

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE LARANJEIRAS DO SUL**

LUIZ EDUARDO BENVENUTTI BABARESCO

**ANÁLISE DE DNA DO APARELHO BUCAL DE TABANÍDEOS PARA DETECÇÃO
DE *Trypanosoma evansi***

LARANJEIRAS DO SUL

2022

LUIZ EDUARDO BENVENUTTI BABARESCO

**ANÁLISE DE DNA DO APARELHO BUCAL DE TABANÍDEOS PARA DETECÇÃO
DE *Trypanosoma evansi***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Licenciado.

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS JOSÉ RAUPP RAMOS

LARANJEIRAS DO SUL

2022

LUIZ EDUARDO BENVENUTTI BABARESCO

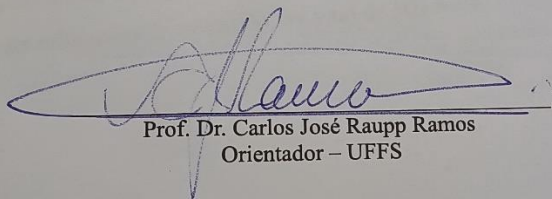
ANÁLISE DE DNA DO APARELHO BUCAL DE TABANÍDEOS PARA DETECÇÃO DE *Trypanosoma evansi*

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para a obtenção do grau de Licenciado(a) em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Laranjeiras do Sul.

Orientador: Carlos José Raupp Ramos

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 13/07/2023

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos José Raupp Ramos
Orientador – UFFS

Documento assinado digitalmente
gov.br SILVIA ROMAO
Data: 19/07/2023 10:09:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Sílvia Romão
UFFS

Documento assinado digitalmente
gov.br GABRIELLA BASSI DAS NEVES
Data: 18/07/2023 18:24:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Gabriella Bassi das Neves
UNIFACVEST

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Babaresco, Luiz Eduardo Benvenuto

Análise de DNA do aparelho bucal de tabanídeos para
detecção de *Trypanosoma evansi* / Luiz Eduardo Benvenuto
Babaresco. -- 2023.
25 f.:il.

Orientador: Doutor Carlos José Raupp Ramos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Licenciatura em Ciências Biológicas, Laranjeiras do
Sul, PR, 2023.

1. Biologia Molecular. 2. *Trypanosoma evansi*. 3.
Eletroforese. I. Ramos, Carlos José Raupp, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
2	OBJETIVOS	5
2.1	OBJETIVO GERAL	5
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3	REFERENCIAL TEÓRICO	5
3.1	DESCRIÇÃO GERAL DOS INSETOS – TABANÍDEOS.....	5
3.2	INSETOS COMO VETORES MECÂNICOS	7
3.3	<i>Trypanosoma evansi</i>	7
3.4	BIOLOGIA MOLECULAR NA DETECÇÃO DE TRIPANOSSOMATÍDEOS	9
4	METODOLOGIA.....	10
4.1	DESCRIÇÃO DA REGIÃO A SER ESTUDADA.....	10
4.2	ANIMAIS	10
4.3	PRÉ EXTRAÇÃO DE DNA	10
4.4	PREPARAÇÃO DE REAGENTES	11
4.5	EXTRAÇÃO DE DNA	11
4.6	DETECÇÃO DE DNA DE <i>T. EVANSI</i> EXTRAÍDO DO APARELHO BUCAL DOS TABANÍDEOS	12
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
6	CONCLUSÃO	13
7	REFERÊNCIAS	14
8	ANEXO 1	18

RESUMO

As tripanossomoses são enfermidades mundialmente importantes para o homem e para animais. Equinos acometidos por tripanossomose, cujo agente etiológico é o *Trypanosoma evansi*, apresentam uma enfermidade conhecida como "surra" ou "mal das cadeiras", que pode causar paralisia dos membros posteriores. Torna-se importante a detecção do parasita por meio de técnicas moleculares, como PCR, para detectar o DNA do *T. evansi* em aparelho bucal de moscas da família tabanidae, vetores do parasita. Na região de Laranjeiras do Sul -PR, assim como em todo o Brasil, existem pouquíssimos estudos sobre *T. evansi* e tabanídeos. Para este estudo, foram coletados tabanídeos em propriedades selecionadas, na região de Laranjeiras do Sul - PR, levados ao laboratório de bioquímica da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) onde se procedeu extração de DNA do aparelho bucal de 2 espécies de tabanídeos, uma do gênero *Fidena spp.*, e também em *T. nebulosus ornativentris*, as mais frequentes nas coletas, e feito PCR para detecção de *T. evansi*, e a confirmação foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose, onde não foi detectada a presença do *T. evansi*.

Palavras-chave: Biologia Molecular – Eletroforese - Patógenos

ABSTRACT

Trypanosomoses are globally significant diseases for humans and animals. Horses affected by trypanosomiasis, transmitted by *Trypanosoma evansi*, present a condition known as "surra" or "mal das cadeiras," which can cause paralysis of the hind limbs. It is important to detect the parasite using molecular techniques such as PCR to detect *T. evansi* DNA in the mouthparts of tabanid flies, the parasite's vectors. In the Laranjeiras do Sul region, Paraná, as well as throughout Brazil, there are very few studies on *T. evansi* and tabanids. For this study, tabanid flies were collected from selected properties in the Laranjeiras do Sul region, Paraná, and taken to the biochemistry laboratory at the Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), where DNA was extracted from the mouthparts of the two most commonly collected tabanid species, and PCR was performed to detect *T. evansi*.

Key words: Molecular biology - Electrophoresis - Pathogens

1 INTRODUÇÃO

A classe insecta é a mais numerosa e diversificada do reino animal, sendo que, várias espécies podem atuar como vetores de inúmeros agentes patogênicos (ROCHA, SANTOS, 2016).

Os insetos membros da família Tabanidae conhecidos no Brasil como mutucas ou botucas, pertencem ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Brachycera.

Esses insetos têm grande interesse médico e veterinário, devido às insistentes e irritantes picadas e por serem capazes de transmitir diversos agentes patogênicos incluindo vírus, bactérias, helmintos e protozoários, incluindo espécies do protozoário *Trypanosoma* (TURCATEL, CARVALHO, RAFAEL, 2007). Apesar de novas espécies estarem sendo descobertas, quando se avalia a situação do conhecimento da biodiversidade em tabanídeos no Brasil e sua infectividade, observa-se que não há muitos estudos nesta área.

Alguns dos principais parasitos transmitidos por insetos são os tripanossomatídeos, protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Dentre os potencialmente transmitidos por tabanídeos, estão as espécies *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi*, ambas patogênicas e de importância para a pecuária brasileira (SILVA et al., 1998; SEIDL et al., 1999). A transmissão mecânica do *T. evansi* por tabanídeos vem sendo estudada mundialmente por muito tempo estando bem estabelecida (FOIL, 1989). O protozoário encontra-se disseminado desde a África do Norte ocorrendo em partes da Ásia até a América do Sul, passando pelo sul da Argentina até o Panamá onde o *T. evansi* provoca infecções agudas em várias espécies animais (WELLS, 1984).

As tripanossomoses são enfermidades mundialmente importantes para o homem e para os animais, pois podem diminuir consideravelmente os níveis de produção. Equinos acometidos por tripanossomose, cujo causador da doença é o *T. evansi* apresentam sintomas de uma enfermidade popularmente conhecida por “surra” ou “mal das cadeiras”, que cursa com febre, emaciação, anemia,

edemas de região ventral do abdômen e genitais nos casos agudos. Nos casos crônicos, em equinos, pode ocorrer paralisia progressiva dos membros posteriores (RODRIGUES, et al., 2005).

De acordo com a EMBRAPA (apud Perry et al., 2002, p. 19) doenças de animais continuam afetando a produção pecuária, o desenvolvimento agropecuário, o bem-estar humano e a luta contra a pobreza de diferentes maneiras em muitas regiões dos países em desenvolvimento. Algumas destas doenças afetam a população humana em regiões mais pobres, ocasionando mortes, incapacidade e sofrimento, impedindo a luta contra a pobreza. Ainda de acordo com estes autores, as tripanossomoses estão na lista das vinte doenças mais importantes de acordo com seu impacto na população mais carente. De maneira geral, as doenças de animais trazem grandes prejuízos tanto diretos quanto indiretos. Podemos arrazoar como consequências socioeconômicas diretas, a mortalidade, o retardo no crescimento, os gastos no controle, os custos de diagnósticos, o tratamento dos animais, as profilaxias e as pesquisas sobre a enfermidade. E como consequências indiretas, podemos citar que a tripanossomose animal afeta a saúde humana, também afeta a agricultura, pois causa perda de animais de tração. Ainda, prejudica a economia da região, pois acarretará diminuição no processo agropecuário geral.

A carência de trabalhos sobre tabanídeos e tripanossomoses em nosso país e, sobretudo na região sul, faz com que se torne premente a realização de pesquisas neste sentido. No Município de Laranjeiras do Sul, há uma quantidade aproximada de 610 equinos, distribuídos em 172 propriedades (IBGE, 2017), ainda usados como tração e para eventos regionais. Assim, este projeto propõe uma investigação nos tabanídeos que se alimentam através do repasto sanguíneo em equinos na região de Laranjeiras do Sul, para verificar no aparelho bucal dos mesmos se estão presentes protozoários do gênero *Trypanossoma*, espécie *T. evansi*, por meio de técnicas de biologia molecular.

Na medicina veterinária, a biologia molecular está sendo muito importante pois tem contribuído significativamente no diagnóstico e pesquisa de doenças infecciosas dos animais, pois é capaz de detectar agentes infecciosos em poucas horas com alta sensibilidade e especificidade (HAAS, TORRES, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Realizar a detecção de protozoários da espécie *T. evansi* em aparelho bucal de duas espécies de tabanídeos coletados em equinos no município de Laranjeiras do Sul, no estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Retirar aparelho bucal de tabanídeos (*Fidena spp.* E *T. nebulosus ornativentris*) que buscam o repasto sanguíneo em equinos no município de Laranjeiras do Sul-PR.

- Detectar a presença de material genético de *T. evansi* no aparelho bucal dos insetos coletados através da extração do DNA e técnica de PCR.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Descrição geral dos insetos - Tabanídeos

O filo Arthropoda é o mais abundante e diversificado do planeta e apresenta grande importância econômica, ambiental e médica (SANTOS, 2012).

A classe Insecta é extremamente importante devido à sua alta representatividade nos ecossistemas e enorme participação em praticamente todos os processos ecológicos que mantêm a biodiversidade (MAGALHÃES, 2015). Dentro desta classe, a ordem Diptera compreende moscas, mosquitos e afins, sendo muito diversificada, tanto ecologicamente quanto em termos de riqueza de espécies. Os representantes desta ordem encontram-se amplamente distribuídos por todos os continentes, incluindo Antártica. Seu estágio larval ocorre na água, portanto, as larvas de dípteros podem ocupar zonas marinhas costeiras e estuários, lagos, rios, riachos, águas estagnadas, águas termais, poços de petróleo e fitotelmo (PINHO, 2008).

Moscas da família Tabanidae são dípteros que compreendem 4400 espécies distribuídas em 144 gêneros. A família inclui quatro subfamílias divididas em tribos: Chrysopsinae (Bouvieromyiini, Chrysopsini e Rhinomyzini), Pangoniinae (Mycteromyiini, Pangoniini, Philolichini e Scionini), Sceptidinae e Tabaninae (Diachlorini, Haematopini e Tabanini). Economicamente, os tabanídeos mais relevantes são os Chrysopsinae, particularmente o gênero *Chrysops* e os Tabaninae (COSCARÓN, PHILIP, 1979; MULLENS, 2002; LESSARD et al., 2013; ROSKOV et al., 2013).

Tabanídeos estão entre os insetos hematófagos mais comumente encontrados. Existem em todo o mundo, exceto nas regiões polares e algumas ilhas (WHYTE, POPESCU, CARLSON, 2020).

Membros da família Tabanidae tem grande interesse médico e veterinário, devido às insistentes e irritantes picadas e por serem capazes de transmitir 35 agentes patogênicos incluindo vírus, bactérias, helmintos e protozoários, e também espécies do protozoário do gênero *Trypanosoma* (KRINSKY, 1976; FOIL, 1989;).

No sul do Brasil, há poucos estudos abordando tabanídeos (KROLOW, KRUGER, RIBEIRO, 2007; TURCATEL, CARVALHO, RAFAEL, 2007). Marcondes (2001) afirma que no litoral do Paraná, e de São Paulo, *Dichelacera (D.) alcicornis* e *Diachlorus bivittatus* são muito comuns e irritantes entre novembro e janeiro, sendo inclusive prejudiciais ao turismo.

As fêmeas dos tabanídeos colocam cerca de 100 a 800 ovos em uma massa, estes podem levar até 21 dias para eclodir, dependendo da espécie e das condições climáticas, quando a umidade e a temperatura são altas estes eclodem mais rapidamente (CHVÁLA et al., 1972; MULLENS, 2002). As larvas de tabanídeos podem ser encontradas em uma grande variedade de biomas e condições, adaptando-se facilmente a diversas condições e também podem ser excelentes predadoras e canibais. As larvas podem hibernar por até dois ou três meses em temperaturas mais baixas. Espécies de clima temperado podem levar até três anos como larvas. Podem ocorrer uma ou duas gerações por ano, porém, em climas tropicais podem ocorrer até três gerações. A longevidade dos adultos é de aproximadamente três semanas a dois meses (CHVÁLA et al., 1972).

As fêmeas e machos de tabanídeos alimentam-se de suco de plantas para obter energia para o voo e a cópula. O macho ainda utiliza como alimento fezes de afídeos (pulgões, ordem Hemiptera). Em seguida, as fêmeas fazem o repasto sanguíneo e depois de 11 dias ocorre a oviposição, exceto aquelas não hematófagas (*Pangonius* spp.) e aquelas hematófagas autógenas (*Tabanus nigrovittatus*) (MULLENS, 2002).

O aparelho bucal do tipo picador-sugador é largo e robusto, e possui mandíbulas em forma de lâminas afiadas e lacínias com dentes na extremidade, que ao perfurarem a pele do hospedeiro, com movimentos de tesoura, causa uma dor intensa no equino ou outro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Os lóbulos labelares são grandes, dotados de canais esclerotizados que servem para distribuir a saliva, mas que podem armazenar sangue na qual se encontram os agentes etiológicos (KRENN, ASPOCK, 2012).

3.2 Insetos como vetores mecânicos

Os insetos podem servir como vetores mecânicos ou biológicos de patógenos. Vetor é um organismo que devido ao seu contato com outros, adquire um patógeno de um hospedeiro vivo e transmite-o para outros. Portanto, transmissão por vetor é uma forma de transmissão horizontal indireta em que um intermediário biológico, geralmente um artrópodo, carrega o agente de doença entre homens e animais. A saliva dos insetos hematófagos assegura o elo estabelecido pelo hábito hematofágico, acoplando os três principais elementos de uma cadeia epidemiológica: o vetor, o parasito e o hospedeiro. O conhecimento desta interação é de grande relevância para o entendimento da estrutura de transmissão de doenças através da hematofagia (SILVA, 2009). Considerando esta descrição, os tabanídeos são os principais vetores do *T. evansi* (RODRIGUES, 2016).

3.3 *Trypanosoma evansi*

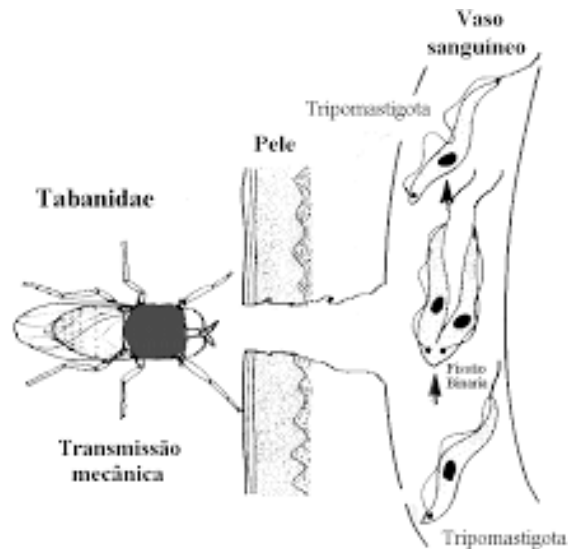
A tripanossomose equina, causada pelo protozoário *T. evansi* é uma doença conhecida como “Mal das Cadeiras” ou “surra”, com registro de diversos surtos e mortes de equinos, resultando em elevados prejuízos tanto aos sistemas pecuários extensivos que dependem do cavalo para o seu manejo quanto aos sistemas de criação para fins comerciais (SILVA, et al., 2002).

O Brasil possui o maior rebanho de equídeos na América Latina e o terceiro maior do mundo, totalizando 8 milhões de cabeças e agregando cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (DE MORAIS, 2017).

Os cavalos são hospedeiros altamente atraentes para tabanídeos e são os animais mais afetados. Sua atratividade, provavelmente, se dê em função do tamanho e cheiro destes animais. Além disso, equinos têm uma pele mais fina que bovinos. Um cavalo no meio do gado atrai mais moscas do que o último (DESQUESNES, 2004). A tripanossomíase equina que ocorre no Sul do Brasil tem seu agente transmitido possivelmente por tabanídeos (DA SILVA et al., 2007). Apesar do aumento de casos de “mal das cadeiras” causada por *T. evansi* no Sul do Brasil, estudos têm sido pouco realizados nesta região para entender a ecologia dos tabanídeos. A maioria deles trata sobre taxonomia (KROLOW, KRUGER, RIBEIRO, 2007; TURCATEL, CARVALHO, RAFAEL, 2007).

O *T. evansi*, possivelmente tem origem na África (DESQUESNES et al., 2013), é monomórfico, encontrado apenas na forma tripomastigota, com tamanho que varia de 15 a 33 μm . Este protozoário tem ciclo direto (Figura 1) não há uma fase de desenvolvimento em hospedeiros intermediários, uma vez que, possivelmente durante o processo evolutivo perdeu o maxicírculo do DNA cinetoplástico mitocondrial (cinetoplasto), e tornou-se incapaz de prosseguir com a multiplicação (LAI et al., 2008; AUTY et al., 2015). Desta forma, *T. evansi* apresenta apenas a forma tripomastigota, encontrada no sangue de vertebrados e é transmitido de forma acíclica por meio de vetores mecânicos, sendo carregado na probóscide após o repasto sanguíneo por insetos hematófagos (DESQUESNES et al., 2013).

FIGURA 1: Ciclo de transmissão do *T. evansi*. Multiplicação na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado. Transmissão mecânica por vetor.



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2002).

3.4 Biologia molecular na detecção de tripanossomatídeos

O melhor método para identificar com precisão os tripanossomatídeos é por meio de técnicas moleculares, como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento, pois estas técnicas possuem maior especificidade e capacidade de diferenciação entre as espécies e são realizadas dentro de um curto espaço de tempo (COIMBRA et al., 2020).

A acurada identificação e caracterização dos parasitas é de fundamental importância quando se estuda os tripanosomas. Inicialmente a caracterização foi baseada em diferenças morfológicas, as quais foram adequadas para distinguir entre parasitas de diferentes subgêneros, porém, falhou na distinção entre variantes biológicas ou cogenéricas (MASIGA et al., 1996). Os métodos moleculares vieram suprir estas deficiências.

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica da Biologia Molecular capaz de produzir grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, de tamanho e sequência definidos, a partir de uma pequena quantidade de um molde de ácido nucléico. Na medicina veterinária, o método tem contribuído significativamente no diagnóstico e pesquisa de doenças infecciosas dos animais, pois é capaz de detectar agentes infecciosos em poucas horas com alta sensibilidade e especificidade (HAAS, TORRES, 2016).

4 METODOLOGIA

4.1 Descrição da região a ser estudada

O presente estudo foi desenvolvido no município de Laranjeiras do Sul, situado no Território Cantuquiriguaçu, no Estado do Paraná, na região centro-oeste, compreendido entre as coordenadas geográficas na latitude 25°00'00" a 25°44'27" sul e longitude 51°38'45" a 53°10'00" oeste, abrangendo uma área de 13.986,40 Km². (IBGE, 2022). O território apresenta clima subtropical ou mesotérmico, tendo no mês mais frio temperatura média inferior a 18°C e superior a -3°C. O regime de chuvas varia de 1800 a 2000mm/ano, bem distribuídas durante todo ano (CONDETEC, 2009). O bioma é formado por floresta ombrófila mista, caracterizada pela presença da espécie *Araucaria angustifolia*. O projeto foi desenvolvido a partir da coleta de tabanídeos, identificação das espécies mais prevalentes, onde duas das mais frequentes foram escolhidas. Os locais escolhidos para coleta de tabanídeos, foram três propriedades que possuem criação de Equinos (17 equinos na primeira propriedade, 37 na segunda e 06 na terceira), e coleção de água em forma de poças, lagos, lagoas ou açudes, artificiais ou naturais.

4.2 Animais

Os animais usados como isca para coleta de tabanídeos tiveram todo acompanhamento veterinário e cuidados com bem-estar. Os proprietários dos animais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para uso destes como isca. O projeto foi submetido à avaliação do comitê de ética do uso de animais (CEUA) da UFFS, no qual foi aprovado e cujo número de protocolo é 8689230323, com ID de número 000480.

A coleta foi feita com auxílio de um frasco de vidro, em seguida os insetos foram armazenados conforme localização do repasto (cabeça, membros, tórax ou abdômen), no dispositivo SECTAB (CHRISTEN et al., 2009). Os insetos coletados foram mortos no momento da coleta com frascos mortíferos com acetato de etila. Todo material entomológico e biológico foi levado para os laboratórios de Parasitologia e Bioquímica e Genética da UFFS, onde foram processados para a retirada do aparelho bucal, congelados em freezer e armazenados a -80 °C para as análises posteriores.

4.3 Pré extração de DNA

Todo material entomológico e biológico foi levado para os laboratórios de Parasitologia e Bioquímica e Genética da UFFS. Foram escolhidas as espécies mais prevalentes na região da coleta (Laranjeiras do Sul), para a retirada das peças bucais. Estas espécies são *Tabanus nebulosus ornativentris* e *Fidena* spp. Os tabanídeos passaram por duas lavagens com solução de etanol 70% e duas vezes em água destilada estéril. As peças bucais dos insetos contendo o aparelho bucal foram retiradas com o auxílio de lupa entomológica, tesouras e lâmina de bisturi estéril. Estas peças bucais posteriormente foram armazenadas em “pool”, por espécie escolhida, separadas por datas de coleta, em microtubos de 1,5mL contendo TNE (Tris base 10mM, NaCl 200mM e EDTA 50mM) e congeladas a -80°C até a extração de DNA.

4.4 Extração de DNA

A obtenção do material genético das peças bucais dos tabanídeos foi feita utilizando o “Quick-DNA™ Tissue/Insect Microprep”, de acordo com as instruções do fabricante (Qagen, D6015®).

Também foi realizada a extração de DNA por meio do método fenol-clorofórmio, o qual utilizou-se um tampão de lise para realizar a lise celular, a precipitação de proteínas foi feita utilizando uma solução fenol:clorofórmio:isoamílico, e então realizado os procedimentos de precipitação do DNA, seguido de lavagem do pellet e então, a eluição do DNA.

A quantificação da concentração de DNA presente nas amostras, foi avaliado com o auxílio de microdrop (MicroDrop™2000 Thermo Scientific Spectrophotometers, ThermoFisher®).

4.5 Detecção de DNA de *T. evansi* extraído do aparelho bucal dos tabanídeos

Posteriormente, as amostras foram submetidas à amplificação por meio de PCR, baseado em protocolos previamente publicados (DÁVILA et al., 2003; SILVEIRA et al., 2013; RAMOS, 2019). Utilizou-se iniciadores para amplificação de espécies de *T. evansi* para excluir falso positivo, como os utilizados por Silva et al., (2013) e Silveira et al., (2013), para amplificação de *T. evansi* (*primer* RoTat, VSG, 1.2 F e 1.2 R com 205 pb) (CLAES et al., 2004; BOUSHAKI et al., 2019).

Realizou-se a confirmação de amplificações e análises dos fragmentos amplificados com eletroforese em gel de agarose 2%, a coloração do DNA com corante fluorescente, GelRed®, e documentação em sistema de fotodocumentação de géis.

5. Resultados e discussão

Para a retirada das peças bucais dos tabanídeos, foram escolhidas as duas espécies mais prevalentes, foram elas *T. nebulosus ornativentris* e *Fidena* spp. Os aparelhos bucais foram separados por espécie e data da retirada.

Foi possível notar que o método fenol-clorofórmio resultou em uma maior concentração de DNA que o método com as colunas de purificação seguindo o kit.

Não foi detectada a presença de DNA de *T. evansi* no aparelho bucal dos tabanídeos (**FIGURA 2**), os resultados se deram através da extração de DNA e PCR, utilizando como parâmetro de comparação o gene RoTat sendo possível observar em gel de agarose.

O gene RoTat utilizado possui as seguintes sequências e temperatura de anelamento na direção 5'-3'. RoTat F 1.2 GCG GGG TGT TTA AAG CAA TA, com 59°C de temperatura de anelamento. E RoTat R 1.2 ATT AGT GCT GCG TGT GTT CG, com temperatura de anelamento de 59°C.

Este resultado não exclui a possível circulação e presença deste parasita na região de Laranjeiras do Sul – PR, ele é corroborado pelos resultados do estudo feito por (SNAK, et al., 2018), na região oeste do Paraná, onde foi realizado dois métodos de diagnósticos diferentes, avaliação direta do esfregaço *buffy coat* e a reação de imunofluorescência indireta, em ambos não foi detectado a presença do *T. vivax*.

Apesar do estudo ter sido feito em bovinos de produção leiteira, e o alvo ser o *T. vivax*, não se pode ignorar o fato de que o vetor é o mesmo, portanto a ausência deste protozoário acaba reforçando, por inferência de correlação indireta, a falta de material genético de *T. evansi* nos vetores *Fidena* spp. e *T. nebulosus ornativentris*.

FIGURA 2 – Resultado de PCR do DNA de aparelho bucal de tabanídeos em gel de agarose para pesquisa de *T. evansi*.

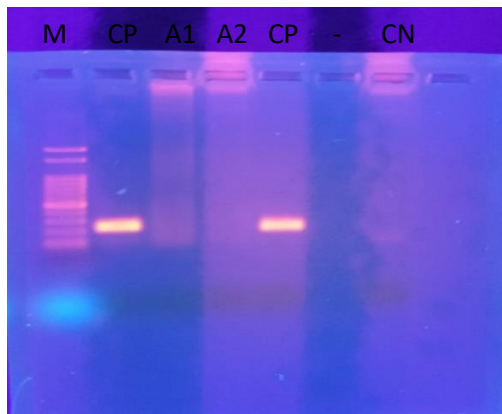


Foto: Acervo do autor, 2023.

Legenda:

M – Marcador

CP – Controle Positivo

A1 – Amostra 1 – Amostra de DNA do aparelho bucal de *Fidena* spp.

A2 – Amostra 2 – Amostra de DNA do aparelho bucal de *T. nebulosus ornativentris*.

CN – Controle Negativo.

Era esperado detectar a presença de *T. evansi* assim como mencionado nos estudos de (RAMOS, 2019), o qual, concluiu através da extração de DNA e PCR, que na região de Lages – SC, são encontrados *T. evansi* no aparelho bucal de tabanídeos. Ramos, 2023, obteve resultado positivo para *T. evansi* em duas espécies de tabanídeos *Dichelacera (D.) alcicornis* e *D. (D.) januarii*, O gênero *Fidena*, foi o terceiro mais encontrado na região (6,11% dos tabanídeos coletados) (RAMOS, 2019), e nele não foi encontrado DNA de *T. evansi*.

Então, tanto neste estudo quanto no estudo de (RAMOS, 2019), o resultado do PCR não demonstrou DNA de *T. evansi*, em tabanídeos do gênero *Fidena*, o que nos mostra que talvez o gênero *Fidena* não seja um vetor do *T. evansi*. Em contra partida, no gênero *Dichelacera*, Ramos, et al., 2023 obtiveram resultado positivo na pesquisa realizada em Lages, já em Laranjeiras do Sul, este gênero não se mostrou prevalente, por isso não foi testado a presença do protozoário em espécies deste gênero.

Portanto, não podemos afirmar com certeza que não existe *T. evansi* circulante na região, ou se as espécies de tabanídeos testadas não são vetores deste agente etiológico.

6. CONCLUSÃO

O levantamento epidemiológico é muito importante para que possamos ter ideia sobre a circulação de agentes patogênicos na região.

Esta metodologia auxilia a desenvolver um protocolo fácil e barato, além de contribuir no conhecimento de como utilizar a biologia molecular na detecção de agentes causadores de enfermidades vetoradas por artrópodos, neste caso de tabanídeos, pouco explorados e de grande valor epidemiológico para a medicina e medicina veterinária, bem como para a parasitologia médica em geral, mostrando que esta é uma das inúmeras formas de se utilizar essa importante ferramenta.

Apesar da extração de DNA e do PCR não ter detectado material genético de *T. evansi*, não se pode descartar a possibilidade do protozoário estar circulando no rebanho equino do local pesquisado, desta forma, vale ressaltar que estudos dessa natureza devem ser mais incentivados e feitos de forma continuada, como o monitoramento constante dos rebanhos. Estudos e protocolos como o demonstrado neste trabalho são, até então, muito escassos no Brasil como um todo, e principalmente, na região de Laranjeiras do Sul – PR.

REFERÊNCIAS

AUTY, H. et al. Tripanossomose bovina: a diversidade de tripanossomas e implicações para a epidemiologia e controle da doença. **Revue scientifique et Technique (Escritório Internacional de Epizootias)**, v. 34, n. 2, pág. 587-598, 2015.

BOUSHAKI, Djamila et al. Epidemiological investigations on *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the South of Algeria. **Heliyon**, v. 5, n. 7, 2019.

CHVÁLA, Milan et al. As mutucas da Europa (Diptera, Tabanidae). **As mutucas da Europa (Diptera, Tabanidae)**, 1972.

CLAES, Filipe et al. Variable Surface Glycoprotein RoTat 1.2 PCR como uma ferramenta de diagnóstico específica para a detecção de infecções por *Trypanosoma evansi*. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 3, n. 1, pág. 1-6, 2004.

COIMBRA, Diogo P. et al. Identificação molecular e morfométrica de *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) minasense em amostras de sangue de saguis (*Callithrix*:

Callithrichidae) da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitologia internacional**, v. 75, p. 101999, 2020.

CONDETEC. **Conselho de desenvolvimento do território**. 2009. Disponível em: <http://www.cantuquiriguacu.com.br/condetec.php>. Acesso em: 14 nov. 2022.

COSCARON, Sixto; PHILIP, Cornelius B.; FAIRCHILD, G. B. Further notes on the Pangoniini of the austral region of South America (Diptera: Tabanidae). **Florida Entomologist**, p. 301-304, 1979.

DÁVILA, AMR et al. Usando PCR para desvendar a epizootiologia críptica da tripanossomose pecuária no Pantanal, Brasil. **Parasitologia veterinária**, v. 117, n. 1-2, pág. 1-13, 2003.

DESQUESNES, Marc et al. **Livestock trypanosomes and their vectors in Latin America**. Paris: OIE, 2004.

DESQUESNES, Marc et al. Trypanosoma evansi e surra: uma revisão e perspectivas sobre origem, história, distribuição, taxonomia, morfologia, hospedeiros e efeitos patogênicos. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

EMBRAPA. **Empresa brasileira de agropecuária**, 2002. Livro015.pdf. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/810940/1/Livro015.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2022.

FOIL, L. D. Tabanids as vectors of disease agents. **Parasitology today**, v. 5, n. 3, p. 88-96, 1989.

HAAS, DIONEI JOAQUIM; TORRES, ANA CAROLINE DOYLE. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista científica de medicina veterinária**. 26. ed. [S. l.: s. n.]. jan. 2016. ISSN:1679-7353.

IBGE. **Censo Agropecuário**, 2017. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/laranjeiras-do-sul/pesquisa/24/27745>. Acesso em: 02 de março de 2023.

IBGE. **Cidades paranaenses**, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/pr/laranjeiras-do-sul.html>. Acesso em: 22 nov. 2022.

KRENN, Harald W.; ASPÖCK, Horst. Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. **Arthropod structure & development**, v. 41, n. 2, p. 101-118, 2012.

KRINSKY, William L. Agentes de doenças animais transmitidos por moscas dos cavalos e moscas dos cervídeos (Diptera: Tabanidae). **Journal of medical Entomology**, v. 13, n. 3, pág. 225-275, 1976.

KROLOW, Tiago Kütter; KRUGER, Rodrigo Ferreira; RIBEIRO, Paulo Bretanha. Chave pictórica para os gêneros de Tabanidae (Insecta: Diptera) do bioma Campos Sulinos, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 253-264, 2007.

LAI, De-Hua et al. Adaptações do Trypanosoma brucei à perda gradual do DNA do cinetoplasto: Trypanosoma equiperdum e Trypanosoma evansi são pequenos

mutantes do *T. brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** , v. 105, n. 6, pág. 1999-2004, 2008.

LESSARD, B. D. et al. The evolution and biogeography of the austral horse fly tribe Scionini (Diptera: Tabanidae: Pangoniinae) inferred from multiple mitochondrial and nuclear genes. **Molecular phylogenetics and Evolution**, v. 68, n. 3, p. 516-540, 2013.

MAGALHÃES, MARCELO DA ROCHA LEÃO. **Concentrações naturais de elementos químicos da classe insecta do fragmento florestal de mata atlântica reserva Charles Darwin**. 2015. Programa de Pós-Graduação - Tecnologias Energéticas e Nucleares, UFPE, 2015.

MASIGA, DK e cols. Uma alta prevalência de infecções mistas por tripanossomas em moscas tsé-tsé em Sinfra, Costa do Marfim, detectadas por amplificação de DNA. **Parasitologia**, v. 112, n. 1, pág. 75-80, 1996.

MULLENS et al. Duração da viremia infecciosa por *Culicoides sonorensis* em bovinos e ovinos infectados pelo vírus da língua azul. **Microbiologia veterinária** , v. 88, n. 2, pág. 115-125, 2002.

PINHO, LUIZ CARLOS. **Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo: Diptera**. 2008. Froehlich, C.G. (org.). Disponível em: <http://sites.ffclrp.usp.br/aquadoce/guiaonline>.

RAMOS, CARLOS JOSÉ RAUPP. **Tabanídeos, da floresta ombrófila mista na região de Lages, SC: análise proteômica da glândula salivar e prospecção de tripanossomatídeos**. 2019. Tese de doutorado - Ciência Animal, UDESC, Lages, 2019.

RAMOS, CARLOS JOSÉ RAUPP; et al. First record of *Trypanosoma evansi* DNA in *Dichelacera alcicornis* and *Dichelacera januarii* (Diptera: Tabanidae) flies in South America. **Parasit Vectors**. 2023 Jan 5;16(1):4. doi: 10.1186/s13071-022-05562-7. PMID: 36604766; PMCID: PMC9817266.

ROCHA, ROSELI DE SOUZA; SANTOS, FABIO A. LEAL. **Insetos como vetores de doenças**. Seminários de Biomedicina do Univag, 2016.

RODRIGUES, Carla Monadeli Figueira. **Tripanossomas de ungulados no Brasil e na África: novas abordagens em estudos epidemiológicos de genótipos, vetores e reservatórios, e patologia de isolados Brasileiros**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ROSKOV, et al. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2013 Annual Checklist. 2013.

SANTOS, Marco Antonio de Oliveira dos. **Reconstrução Filogenética do Filo Arthropoda Baseada no Genoma Mitocondrial**. 2012.

SEIDL, et al. **A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal**, 1999.

SILVA, Aleksandro Schafer et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira-SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae** , v. 35, n. 3, pág. 373-376, 2007.

SILVA, ALEKSANDRO SCHAFER, *et al.* Infecção experimental de *Trypanosoma evansi* em coelhos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 519-523, abr./jun. 2008.

SILVA, Francinaldo S. **A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos.** Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas, v. 3, n. 3, p. 4, 2009.

Silva, R. A. M. S., *et al.* "Outbreaks of trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in cattle in Bolivia." *Veterinary parasitology* 76.1-2 (1998): 153-157. 1998

SILVA, ROBERTO AGUILAR MACHADO SANTOS, *et al.* ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle.** Corumbá, MS. 2002.

SILVA-ITURRIZA, Adriana *et al.* **O minicírculo de kDNA de *Trypanosoma evansi* encontrado no morcego nectarífero venezuelano *Leptonycteris curasoae* (Glossophaginae) suporta a hipótese de múltiplas origens desse parasita na América do Sul.** Parasitologia Internacional, v. 62, n. 2, pág. 95-99, 2013.

SILVEIRA, Júlia AG *et al.* **Molecular detection and identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brazil.** Ticks and tick-borne diseases, v. 4, n. 4, p. 341-345, 2013.

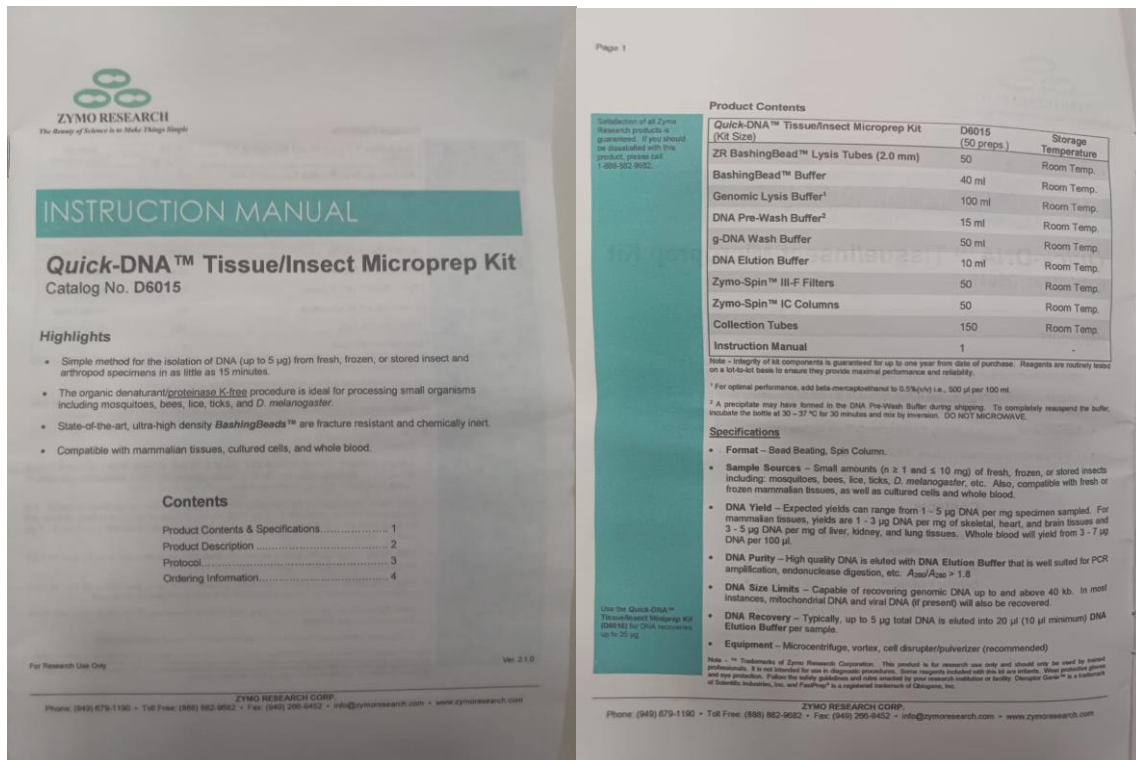
SNAK, Alessandra *et al.* **Prevalence study on *Trypanosoma vivax* in dairy cattle in the western region on the State of Paraná, Brazil.** Semina: Ciências Agrárias, v. 39, n. 1, p. 425-430, 2018.

TURCATEL, M.; CARVALHO, C. J. B.; RAFAEL, J. A. **Horse flies (Diptera: Tabanidae) of Paraná State, Brazil: pictorial identification key for subfamilies, tribes and genera.** Biota Neotrop., v. 7, p. 265-278, 2007.

WELLS, *et al.* **The measurement of dyspnea: contents, interobserver agreement, and physiologic correlates of two new clinical indexes.** Chest, v. 85, n. 6, p. 751-758, 1984.

WHYTE, ANDREW F.; POPESCU, FLORIN-DAN; CARLSON, JOHN. **Tabanidae insect (horsefly and deerfly) allergy in humans: A review of the literature.** John Wiley & Sons Ltd. 2020.

ANEXO 1: Manual de instruções do kit de extração de DNA “Quick-DNA™ Tissue/Microprep Kit”



Page 2

Product Description

The Quick-DNA™ Tissue/Insect Microprep Kit is designed for the simple, rapid isolation of up to 5 µg total DNA (e.g., genomic, viral, mitochondria) from small amounts of fresh, frozen, or stored insect specimens including mosquitoes, bees, lice, ticks, and *D. melanogaster*. The procedure is easy and can be completed in as little as 15 minutes; samples are added directly to a ZR BashingBead™ Lysis Tube (2.0 mm), then rapidly and efficiently lysed by bead, without using organic denaturants or proteinases. The DNA is isolated and purified using our Zymo-Spin™ Technology and is ideal for downstream molecular-based applications including PCR, array, genotyping, etc. The procedure is compatible with mammalian tissues, whole blood, and cultured cells. A schematic of the Quick-DNA™ Tissue/Insect Microprep Kit procedure is shown below.

For Technical Assistance, please contact Zymo Research's Technical Department at 1-866-882-9682 or e-mail to info@zymoresearch.com.

Comparison of DNA yields from various insect and mouse samples using the Quick-DNA™ Tissue/Insect Microprep Kit. Various *Aedes albopictus* samples were processed with equal volumes of eluted DNA, embedded in a 0.8% (w/v) agarose/ethidium bromide gel. The 1 kb DNA size marker is from Zymo Research.

ZYMO RESEARCH CORP.
Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (866) 882-9682 • Fax: (949) 295-9452 • info@zymoresearch.com • www.zymoresearch.com

Page 3

Protocol

For optimal performance, add beta-mercaptoethanol (user supplied) to the Genomic Lysis Buffer to a final dilution of 0.5%(v/v) i.e., 500 µl per 100 ml.

- Add specimen(s) to a ZR BashingBead™ Lysis Tube (2.0 mm). Add 750 µl BashingBead™ Buffer to the tube and cap tightly.

Note: Generally, no more than 10 mg tissue should be sampled, since larger samples will exceed the DNA binding capacity of the spin column (See Specifications on page 1). Up to 200 µl of whole blood or up to 1.7 x10⁶ cells suspended in 200 µl PBS can also be sampled.
- Secure in a bead beater fitted with a 2 ml tube holder assembly (e.g., Disruptor Genie™) and process at maximum speed for 10 minutes.

Note: Processing time will vary based on sample input and bead beater. Times may be as little as 5 minutes when using high-speed cell disruptors (FastPrep™-2G).
- Centrifuge the ZR BashingBead™ Lysis Tube (2.0 mm) in a microcentrifuge at $\geq 10,000 \times g$ for 1 minute.
- Transfer up to 600 µl supernatant to the Zymo-Spin™ III-F Filter in a Collection Tube and centrifuge at $8,000 \times g$ for 1 minute. Discard the Zymo-Spin™ III-F Filter.
- Add 1,200 µl of Genomic Lysis Buffer to the filtrate in the Collection Tube from Step 4. Mix well.
- Transfer 600 µl of the mixture from Step 5 to a Zymo-Spin™ IC Column* in a Collection Tube and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
- Discard the flow through from the Collection Tube and repeat Step 6.
- Add 200 µl DNA Pre-Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IC Column in a Collection Tube and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
- Add 500 µl g-DNA Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IC Column and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
- Transfer the Zymo-Spin™ IC Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add $\geq 20 \mu\text{l}$ (10 µl minimum) DNA Elution Buffer directly to the column matrix. Centrifuge at $10,000 \times g$ for 30 seconds to elute the DNA.

Ultra-pure DNA is now ready for use in your experiments.

*Apuric acid
apuric eluted
Methanol
Benzimidazole*

The Zymo-Spin™ IC Column has a maximum capacity of 200 µl.

ZYMO RESEARCH CORP.
Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (866) 882-9682 • Fax: (949) 295-9452 • info@zymoresearch.com • www.zymoresearch.com

Page 4

Ordering Information

Product Description	Catalog No.	Kit Size
Quick-DNA™ Tissue/Insect Microprep Kit	D6015	50 preps.
Quick-DNA™ Tissue/Insect Miniprep Kit	D6016	50 preps.
Quick-DNA™ Tissue/Insect 96 Kit	D6017	2x96 preps.

For Individual Sale	Catalog No.	Amount
ZR BashingBead™ Lysis Tubes (2.0 mm)	S6003-50	50
BashingBead™ Buffer	D6001-3-40	40 ml
Genomic Lysis Buffer	D3004-1-100	100 ml
DNA Pre-Wash Buffer	D3004-5-15	15 ml
gDNA Wash Buffer	D3004-2-50	50 ml
DNA Elution Buffer	D3004-4-10	10 ml
Zymo-Spin™ III-F Filters	C1057-50	50
Zymo-Spin™ IC Columns	C1004-50	50
	C1004-250	250
Collection Tubes	C1001-50	50
	C1001-500	500
	C1001-1000	1,000

Lysis Instruments

Description	Cat. No.	Amount
Disruptor Genie™, 120V w/ 2 ml tube holder assembly.	S6001-2-120	1 unit
Disruptor Genie™, 240V w/ 2 ml tube holder assembly.	S6001-2-240	1 unit
Turbolix Attachment, 2 ml Permanently mounts to most existing Vortex Genie™ mixers converting them to a Disruptor Genie™	S6004-2	1 unit

The Disruptor Genie™ with 2 ml tube holder from Scientific Industries, Inc. (Cat. No. S6001-2 from Zymo Research Corp.)

ZYMO RESEARCH CORP.
Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (866) 882-9682 • Fax: (949) 295-9452 • info@zymoresearch.com • www.zymoresearch.com

ANEXO 2: Preparação de Reagentes.

Para a extração de DNA é necessário preparar os reagentes que serão utilizados durante o processo.

Tampão TE (Tris-EDTA), com tris base 10mM e EDTA 1mM.

Fez-se tampão de lise com tris HCl 1M, NaCl 1M, EDTA 0,5M, e SDS 10%. Utilizou-se HCl para ajustar o pH para 7,4, com auxílio do peagametro.

Também foi utilizado acetato de sódio 3M, 2-mercaptoetanol. Com adição de HCl 8M, atingiu-se o pH 5,2, com auxílio do peagametro.