

RAN0005 - AVALIAÇÃO DE NOVOS PRIMERS UNIVERSAIS DO GENE RRNA 18S E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE 37 GENÓTIPOS DE CRYPTOSPORIDIUM

Autores: Willame Rodrigues Do Nascimento Sousa - 1ºAutor (UFPI- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI); Carlos Syllas Monteiro Luz - Co-Autor (UFPI- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI); Dra. Tania Maria Leal - Co-Autor (EMBRAPA MEIO NORTE); Geice Ribeiro Da Silva - Co-Autor (UFPI- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI); Dr. Fabio Mendonca Diniz - Orientador (EMBRAPA CAPRINOS) E OVINOS

Área: Agropecuária **Tipo:** Pesquisa **Nível:** Pós-graduação **STA2:** Não

Resumo: Cryptosporidium são protozoários parasitas monoxenos, que invadem a parede do epitélio gastrointestinal dos hospedeiros, causando diarreia, provocando danos à saúde dos animais e perdas econômicas aos produtores. A identificação e caracterização genética desses patógenos, podem auxiliar em estratégias de prevenção e controle, tanto em hospedeiros humanos como em animais domésticos. Diante disso, os marcadores moleculares tornam-se ferramentas pertinentes, tanto para estudos de caracterização, estudos evolutivos e diagnóstico de doenças. Assim, por meio desse estudo, objetivou-se desenvolver marcadores moleculares que permitissem identificar e, caracterizar espécies de Cryptosporidium por meio do polimorfismo do gene que codifica o RNA ribossômico da subunidade 18S. Para investigar as relações evolutivas e, o polimorfismo genético da subunidade menor do gene rRNA 18S no gênero, pares de iniciadores foram projetados com base em 37 sequências de DNA, disponíveis no banco de dados internacional (genBank/ NCBI). Adotou-se para o desenho de primers o software web Primer3. O editor de alinhamento de sequências BioEdit v7.2.3 foi empregado para a identificação das regiões conservadas, adotando-se o alinhamento de sequências múltiplas (MSA) com o algoritmo ClustalW, de forma a projetar primers nas regiões terminais de parte do gene. Depois de selecionados os primers, todas as sequências foram submetidas a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) in silico de forma a obterem sequências, que posteriormente fossem submetidas a inferências no pacote dos softwares DNAsp v.5.0 e MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versão 7), a fim de obter análise de divergências e relações filogenéticas entre diferentes genótipos de Cryptosporidium. Duas regiões conservadas foram identificadas da sequência consenso. Com a PCR in silico, empregando os primers obtidos, forward 5'-AGCTTTAGACGGTAGGGTATTGG-3' e reverse 5'-ATCCCCTAACTTTTCGTT- 3', a amplificação confirmou produtos variando entre 645 a 661 pb em 31 espécies do gênero Cryptosporidium, presente em diferentes hospedeiros: Cryptosporidium parvum, C. hominis, C. suis, C. andersoni, C. meleagridis, C. canis, C. scrofarum, C. ryanae, C. bovis, C. xiaoi, C. avian, C. avium, C. serpentis e C. galli. A esse grupo foram adicionados mais cinco genótipos desconhecidos oriundos de cavalo, coala, porco, coelho e um subgrupo da espécie C. avian (genótipo V). Foram revelados 30 haplótipos, com 101 locais polimórficos, sendo 18 singleton e 83 sítios informativos parsimônia. A diversidade haplotípica (Hd) foi de 0,988 e a diversidade nucleotídica (Pi) foi de 0,052. Foi obtido um sinal filogenético consistente que suporta uma filogenia bem resolvida desse gene. Na árvore filogenética, as diferentes espécies de Cryptosporidium foram reunidas em dois grupos, sendo que um dos grupos apresentou sete espécies (C. testudinis, C. serpentis, C. andersoni, C. fragile, C. galli, C. proliferans e C. muris) e a outra maior, com 24 espécies, divididas em diferentes subgrupos. A congruência das relações filogenéticas obtidas sugere que a sequências do gene do rRNA 18S, obtidas pelo par de primers aqui desenvolvidos, pode ser útil como marcador para estudos de filogenia molecular no gênero Cryptosporidium.

Keywords: Cryptosporidium, diversidade genética, marcadores moleculares, gene rRNA 18S, filogenia molecular.