% (n=2/5) consideradas positivas para *T. equi*. Já no grupo de amostras de fêmeas (n=31), seis foram amostras de glândula salivar de fêmeas RE, sendo 50% (n=3/6) consideradas positivas pela qPCR. Dentre os adultos coletados sobre o equino (n=34), nove amostras foram glândula salivar de machos e 25 foram glândulas salivares de fêmeas. As amostras de glândula salivar de carrapatos machos e fêmeas foram considerados positivos para *T. equi* com frequência de 77,8% (n=7/9) e 92% (n=23/25), respectivamente (Figura 15-A).

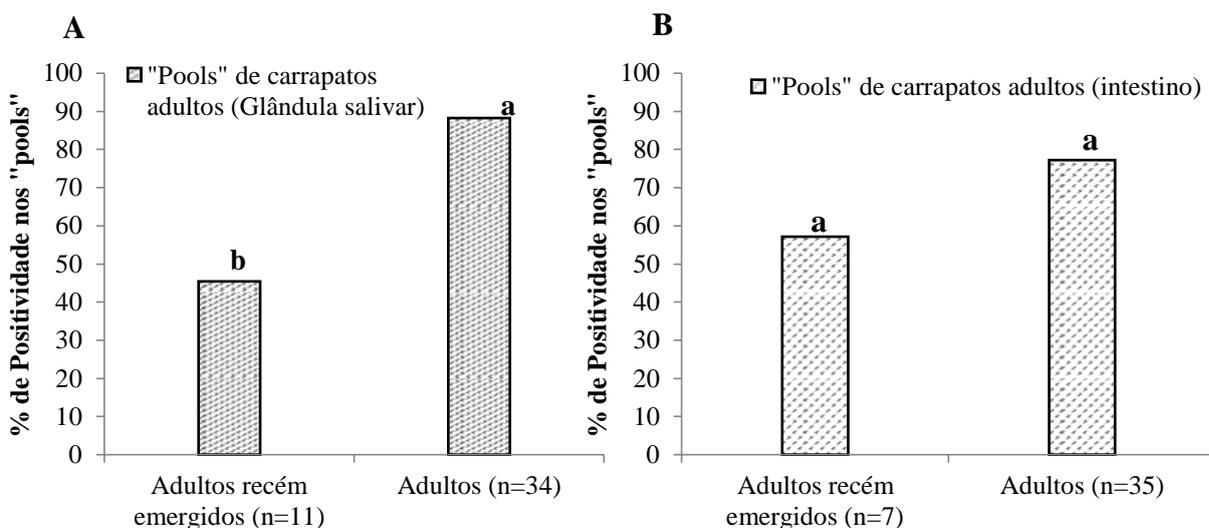
As amostras de "pools" de intestino dos ixodídeos adultos foram divididas em adultos (machos e fêmeas) (n = 35) e adultos recém emergidos (RE) (machos RE e fêmeas RE em B.O.D.) (n = 7). Dentre os machos (n = 12), três amostras foram intestino de machos RE, sendo 66,7% destas (n = 2/3) consideradas positivas para *T. equi*. Já no grupo de amostras de fêmeas (n = 30), quatro foram amostras de intestino de fêmeas RE, sendo 50% (n = 2/4) consideradas positivas pela qPCR. Dentre as amostras de intestino de adultos coletados sobre o equino (n = 35), nove amostras foram intestino de machos e 26 de intestino de fêmeas. Foram considerados positivos para *T. equi* 55,6% (n = 5/9) dos machos e 88,5% (n = 23/26) das fêmeas (Figura 15-B).



**Figura 15.** Frequência de positividade de amostras de glândula salivar (A) e intestino (B) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* adultos para *Theileria equi* através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao gênero e fase de desenvolvimento do carrapato. O teste exato de Fisher foi utilizado na comparação destas frequências de positividade.

Quando o desenvolvimento dos carrapatos adultos foi analisado em separado, houve diferença estatística entre a frequência de positividade das glândulas salivares de carrapatos adultos (n = 34) e carrapatos adultos RE (n = 11). Com relação aos adultos RE, 45,5% (n = 5/11) das amostras de glândula salivares foram positivas para *T. equi*. Já entre as amostras de glândula de adultos, 88,2% (n = 30/34) foram positivas na qPCR (Figura 16-A).

A frequência de positividade das amostras de intestino de carrapatos adultos (n = 35) foi maior do que de carrapatos adultos RE (n = 7), porém sem significância (p > 0,05). Com relação aos adultos RE, 57,14% (n = 4/7) das amostras de intestino foram positivas para *T. equi*. Já entre amostras de intestino de adultos, 77,14% (n = 27/35) foram amostras positivas (Figura 16-B).

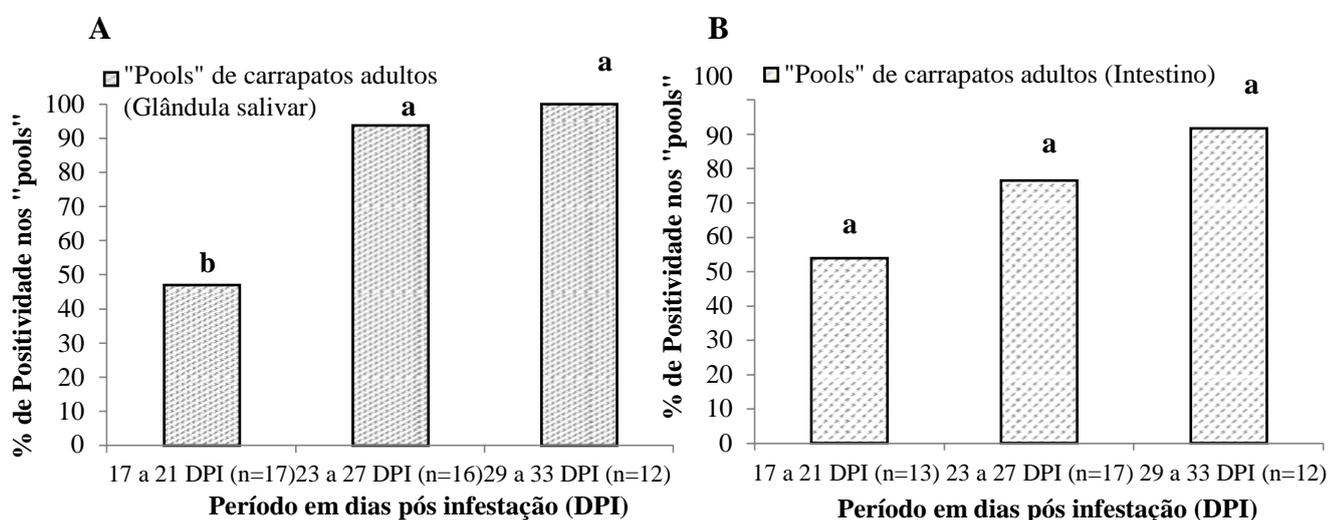


**Figura 16.** Frequência de positividade de amostras de glândula salivar (A) e intestino (B) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* do grupo adultos recém emergidos em B.O.D. e adultos para *Theileria equi* através da técnica de PCR em tempo real, em relação à fase de

desenvolvimento do carrapato adulto. O teste exato de Fisher foi utilizado na comparação destas frequências de positividade.

Na análise da frequência de positividade das amostras de “pool” de glândulas salivares de carrapatos adultos foi observada diferença significativa em relação ao período experimental estabelecido (17 a 21 DPI, 23 a 27 DPI e 29 a 33 DPI). Entre os dias 17 a 21 DPI, 47,03% (n = 8/17) das amostras de glândula salivares de adultos foram consideradas positivas para *T. equi*, diferindo da positividade do segundo período (93,95%; n = 15/16) e do terceiro período experimental (100%; n = 12/12) (Figura 17-A).

Em relação ao período experimental e as amostras de intestino de carrapatos adultos, não foi possível observar diferença estatística significativa entre a frequência de positividade e os períodos. Entre os dias 17 a 21 DPI, 53,85% (n = 7/13) das amostras de intestino de adultos foram consideradas positivas para *T. equi*. No segundo período, a positividade foi de 76,47% (n = 13/17) e no terceiro foi de 91,67% (n = 11/12) (Figura 17-B).



**Figura 17.** Frequência de positividade de amostras de glândula salivar (A) e intestino (B) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* adultos para *Theileria equi* através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao período ao período pós-infestação em dias. O teste exato de Fisher foi utilizado na comparação destas frequências de positividade.

Com relação aos valores da carga média de *T. equi* das amostras de glândulas salivares de carrapatos adultos positivos nos três períodos experimentais testados (17 a 21 DPI, 23 a 27 DPI, 29 a 33 DPI), não houve diferença estatística. No primeiro período do experimental, o valor da carga média de parasitos foi de  $10^{3,666}$  (n = 8). No segundo e terceiro período, o valor da carga média de parasitos foi  $10^{5,832}$  (n = 15) e  $10^{4,694}$  (n = 12), respectivamente (Tabela 4). Não houve variação significativa entre a carga média de parasitos nas amostras de intestino em função do período experimental, sendo a carga parasitária média nas amostras coletadas no primeiro período de  $10^{4,593}$  (n=7), do segundo de  $10^{4,205}$  (n=13) e do terceiro de  $10^{5,142}$  (n=11) (Tabela 5).

**Tabela 4.** Análise descritiva dos valores da carga média de parasitos obtidos a partir do resultado da qPCR para o diagnóstico de *Theileria equi*, em amostras de “pools” de glândula salivar de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante os três períodos da infestação experimental.

PPI	N	$\bar{x}$	Md	DP	EP	Mín	Máx
17 a 21 DPI	8	$10^{3.666}$ <sub>a</sub>	$10^{2.928}$	$10^{4.034}$	$10^{3.582}$	$10^{1.223}$	$10^{4.495}$
23 a 27 DPI	15	$10^{5.832}$ <sub>a</sub>	$10^{4.657}$	$10^{6.254}$	$10^{5.666}$	$10^{0.995}$	$10^{6.846}$
29 a 33 DPI	12	$10^{4.694}$ <sub>a</sub>	$10^{4.515}$	$10^{4.736}$	$10^{4.196}$	$10^{2.833}$	$10^{5.239}$

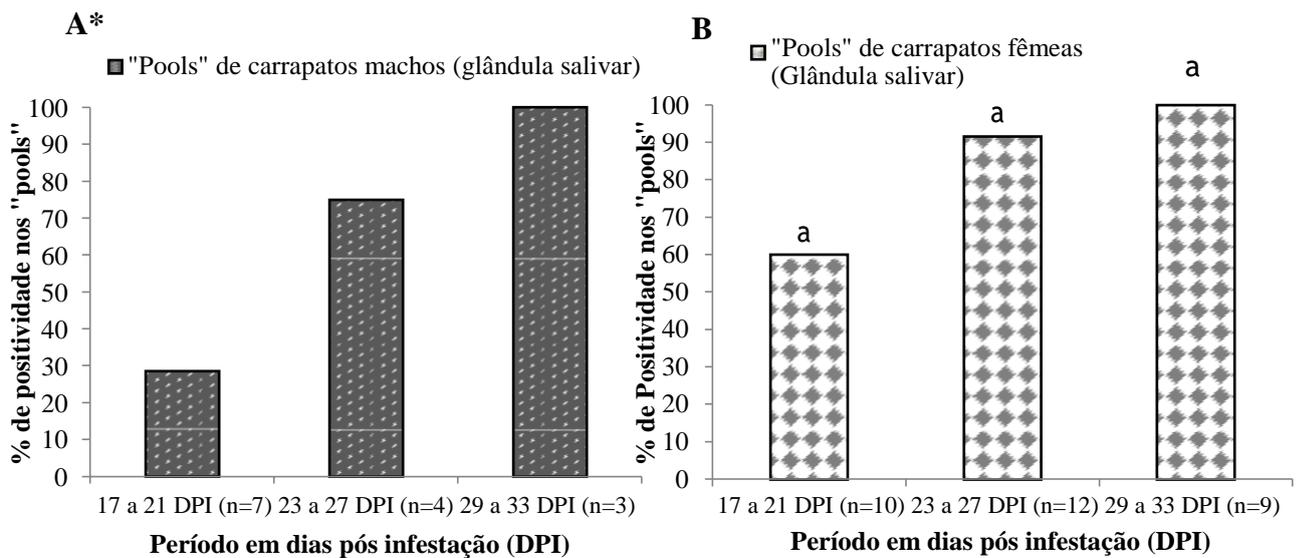
PPI: período pós-infestação; N: número de observações;  $\bar{x}$ : média aritmética; Md: mediana. DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín: mínimo; Máx: máximo. <sup>a</sup>Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste Kruscall-Wallis a 5% de significância (p<0,05).

**Tabela 5.** Análise descritiva dos valores da carga média de parasitos obtidos a partir da detecção molecular por qPCR de *Theileria equi*, em amostras de “pools” de intestino de carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante o período de infestação experimental.

PPI	N	$\bar{x}$	Md	DP	EP	Min	Max
17 a 21 DPI	7	$10^{4.593}$ <sub>a</sub>	$10^{2.412}$	$10^{4.911}$	$10^{4.489}$	$10^{1.270}$	$10^{5.338}$
23 a 27 DPI	13	$10^{4.205}$ <sub>a</sub>	$10^{3.468}$	$10^{4.366}$	$10^{3.809}$	$10^{0.816}$	$10^{4.814}$
29 a 33 DPI	11	$10^{5.142}$ <sub>a</sub>	$10^{2.526}$	$10^{5.620}$	$10^{5.099}$	$10^{0.916}$	$10^{6.143}$

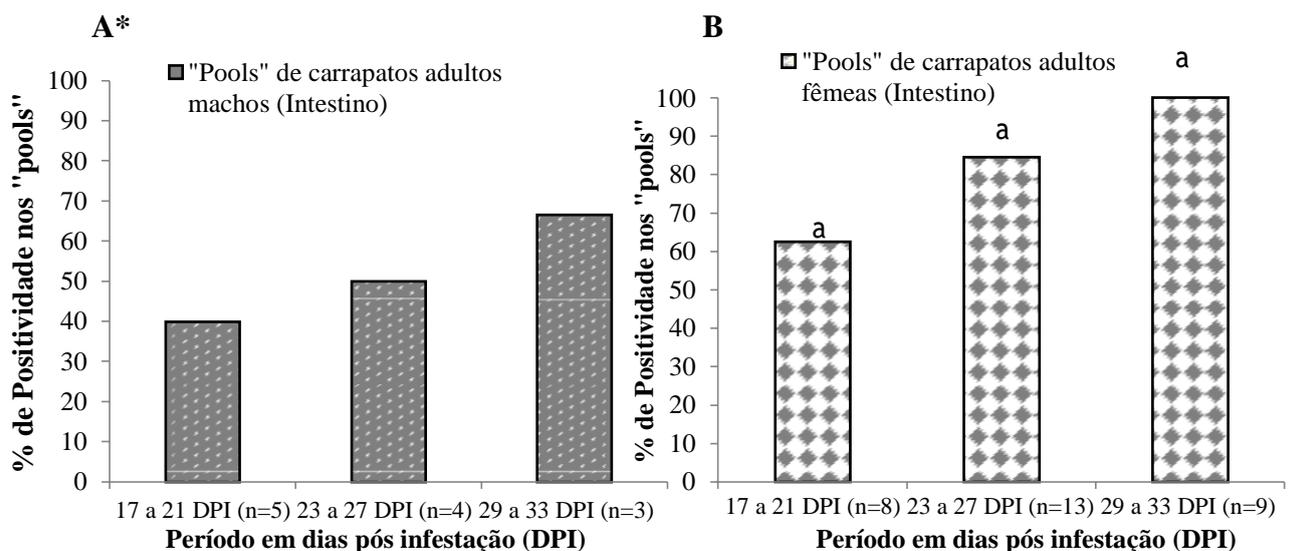
PPI: período pós-infestação; N: número de observações;  $\bar{x}$ : média aritmética; Md: mediana. DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín: mínimo; Máx: máximo. <sup>a</sup>Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste Kruscall-Wallis a 5% de significância (p<0,05).

Analisando as amostras de glândula salivar de machos e fêmeas separadamente em relação aos três períodos experimentais, pode-se observar que o percentual de machos positivos no primeiro período (28,57%, n = 2/7), no segundo (75%, n = 3/4) e no terceiro período do experimental (100%, n = 3/3) aumentou em relação ao tempo (Figura 18A). No entanto, não foi possível analisar estatisticamente devido ao “n” baixo de observações. Já com as amostras de fêmeas, não houve diferença significativa entre a frequência de positividade no primeiro período (60%, n = 6/10) em relação ao segundo (91,67%, n = 11/12) e terceiro período da fase parasitária do ciclo do carrapato sobre o equino (100%, n = 9/9) (Figura 18B).



**Figura 18.** Frequência de positividade de amostras de glândula salivar de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* adultos machos (A) e fêmeas (B) para *Theileria equi* através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao período pós-infestação em dias. \*quando o n amostral  $\leq 5$ , o teste estatístico exato de Fisher não foi realizado.

Através de análise exploratória dos dados por gráficos, as amostras de intestino de machos demonstraram aumento no percentual de positividade com o passar do período de infestação. No primeiro período observou-se 40% de amostras positivas ( $n = 2/5$ ), no segundo 50% ( $n = 2/4$ ) e no terceiro período do experimental 66,67% ( $n = 2/3$ ). Da mesma forma, nas amostras de intestino de fêmeas foi possível observar aumento na frequência de positividade com o passar do período da fase de vida parasitária do carrapato. No primeiro período, a positividade foi de 62,50% ( $n = 5/8$ ), no segundo 84,62% ( $n = 11/13$ ) e 100% ( $n = 9/9$ ) no terceiro período (Figura 19B). Os dados de machos tiveram o número de observações  $\leq 5$  e portanto, o teste exato de Fisher não foi realizado (Figura 19A).



**Figura 19.** Frequência de positividade de amostras de intestino de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* adultos machos (A) e fêmeas (B) para *Theileria equi* através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao período pós-infestação em dias. \*quando o n amostral  $\leq 5$ , o teste estatístico exato de Fisher não foi realizado.

Isolando a variável gênero do carrapato, não houve diferença estatística significativa entre a média dos valores de carga parasitária de *T. equi* em amostras de glândula salivar de carrapatos adultos machos ( $10^{5.904}$ ) e fêmeas ( $10^{5.142}$ ) ( $P > 0,05$ ) (Tabela 6). Os valores médios de carga parasitária em amostras de glândula salivar de machos RE (n=2) e machos (n=7), bem como entre fêmeas RE (n=3) e fêmeas (n=23) não foram testados por insuficiência no número de observações. Já a carga parasitária média das amostras de intestino, o maior valor foi observado nos machos (Machos= $10^{5.462}$ ; Fêmea= $10^{4.029}$ ;  $P < 0,05$ ), fato este que deve ser analisado com cautela, devido ao reduzido número amostral de um dos gêneros (Machos; n=6) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise descritiva dos valores de carga parasitária obtidos a partir da detecção molecular por qPCR de *Theileria equi*, em amostras de “pools” de glândula salivar e intestino de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em função do gênero do carrapato adulto durante o período experimental.

G/D	N	Md	DP	EP	Min	Max
<b>Glândula Salivar</b>						
Macho (total)	9	$10^{5.904}_a$	$10^{4.496}$	$10^{6.367}$	$10^{5.890}$	$10^{6.846}$
Fêmea (total)	26	$10^{5.142}_a$	$10^{4.004}$	$10^{5.495}$	$10^{4.787}$	$10^{6.063}$
<b>Intestino</b>						
Macho (total)	6	$10^{5.462}_a$	$10^{4.816}$	$10^{5.737}$	$10^{5.348}$	$10^{6.146}$
Fêmea (total)	25	$10^{4.029}_b$	$10^{2.540}$	$10^{4.310}$	$10^{3.611}$	$10^{4.814}$

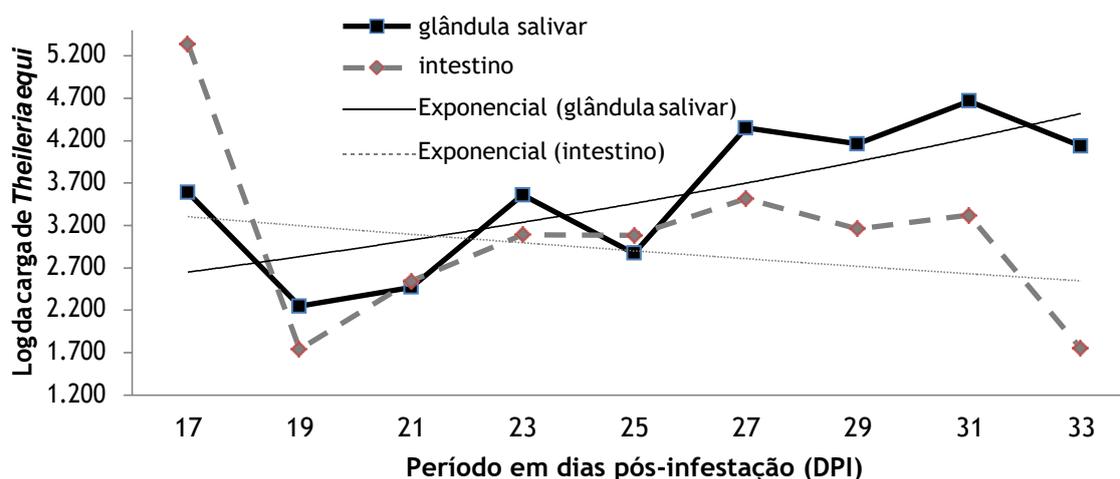
G/D: gênero/desenvolvimento; N: número de observações;  $\bar{}$ : média aritmética; Md: mediana. DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín: mínimo; Máx: máximo. <sup>a</sup>Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste Mann-Whitney a 5% de significância ( $p < 0,05$ ). O teste não foi realizado entre os grupos de Macho RE e Macho e entre, Fêmea RE e Fêmea, pois o número amostral foi  $\leq 5$ .

No período de 17 a 21 DPI, somente duas amostras de glândula salivar de machos foram consideradas positivas para *T. equi*, não havendo possibilidade de realizar análises com os dados de glândula salivar de machos em função dos períodos de infestação. No caso de amostras de glândula salivar de fêmeas, no primeiro período, 17 a 21 DPI, a média da carga de parasitos foi de  $10^{2.879}$ . No segundo período, entre 23 a 27 DPI, a média da carga de parasitos foi de  $10^{5.455}$  e no terceiro e último período, entre 29 a 33 DPI, foi de  $10^{4.716}$  (Tabela 7). Não houve diferença estatística significativa entre a carga de parasitos nas amostras de glândula salivar de fêmeas de acordo com os períodos experimentais delimitados. No entanto, de acordo com os dados demonstrados é possível perceber que a carga parasitária nos carrapatos aumenta com a evolução do ciclo do carrapato sobre o equino.

**Tabela 7.** Análise descritiva dos valores de carga parasitária obtidos a partir da detecção molecular por qPCR de *Theileria equi*, em amostras de “pools” de glândula salivar de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em função do período experimental.

G/D	N		Md	DP	EP	Mín	Máx
17 a 21 DPI	6	$10^{2.879}$ <sub>a</sub>	$10^{2.471}$	$10^{2.974}$	$10^{2.585}$	$10^{1.223}$	$10^{3.307}$
23 a 27 DPI	11	$10^{5.455}$ <sub>a</sub>	$10^{4.897}$	$10^{5.650}$	$10^{5.129}$	$10^{1.024}$	$10^{6.063}$
29 a 33 DPI	9	$10^{4.716}$ <sub>a</sub>	$10^{4.457}$	$10^{4.782}$	$10^{4.305}$	$10^{2.833}$	$10^{5.239}$

O valor médio da carga de parasitos de *T. equi* de todas as amostras de glândula salivar de carrapatos adultos teve uma tendência de aumento com o avançar dos dias pós-infestação (DPI), sendo o 31º DPI identificado como o dia onde foi observado maior carga média de parasitos ( $10^{4.667}$ ) e o 19º dia onde foi observado o menor valor médio de carga de parasitos ( $10^{2.248}$ ) (Figura 20). Com relação às amostras de intestino foi possível observar que o valor médio da carga parasitária teve uma tendência de declínio ao longo dos dias pós-infestação, sendo 19º e 33º DPI identificado com o de menor carga de parasitos ( $10^{1.738}$ ;  $10^{1.752}$ ) e o 17º DPI com o de maior carga de parasitos ( $10^{5.339}$ ) (Figura 20).



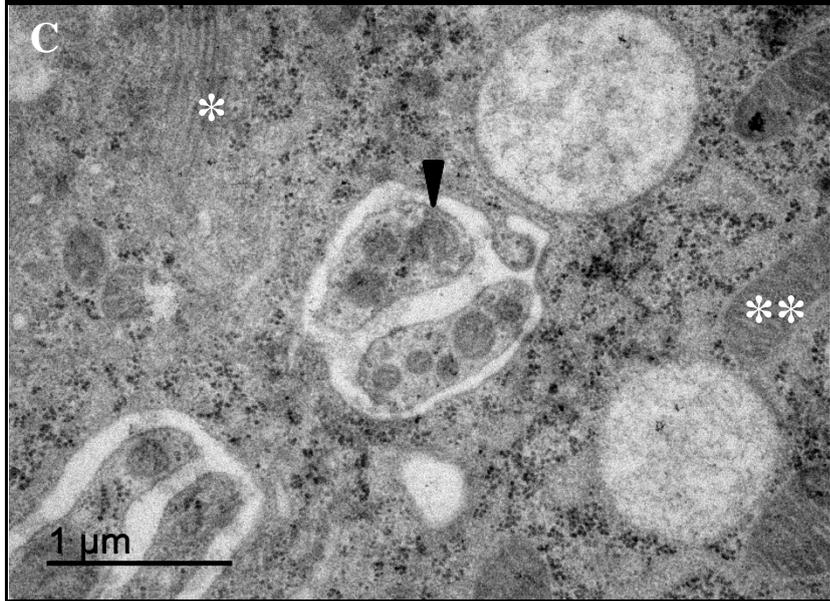
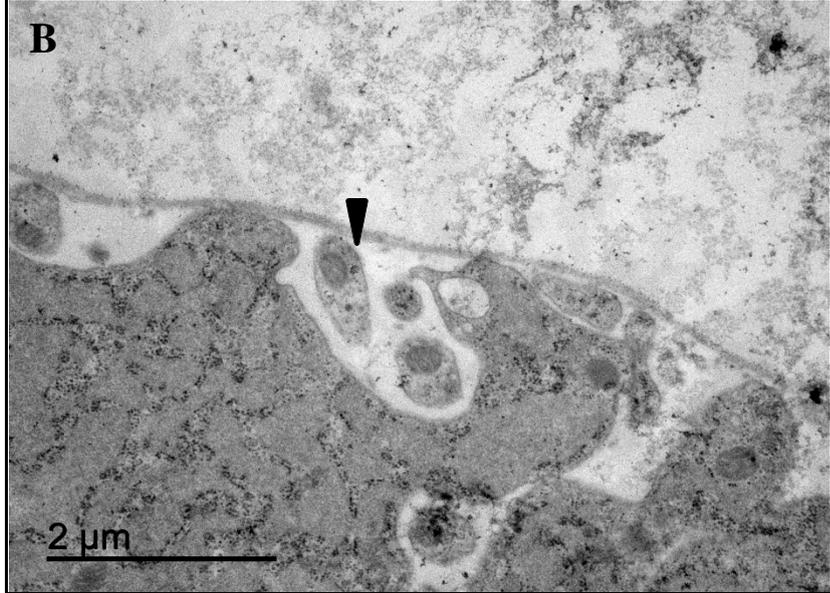
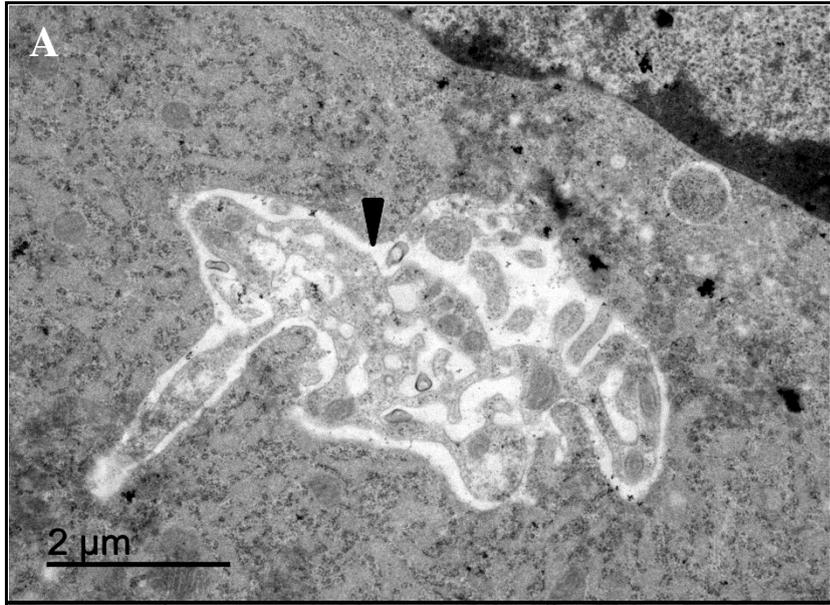
**Figura 20.** Valores de Log da carga de parasitos média de *Theileria equi* das amostras de “pool” de glândula salivar e intestino de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* adulto pela técnica de PCR em tempo real, no decorrer do período experimental em dias.

#### 45 Avaliação das glândulas salivares de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante infestação experimental através da Microscopia Eletrônica de Transmissão

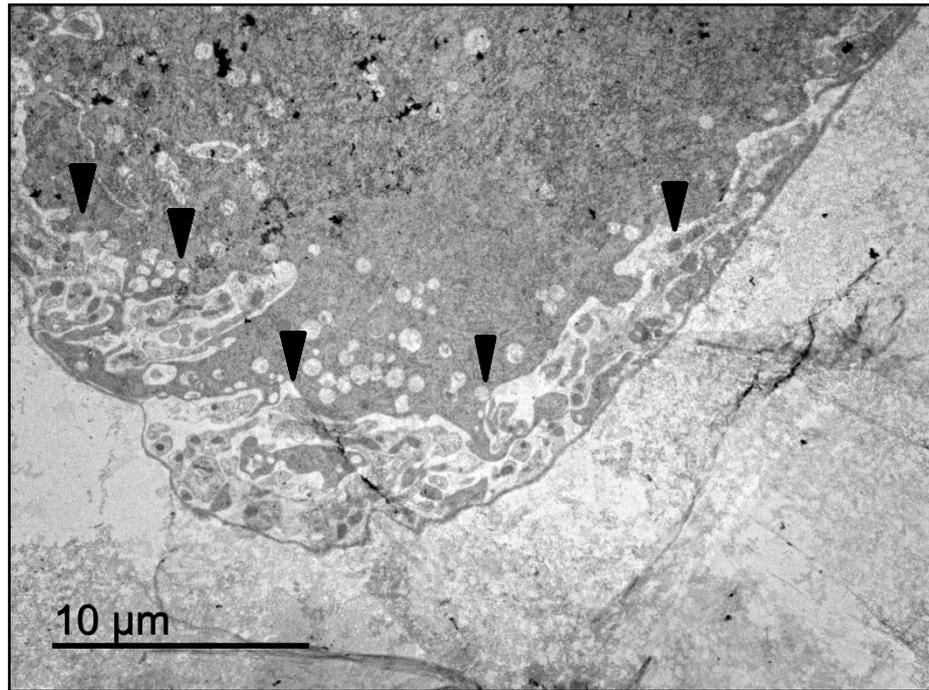
Formas evolutivas de *T. equi* foram observadas nas células das glândulas salivares de ninfas de *R. (B.) microplus* coletadas no 11º DPI. Este estágio evolutivo mais jovem do parasito possui muitas formas nucleares, irregulares e de tamanhos variados e a forma do parasito apresentou-se levemente alongada, arredondada ou em forma de vírgula (Figura 21). O nucleoplasma não exibe diferença entre áreas de cromatina dispersa e condensada. A textura dos núcleos é homogênea. No citoplasma são encontrados materiais granulares finos e grânulos maiores arredondados e moderadamente eletrondensos. Possivelmente este citoplasma possua quantidades moderadas de ribossomos livres, que são menores do que os ribossomos da célula hospedeira e menos contrastados por metais pesados.

Nesta amostra de ninfa do 11° DPI, podemos dizer que a forma de desenvolvimento do parasito é imatura já que as ninfas começaram a ser observadas sobre o equino no 7° DPI no estudo da dinâmica de infecção. Estas formas imaturas de *T. equi* localizaram-se principalmente próximo à periferia dos ácinos da glândula salivar de ninfas (Figura 21B e 22), isolados ou em grupos (Figura 21A) e no interior de vacúolos parasitóforos. Os vacúolos parasitóforos são formados por uma única membrana e contém material eletrólucido (Figura 21C), com um, dois ou vários patógenos dentro. Alguns vacúolos parasitóforos apresentam numerosos patógenos que parecem estar em divisão.

A morfometria destas formas jovens de *T. equi* na glândula salivar de ninfas no 11° DPI foi de aproximadamente 0,9 µm à 1,4 µm de comprimento e 0,4 µm à 0,5 µm de largura.



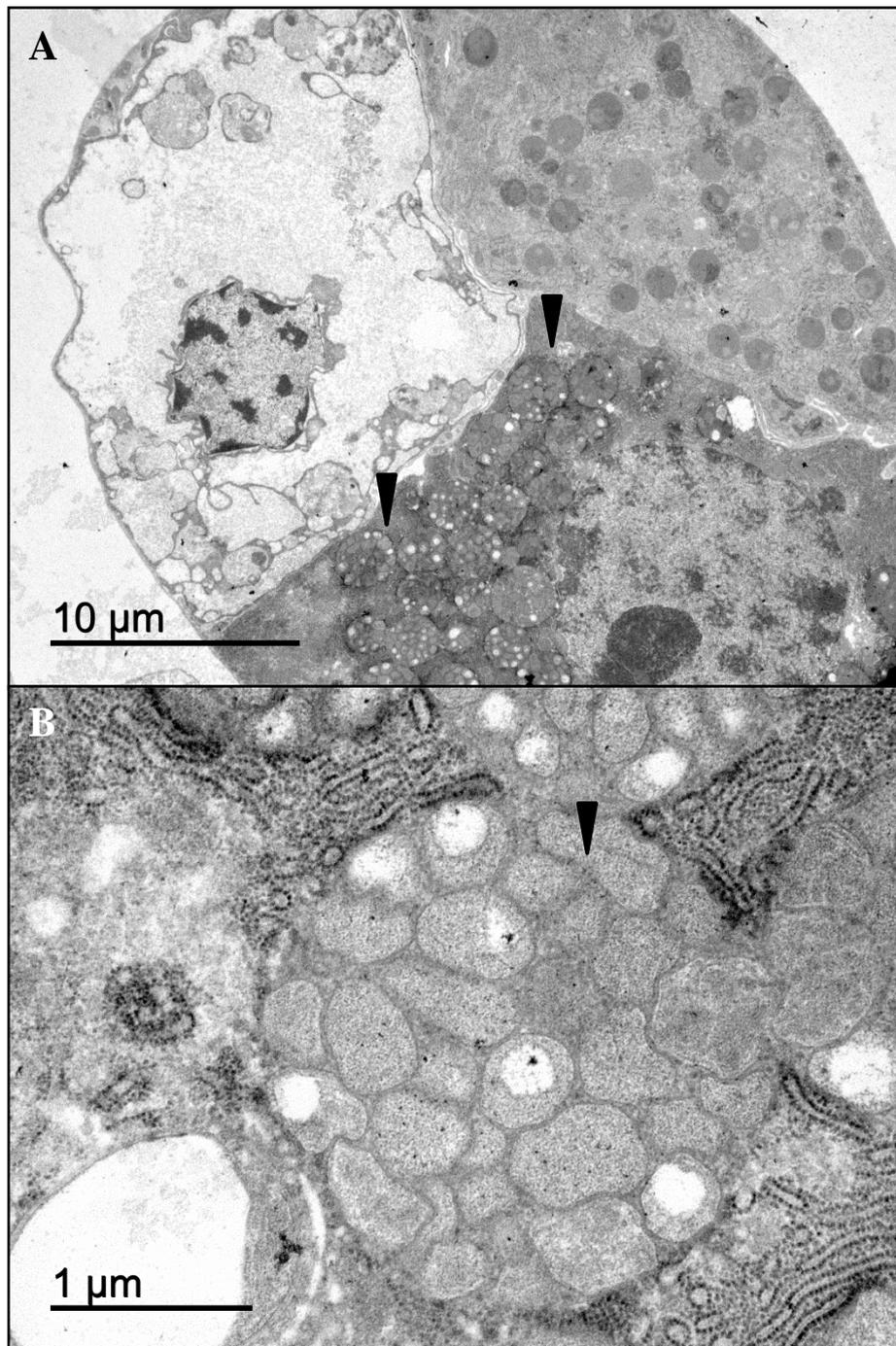
**Figura 21.** Micrografias eletrônicas das glândulas salivares de ninfas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no 11° dia pós-infestação, infectadas com *Theileria equi*. A: grupo de parasitos no interior de vacúolos parasitóforos em processo de divisão assexuada formando labirintos com o citoplasma na célula hospedeira. B: parasitos no interior de vacúolos parasitóforos na periferia das células acinares. C: corte transversal do parasito multinucleado. Esporoblastos de *T. equi* (cabeça de seta). Retículoendoplasmático (\*); mitocôndrias (\*\*).



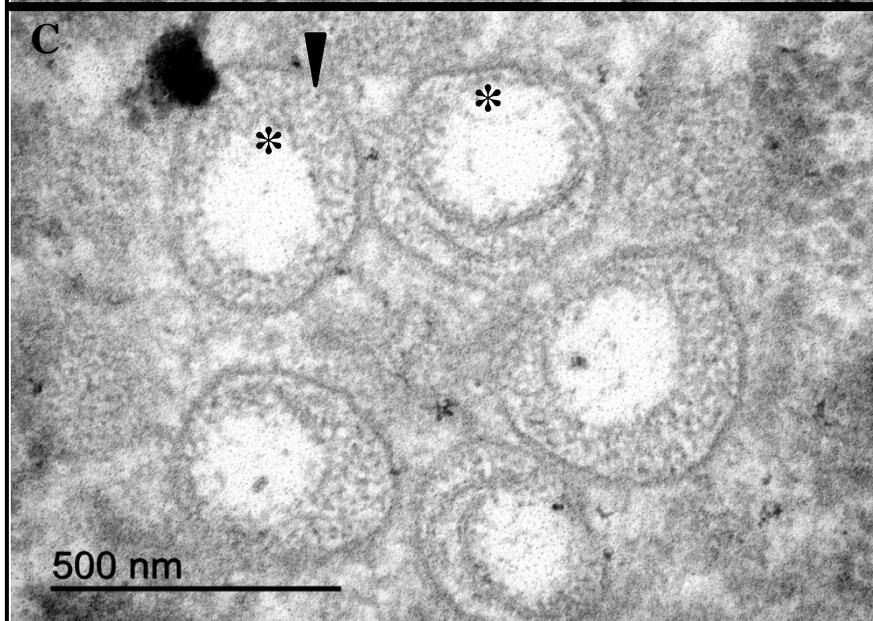
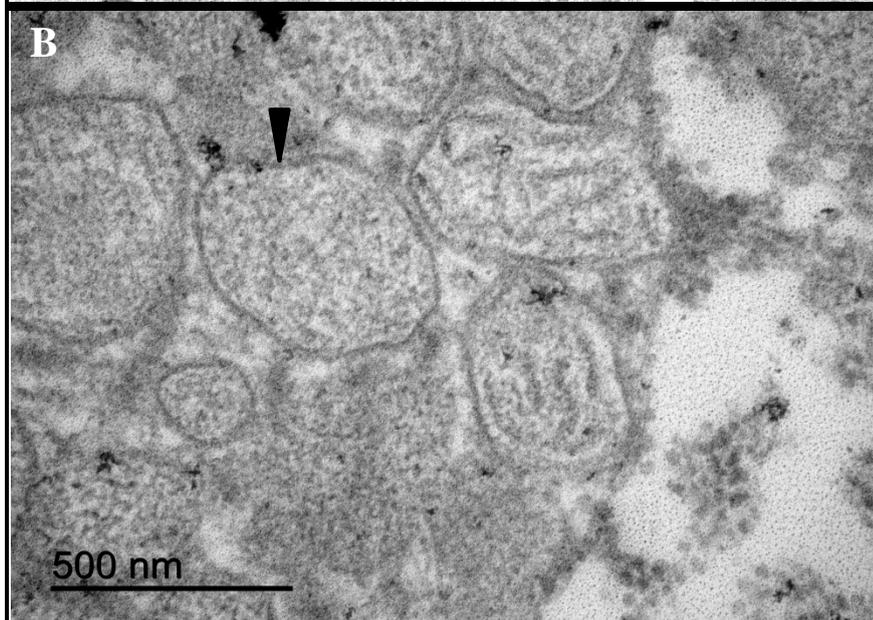
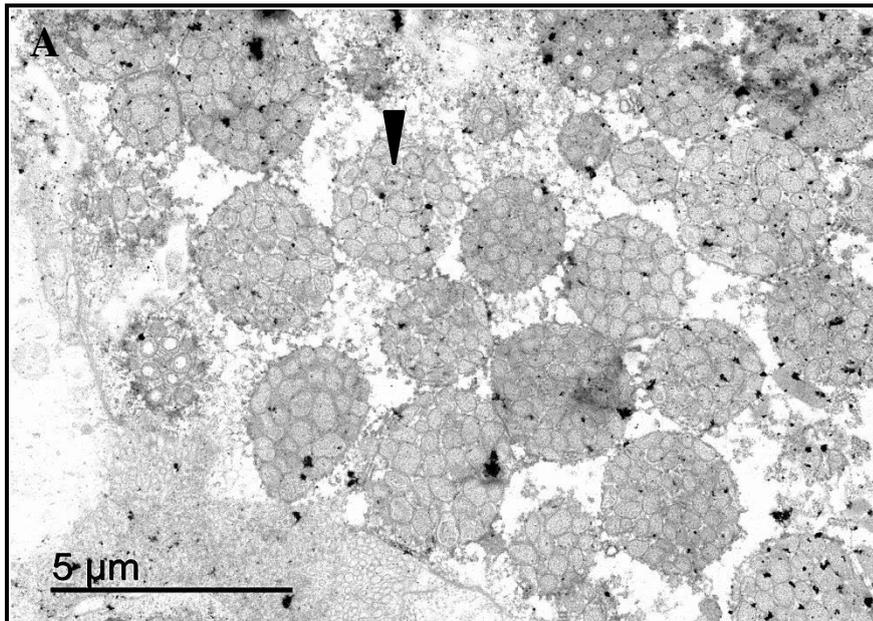
**Figura 22.** Micrografia eletrônica das glândulas salivares de ninfas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no 11° dia pós-infestação, infectadas com *Theileria equi*. Corte transversal dos parasitos na periferia do ácino da glândula salivar, evidenciando os labirintos formados pelo parasito em divisão na célula hospedeira (cabeça de seta).

Machos de *R. (B.) microplus* foram observados sobre o equino a partir do 17° DPI. Formas de multiplicação do parasito foram observadas nas glândulas salivares desses machos no dia 21° DPI (Figura 23). O patógeno se encontrava no interior de grânulos de secreção dos ácinos tipo III (Figura 23), e não no interior do vacúolo parasitóforo.

Da mesma forma que no 21° DPI, as amostras de glândulas salivares de machos do 25° DPI, apresentaram formas de multiplicação isoladas por uma membrana, aparentando ter ocorrido dentro de grânulos de secreção (Figura 24). Dentro de algumas vesículas de secreção haviam formas de multiplicação de *T. equi*, sendo possível observar que a existência de vacúolos delimitados por uma membrana (Figura 24C).



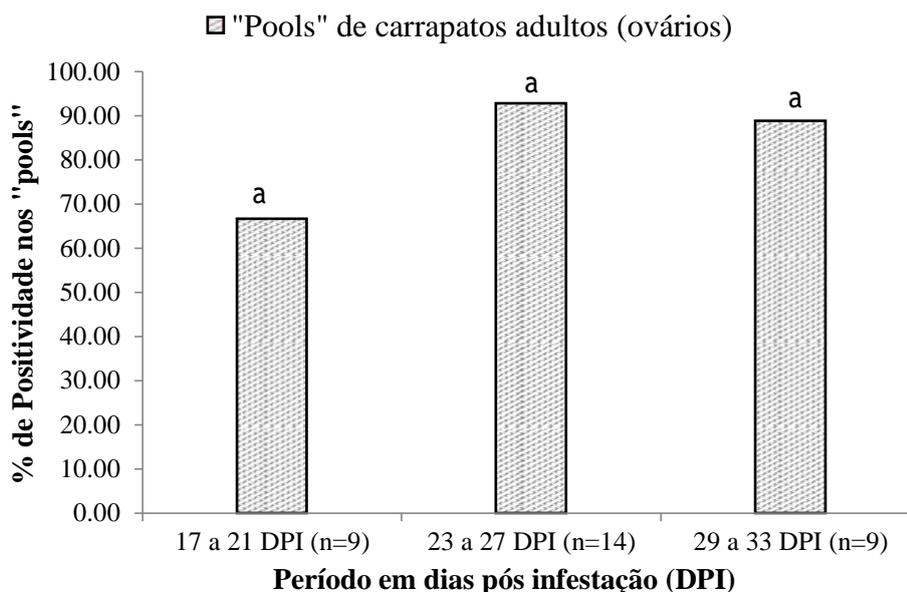
**Figura 23.** Micrografia eletrônica do ácino da glândula salivar de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* macho coletado no 21º dia pós-infestação contendo formas evolutivas de *Theileria equi* em multiplicação no interior de célula no ácino tipo III (cabeça de seta). A: grupo de parasitos no interior de vesículas de secreção. B: parasitos no interior de vesículas de secreção em maior aumento.



**Figura 24.** Micrografia eletrônica do ácino da glândula salivar de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* macho coletado no 25º dia pós-infestação contendo as formas evolutivas de *Theileria equi* em multiplicação no interior de vesículas de secreção (cabeça de seta). A: grupo de parasitos no interior de vesículas de secreção. B: parasitos no interior de vesículas de secreção em maior aumento. C: vacúolos envolvidos por membrana dentro de algumas formas de *T. equi* (\*).

#### 46 Avaliação dos ovários e ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentados em equino cronicamente infectado por *Theileria equi* através da PCR em tempo real

Amostras de “pools” de ovários de *R. (B.) microplus* totalizaram 32 amostras testadas para *T. equi* pela qPCR. Os ovários foram dissecados a partir do 17º DPI. Dentre as amostras testadas, 84,38% (n = 27/32) foram consideradas positivas para *T. equi*. Quando dividimos as datas das fêmeas coletadas em três períodos, sendo o primeiro de 17 a 21 DPI, o segundo de 23 a 27 DPI e o terceiro de 29 a 33 DPI, a positividade foi de 66,67% (n = 6/9), 92,86% (n = 13/14) e 88,89% (n = 8/9), respectivamente. Não houve diferença estatística entre a frequência de positividade de ovários nos período estabelecidos (Figura 25).



**Figura 25.** Frequência de positividade de amostras de ovário de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para *Theileria equi* através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao período experimental.

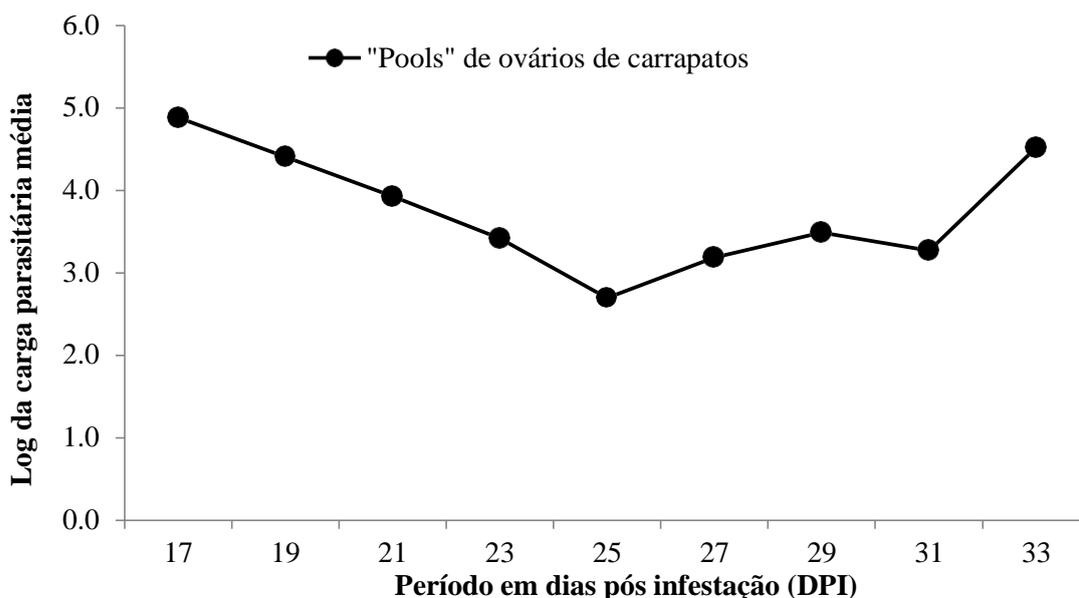
Observou-se que o valor médio da carga de parasitos das amostras de ovários foi de  $10^{4.624}$  no primeiro período do experimental (17 a 21 DPI). No segundo período do ciclo parasitário (23 a 27 DPI), o valor médio foi de  $10^{4.392}$ . No terceiro período avaliado (29 a 33 DPI), o valor médio da carga de parasitos das amostras de ovários foi de  $10^{4.910}$ . Não houve diferença estatística entre os valores médios da carga de parasitos de ovários dentre todos os períodos avaliados (Tabela 8).

**Tabela 8.** Análise descritiva dos valores médio da carga parasitária de *Theileria equi* obtidos a partir da detecção molecular por qPCR, em amostras de “pools” de ovários de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* positivos durante o período de infestação experimental.

PPI	N	$\bar{x}$	Md	DP	EP	Min	Max
17 a 21 DPI	6	10 <sup>4.624</sup> a	10 <sup>4.279</sup>	10 <sup>4.725</sup>	10 <sup>4.336</sup>	10 <sup>3.171</sup>	10 <sup>5.128</sup>
23 a 27 DPI	13	10 <sup>4.392</sup> a	10 <sup>2.446</sup>	10 <sup>4.733</sup>	10 <sup>4.176</sup>	10 <sup>0.980</sup>	10 <sup>5.274</sup>
29 a 33 DPI	8	10 <sup>4.910</sup> a	10 <sup>4.047</sup>	10 <sup>5.127</sup>	10 <sup>4.676</sup>	10 <sup>1.477</sup>	10 <sup>5.474</sup>

PPI: período pós-infestação; N: número de observações;  $\bar{x}$ : média aritmética; Md: mediana. DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín: mínimo; Máx: máximo. <sup>a</sup>Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste Kruscall-Wallis a 5% de significância (p<0,05).

Através de uma análise meramente exploratória dos dados foi possível observar que do 17º DPI ao 25º DPI houve uma redução na carga parasitária média de *T. equi* em amostras de ovário, e logo em seguida um aumento progressivo até o 33º DPI (Figura 26).

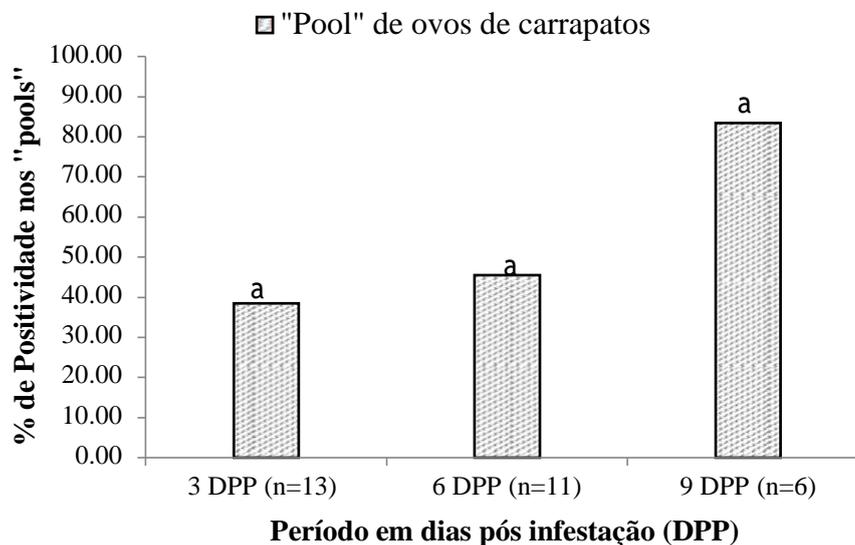


**Figura 26.** Valores da carga média *Theileria equi* nas amostras de “pool” de ovário de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pela técnica de PCR em tempo real, no decorrer do período experimental em dias.

Nenhuma das amostras de ovário utilizadas no estudo amplificou DNA de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *B. caballi*. Desta forma, houve confiabilidade sobre os resultados de positividade para *T. equi* para este tecido e para a colônia utilizada.

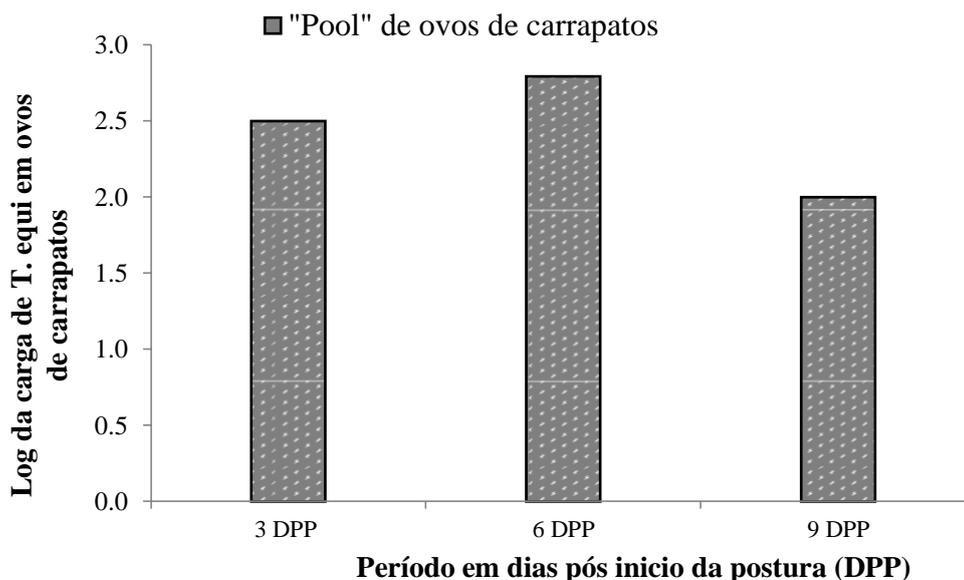
Foram avaliadas 30 amostras de “pools” de ovos provenientes das fêmeas alimentadas sobre o equino cronicamente infectado para *T. equi*. Dentre estas, 50% (n = 15/30) foram consideradas positivas para *T. equi* pela técnica de qPCR. Também foi possível observar que a frequência de positividade destes ovos variou de acordo com os dias após o início da postura das teleóginas (DPP). A frequência de positividade foi de 38,46% (n = 5/13) no primeiro período de análise (3 DPP), 45,45% (n = 5/11) no segundo período (6 DPP) e 83,33% (n = 5/6) no terceiro período (9 DPP) (Figura 27). Mesmo com esta discrepância no percentual de

positividade, não foi observada diferença significativa entre estes períodos analisados ( $p>0,05$ ), o que pode estar relacionado com o número amostral relativamente baixo para algumas das categorias avaliadas.



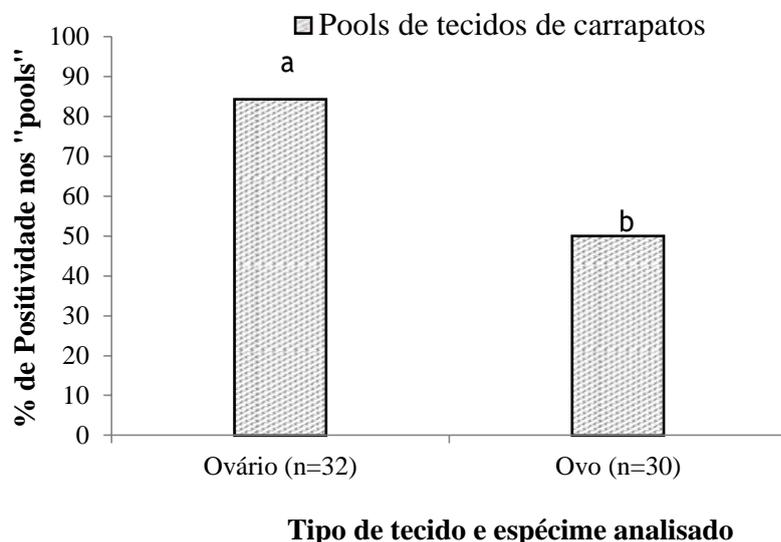
**Figura 27.** Frequência de positividade de amostras de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para *Theileria equi* através da técnica de PCR em tempo real, em relação ao dia pós-postura (DPP) das fêmeas ingurgitadas.

Com relação aos valores da carga parasitária média das amostras de "pool" de ovos positivos para *T. equi* pela qPCR, é possível notar uma uniformidade deste parâmetro com o passar dos DPP. Do 3° ao 9° DPP, a carga média foi de  $10^{2.498}$ ,  $10^{2.792}$  e  $10^{1.998}$ , respectivamente (Figura 28).



**Figura 28.** Valores médios da carga de parasitos em amostras de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* positivas para *Theileria equi* pela técnica de PCR em tempo real, em relação ao dia pós-postura das fêmeas ingurgitadas.

A positividade de ovários em geral foi de 84,38% (n = 27/32) e a de ovos, 50% (n = 15/30), sendo estas frequências diferentes estatisticamente (Figura 29). O valor médio da carga de parasitos entre estes dois tipos de amostras também diferiu, sendo  $10^{4.656}$  para amostras de ovário e de  $10^{2.537}$  para amostras de ovos.

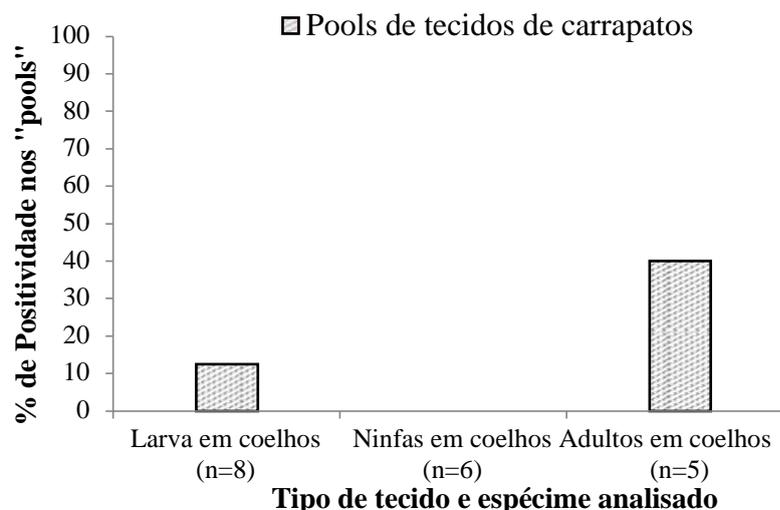


**Figura 29.** Frequência de positividade de amostras de ovários e ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para *Theileria equi* através da técnica de PCR em tempo real.

#### **47 Detecção molecular de *Theileria equi* na segunda geração de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentados em hospedeiro não infectado**

A postura de fêmeas de *R. (B.) microplus* alimentadas em equino cronicamente infectado para *T. equi* foi colocada em B.O.D. até o momento da eclosão de larvas. Após eclosão e maturidade das larvas, elas foram utilizadas na infestação de coelhos com o intuito de realizar uma avaliação preliminar de *T. equi* na segunda geração do carrapato vetor.

Dentre oito "pools" de amostras de larvas ingurgitadas em coelhos, foi possível detectar o DNA de *T. equi* em apenas uma amostras (12,5%). Nenhuma das amostras de "pool" de ninfa foi considerada positiva para *T. equi* dentre seis amostras testadas (n = 0/6). No entanto, em carrapatos retirados na fase adulta, foi possível observar positividade de 2 amostras em 5 testadas. Não coube teste estatístico para a frequência de positividade destas amostras (n≤5) (Figura 30).

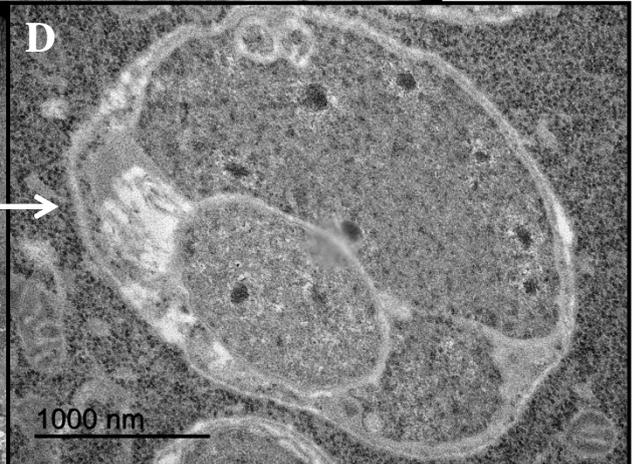
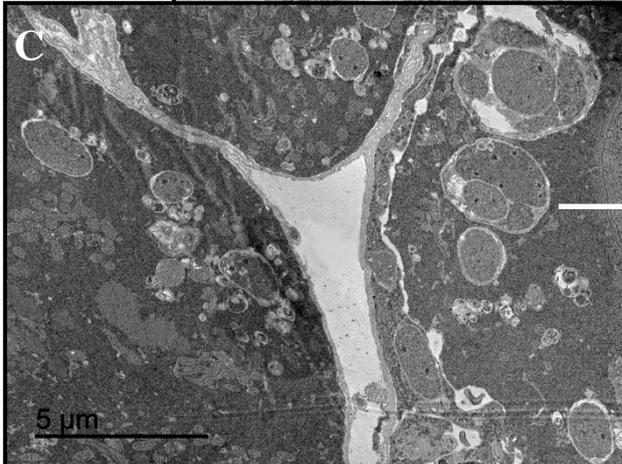
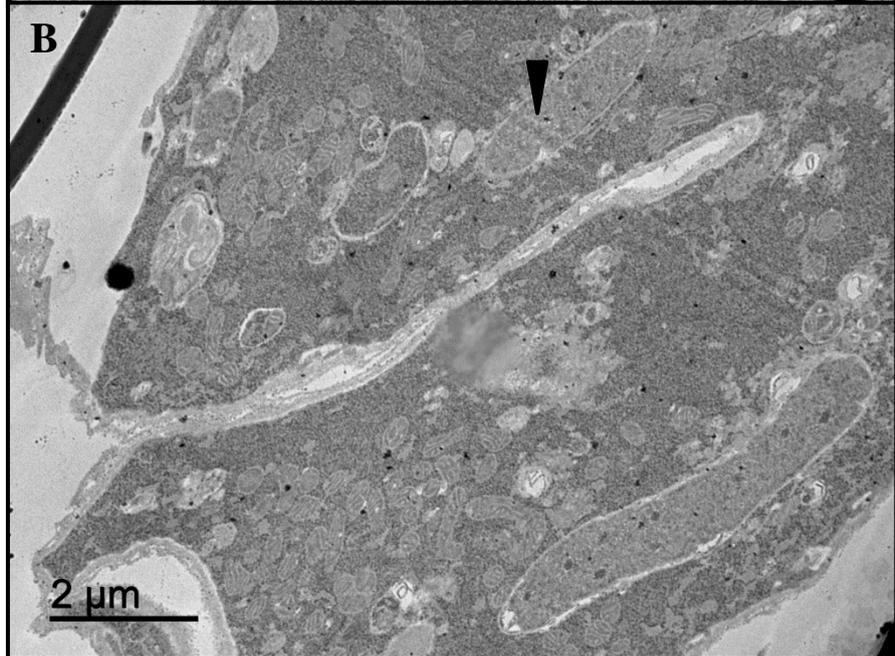
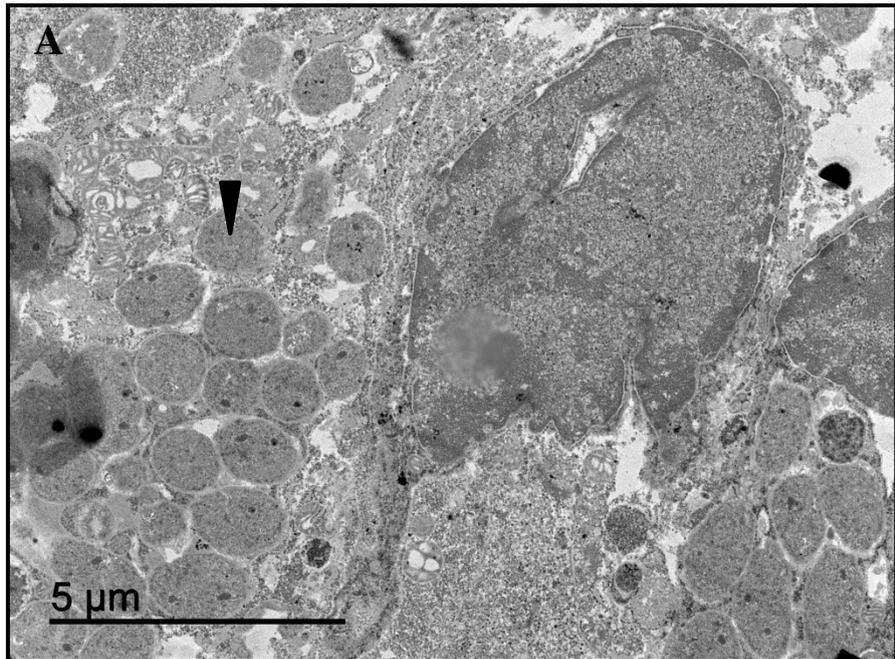


**Figura 30.** Frequência de positividade de amostras de ovário, ovos, larvas, ninfas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para *Theileria equi* através da técnica de PCR em tempo real. Larvas, ninfas e adultos foram alimentados em coelhos e foram originados de ovos de colônia positiva.

#### **48 Avaliação dos ovários de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante infestação experimental através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Nos ovários, formas similares à *T. equi* também foram observadas, tanto isoladas quanto em agrupamento. As formas apresentaram-se predominantemente do tipo ovóide, mas também foi encontrado o formato de vírgula ou arredondado (Figura 31A). Outras formas também foram observadas como alongadas (Figura 31B) e em pares, resultantes de divisão binária e interligadas por pregas citoplasmáticas (Figura 31C/D).

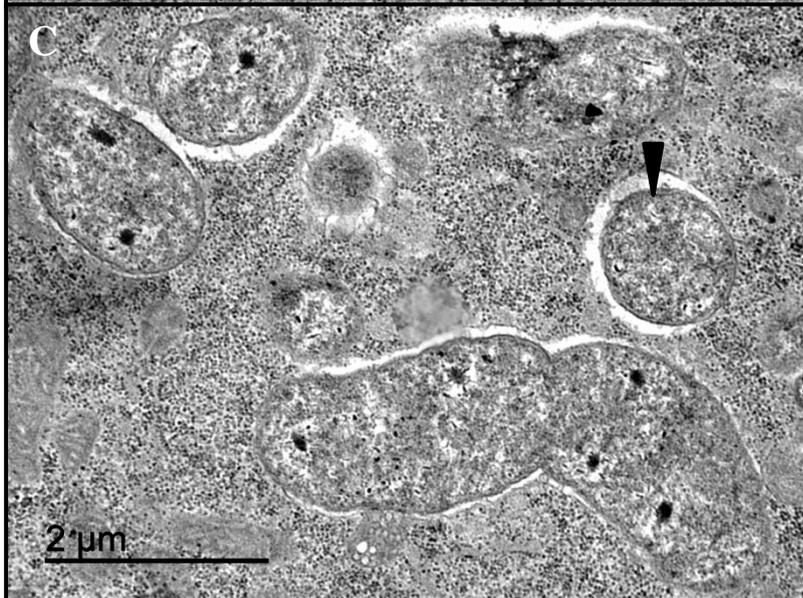
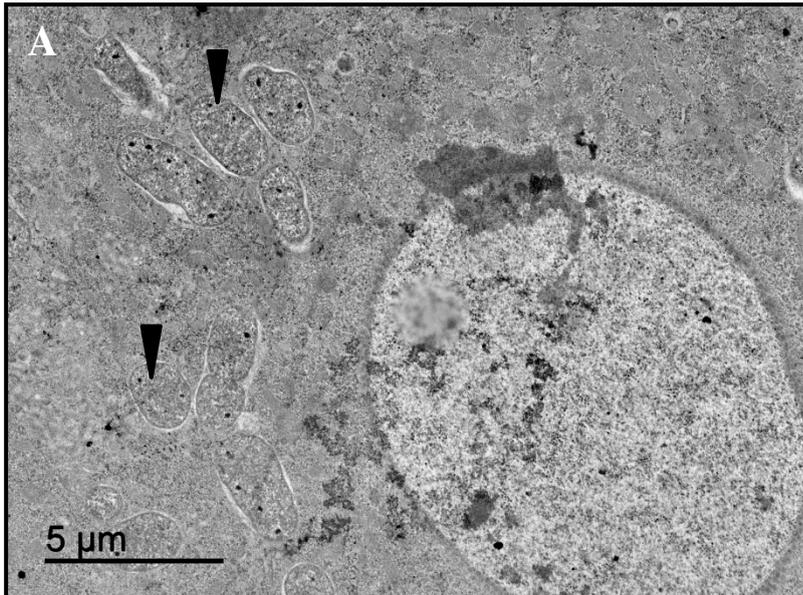
As formas semelhantes ao patógeno são caracterizadas por apresentar dupla membrana plasmática. O núcleo não foi observado. Em seu citoplasma é observada a presença de pequenos grânulos arredondados e fortemente eletrodensos, material granular (material reticular) e ribossomos. Nos ovários das fêmeas jovens (19° DPI), as formas evolutivas foram encontradas no interior de vacúolos (vacúolos parasitóforos) juntamente com material granular fino, pequenas e médias vesículas e, eventualmente alguns ribossomos (Figura 31).



**Figura 31.** Micrografia eletrônica do ovário de fêmea jovem de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* retirada do equino no 19° dia pós-infestação contendo formas evolutivas indicadas como *Theileria equi* (cabeça de seta) neste estudo. A: formas arredondadas e ovoides. B: formas alongadas. C: formas de multiplicação binária do parasito dentro de uma região de halo vacuolar. D: formas de multiplicação binária.

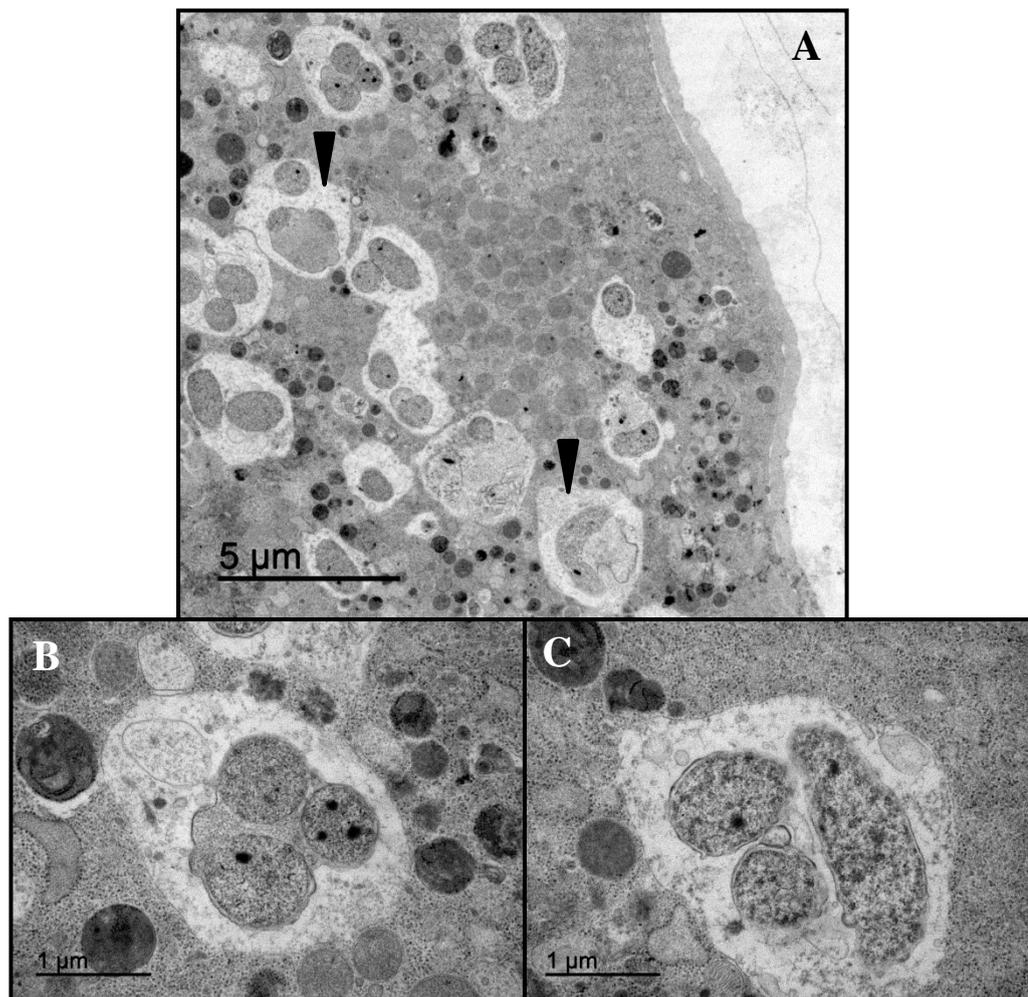
Formas similares foram observadas em ovários de fêmeas semi-ingurgitadas coletadas no 25° DPI. O núcleo do parasito não foi observado nestas formas também. No citoplasma, pequenos grânulos arredondados e fortemente eletrodensos, material granular (material reticular) e ribossomos foram observados (Figura 32). Nos ovários dos carrapatos semi-ingurgitados coletados no 25° DPI, o patógeno é observado com uma região vacuolar (halo vacuolar) delimitada por uma membrana interna (inclusa) (Figura 32B).

A morfometria destas formas de *T. equi* nos ovários de fêmeas no 19° DPI e 25° DPI foi de aproximadamente 1 µm à 5 µm de comprimento e 0,8 µm à 1 µm de largura.

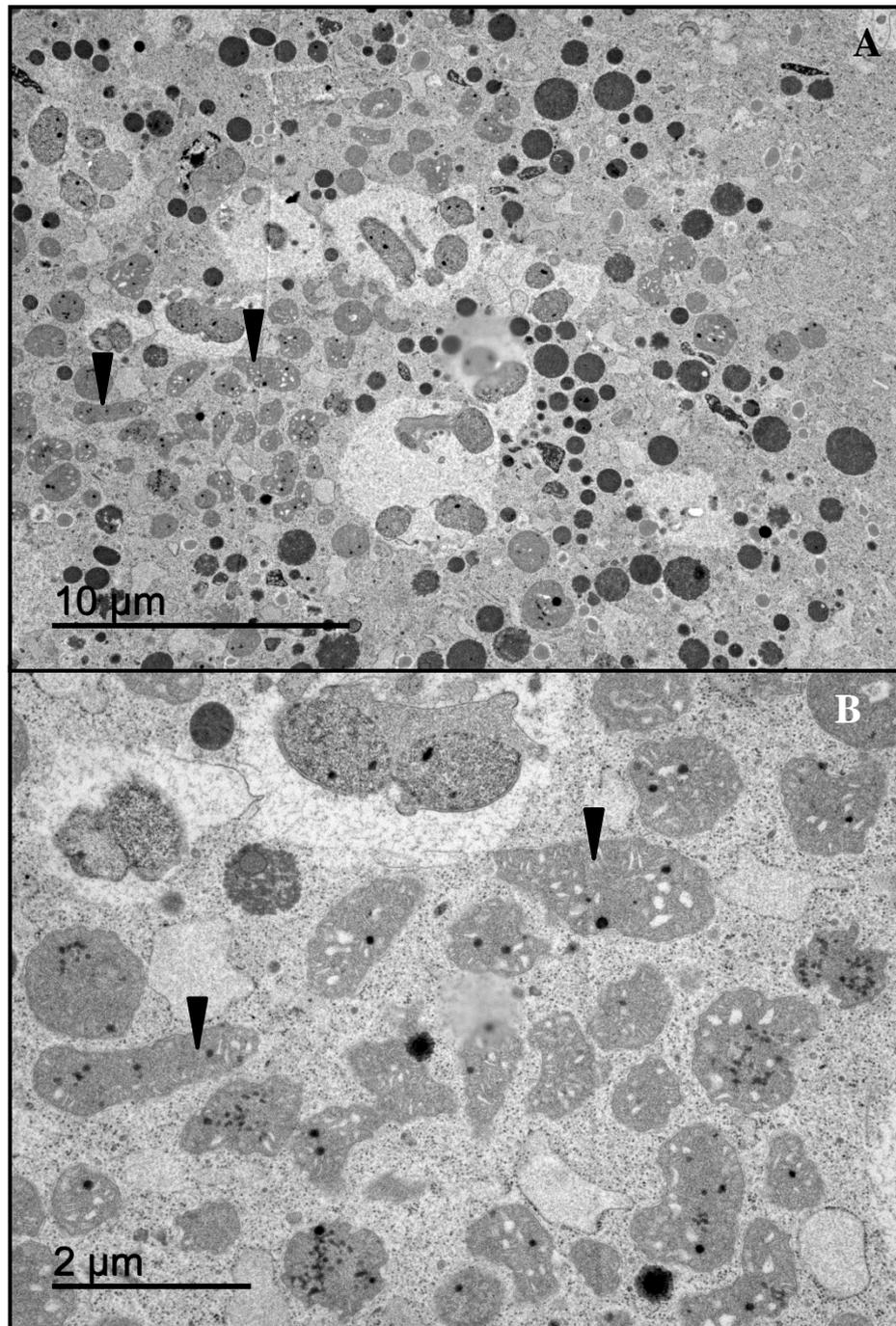


**Figura 32.** Micrografia eletrônica do ovário de fêmea jovem de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* retirada do equino no 25° dia pós-infestação contendo as formas evolutivas indicadas como *Theileria equi* (cabeça de seta) neste estudo. A: formas arredondadas e ovoides. B: parasito delimitado por região vacuolar e membrana interna (\*). C: formas arredondadas, ovoides e alongadas do parasito, sendo a forma alongada apresentado área de constrição.

Em ovário de fêmeas jovens coletadas no 33° DPI, que provavelmente tiveram seu desenvolvimento prejudicado pelo tipo de hospedeiro, os patógenos mantiveram sua morfologia como descrita para os outros materiais. No entanto, as formas de *T. equi* foram observadas no interior de vacúolos (vacúolo parasitóforo) juntamente com pequenas e médias vesículas e, eventualmente alguns ribossomos, sempre em processo de multiplicação assexuada (Figura 33). Ou disperso no citoplasma similar aos esporozoítos (Figura 34).



**Figura 33.** Micrografia eletrônica do ovário de fêmea jovem de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* retirada do equino no 33° dia pós-infestação contendo as formas evolutivas de *Theileria equi*. A: diversas formas de multiplicação do parasito dentro de vacúolos parasitóforos (cabeça de seta). B e C: detalhe do parasito dentro de vacúolos parasitóforos.



**Figura 34.** Micrografia eletrônica do ovário de fêmea jovem de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* retirada do equino no 33° dia pós-infestação contendo as formas evolutivas indicadas como *Theileria equi* neste estudo. A: diversas formas de multiplicação do parasito dentro de vacúolos parasitóforos e formas similares à esporozoítos fora dos vacúolos parasitóforos (cabeça de seta). B: diversas formas similares à esporozoítos em processo de maturação (cabeça de seta).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Aspectos da infestação de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em equinos

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos principais problemas sanitários para a pecuária de muitos países, incluindo o Brasil. Os hospedeiros principais são bovinos, mas pode parasitar ocasionalmente ovelhas, cervídeos, equinos, búfalos, porcos, cabras, cães (ARAGÃO, 1936; GONZALES, 1974; PEREIRA, 1980; SZABO et al., 2003; FRANQUE et al., 2007) e até mesmo o homem (GUGLIELMONE et al., 1991). Seus efeitos patogênicos podem ser classificados em diretos pela ação do hematofagismo em todas as fases de desenvolvimento do carrapato e indiretos pela transmissão de patógenos como *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. Além disso, é responsável por prejuízos aos criadores, como a perda na qualidade do couro, redução da produção de carne e leite, gastos com tratamento carrapaticida para o controle da população, dentre outros. Este prejuízo causado por *R. (B.) microplus* pode chegar à aproximadamente 3,2 bilhões de dólares em gastos anuais (GRISI et al., 2014).

A presença desta espécie de carrapato em equinos de diferentes regiões do país foi relatada por diversos autores (FREIRE, 1972; FALCE, 1982; BITTENCOURT, 1990; LABRUNA et al., 2001). Contudo, alguns trabalhos demonstram que *R. (B.) microplus* tem dificuldade em se desenvolver adequadamente sobre este hospedeiro vertebrado. Segundo Bittencourt (1990), a infestação de equinos com larvas de *R. (B.) microplus* provenientes de fêmeas ingurgitadas em bovinos não desenvolveu adequadamente devido à reações de hipersensibilidade manifestada pelo hospedeiro, fato este que deve ter dificultado a fixação destes carrapatos nestes animais. A infestação de equinos com larvas de *R. (B.) microplus* causa intensa reação fibrinosa cutânea e formação de pápulas no animal, conforme descrito por Franque et al. (2009). As larvas podem apresentar-se envoltas em exsudato, quase sempre mortas (FRANQUE et al., 2009).

O equino cronicamente infectado por *T. equi* utilizado neste estudo foi infestado por *R. (B.) microplus* por aproximadamente 80 mil larvas, ea utilização de um número de larvas muito acima da infestação para um bovino (20 mil) se deve ao fato de que, em equinos, a mortalidade de larvas pode chegar a 90% (FRANQUE et al., 2009). Neste estudo foi possível observar um baixo percentual de *R. (B.) microplus* recuperados durante o ciclo biológico sobre o equino, o que resultou em uma baixa taxa de recuperação de fêmeas ingurgitadas na fase final da experimentação. Em hospedeiros que não são o de predileção de *R. (B.) microplus*, sabe-se que normalmente poucos carrapatos atingem a fase de fêmea ingurgitada (RIEK, 1959).

O período da fase parasitária de *R. (B.) microplus* sobre o equino foi de aproximadamente 35 dias neste estudo, corroborando os estudos de Bittencourt (1990) e Franque et al. (2009), que observaram entre 28 e 38 dias de fase parasitária. Em seu hospedeiro de predileção, os bovinos, o início do desprendimento de fêmeas ingurgitadas ocorre entre 19 e 21 dias (DAVEY et al., 1982). O prolongamento da fase parasitária pode ter uma relação com a dificuldade de adaptação deste artrópode a um hospedeiro não típico. Fato este pode ser mais bem demonstrado na relação direta com o baixo peso das teleóginas coletadas no equino do estudo, mesmo ao final da fase parasitária. Além disso, foi possível observar uma alta taxa de mortalidade de carrapatos durante a infestação experimental, o que pode ter uma relação com a imunidade mais efetiva desta espécie animal no combate a este ectoparasito (BITTENCOURT, 1990; FRANQUE et al., 2009). Outro achado importante foi o longo período da fase parasitária observado em alguns espécimes machos sobre o equino.

## 5.2 Detecção de *Theileria equi* em glândula salivar, intestino e em carrapatos inteiros da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por qPCR

Os gêneros de ixodídeos *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes*, perfazendo mais de vinte espécies de carrapatos são indicadas como transmissoras de *T. equi* no mundo (SCOLES; UETI, 2015). No Brasil, três principais espécies de carrapatos são observadas parasitando equinos, *Dermacentor nitens*, *A. sculptum* e *R. (B.) microplus* (SOUZA; SERRA-FREIRE, 1992; LABRUNA et al., 2001). Dentre eles, somente *R. (B.) microplus* foi indicado como possível vetor biológico de *T. equi* para equinos (GUIMARÃES, 1998a; STILLER et al., 2002; UETI et al., 2005; 2008). Embora *Amblyomma sculptum* (complexo *A. cajennense*) seja um vetor indicado por dados epidemiológicos (HEUCHERT et al., 1999; KERBER et al., 2009; SANTOS et al., 2011; PECKLE et al., 2013), a infecção de *A. sculptum* por *T. equi* não foi observada em condições experimentais (RIBEIRO et al., 2011).

O uso de equino cronicamente infectado com *T. equi* mimetiza o que ocorre em condições de campo, onde os equinos, uma vez infectados, mantém uma baixa parasitemia deste protozoário por toda a vida, funcionando como fonte de infecção eficiente para carrapatos vetores. Alguns estudos demonstraram que, alcançado um limiar de carga de parasitos no sangue do hospedeiro vertebrado, seja na fase aguda da infecção (média de  $10^{8.8}$  parasitos/ml de sangue) ou crônica (média de  $10^{5.5}$  parasitos/ml de sangue), um aumento adicional de patógenos no sangue tem pouco ou nenhum efeito na porcentagem de carrapatos infectados (RIEK et al., 1964; ERIKS et al., 1993; UETI et al., 2005). Ueti et al. (2005; 2008) relataram que a parasitemia durante a alimentação do carrapato afeta a eficiência da infecção inicial. No entanto, os carrapatos infectados apresentam níveis idênticos da carga de parasitos nas glândulas salivares independente da parasitemia do equino durante a alimentação e transmitem o patógeno com a mesma eficiência. Portanto, um modelo experimental utilizando um equino cronicamente infectado é igualmente eficiente em estudos de transmissão deste hemoparasito. Esta eficiência pode ser demonstrada também no presente estudo, onde a positividade para *T. equi* das amostras de carrapatos inteiros foi acima de 90% e dentre as 45 amostras de glândulas salivares de carrapatos adultos foi observada uma positividade de 77,78% ( $n = 35/45$ ).

No presente estudo, foi possível observar a capacidade de transmissão transestadial de *T. equi* por *R. (B.) microplus*, através de dados de positividade de carrapatos recém emergidos (RE) em B.O.D. (ninfas RE, machos RE e fêmeas RE), com taxas de 75%, para ninfas RE e machos RE e 85,71%, em relação as fêmeas RE. No caso dos carrapatos RE, admite-se que não haja sangue do equino no intestino, já que eles foram retirados como larvas, no caso das ninfas RE, e como ninfas, no caso de adultos RE, sendo a mudança de ecdise em B.O.D. Outro aspecto que indica a transmissão transestadial é a positividade de 45,5% ( $n = 5/11$ ) das amostras de glândulas salivares de carrapatos adultos RE, retirados como ninfas do equino. É perfeitamente notável que a transmissão transestadial varia conforme o estágio de desenvolvimento do carrapato e o sucesso dessa modalidade de transmissão é maior no estágio de ninfa para carrapatos adultos. A transmissão transestadial de *T. equi* já foi demonstrada também através de ninfas de *R. (B.) microplus* (STILLER et al., 2002).

Além de a transmissão transestadial ter sido demonstrada neste trabalho, observou-se também que a frequência desta transmissão é maior quando o carrapato permanece alimentando-se no equino cronicamente infectado, uma vez que quando os carrapatos são alimentados em hospedeiros não infectados (coelhos) a frequência da transmissão transestadial diminuiu consideravelmente.

A carga parasitária média de *T. equi* em amostras de carrapatos inteiros foi aumentando com o avançar do período experimental. Da mesma forma, em carrapatos adultos, ocorre uma tendência de aumento da frequência de positividade com o passar do tempo da infestação, tanto em carrapatos inteiros (machos e fêmeas), quanto em glândula salivar e intestino. Este fato parece estar relacionado ao tempo que os carrapatos passaram se alimentando no equino cronicamente infectado, sugerindo que, quanto maior esse tempo, maior a frequência de positividade dos carrapatos e seus tecidos. Este fato corrobora com o estudo de Ueti et al.(2003), os quais relataram que quanto maior o tempo em que o carrapato passa se alimentando, maior o número de carrapatos com as glândulas salivares infectadas e maior a carga de parasitos detectada neste órgão.

Quando os estágios e gêneros dos carrapatos inteiros foram analisados em separado, a carga parasitária foi estatisticamente maior no terceiro período (17 a 21 DPI) no caso das ninfas mostrando um aumento na carga de parasitos a partir do 17º DPI. Para machos e fêmeas inteiros, esta tendência de aumento de carga com o tempo não foi observada, pois machos e fêmeas foram coletados sobre o animal principalmente a partir do 17º DPI e após este dia, a média da carga de parasitos observada nos carrapatos por dia de coleta foi considerada estável. Em amostras de glândulas salivares foi observada uma tendência temporal de aumento gradual da infecção na glândula, quando avaliada pontualmente em cada dia de coleta, com o avançar do tempo de infestação. Além disso, a frequência de positividade de amostras de glândulas salivares de carrapatos adultos no primeiro período da infestação (17 a 21 DPI) foi menor estatisticamente quando comparado ao segundo (23 a 27 DPI) e terceiro períodos (29 a 33 DPI). É provável que, inicialmente, os cinetos tenham penetrado na glândula, porém não tenham se transformado e multiplicado. A penetração do cineto nas glândulas salivares tem início entre 7-8 dias pós-infestação e a maturação e início da multiplicação pode ocorrer em até 26 dias (MEHLHORN; SCHEIN, 1984; 1993; 1998). O início da penetração de cinetos de *T. parva* nas glândulas salivares de *R. appendiculatus* ocorreu com 25 DPI, e no caso de *T. annulata* em *Hyalomma anatolicum* foi de 18 DPI (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Portanto, a carga parasitária na glândula salivar do ixodídeo vetor tende a aumentar naturalmente com o passar dos DPI.

Neste estudo, não foi possível observar diferença estatística entre a frequência de positividade de amostras de glândulas salivares de machos e fêmeas. Além disso, a carga parasitária média da glândula salivar de machos e fêmeas foi semelhante nos três períodos experimentais testados. Esse resultado também foi observado em carrapatos inteiros. Embora o sexo do carrapato pareça não influenciar na biologia deste hemoparasito, a alta frequência da transmissão transtadial de ninfas para machos de *R. (B.) microplus* pode ser considerada um importante aspecto na manutenção do ciclo de transmissão de *T. equi* em áreas onde apenas esta espécie é reconhecida como vetor biológico, como é o caso do Brasil. Este fato poderia estar relacionado ao alto índice endêmico de *T. equi* no país, principalmente em regiões com criações mistas de bovinos e equinos, uma vez que os machos deste gênero de carrapato podem realizar o repasto sanguíneo em mais de um hospedeiro (LITTLE et al., 2007). Este resultado é reforçado pelo estudo de Ueti et al. (2008) no qual observaram que são necessários apenas dois machos com cargas de  $10^{4.2}$  parasitos por glândula salivar para que ocorra a transmissão de *T. equi* para um equino livre de infecção. Além disso, Ueti et al. (2008) destacam a importância do macho, pelo comportamento da alimentação interrompida e maior locomoção entre hospedeiros em busca de fêmeas. Muito embora os resultados deste estudo não indiquem o macho como gênero de maior importância epidemiológica, o reduzido número amostral de machos em detrimento das fêmeas em cada tipo de tecido pode ter influenciado nos resultados obtidos.

A transmissão intraestadial de *T. equi* por machos de *R. (B.) microplus* foi investigada e confirmada, sendo os machos indicados como alvo de controle para prevenir a theileriose

em equinos (UETI et al., 2008). Neste estudo, é importante mencionar que a taxa de infecção e o valor médio da carga parasitária foi elevada para machos, e que muitos exemplares foram observados ainda por um longo período sobre o hospedeiro infectado. Desta forma, isso poderia ampliar, sob condições naturais, a possibilidade deste vetor de entrar em contato com outros hospedeiros susceptíveis, disseminando assim, este agente etiológico.

Em amostras de intestino, embora tenha a mesma tendência de aumento da frequência de positividade nos carrapatos adultos, isso não ocorreu para a carga parasitária média que se manteve constante, tanto entre os períodos avaliados, quanto pontualmente ao longo de cada coleta da infestação experimental. Vale destacar que o intestino apresentou resultados discrepantes entre a carga de parasitos e frequência de positividade entre machos e fêmeas, fato que pode ter uma relação com o baixo número de amostras obtidos para machos, ou com a maior capacidade de engurgitamento nas fêmeas e portanto, maior ingestão de formas infectantes de *T. equi* em detrimento dos machos.

Um estudo desenvolvido por Ueti et al. (2003) demonstraram que ninfas alimentadas por 2-3 dias sobre animal infectado não apresentaram infecção de *T. equi* detectáveis em amostras de intestino, através da técnica de imunofluorescência direta. No entanto, em ninfas alimentadas entre 7-8 dias foi possível detectar o agente em 66-100% das amostras de intestino (UETI et al., 2003). Mehlhorn e Schein (1998) observaram que após ingestão de gamontes pelo carrapato, as formas permanecem as mesmas por dois dias no conteúdo intestinal e zigotos são visualizados somente entre 4-7 dias após a ingestão dos gamontes. Neste órgão não há multiplicação do protozoário. O tempo no qual o ixodídeo passa se alimentando sobre o hospedeiro infectado é importante para o desenvolvimento de *T. equi* no intestino (UETI et al., 2003) e em outros órgãos, de acordo com o ciclo deste Piroplasmida (MEHLHORN; SCHEIN, 1998).

Além do tempo de alimentação do carrapato sobre o hospedeiro, outros fatores podem influenciar na carga de parasitos no ixodídeo e na frequência de vetores positivos. O desenvolvimento de um Piroplasmida nos órgãos do carrapato vetor também depende do equilíbrio entre o estabelecimento da defesa do carrapato contra o parasito e a habilidade do parasito em escapar da resposta imune do carrapato (TSUJI et al., 2007). Estudos demonstram a existência de proteases no intestino de carrapatos, responsáveis por controlar o número de parasitos que saem ou invadem este tecido (TSUJI et al., 2007; 2008), fato este que pode equilibrar a infecção do protozoário no órgão e limitar o número de parasitos novos adquiridos pelo carrapato embora ele continue se alimentando.

Com relação ao estágio de desenvolvimento do carrapato foi observado maior frequência de positividade em amostras de glândulas salivares de carrapatos retirados como adultos do equino, em comparação com as amostras oriundas de adultos RE. A alimentação de adultos recém emergidos sobre o equino por 2-5 dias torna completa a formação dos citômeros e a multiplicação de esporozoítos infectivos de *T. equi* nas glândulas salivares (MEHLHORN; SCHEIN, 1993; 1998), aumentando as chances do diagnóstico positivo pela qPCR em amostras de carrapatos removidos já como adultos do equino. Os ixodídeos são incapazes de transmitir piroplasmas logo após o início da alimentação, pois as glândulas salivares tornam-se pouco desenvolvidas após a ecdise. Posterior a alimentação em um hospedeiro vertebrado, os alvéolos das glândulas salivares se desenvolvem e junto com eles, ocorre o desenvolvimento e a multiplicação destes parasitos (MEHLHORN; SCHEIN, 1985).

A penetração do parasito na parede intestinal ocorre entre 2-3 DPI. Nestas células, realizam a reprodução sexuada culminando na formação do zigoto 4-6 DPI, que transformam-se em cineto móvel alcançando a hemolinfa do ixodídeo em 5-7 DPI (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; 1993; 1998). Neste processo denominado gametogonia, não há multiplicação de formas nas células intestinais e ele acontece sempre que o carrapato vetor estiver fixado em processo de alimentação. Esta diferença entre o valor da carga parasitária médias das amostras

de glândulas salivares e intestinos também é notada no gráfico de linhas, onde foi possível observar que a maior carga de parasitos na glândula ocorreu no final do período experimental (31° DPI) e o de intestino, ocorreu no início do período experimental (17° DPI).

### 5.3 Avaliação das glândulas salivares de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante infestação experimental através da Microscopia Eletrônica de Transmissão

Através das análises de micrografias de transmissão, foi possível observar a infecção e a multiplicação de formas evolutivas de *T. equi* dentro dos ácinos das glândulas salivares de ninfas e machos de *R.(B.) microplus*. Isso demonstra, mais uma vez, a capacidade do *R.(B.) microplus* em se infectar e em transmitir *T. equi* transestadialmente, tanto para ninfas como para adultos, quando alimentados em hospedeiro cronicamente infectado. Pesquisas realizadas por Guimarães et al. (2008a,b) demonstraram que os esporozoítos de *T. equi* são capazes de completar seu desenvolvimento em *R. (B.) microplus* e sendo assim, este carrapato foi responsável pela transmissão experimental do agente em equinos, também no Brasil.

O tamanho das formas observadas neste estudo em amostras de glândula salivar de ninfas foi de 0,9 à 1,4 µm x 0,4 à 0,5 µm. Devido ao tamanho e à falta de algumas organelas na visualização das micrografias, os esporozoítos presentes em glândulas salivares de ninfas deste estudo parecem imaturos. Em trabalhos desenvolvidos por Guimarães et al. (1998a,b), o tamanho dos esporozoítos maduros foi de 2,0 x 1,1 µm e no estudo de Moltmann et al. (1983) com *T. equi* em *Hyalomma* spp. foi de 3,0 x 1,2 µm. Em ambos estudos, as formas de *T. equi* em glândulas salivares foram maiores do que as visualizadas neste estudo. Ainda, é importante ressaltar que estas medidas são aproximadas, já que os diferentes planos de corte da MET influenciam na morfometria.

No 8° dia de alimentação, foi possível visualizar esporontes de *T. equi* nas glândulas salivares de ninfas de *Hyalornma anatolicum anatolicum*, *H. a. excavatum*, *Rhipicephalus turanicus* (MOLTMANN et al., 1983). No presente estudo, as ninfas começaram a ser observadas sobre o animal no 7° DPI e as amostras começaram a ser coletadas no 11° DPI, logo acredita-se que as ninfas se alimentaram por um período médio de aproximadamente 4 dias. Este fato reforça a ideia de que as formas de esporontes e esporozoítos observadas não estavam maduras.

Nos machos, as formas de esporontes mostraram-se diferentes das observadas em ninfas. Foram observadas entre 20-30 formas arredondadas, granulares ou estriadas, contendo estruturas eletrodensas similares ao micronema e roptrias e circundadas por membrana. Algumas imagens mostraram esta membrana em rompimento e as formas mudando de conformação e em processo de saída. Outras formas de *T. equi* apresentaram vacúolo único arredondado em seu interior. Embora estas formas ainda não tenham sido visualizadas por outros autores, é possível que a data da coleta dos machos e a cronicidade da infecção no equino tenham afetado a morfologia das formas evolutivas observadas. Além disso, pode ser que a alimentação de *R. (B.) microplus* em hospedeiro equino que recebeu cargas desta espécie de carrapato com certa frequência, prejudique seu desenvolvimento, associado ao fato do parasito também causar prejuízos ao carrapato vetor (CHAUVIN et al., 2009).

### 5.4 Detecção de *Theileria equi* em ovários e ovos de carrapatos inteiros da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por qPCR e avaliação de ovário por Microscopia Eletrônica de Transmissão

No gênero *Babesia*, os zigotos multiplicam-se no carrapato e os esporocinetos resultantes invadem vários órgãos do artrópode, incluindo os ovários. Deste modo, a infecção passa através do ovário e do ovo para a geração seguinte do vetor (BONNET et al., 2007; HOWELL et al., 2007). Quando o carrapato se alimenta de um novo hospedeiro, a maturação dos esporozoítos ocorre e o hospedeiro se infecta com a saliva do carrapato. Certas espécies de *Babesia* podem persistir ao longo de várias gerações dos carrapatos, mesmo sem novas infecções (UILENBERG et al., 2006). Com relação ao gênero *Theileria* a transmissão transovariana parece não ocorrer (MEHLHORN; SCHEIN, 1998). Para o gênero *Theileria* alguns autores relatam que o cineto móvel passa do intestino para a hemolinfa, indo direto para a glândula salivar. Acredita-se, desta forma, que o cineto de *T. equi* não invada outros órgãos, não havendo passagem através dos ovários e dos ovos (DE WALL et al., 1992; SIGRIST, 1983; SCHEIN, 1988; MEHLHORN & SCHEIN, 1998; UILENBERG, 2006; SCOLES & UETI, 2015). Embora estudos reforcem a ideia de que a transmissão transovariana não ocorra para este gênero, outros apontam para esta possibilidade, em diferentes espécies de carrapatos (NEITZ, 1956; DIPEOLU; OGUNGI, 1977; BATTSETSEG et al., 2002a; BATTSETSEG et al., 2002b; IKADAI et al., 2007).

No presente estudo, aproximadamente 84% dos “pools” de ovários testados amplificaram o DNA alvo de *T. equi* através da qPCR. Além disso, formas sugestivas deste agente foram observadas, em cortes teciduais deste órgão em diferentes exemplares, através de microscopia eletrônica, ao longo do período experimental. Logo, pelas evidências demonstradas neste estudo, é possível sugerir que ocorra a infecção de ovários de *R. (B.) microplus* com *T. equi*, e com isso indicar a possibilidade da transmissão transovariana.

Em 1956, Neitz relata que a espécie *Hyalomma anatolicum* é a única onde a transmissão transovariana de *T. equi* ocorre de fato. Quase 50 anos depois, Battsetseg et al. (2002a) demonstraram através de reações de nPCR, que 43% dos ovos e 62,5% das larvas oriundas de teleóginas de *R. (B.) microplus* alimentadas em equinos infectados por *T. equi* foram positivos para o agente. Em outro estudo, Battsetseg et al. (2002b), observaram 3,8% de positividade de ovos e larvas de *Dermacentor nutalli* para *T. equi*. Um estudo semelhante realizado por Ikadai et al. (2007) demonstraram, através de ensaio de inoculação experimental de *T. equi* em *Hyalomma longicornis*, que 50% das amostras de ovos e 70% das amostras de larvas oriundas destas teleóginas foram positivas para *T. equi*. No entanto, Ueti et al. (2008) observaram apenas 0,2% a 1,5% de massas de ovos de *R. (B.) microplus* testadas foram positivas para *T. equi* através de nested PCR. Estes autores refutaram a possibilidade de transmissão de *T. equi* para um hospedeiro vertebrado livre da infecção utilizando os diferentes estágios oriundos destas posturas positivas em infestação experimental.

No presente estudo foi observada uma positividade de 50% (n=15/30) em amostras de massas de ovos testadas pela qPCR. Além disso, a carga parasitária média avaliada neste tecido ( $10^{2.559}$ ) foi relativamente mais baixa que a observada nos demais tecidos testados, sugerindo que mesmo que a infecção ocorra, ainda assim, ela apresenta uma baixa eficiência, frente aos demais tecidos e órgãos do artrópode. Além disso, somente um “pool” de amostra de larvas oriundas de postura de fêmeas alimentadas em equino cronicamente infectado para *T. equi* foi considerada positiva para o agente pela qPCR (12,5%, n=1/8).

No estudo de Battsetseg et al. (2002), fêmeas ingurgitadas foram coletadas de equinos infectados por *T. equi* à campo, sendo estes considerados cronicamente infectados. Estes autores observaram a passagem de *T. equi* para ovos e larvas de *R. (B.) microplus*. Diferente de Ueti et al. (2008), que não observaram transmissão transovariana e utilizaram um equino em fase aguda da infecção para alimentar as teleóginas. É possível que a fase da infecção do hospedeiro vertebrado influencie a taxa de infecção do vetor, e com isso, a transmissão de *T. equi* para a próxima geração de carrapatos. Alguns estudos destacam as variações na taxa de

infecções dos ovos e larvas de outros piroplasmas, em função da taxa de infecção das fêmeas do carrapato vetor.

Howell et al. (2007) observaram uma baixa taxa de infecção em larvas de *R. (B.) microplus* por *Babesia bovis*, quando derivadas de fêmeas com altas cargas de cinetos na hemolinfa. Os autores deste estudo observaram que fêmeas de *R. (B.) microplus* negativas no exame de hemolinfa foram capazes de transmitir *B. bovis* para as larvas. Cafrune e Aguirre (1995), da mesma forma, observaram associação negativa entre taxas de infecção da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* com *B. bovis* e taxas de infecção dos ovos destas fêmeas. Em estudo envolvendo outro babesídeo, Buscher et al. (1988) observaram uma baixa taxa de infecção nos ovos, além de ovos que degeneraram, quando produzidos por fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus bursa* com altas taxas de infecção da hemolinfa com *B. ovis*. A baixa taxa de eclosão de larvas oriundas de fêmeas com altas taxas de *Babesia* spp na hemolinfa também foi verificada por Oliveira et al. (2005). A taxa de infecção dos ovos parece reduzir quando os ovos são oriundos de fêmeas alimentadas em hospedeiros na fase aguda da infecção por parasitos da ordem Piroplasmida. É possível que a alta carga de parasitos provoque um efeito deletério no ovário prejudicando a postura e a taxa de infecção em ovos. No presente estudo, os ovos foram de fêmeas alimentadas em hospedeiro cronicamente infectado, o que pode ter influenciado positivamente a taxa de infecção do parasito para a próxima geração do carrapato vetor.

A infestação de equinos por *R. (B.) microplus* à campo é observada com maior frequência em áreas onde bovinos pastejam (BITTENCOURT et al., 1990; HEUCHERT et al., 1999; LABRUNA et al., 2001). No entanto, a alta morbidade da theileriose equina no Brasil não é completamente explicada pela baixa frequência de *R. (B.) microplus* infestando equinos (PECKLE et al., 2013; RIBEIRO et al., 2011). Além do *R. (B.) microplus*, *D. nitens* e *A. sculptum* são comumente encontrados parasitando equinos (SOUZA; SERRA-FREIRE, 1992; LABRUNA et al., 2001). No entanto, a transmissão de *T. equi* por essas duas espécies de carrapatos não foi observada até o momento (DENNIG, 1988; RIBEIRO et al., 2011). Desta forma, é provável que outras formas de transmissão de *T. equi* na população de *R. (B.) microplus*, como a transovariana, possam estar envolvidas na manutenção de um elevado nível enzoótico da doença no país.

Juntamente com os dados de Battsetseg et al. (2002a; 2002b), os dados do presente estudo sugerem que a infecção nos ovários, ovos e larvas de fato podem ocorrer. No entanto, a taxa de infecção dos ovos neste estudo foi aproximadamente 1,7 vezes menor que a observada nos “pool” de ovários. Este fato pode ter uma relação com a defesa imunológica do carrapato, uma vez que o sistema imune do ixodídeo possui um papel importante na tentativa de debelar a infecção por hemoparasitos (CHAUVIN et al., 2009; LIU & BONNET, 2014). É possível que este fato possa influenciar na queda da taxa de infecção ao longo das fases de desenvolvimento do carrapato ou até mesmo de uma geração do carrapato para outra.

Em amostras de ovários do presente estudo foram observadas através da MET formas de multiplicação similares às de outros piroplasmas já relatados em estudos anteriores (MOLTMANN et al., 1982; MEHLHORN; SCHEIN, 1984), sugerindo a possível infecção deste órgão pelo agente estudado. Baseado no resultado negativo destas amostras de ovário para *B. caballi*, *B. bovis* e *B. bigemina* através de PCR convencional e baseado na morfologia das estruturas observadas, acredita-se que estas formas sejam de *T. equi*. Em fêmeas do 19° DPI e 25° DPI foram visualizadas formas polimórficas, arredondadas, ovais e alongadas, com pontos eletrodensossimilares ao micronema e roptrias, características de um estágio após a penetração do cineto, ou seja, quando o cineto perde suas características. A subdivisão deste estado polimórfico é limitado por membrana simples, também evidenciado nas imagens de ovários de fêmeas do 19° DPI e 25° DPI. Ela pode ter sido formada pela invaginação da membrana do ovário durante a penetração do patógeno, podendo desintegrar-se durante o

desenvolvimento do parasito. Neste caso, não é considerado um vacúolo parasitóforo (MOLTMANN et al., 1982; MEHLHORN ; SCHEIN, 1984; KARAKASH et al., 1986).

Em amostras de ovários de fêmeas do 19° DPI e 33° DPI é possível observar formas similares à esporoblastos de *T. equi* em glândulas salivares de *R. (B.) microplus* (GUIMARÃES et al., 1998a). No entanto, no entorno destas formas de multiplicação é possível observar estruturas similares à esporozoítos, cujas organelas não podem ser identificadas e o citoplasma está repleto de vacúolos. Neste caso, é possível que o parasito tenha sido afetado pelo sistema imune do próprio artrópode (CHAUVIN et al., 2009; LIU BONNET, 2014) ou o próprio desenvolvimento de *R. (B.) microplus* estar dificultado pela alimentação em um equino imunologicamente mais resistente (FRANQUE et al., 2009) já que o equino utilizado no presente estudo foi infestado por *R. (B.) microplus* ao longo de vários anos.

Embora a presença de *T. equi* em ovários e ovos de *R. (B.) microplus* tenha sido suscitada neste e em outros estudos (BATTSETSEG et al., 2002a; b; UETI et al., 2008), são necessários mais estudos para a confirmação da transmissão transovariana, uma vez que, este assunto ainda é controverso por se tratar de um protozoário do gênero *Theileria*. Além disso, os mecanismos pelos quais parasitos do gênero *Babesia* e *Theileria* desenvolvem infectividade no momento da transmissão ainda são desconhecidos, o que reforça a necessidade de pesquisas neste tema.

## 6 CONCLUSÕES

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é capaz de se infectar por *Theileria equi* quando alimentado em equino cronicamente infectado.

A transmissão transtadial de *T. equi* ocorre tanto no estágio de larvas para ninfas, quanto no estágio de ninfas para adultos de *R. (B.) microplus*.

Existe uma associação entre o grau de infecção da glândula salivar por *T. equi* e o tempo de infestação de *R. (B.) microplus* sobre o equino infectado, quando analisado até 33° dias pós-infestação.

O elevado percentual de infecção de carrapatos, associado com aumento gradativo da carga parasitária na glândula salivar de *R. (B.) microplus*, e uma maior permanência da fase parasitária dos machos na infestação dos equinos, indica que esta espécie é importante como potencial vetor natural de *T. equi* no plantel de equinos do Brasil.

A detecção do DNA alvo de *T. equi* em amostras de ovários e ovos, além da visualização de estruturas morfológicamente compatíveis com um piroplasma, sugerem a possibilidade de que a transmissão transovariana ocorre em *R. (B.) microplus* quando alimentado em equino cronicamente infectado por *T. equi*.

Estruturas morfológicamente compatíveis com um Piroplamida, sugerem que esporozoítos imaturos de *T. equi* são observados em glândulas salivares de ninfas coletadas no 11° DPI. E que esporoblastos de *T. equi* são observados em glândula salivar de adultos machos de *R. (B.) microplus* quando coletados no 21° e 25° DPI, em um equino cronicamente infectado com *T. equi*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.31, p.759-843, 1936.
- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L. & SANTOS, A.A. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA. 2007.
- BALDANI C.D.; MACHADO R.Z.; RASO T.F.; PINTO A.A. Serodiagnosis of *Babesia equi* in horses submitted to exercise stress. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 27(4):179-183, 2007.
- BARREIRA, J.D. Efeitos da infecção de *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babés, 1888) sobre os parâmetros biológicos do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). 2001. 138f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- 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.
- BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; JOSE, R.B.L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in the *Dermacentor nuttalli* adult tick. **International Journal Parasitology**, v.31, p.384-386, 2001.
- BECHARA, G.H., SZABO, M.P., FERREIRA, B.R., GARCIA, M.V. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 4, 61-66, 1995.
- BITTENCOURT, A.J.; FONSECA, A.H.; FACCINI, J.L. Comportamento das fases parasitárias e não parasitárias do *Boophilus microplus* (Canestrini) ingurgitadas em diferentes hospedeiros. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 14:32-38, 1990.
- BONNET S., JOUGLIN M., MALANDRIN L., BECKER C., AGOULON A., L'HOSTIS M. Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. **Parasitology**, v.134, p.197-207, 2007.
- BÜSCHER, G.; FRIEDHOFF, K.T.; EL-ALLAWY, T.A.A. Quantitative description of the development of *Babesia ovis* in *Rhipicephalus bursa* (hemolymph, ovary, eggs). **Parasitology Research**, v.74, n.4, p.331-339, 1988.
- CAFRUNE, M.M.; AGUIRRE, D.H. Experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. **Research in Veterinary Science**, v.58, p.284-285, 1995.
- CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p.37, 2009.

- DAEMON, E. **Biologia da fase não parasitária de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acarina: Ixodidae) em condições de laboratório.** 1985. 91p. Dissertação de Mestrado (Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 91 pp.
- DAVEY, R.B.; GARZA, J.; THOMPSON, G.D. Seasonal observations on the development and ovipositional capability of *Boophilus annulatus* and *B. microplus* (Acari: Ixodidae) reared on bovines. **Journal Medical Entomology**, v.19, p.24-28, 1982.
- DAVEY, R.B.; OSBURN, R.L.; MILLER, J.A. Ovipositional and morphological comparisons of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from different geographical areas. **Annals of the Entomological Society of America**, v.77, n.1, p.1-5, 1984.
- DENNIG, F. **Unsuccessful attempts at transmission of *Babesia equi* by *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense*.** 1988. 122p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Hannover Veterinary College.
- DIPEOLU, O.O.; OGUNJI, F.O. The transmission of *Theileria annulata* to a rabbit by the larvae of the tick *Hyalomma rufipes*. **Laboratory Animals**, v.11, p.39-40, 1977.
- EDWARDS, K. T.; GODDARD, J.; VARELA-STOKES, A.S. Examination of the Internal Morphology of the Ixodid Tick, *Amblyomma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a “How-to” Pictorial Dissection Guide. **Midsouth Entomologist**, v.2, p.28–39, 2009.
- ERIKS, I.S., STILLER, D., PALMER, G.H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **Journal Clinical Microbiology**. v.31, p.2091–2096, 1993.
- FALCE, H.C. **Ixodídeos dos equinos, muares e asininos no Estado do Paraná, Brasil** (Acari: Ixodidae). Curitiba, 1982. 88p. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná.
- FRANQUE, M.P. et al. Características biológicas de *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) a partir de infestação experimental em cão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, p.238-242, 2007.
- FRANQUE, M.P.; SANTOS, H.A.; LINAREZ, F.F.M.; MASSARD, C.L. Infestação experimental de equinos por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2117-2122, 2009.
- FREIRE, J.J. Revisão das espécies da família Ixodidae. **Revista de Medicina Veterinária**, v.8, p.1-16, 1972.
- GLÓRIA, M.A.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E.; GRISI, L. Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *Boophilus microplus* (CAN. 1887) resistente e sensível a carrapaticidas em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.2, n.2, p.79-84, 1993.
- GONZALES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle.** São Paulo: Mestre Jou, 1974, 101p.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S; BARROS, A.T.M; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n.2, p.150-156, 2014.
- GROSS, E. Curso Teórico Prático de Técnicas em Microscopia Eletrônica UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ 17 a 21 de março de 2014. Apostila elaborada por: Prof. Téc. MSc. Marcel Pires, Téc.Valéria Fernandes Ilhéus, Bahia. Março de 2014.

- GUGLIELMONE, A.A; MANGOLD, A.J.; VIÑBAL, A.E. Ticks (Ixodidae) parasitizing humans in four provinces of North-Western. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.85, n.5, p.539-542, 1991.
- GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.84, n.4, p.323-327, 1998b.
- GUIMARÃES, A.M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO, M.F.B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, 84: 323-327, 1998a.
- HEUCHERT, C.M.S.; GIULLI, V.; ATHAIDE, D.F.; BOSE, R.; FRIEDHOFF, K.T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.1-11, 1999.
- HOWELL, J.M.; UETI, M.W.; PALMER, G.H.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, D.P. Persistently Infected Calves as Reservoirs for Acquisition and Transovarial Transmission of *Babesia bovis* by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.10, 2007.
- KARAKASHIAN J.; RUDZINSKAA, M.A.; SPIELMANS, A.; LEWENGRU B.; CAMPBELL, J. Primary and secondary ookinetes of *Babesia microti* in the larval and nymphal stages of the tick *Ixodes dammini*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 64, n.2, p. 328-339, 1986.
- 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.
- 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.
- LABRUNA, M.B.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; DE WALL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.97, n.1, p.1-14, 2001.
- LINHARES, G.F.C; SANTANA, A.P.; LAUEMAN, L.H.; MADRUGA, C.R. Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, n.2, p.27-32, 2002.
- LIU, X.Y.; BONNET, S.I. Hard Tick Factors Implicated in Pathogen Transmission. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.1, p.2566, 2014.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v. 84, p. 467-475, 1998.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasm: Cycle and sexual stages. **Advance in Parasitology**, v. 23, p. 37-103, 1984.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: “A long story in short” or “Robert Koch has seen it”. **European Journal Protistology**, v.29, p.279- 293,1993.

- MOLTMANN, U. G.; MEHLHORN, H.; FRIEDHOFF, K. T. Ultrastructural study of the development of *Babesia ovis* (Piroplasmia) in the ovary of the vector tick *Rhipicephalus bursa*. **Journal Protozoology**, v.29, p.30-38, 1982.
- 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, n.1, p.111-120, 1983.
- NEITZ, W.O. A Consolidation of our Knowledge of the Transmission of Tick-Borne Diseases. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.27, n.2, p.115-163, 1956.
- 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.
- NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the lifecycle of the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.38, n.3, p.215-224, 1971.
- OLIVEIRA, M.C.S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; ARAUJO Jr, J.P.; AMARANTE, A.F.T.; OLIVEIRA, H.N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.61-67, 2005.
- 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.
- PEREIRA, M.C. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): Revisão Taxonômica e Morfológica, 1980. 126p. Dissertação (mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PIEEL, M.C.; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. "Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification". **Hydrology and Earth System Sciences**, v.11, n.5, p.1633-1644, 2007.
- RIBEIRO M.F.B.; SILVEIRA, J.A.G.; BASTOS, C.V. Failure of the *Amblyomma cajennense* nymph to become infected by *Theileria equi* after feeding on acute or chronically infected horses. **Experimental Parasitology**, v.128, n.4, p.324-327, 2011.
- RIEK, R.F. Studies on the reaction of animals to infestation with ticks. V. Laboratory Animals as Hosts for the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agriculture Research**, v.10, p.614-619, 1959.
- RIEK, R.F. The cycle of *Babesia bigemina* (Smith & kilborne , 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.15, p.802-21, 1964.
- SANTOS, T.M.; FERRAZ, P.Q.; ALMEIDA, F.Q.; MASSARD, C.L.; BALDANI, C.D.; BOTTEON, P.T.L.; SANTOS, H.A.; MACHADO, R.Z.; ANDRADE, C.M. Estudo comparativo de três métodos de diagnóstico para detecção de anticorpos anti-*Theileria equi* em equinos de áreas endêmicas do estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** ,v.46, n.6, p.484-490, 2009.
- 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.

SCOLES, G.A.; UETI, M.W. Vector Ecology of Equine Piroplasmiasis. **Annual Review of Entomology**, v.60, p.561-580, 2015.

SOUZA, A.P.; SERRA-FREIRE, N.M. Variação sazonal dos estádios adultos de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, como parasitas de cavalos, no município de Itaguaí, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, n.1, p.31-34, 1992.

STILLER, D.; GOFF, W.L.; JOHNSON, L.W.; KNOWLES, D.P. *Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): experimental vectors of *Babesia equi* to equids. **Journal of Medical Entomology**, v.39, p.667-670, 2002.

SZABO, M.P.; LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C.; DUARTE, J.M. Ticks (Acari:Ixodidae) in wild marsh-deer (*Blastocercus dichotomus*), from Southeast Brasil: infestations before and after habitat loss. **Journal of Medical Entomology**, v.40, n.3, p.:268-274, 2003.

THOMPSON, P.H. Ticks as vectors of equine piroplasmiasis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.155, p.454-457, 1969.

UETI, M.W.; PALMER, G.H.; KAPPEMEYER, L.S.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, D.P. Expression of equi merozoite antigen 2 during development of *Babesia equi* in the midgut and salivary gland of the vector tick *Boophilus microplus*. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, p.5803-5809, 2003.

UETI, W.M.; PALMER, G.H.; KAPPEMEYER, L.S.; STATFIELD, M.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, P.D. Ability of vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p. 3755-3759, 2005.

UETI, W.M.; PALMER, G.H.; SCOLES, G.A.; KAPPEMEYER, L.S.; KNOWLES, P.D. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. **Infection and Immunity**, v.76, n.8, p.3525-3529, 2008.

UILENBERG, G. *Babesia* – a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.1-2, p.3-10, 2006.

## 8. CONCLUSÕES GERAIS

As sequências de 152 aminoácidos deduzidas do gene *rap-1* de *Babesia caballi*, bem como as sequências de nucleotídeos de 1244pb do gene *rap-1* de *B. caballi* presentes em equinos naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro, Brasil, estão agrupadas em um único clado (A), juntamente com isolados presentes nos EUA, Porto Rico e Egito.

A técnica cELISA é capaz de detectar os anticorpos produzidos em equinos pela exposição à estirpes de *B. caballi* oriundas do Brasil.

Existem 12 variantes do gene *18S rDNA* de *Theileria equi*, presentes em equinos naturalmente infectados no estado do Rio de Janeiro, Brasil, divididas em dois clados, I e II.

*Theileria equi*, baseado no gene *18S rDNA*, agrupa em outro clado que não o de *Theileria* e/ou *Babesia*.

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é capaz de se infectar por *T. equi* quando alimentado em equino cronicamente infectado e transmitir transestadialmente o agente.

A alta taxa de *R. (B.) microplus*, associado com aumento gradativo da carga parasitária na glândula salivar de *R. (B.) microplus*, indica que esta espécie é importante como potencial vetor natural de *T. equi* no plantel de equinos do Brasil.

A detecção do DNA alvo de *T. equi* em amostras de ovários e ovos, além da visualização de estruturas morfológicamente compatíveis com um piroplasma, sugerem a possibilidade de que a transmissão transovariana ocorre em *R. (B.) microplus*.

## 9. ANEXOS

Anexo I– Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo N° 201/2012

### PARECER

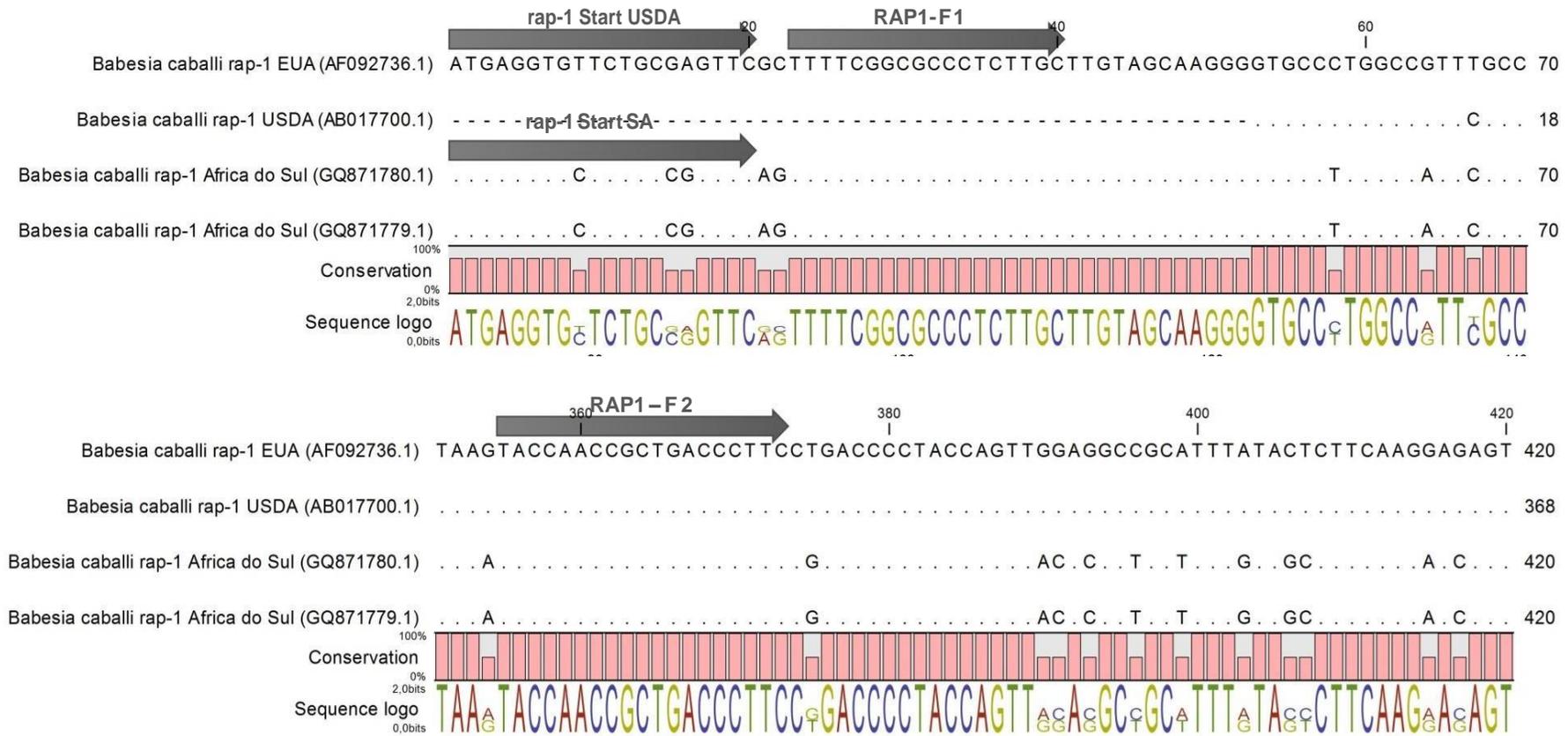
O Projeto de Pesquisa intitulado “*Mecanismos de infecção e transmissão de Theileria equi (Piroplasmida: Theileriidae) e Babesia caballi (Piroplasmida: Babesiidae) por carrapatos em eqüinos sob condições experimentais*” sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Luiz Massard do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária, processo 23083.001257/2012-53, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV.

UFRRJ, 24/05/2012.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Aurea Echevarria Neves Lima'.

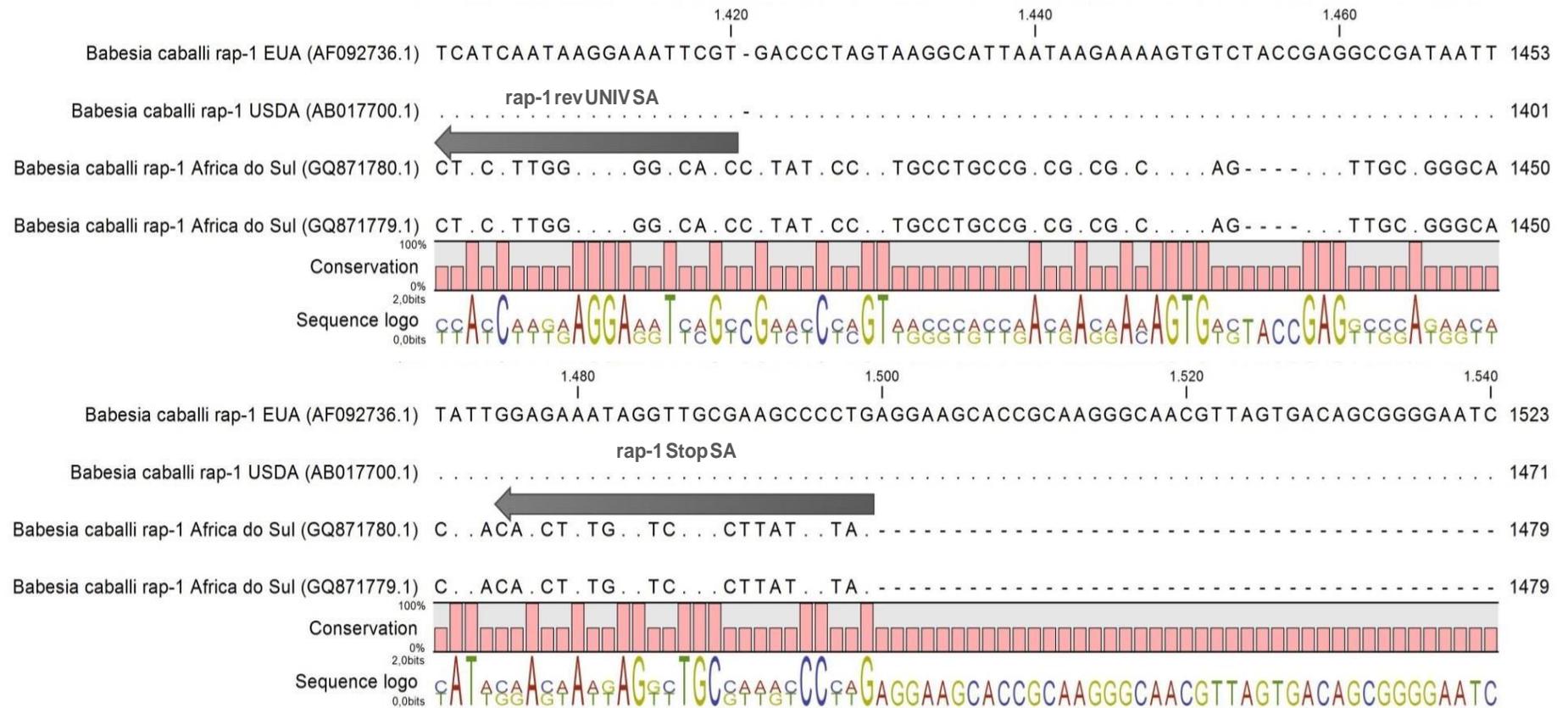
Prof. Dra. Aurea Echevarria Neves Lima  
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação

**Anexo II** – Posição dos “primers” desenhados para o gene *rap-1* de *Babesia caballi* em relação às sequências completas do referido gene de amostras dos EUA e África do Sul, do nucleotídeo 1 ao 420.

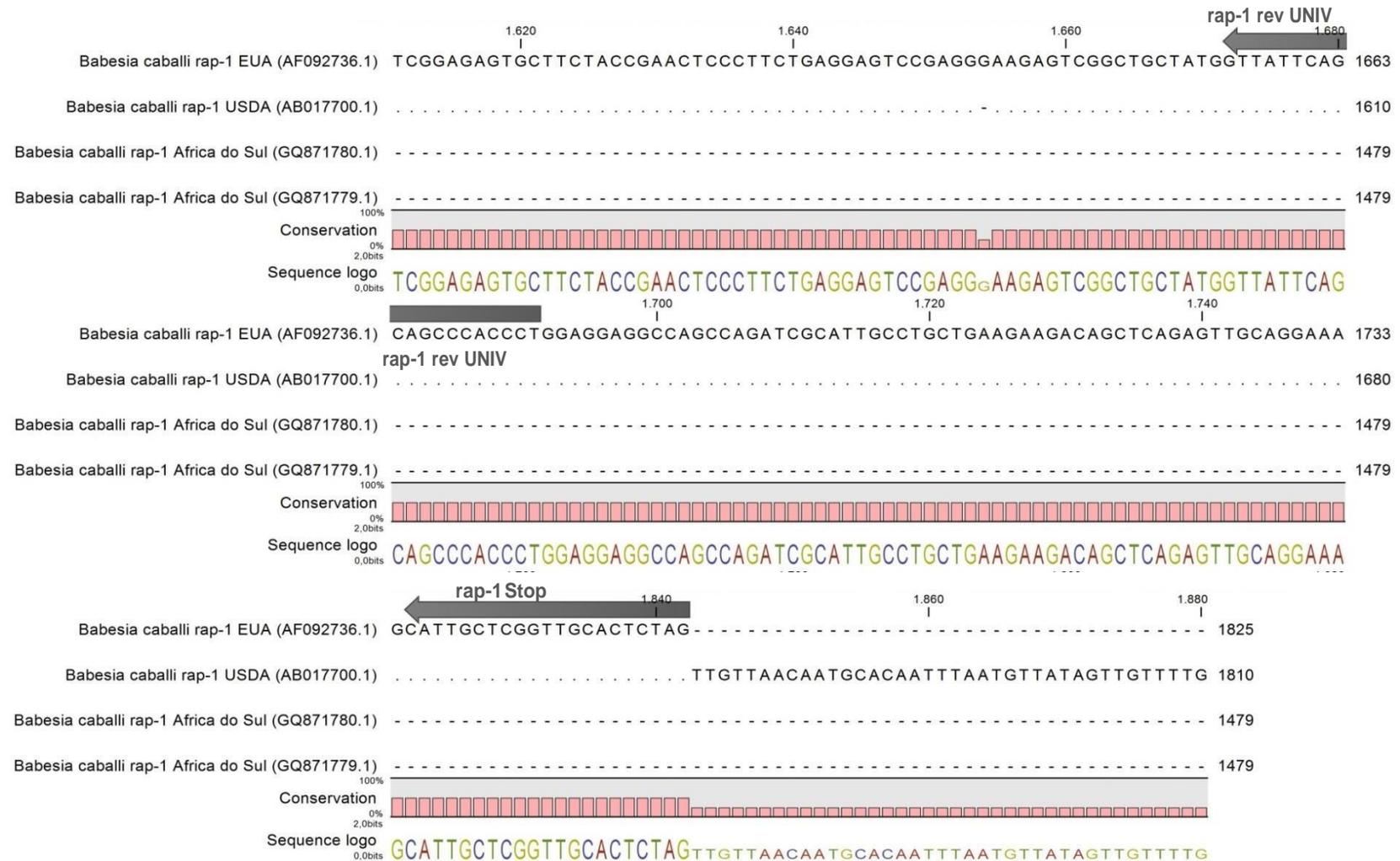




**Anexo IV** – Posição dos “primers” desenhados para o gene *rap-1* de *Babesia caballi* em relação às sequências completas do referido gene de amostras dos EUA e África do Sul, do nucleotídeo 1401 ao 1479.



**Anexo V** – Posição dos “primers” desenhados para o gene *rap-1* de *Babesia caballi* em relação às sequências completas do referido gene de amostras dos EUA e África do Sul, do nucleotídeo 1611 ao 1825.



**Anexo VI – Matriz de similaridade e número de pontos de mutação de aminoácidos não sinônima baseada no fragmento de 152 aminoácidos do gene *rap-1* de *Babesia caballi* das amostras do Brasil, Porto Rico, Egito, Israel e África do Sul.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
Babesia_caballi/USDA_(AB017700)	1		100.00	99.34	90.73	98.68	76.82	76.82	76.82	92.05	78.15	76.16	76.16	76.82	78.15	96.69	94.04	92.05	93.38	94.04	96.69	98.01	96.69	97.35	96.69	98.01	96.69	98.01	98.01	93.38	98.68	98.68	95.36	97.35	99.34	93.38	97.35	98.01	93.38	99.34	
Babesia_caballi/USA_(AF092736)	2	0		99.34	90.73	98.68	76.82	76.82	76.82	92.05	78.15	76.16	76.16	76.82	78.15	96.69	94.04	92.05	93.38	94.04	96.69	98.01	96.69	97.35	96.69	98.01	96.69	98.01	98.01	93.38	98.68	98.68	95.36	97.35	99.34	93.38	97.35	98.01	93.38	99.34	
Babesia_caballi/Egypt_(KR811095)	3	1	1		91.39	98.01	77.48	77.48	77.48	92.72	78.81	76.82	76.82	77.48	78.81	97.35	93.38	92.72	94.04	94.70	97.35	96.03	98.01	97.35	96.03	97.35	98.68	94.04	98.01	96.03	96.69	98.68	94.04	96.69	98.68	94.04	96.69	98.68	94.04	96.69	
Babesia_caballi/Egypt_(KR811096)	4	14	14	13		89.40	77.48	77.48	77.48	98.68	78.15	76.82	76.82	77.48	78.15	94.04	96.69	98.68	97.35	96.69	94.04	92.72	94.04	93.38	94.04	92.72	94.04	92.72	92.72	97.35	92.05	92.05	95.36	93.38	91.39	97.35	93.38	92.72	97.35	91.39	
Babesia_caballi/Egypt_(KR811097)	5	2	2	3	16		76.82	76.82	76.82	90.73	76.82	76.16	76.16	76.82	76.82	95.36	92.72	90.73	92.05	92.72	95.36	96.69	95.36	96.03	95.36	96.69	95.36	96.69	92.05	97.35	97.35	94.04	96.03	98.01	92.05	96.03	96.69	92.05	98.01		
Babesia_caballi/Israel_(KF059875)	6	35	35	34	34	35		100.00	100.00	77.48	92.00	99.33	99.33	100.00	92.00	76.16	76.16	77.48	78.81	77.48	77.48	77.48	74.83	78.15	77.48	75.50	74.83	77.48	78.15	77.48	77.48	76.82	76.82	76.82	77.48	75.50	76.82	76.82	76.16	77.48	
Babesia_caballi/Israel_(KF059876)	7	35	35	34	34	35	0		100.00	77.48	92.00	99.33	99.33	100.00	92.00	76.16	76.16	77.48	78.81	77.48	77.48	77.48	74.83	78.15	77.48	75.50	74.83	77.48	78.15	77.48	77.48	76.82	76.82	76.82	77.48	75.50	76.82	76.82	76.16	77.48	
Babesia_caballi/Israel_(KF059877)	8	35	35	34	34	35	0	0		77.48	92.00	99.33	99.33	100.00	92.00	76.16	76.16	77.48	78.81	77.48	77.48	77.48	74.83	78.15	77.48	75.50	74.83	77.48	78.15	77.48	77.48	76.82	76.82	76.82	77.48	75.50	76.82	76.82	76.16	77.48	
Babesia_caballi/Puerto_Rico_(EU669865)	9	12	12	11	2	14	34	34	34		78.15	76.82	76.82	77.48	78.15	95.36	98.01	100.00	98.68	98.01	95.36	94.04	95.36	94.70	95.36	94.04	94.04	98.68	93.38	93.38	96.69	94.70	92.72	98.68	94.70	94.04	98.68	92.72	92.72		
Babesia_caballi/South_Africa_(G0871178)	10	33	33	32	33	35	12	12	12	33		91.33	91.33	92.00	100.00	77.48	76.82	78.15	79.47	78.15	78.81	78.81	76.16	79.47	78.81	76.82	76.16	78.81	79.47	78.15	78.81	78.81	78.15	78.15	78.15	78.15	76.82	78.15	78.15	77.48	78.81
Babesia_caballi/South_Africa_(G0871179)	11	36	36	35	35	36	1	1	1	35	13		98.67	99.33	91.33	75.50	75.50	76.82	78.15	76.82	76.82	74.17	77.48	76.82	74.83	74.17	76.82	77.48	76.82	76.82	76.16	76.16	76.16	76.82	74.83	76.16	76.16	75.50	76.82		
Babesia_caballi/South_Africa_(G0871180)	12	36	36	35	35	36	1	1	1	35	13	2		99.33	91.33	75.50	75.50	76.82	78.15	76.82	76.82	74.17	77.48	76.82	74.83	74.17	76.82	77.48	76.82	76.82	76.16	76.16	76.16	76.82	74.83	76.16	76.16	75.50	76.82		
Babesia_caballi/Israel_(KF059879)	13	35	35	34	34	35	0	0	0	34	12	1	1		92.00	76.16	76.16	77.48	78.81	77.48	77.48	77.48	74.83	78.15	77.48	75.50	74.83	77.48	78.15	77.48	77.48	76.82	76.82	76.82	77.48	75.50	76.82	76.82	76.16	77.48	
Babesia_caballi/Israel_(KF059878)	14	33	33	32	33	35	12	12	12	33	0	13	13	12		77.48	76.82	78.15	79.47	78.15	78.81	78.81	76.16	79.47	78.81	76.82	76.16	78.81	79.47	78.15	78.81	78.81	78.15	78.15	78.15	78.15	76.82	78.15	78.15	77.48	78.81
Babesia_caballi/Brazil_2	15	5	5	4	9	7	36	36	36	7	34	37	37	36	34		94.70	95.36	95.36	96.03	98.68	97.35	98.68	98.01	98.68	98.68	98.68	97.35	97.35	96.69	96.69	96.69	97.35	98.01	97.35	96.69	99.34	98.68	96.69	97.35	96.03
Babesia_caballi/Brazil_9_clone_1	16	9	9	10	5	11	36	36	36	3	35	37	37	36	35	8		98.01	96.69	97.35	94.70	94.70	96.03	94.04	94.70	96.03	96.03	94.70	94.70	96.69	95.36	95.36	96.03	95.36	94.70	96.69	95.36	94.70	96.69	94.70	
Babesia_caballi/Brazil_9_clone_2	17	12	12	11	2	14	34	34	34	0	33	35	35	34	33	7	3		98.68	98.01	95.36	94.04	95.36	94.70	95.36	94.04	94.04	98.68	93.38	93.38	96.69	94.70	92.72	98.68	94.70	94.04	98.68	92.72	92.72		
Babesia_caballi/Brazil_9_clone_3	18	10	10	9	4	12	32	32	32	2	31	33	33	32	31	7	5	2		98.01	95.36	95.36	96.03	96.69	94.04	95.36	95.36	96.69	94.70	94.70	95.36	96.03	94.04	98.68	94.70	95.36	97.35	94.04	94.04		
Babesia_caballi/Brazil_9_clone_4	19	9	9	8	5	11	34	34	34	3	33	35	35	34	33	6	4	3	3		96.03	94.70	96.03	95.36	96.03	96.03	96.03	94.70	96.03	95.36	95.36	97.35	96.69	95.36	94.70	98.01	95.36	96.03	96.69	94.70	
Babesia_caballi/Brazil_10	20	5	5	4	9	7	34	34	34	7	32	35	35	34	32	2	8	7	7	6		98.68	97.35	99.34	98.68	97.35	97.35	98.68	98.68	96.69	98.01	98.01	97.35	98.01	97.35	96.69	98.01	97.35	96.69	96.03	97.35
Babesia_caballi/Brazil_28	21	3	3	4	11	5	37	37	37	9	35	38	38	37	35	2	8	9	7	8	2		97.35	99.34	98.68	97.35	97.35	100.00	98.68	95.36	99.34	96.03	99.34	98.68	95.36	98.01	97.35	95.36	97.35	98.68	
Babesia_caballi/Brazil_34	22	5	5	6	9	7	38	38	38	7	36	39	39	38	36	2	6	7	7	6	4	4		96.69	97.35	98.68	100.00	97.35	96.03	96.69	96.69	96.69	96.03	98.01	97.35	96.69	99.34	97.35	96.69	97.35	96.03
Babesia_caballi/Brazil_42	23	4	4	3	10	6	33	33	33	8	31	34	34	33	31	3	9	8	6	7	1	1	5		99.34	96.69	96.69	99.34	99.34	96.03	98.68	98.68	96.69	98.68	98.01	96.03	97.35	98.01	96.03	96.69	98.01
Babesia_caballi/Brazil_56	24	5	5	4	9	7	34	34	34	7	32	35	35	34	32	2	8	7	5	6	2	2	4	1		97.35	97.35	98.68	98.68	96.69	98.01	98.01	97.35	99.34	97.35	96.69	98.01	98.68	96.69	97.35	
Babesia_caballi/Brazil_63	25	3	3	4	11	5	37	37	37	9	35	38	38	37	35	2	8	9	7	8	2		97.35	99.34	98.68	97.35	97.35	100.00	98.68	95.36	99.34	96.03	99.34	98.68	95.36	98.01	97.35	95.36	97.35	98.68	
Babesia_caballi/Brazil_68	26	5	5	6	9	7	38	38	38	7	36	39	39	38	36	2	6	7	7	6	4	4	0	5	4	2		97.35	96.03	96.69	96.69	96.03	98.01	97.35	96.69	99.34	97.35	96.69	97.35	96.03	
Babesia_caballi/Brazil_69	27	3	3	4	11	5	34	34	34	9	32	35	35	34	32	4	8	9	7	8	2	0	4	1	2	4	4		98.68	95.36	99.34	99.34	96.03	98.68	95.36	98.01	97.35	95.36	97.35	98.68	
Babesia_caballi/Brazil_71	28	3	3	2	11	5	33	33	33	9	31	34	34	33	31	4	8	9	7	6	2	2	6	1	2	4	6	2		95.36	99.34	99.34	97.35	98.01	98.68	95.36	96.69	98.68	95.36	97.35	98.68
Babesia_caballi/Brazil_79	29	10	10	9	4	12	34	34	34	2	33	35	35	34	33	5	5	2	2	3	5	7	5	6	5	7	5	7	7		94.70	94.70	96.69	96.03	94.04	100.00	96.03	95.36	98.68	94.04	
Babesia_caballi/Brazil_81	30	2																																							



**Anexo VIII**– Localização dos pontos de mutação nas sequências de aminoácidos do gene *rap-1* de *Babesia caballi* deste estudo em relação à sequência dos EUA (BAA83725.1). As sequências do presente estudo se posicionaram entre o 94° e o 246° aminoácidos. Continuação.

163°

168° 170°

180°

187°

201°

237°

**Anexo IX**– Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas da experimentação 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:

<b>Vigência do projeto:</b> 08/2015 a 08/2017
<b>Espécie/linhagem:</b> Bovino / Coelho / Equideo
<b>Nº de animais:</b> 2 / 20 / 4
<b>Sexo:</b> Machos e Fêmeas
<b>Origem:</b> 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-Coodenador CEUA-IV

**Anexo X** - Protocolo modificado do Kit de Extração Dneasy Blood and Tissue Kit – Qiagen utilizado em amostras de carrapatos inteiros, tecidos de carrapatos e ovos

- 1 Pré-aqueça o “termomixer” ou banho-maria à 56°C.
- 2 Coloque o **carrapato inteiro/ovos** em um tubo de 2,0 mL e os **tecidos dissecados** em tubos de 1,5 mL.
- 3 Pipetar 180 µL da solução tampão ATL (macerar em 80µL e usar os outros 100µL para lavar o objeto).
- 4 Macerar os **carrapatos inteiros/ovos** com bastão de vidro estéril e os **tecidos dissecados** com a ponteira de 1 mL queimada na extremidade.
- 5 Vortex por 15 segundos para homogeneizar.
- 6 Pipetar 20µL de proteinase K (Qiagen).
- 7 Vortex por 15 segundos para homogeneizar.
- 8 Colocar os tubos no “termomixer” ou banho-maria com a seguinte programação: 56°C por 2 horas, homogeneizando por 25 segundos de 10 em 10 minutos.
- 9 Retirar do aquecimento e adicionar 1,5µL de RNAse (100 mg/mL) – Promega.
- 10 Incubar em temperatura ambiente por 5 minutos.
- 11 Adicionar 200µL de solução de tampão AL.
- 12 Vortex por 15 segundos para homogeneizar.
- 13 Centrifugar à 8.000 rpm por 1 minuto e pipetar somente o sobrenadante para outro tubo. Descartar o tubo antigo com o sedimento.
- 14 Adicionar 230µL de etanol 100% e homogeneizar por inversão por 1 minuto.
- 15 Pipetar toda a amostra para uma coluna de sílica com tubo de 2 mL coletor embaixo.
- 16 Centrifugar à 8.000 rpm por 1 minuto.
- 17 Descartar o tubo coletor e seu conteúdo e preservar a coluna em um novo tubo coletor.
- 18 Adicionar 500µL de tampão AW1 na coluna.
- 19 Centrifugar à 8.000 rpm por 1 minutos.
- 20 Descartar o tubo coletor e seu conteúdo e preservar a coluna em um novo tubo coletor.
- 21 Adicionar 500µL de tampão AW2 na coluna.
- 22 Centrifugar em velocidade máxima (14.000 rpm) por 3 minutos;
- 23 Descartar o tubo coletor e seu conteúdo e preservar a coluna em um novo tubo de 1,5mL.
- 24 Pipetar 50 µL de tampão AE na coluna para eluição.
- 25 Incubar por 2 minutos no ambiente.
- 26 Centrifugar à 8.000 rpm por 1 minuto.
- 27 Inverter o tubo à 180° e centrifugar por mais 1 minuto na mesma velocidade.