

Diagnóstico Molecular e Análise Filogenética de Isolados Brasileiros de *Trypanosoma vivax* Baseado na Reação da Polimerase em Cadeia – PCR

Claudio Roberto Madruga¹
Flávio Ribeiro de Araújo²
Cleber Oliveira Soares³
Elaine Silva de Pádua Melo⁴
Danielle Andrade Almeida⁵
Nalvo Franco de Almeida Júnior⁶
Mauro Aparecido Silva Xavier⁷
Ana Luíza Alves Osório⁸
Gustavo Góes-Cavalcante⁹
Carlos Alberto do Nascimento Ramos¹⁰

Introdução

As infecções por *Trypanosoma* sp. apresentam grande importância econômica, afetando o desenvolvimento da pecuária em grandes áreas da África e da América do Sul (Jones & Dávila, 2001). No Brasil, surtos de tripanossomose têm sido relatados nas regiões Norte (Shaw & Lainson, 1972) e Centro-Oeste, Pantanal (Silva et al., 1996), com consideráveis prejuízos.

Os exames parasitológicos de Woo ou de esfregaço de sangue corado são os mais utilizados para detecção das infecções por *Trypanosoma* em bovinos. Testes de imunoabsorção enzimática com anticorpo monoclonal para captura de antígenos de tripanossomos foram desenvolvidos (Nantulya & Lindqvist, 1989) e têm sido avaliados em diversos países da África e na América Latina (Rebeski et

al., 1996). Apesar de apresentarem elevada especificidade, nenhuma dessas técnicas apresenta sensibilidade satisfatória, sobretudo na fase crônica da infecção.

Nos últimos anos, as técnicas moleculares e, em particular, a reação da polimerase em cadeia – PCR – aumentaram consideravelmente a sensibilidade dos métodos diretos de diagnóstico. Portanto, a PCR tornou-se uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos, possibilitando a detecção de portadores crônicos com parasitemias abaixo do limite de detecção de técnicas parasitológicas tradicionais (Desquesnes & Tresse, 1996; Almeida et al., 1997).

Variações da PCR convencional, como a associação com a técnica de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism* – RFLP), podem ser empregadas para diferenciação entre parasitos de

¹ Méd.-Vet., Ph.D., CRMV-MS N° 0587, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: madruga@cnpqc.embrapa.br

² Méd.-Vet., M.Sc., CRMV-MS N° 1.895, Embrapa Gado de Corte. Correio eletrônico: flavio@cnpqc.embrapa.br

³ Méd.-Vet., Ph.D., CRMV-RJ N° 5.344, Embrapa Gado de Corte. Correio eletrônico: cleber@cnpqc.embrapa.br

⁴ Estudante de graduação em Biologia da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS. Bolsista de Iniciação Científica da Fundect-CNPq.

⁵ Méda.-Veta., Bolsista de Apoio Técnico da Fundect-CNPq.

⁶ Matemático, Ph.D., Professor adjunto do Departamento de Computação e Estatística, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Caixa Postal 549, CEP 79070-900 Campo Grande, MS. Endereço eletrônico: nalvo@dtc.ufms.br

⁷ Biólogo, Ph.D., Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília. Brasília, DF

⁸ Méda.-Veta., Ph.D., Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Caixa Postal 549, CEP 79070-900 Campo Grande, MS.

espécies distintas, sem a necessidade do conhecimento prévio da seqüência do ácido desoxirribonucléico – DNA – genômico da espécie a ser diagnosticada ou do uso de sondas de DNA específicas (Geysen et al., 2003).

Nesse sentido, o gene 18S rRNA é um candidato ideal para essa abordagem, já que constitui um mosaico de seqüências altamente conservadas espécie-específicas, presentes em um locus multicópia (Geysen et al., 2003). Ademais, a PCR permite análise do genoma do parasito por seqüenciamento do produto amplificado, possibilitando estudos filogenéticos e de epidemiologia molecular.

Nesse contexto, baseado em seqüência do gene 18S rRNA, este estudo teve o objetivo de avaliar a técnica de PCR e PCR-RFLP para diagnóstico das infecções por *T. vivax* em bovinos no Brasil, para diagnóstico diferencial de *T. evansi* e, por meio de seqüenciamento do produto dessa amplificação *in vitro*, realizar um estudo molecular e filogenético com os isolados estudados.

Metodologia

A extração de DNA genômico dos isolados criopreservados de *T. vivax* do Pará (Belém) e dos Pantanaís de Mato Grosso (Poconé) e de Mato Grosso do Sul (Aquidauana), bem como do isolado de *T. evansi* do Pantanal de Mato Grosso do Sul, foi feita com o *kit Easy DNA* (Invitrogen). Para amplificação por PCR do fragmento do gene 18S rRNA, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 18STNF2 5' CAACGATGACCCCATGAATTGGGGA 3' e 18STNR3 5' TGCGCGACCAATAATTGCAATAC 3' (Geysen et al., 2003).

As reações foram feitas em volume de 50 µL e em duplicata, contendo 100 ng de DNA genômico, 10 mM de tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 100 ng de cada oligonucleotídeo iniciador e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase. O protocolo da PCR consistiu em: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto e 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores a 58°C, por 1,5 minuto; e extensão a 72°C por 2 minutos.

Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Em seguida, foram ligados ao plasmídeo pTrcHis-TOPO (Invitrogen) para transformação de células *Escherichia coli* TOP10. Após seleção dos clones, realizou-se extração de plasmídeos com *kit* Miniplasmid Prep (MoBio). As reações de seqüenciamento foram realizadas pelo método de díedoxi e analisadas em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), na Universidade de Brasília.

As seqüências de 18S rRNA de isolados brasileiros de *T. vivax*, geradas neste estudo, e africanos de *T. vivax* e *T.*

evansi, disponíveis no GenBank nr (números de acesso: U22316, AJ009154, D89527, U75507), limitadas pelos oligonucleotídeos iniciadores 18STNF2 e 18STNR3, foram analisadas quanto à presença de sítios de restrição pelo programa MapDraw/DNAStar. Baseado nesta análise, a enzima *Alu* I foi selecionada para digestão, já que produz padrões de restrição distintos entre *T. vivax* e *T. evansi*.

Uma alíquota de 50 µL de cada produto de PCR foi digerida com enzima de restrição *Alu* I (10 U/µL – Invitrogen), por 12 horas, a 37°C. As alíquotas não digeridas e digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão tris-acetato-EDTA, corado em brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A determinação do tamanho dos fragmentos de DNA foi feita após fotografia do gel, em programa AlphaDigiDoc (Alfa Innotech).

Resultados e discussão

Os fragmentos de DNA dos isolados de *T. vivax* e *T. evansi* amplificados por PCR apresentaram tamanhos de 659 e 764 pb, respectivamente. Portanto, essa PCR convencional diferencia essas duas espécies de tripanossomos que infectam bovinos. Após clonagem e seqüenciamento, o alinhamento múltiplo das seqüências de isolados brasileiros de *T. vivax* pelo programa ClustalW permitiu a análise de fragmentos de 574 pb, os quais apresentaram identidade de 100% (Fig. 1). Usando BLASTn, os fragmentos apresentaram alinhamentos significativos com seqüências de 18S rRNA de *Trypanosoma* sp. presentes no banco nr (NCBI).

Foram selecionadas, a partir do GenBank, as seqüências de 18S rRNA de *T. vivax*, *T. evansi* e *T. theileri*, que são as espécies que infectam bovinos no Brasil. Um alinhamento múltiplo do total das seqüências, assim como uma árvore filogenética (Fig. 2), foi gerado usando, respectivamente, os programas ClustalW e Mega (máxima parcimônia, 1.000 replicações de *bootstrap*), demonstrando conservação entre os isolados brasileiros e o africano de *T. vivax* e, ao mesmo tempo, diferenciação das outras duas espécies.

Após digestão dos produtos de PCR com *Alu* I, os fragmentos de 18S rRNA digeridos de *T. vivax* apresentaram tamanhos de 547 e 112 pb; enquanto os de *T. evansi* foram de 323, 250 e 191 pb (Fig. 3). Os padrões de digestão encontrados neste estudo são idênticos aos esperados pela análise *in silico* de fragmentos de 18S rRNA de isolados africanos de *T. vivax* e *T. evansi*, delimitados pelos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, e permitiram a diferenciação entre as duas espécies. O padrão de restrição observado em diferentes isolados brasileiros de *T. vivax* foi idêntico, o que é compatível com a natureza conservada de 18S rRNA.

TvivaxPocone	GCGCGCGCGCTCGCTCCACCAACCATCACGTGCACATTCTTTGGCGGGCTTCGGCCCCG 60
TvivaxPara	GCGCGCGCGCTCGCTCCACCAACCATCACGTGCACATTCTTTGGCGGGCTTCGGCCCCG 60
TvivaxAquidauana	GCGCGCGCGCTCGCTCCACCAACCATCACGTGCACATTCTTTGGCGGGCTTCGGCCCCG 60

TvivaxPocone	CCGCTACGGGAATGCCTCAGCACGTCTCACTGCCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGT 120
TvivaxPara	CCGCTACGGGAATGCCTCAGCACGTCTCACTGCCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGT 120
TvivaxAquidauana	CCGCTACGGGAATGCCTCAGCACGTCTCACTGCCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGT 120

TvivaxPocone	CTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATTGACGGGAATGGCACCACA 180
TvivaxPara	CTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATTGACGGGAATGGCACCACA 180
TvivaxAquidauana	CTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATTGACGGGAATGGCACCACA 180

TvivaxPocone	AGACGTGGAGCGTGCCTTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCCGGACAG 240
TvivaxPara	AGACGTGGAGCGTGCCTTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCCGGACAG 240
TvivaxAquidauana	AGACGTGGAGCGTGCCTTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCCGGACAG 240

TvivaxPocone	GGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTCTTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGC 300
TvivaxPara	GGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTCTTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGC 300
TvivaxAquidauana	GGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTCTTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGC 300

TvivaxPocone	TTTGGTCCGGTGGAGTGATTGTTTGGTTGATTCCGTCACGGACGAGATCCAGGCCGCC 360
TvivaxPara	TTTGGTCCGGTGGAGTGATTGTTTGGTTGATTCCGTCACGGACGAGATCCAGGCCGCC 360
TvivaxAquidauana	TTTGGTCCGGTGGAGTGATTGTTTGGTTGATTCCGTCACGGACGAGATCCAGGCCGCC 360

TvivaxPocone	CAGTAGGCCCCAGGATCACGCACAGGACAGCAGCACGGTGGCGGGCCCTCGGGCCCAACG 420
TvivaxPara	CAGTAGGCCCCAGGATCACGCACAGGACAGCAGCACGGTGGCGGGCCCTCGGGCCCAACG 420
TvivaxAquidauana	CAGTAGGCCCCAGGATCACGCACAGGACAGCAGCACGGTGGCGGGCCCTCGGGCCCAACG 420

TvivaxPocone	CCGTCCGCATCCGGTTCGGGGCCTTCTCTGCGGGATTCCCTGCACGCGCAAGGTGAGATGC 480
TvivaxPara	CCGTCCGCATCCGGTTCGGGGCCTTCTCTGCGGGATTCCCTGCACGCGCAAGGTGAGATGC 480
TvivaxAquidauana	CCGTCCGCATCCGGTTCGGGGCCTTCTCTGCGGGATTCCCTGCACGCGCAAGGTGAGATGC 480

TvivaxPocone	TGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCGATGCTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGT 540
TvivaxPara	TGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCGATGCTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGT 540
TvivaxAquidauana	TGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCGATGCTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGT 540

TvivaxPocone	CAGTGGGAACAAGACACGGCTCGCCGCGCCCG 574
TvivaxPara	CAGTGGGAACAAGACACGGCTCGCCGCGCCCG 574
TvivaxAquidauana	CAGTGGGAACAAGACACGGCTCGCCGCGCCCG 574

Fig. 1. Alinhamento das seqüências de 18S rRNA de isolados brasileiros de *Trypanosoma vivax*.

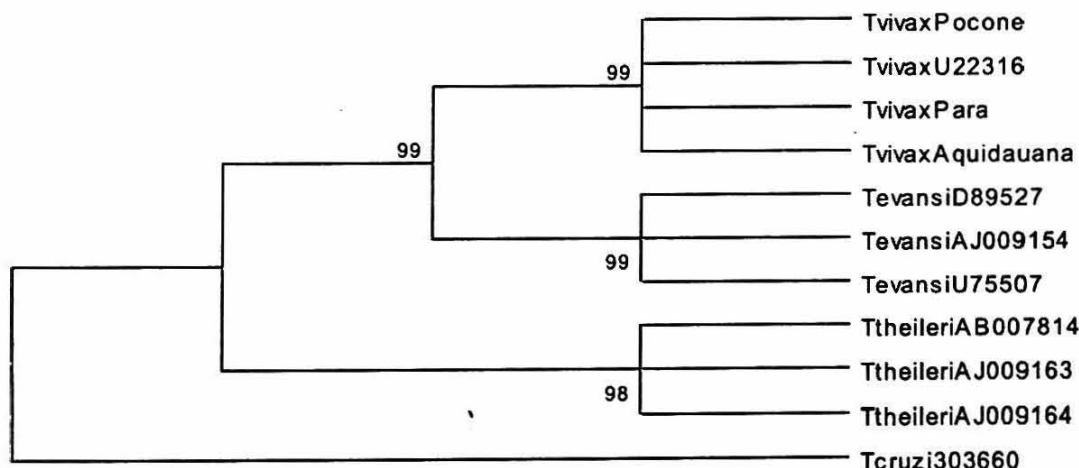


Fig. 2. Árvore filogenética pelo método de máxima parcimônia com seqüências de 18S rRNA de *Trypanosoma vivax*, *T. evansi* e *T. theileri*.

Obs.: 18S rRNA de *Trypanosoma cruzi* foi selecionado como *outgroup*.

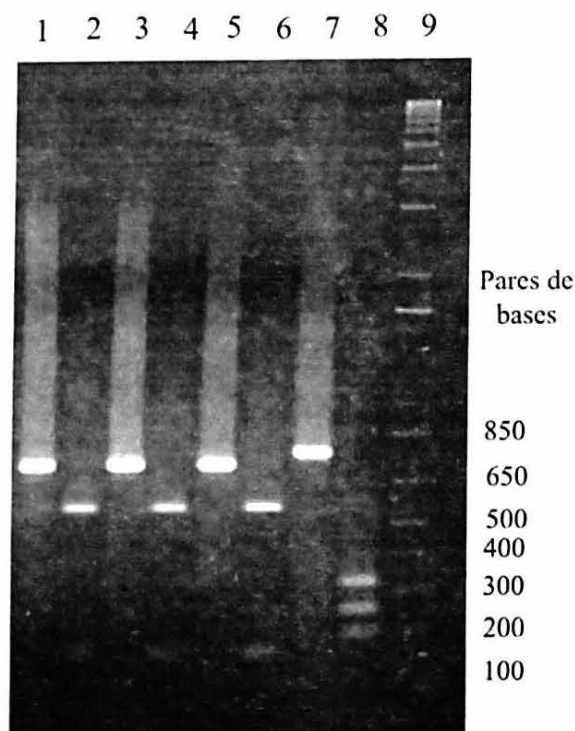


Fig. 3. Digestão de fragmentos de 18S rRNA de *Trypanosoma vivax* e *T. evansi*, amplificados por PCR, com *Alu I*. Linha 1: 18 S rRNA de *T. vivax* isolado Pará; linha 2: 18S rRNA de *T. vivax* isolado Pará digerido com *Alu I*; linha 3: 18S rRNA de *T. vivax* isolado Poconé; linha 4: 18 S rRNA de *T. vivax* isolado Poconé digerido com *Alu I*; linha 5: 18S rRNA de *T. vivax* isolado Aquidauana; linha 6: 18S rRNA de *T. vivax* isolado Aquidauana digerido com *Alu I*; linha 7: 18S rRNA de *T. evansi*; linha 8: 18S rRNA de *T. evansi* isolado digerido com *Alu I*; linha 9: marcador de pares de bases (1 kb plus, Invitrogen).

Este estudo preliminar deverá envolver ainda o seqüenciamento de 18S rRNA de outros isolados de *T. vivax* brasileiros, de *T. evansi* e *T. theileri*, assim como a análise por PCR-RFLP de fragmento de 18S rRNA de *T. theileri*, já que esta espécie também infecta bovinos no Brasil. A análise *in silico* das seqüências de 18S rRNA de *T. theileri*, disponíveis no GenBank nr, mostrou que a digestão do fragmento limitado pelos oligonucleotídeos, utilizados neste estudo com *Alu I*, também produz padrão de restrição distinto daqueles observados em *T. vivax* e *T. evansi*, porém é necessária a realização de estudo *in vitro* com isolados brasileiros desta espécie.

Conclusões

A PCR convencional e a PCR-RFLP possibilitam o diagnóstico diferencial entre os isolados brasileiros de *T. vivax* e *T. evansi*.

Com relação ao gene 18S rRNA, os isolados brasileiros de *T. vivax* não apresentam polimorfismo e são idênticos filogeneticamente.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, P. J.; NDAO, M.; VAN MEIRVENNE, N.; GEERTS, S. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Acta Tropica*, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 45-50, 1997.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation of sensitivity of PCR for detecting DNA of *Trypanosoma vivax* with several methods of blood sample preparations. *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, Paris, v. 49, n. 4, p. 322-327, 1996.

GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR-RFLP using *Ssu-rDNA* amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 110, n. 4, p. 171-180, 2003.

JONES, T. W.; DÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma vivax* – out of Africa. *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 17, n. 2, p. 99-101, 2001.

NANTULYA, V. M.; LINDQVIST, K. J. Antigen detection enzyme linked immunoassay for the diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense*, and *T. brucei* infections in cattle. *Tropical Medicine and Parasitology*, Stuttgart, v. 40, n. 3, p. 267-272, 1989.

REBESKI, D. E.; WINGER, E. M.; DWINGER, R. H. Performance of a direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of trypanosomal antigens. Antigen ELISAs for Trypanosomes. In: WORKSHOP HELD AT ILRI, 1996, Nairobi. *Proceedings...* p. 31-38.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Liverpool, v. 66, n. 1, p. 25-32, 1972.

SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; FREITAS, J.; MESQUITA, D.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 9, n. 9, p. 561-562, 1996.

Agradecimentos

Este projeto teve suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – e da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – Fundect.

Agradecemos à Dra. Maria Elisabeth Moraes Cavalheiro Dorval, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS –, pela doação do isolado de *Trypanosoma evansi*.

Comunicado Técnico, 84

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Corte
Endereço: Rodovia BR 262, km 4, Caixa Postal 164
79002-970 Campo Grande, MS
Fone: (67) 368 2083
Fax: (67) 368 2180
E-mail: publicacoes@cnpgc.embrapa.br

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição
1ª Impressão (2003): 500 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Ivo Martins Cezar
Secretário-Executivo: Líana Jank
Membros: Antonio do Nascimento Rosa, Arnildo Pott,
Ecile Caroline N. Z. Lima, José Raul Valério, Lúcia
Getto, Maria Antonia M. de U. Chira, Rosângela
Maria S. Rosendo, Tênisson W. de Souza

Expediente

Supervisor editorial: Ecile Caroline N. Z. Lima
Revisão de texto: Lúcia Helena Paula do Couto
Edição eletrônica: Ecile Caroline N. Z. Lima