

BIOL 239

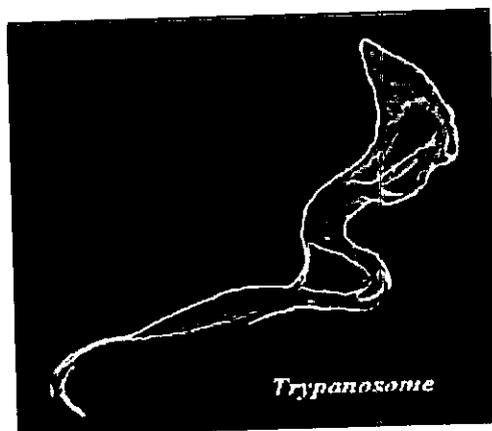


UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Trabalho de Culminação de Estudos**

(Trabalho de Investigação)

Detecção e Identificação Molecular de Tripanossomas nas Glossinas da  
Reserva Especial de Maputo.



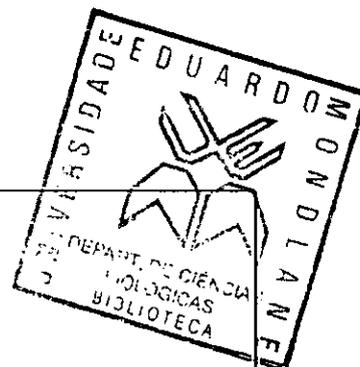
AUTORA:  
Machado, Mariamo Jaime

*Maputo, Janeiro de 2008*





UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



## **Trabalho de Culminação dos Estudos**

(Trabalho de Investigação)

Detecção e Identificação Molecular de Tripanossomas nas Glossinas da  
Reserva Especial de Maputo.

**SUPERVISORES:**

Prof. Dr. Luis Neves  
Dra. Cristina Beatriz

**CO-SUPERVISORA:**

Dra. Paula Macucule

*Maputo, Janeiro de 2008*

## AGRADECIMENTOS

A Deus nosso Pai, que tudo criou, tudo dá e a Ele tudo pertence.

Aos meus pais: Jaime Mendes Machado e Mariamo Munjui Machado; aos meus irmãos: Cêu, São, Josina, Augusto, Elsa, Maurício e Regina; aos meus cunhados: Tito, Tomás e Isac; aos meus sobrinhos: Tomázia, Luzia, Jaime, Aziza, Cêu, Tito, Mita, Mamo e Carmen, por todo o amor, carinho, acompanhamento, apoio moral e financeiro que sempre tiveram comigo.

Aos meus supervisores: Prof. Dr. Luís Neves, por me ter recebido com consideração e ter atribuído o tema deste trabalho e ainda pelos ensinamentos e pelo apoio. À dr<sup>a</sup> Cristina Beatriz por todo amor e carinho, por ser uma excelente docente e orientadora, além de mãe e grande amiga.

A dr<sup>a</sup> Paula Macucule, pela amizade, apoio, acompanhamento e por sua grande contribuição na realização desta tese.

Ao Manecas pela ajuda na procura de grande parte do material bibliográfico usado neste trabalho.

A todo o pessoal do laboratório que de alguma maneira me auxiliou na execução deste trabalho.

Agradecimento especial as minhas amigas de curso: Delfínia, Emelva, Nídia, Sónia e Zita, pelo amor e amizade que cultivamos umas com as outras durante os quatro anos de curso.

## DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Mariamo Jaime Machado, declaro por minha honra que o presente trabalho foi por mim realizado, e que as bibliografias citadas e os resultados apresentados são reais.

*Mariamo Jaime Machado*

Mariamo Jaime Machado

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à Nelson António Parruque, pelo amor, companheirismo e dedicação, que sempre me prestou e principalmente por ser uma das pessoas mais importantes da minha vida.

## RESUMO

As moscas tsé-tsés (género *Glossina*), transmitem ciclicamente protozoários patogénicos do género *Trypanosoma*. Em África, existem 11 espécies diferentes de tripanossomas patogénicos. Estes tripanossomas causam doenças denominadas tripanossomoses. Moçambique é um dos 37 países africanos afectados pelas tripanossomoses fazendo parte dum vasto território habitado pelas moscas tse-tsés (*Glossina* spp) vectores da doença – o cinturão tse-tsé.

A identificação precisa dos tripanossomas é essencial para acessar o risco das tripanossomoses, e uma das formas de se alcançar este objectivo, é a identificação dos tripanossomas dentro das moscas tsé-tsés.

A detecção e identificação de espécies de tripanossomas nas glossinas da Reserva Especial de Maputo, foi realizada através do uso da Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR). A Reacção em Cadeia da Polimerase é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de sequências específicas de ácido desoxiribonucléico (ADN) ou de ácido ribonucléico (ARN), a sua característica mais importante é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de ADN a partir de pouca quantidade de material.

Duzentas e uma Glossinas foram capturadas através de armadilhas de captura e de ronda de carro. A espécie de glossina predominante encontrada foi *G. brevipalpis* (186) e a outra espécie foi *G. austeni* (15). As 201 glossinas foram utilizadas para a detecção e identificação dos tripanossomas com *primers* ITS1 *cf/br*. A PCR permitiu a identificação de 15 das glossinas infectadas, sendo 14 (2 fêmeas e 12 machos) da espécie *G. brevipalpis* e 1 (fêmeas) da espécie *G. austeni*.

A taxa de infecção das glossinas da R.E.M. por tripanossomas foi de 7.5% para *G. brevipalpis* e 6.7% para *G. austeni*. A taxa de infecção para as duas espécies de glossinas foi de 7.46%. As espécies de tripanossomas encontradas foram *T. brucei brucei* (66.7%) e *T. vivax* (33.3%).

## LISTA DE TABELAS

Pag.

Tabela 1: Classificação dos principais tripanossomas patogénicos africanos-----	5
Tabela 2: <i>Primers</i> ou oligonucleótidos-----	17
Tabela 3: Condições da PCR para amplificação da região ITS1-----	19
Tabela 4: Espécies de tripanossomas identificadas através da PCR-----	22
Tabela 5: Glossinas positivas, sexo e espécies de tripanossomas detectados-----	23

## LISTA DE FIGURAS

Pag.

Fig. 1: Características morfológicas de um <i>Trypanosoma</i> -----	6
Fig. 2: Características distintivas das glossinas -----	7
Fig. 3: Total de glossinas capturadas por espécie -----	21
Fig. 4 e 5: Gel da agarose para algumas das amostras positivas -----	23
Fig. 5: Gel da agarose para todas as amostras que foram positivas -----	24

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo A1:** Distribuição da mosca tsé-tsé em África (o cinturão tsé-tsé).    **i**
- Anexo A2:** Distribuição das moscas tse-tsé no Sul de África, e no sul de Moçambique em particular.    **ii**
- Anexo A3.** Localização das diferentes espécies de tripanossomas dentro dos órgãos da mosca tsé-tsé.    **iii**
- Anexo B1:** Localização geográfica da Reserva Especial de Maputo.    **iv**
- Anexo B2:** Vegetação da Reserva Especial de Maputo.    **v**
- Anexo C1:** Armadilhas para a captura de glossinas.    **vi**
- Anexo C2:** Coordenadas dos locais onde as glossinas foram captura.    **vii**
- Anexo E:** Protocolo de extracção de ADN.    **viii**
- Anexo F:** Protocolo de quantificação de ADN.    **ix**

## LISTA DE ABREVIATURAS

CB-UEM	Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane
ddH <sub>2</sub> O	Água bi-destilada
DINAP	Direcção Nacional de Pecuária
DNFFB	Direcção Nacional de Florestas e Fauna Bravia
dNTPs	Desoxyribonucleosídeo-5-trifosfato
ITS	<i>Internal Transcribed Space</i>
FAO	<i>Food and Agricultural Organization</i> (organização das nações unidas para a alimentação e agricultura)
OAU	<i>Organization of African Unity</i> (Organização da Unidade Africana)
pb	Par(s) de bases
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacção em cadeia da polimerase)
<i>Primers</i>	Sequências iniciadoras de cadeias de nucleótidos
R.E.M.	Reserva Especial de Maputo
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
TBE	Tris Borato EDTA
UV.	Luz ultra-violeta

## ÍNDICE

Pag.

1.	INTRODUÇÃO.....	2
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1.	Tripanossomose.....	4
2.1.1.	Etiologia .....	4
2.2.	Morfologia básica dos tripanossomas.....	5
2.3.	As moscas tsé-tsés (género <i>Glossina</i> ) .....	6
2.3.1.	Localização dos tripanossomas nos órgãos das moscas tsé-tsés.....	8
2.4.	Epidemiologia da tripanossomose.....	8
2.5.	Taxas de infecção de glossinas por tripanossomas.....	9
2.6.	A PCR na epidemiologia da tripanossomose.....	10
2.6.1.	Alvos da PCR para a detecção de tripanossomas.....	12
3.	OBJECTIVOS.....	13
3.1.	Geral.....	13
3.2.	Específicos.....	13
4.	ÁREA E LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	14
4.1.	Área de estudo.....	14
4.2.	Local de Realização do estudo.....	14
5.	MATERIAL E METODOLOGIA.....	15
5.1.	Material.....	15
5.1.1.	Material de captura e identificação das glossinas .....	15
5.1.2.	Material de laboratório e equipamentos .....	15
5.1.3.	Reagentes.....	16
5.2.	Metodologia .....	17
5.2.1.	Captura das Glossinas .....	17
5.2.2.	Identificação das Glossinas .....	18
5.2.3.	Extracção de ADN .....	18
5.2.4.	Quantificação do ADN.....	18
5.2.5.	PCR para a amplificação do ADN dos tripanossomas .....	18
5.2.6.	Electroforese dos produtos da PCR.....	19
5.2.7.	Análise dos resultados.....	20
6.	RESULTADOS .....	21
6.1.	Captura das glossinas .....	21
6.2.	PCR com <i>primers</i> ITS1 cf/br .....	22
7.	DISCUSSÃO.....	25
7.1.	Glossinas capturadas .....	25
7.2.	PCR com <i>primers</i> ITS 1 cf/br .....	25
7.3.	Taxas de infecção das glossinas.....	26
8.	CONCLUSÕES e RECOMENDAÇÕES .....	28
8.1.	Conclusões.....	28
8.2.	Recomendações.....	28
9.	BIBLIOGRAFIA.....	29

## 1. INTRODUÇÃO

Os tripanossomas são protozoários parasitas, que têm como organelos característicos um cinetoplasto e um flagelo. Eles pertencem ao género *Trypanosoma*, ordem Kinetoplastida (Connor, 1994). Os tripanossomas são os parasitas mais importantes dos pontos de vista médico e veterinário, por incluírem os agentes causadores da doença do sono (*Trypanosoma gambiense* e *T. rhodesiense*) e os que afectam os animais domésticos (*T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei*, *T. simiae*, *T. suis*). As doenças causadas pelos tripanossomas ao homem e aos animais são num geral denominadas tripanossomoses (Connor, 1994). As tripanossomoses são doenças fatais, que tem como vector principal, as moscas do género *Glossina* vulgarmente conhecidas como moscas tsé-tsés (Itard, 1989; Connor, 1994). Estas moscas, ingerem os tripanossomas durante a sua refeição de sangue em animais selvagens ou domésticos infectados. Os tripanossomas multiplicam-se intensivamente e completam o seu ciclo de vida a nível do tracto digestivo das moscas de acordo com cada espécie (Itard, 1989). As moscas distribuem a doença para novos hospedeiros quando se alimentam novamente (Connor, 1994; Nagel, 1995).

As moscas tsé-tsés distribuem-se ao longo do vasto território – o cinturão tse-tse (África sub-sahariana entre as latitudes 14° N e 29° S), (Uilenberg, 1998; OIE, 2004). Moçambique, faz parte desta área, tendo cerca de 75% do seu território habitado por *Glossina* spp (Jamal *et al.*, 2005). A região sul de Moçambique, e em particular o distrito de Matutuine onde a Reserva Especial de Maputo (R.E.M.) encontra-se inserida, constitui uma área onde as moscas tsé-tsés habitam como continuação da mancha do KwaZulu-Natal na África do sul (Sigaúque *et al.*, 2000). Em 2000, Sigaúque *et al.*, detectaram a presença da *Glossina brevipalpis* e da *Glossina austeni* no distrito de Matutuine e identificaram em sangue de bovinos, tripanossomas das espécies *T. congolense*, *T. vivax* e *T. brucei*.

Os animais selvagens como o kudo, búfalo, elefante e rinoceronte formam o maior reservatório de infecções tripanossómicas e são frequentemente uma fonte principal de refeições sanguíneas, e consequentemente de tripanossomas para as tsé-tsés (Connor, 1994).

Transmitindo as tripanossomoses, as glossinas contribuem para a redução drástica do número de cabeças de gado disponíveis, e ao mesmo tempo para a morte de animais que são usados como força de trabalho, reduzindo assim, a capacidade dos agricultores de arar a terra e de abrir novas machambas (OAU, 2001). A FAO, estima que todos os anos as tripanossomoses causam aproximadamente três milhões de mortes, ao mesmo tempo que são administrados aproximadamente 35 milhões de doses de drogas tripanocidas para proteger o gado em áreas afectadas pelas glossinas. Foi calculado que devido às tripanossomoses, 10 000 animais morrem todos os dias e outros 700 000 são abortados em cada ano (Pereira de Almeida *et al.*, 1998).

O estudo da epidemiologia da tripanossomose é um factor essencial e determinante, no mapeamento das zonas afectadas e permite desenhar actividades e metodologias de controle apropriadas para cada região (Picozzi *et al.*, 2002).

Em África, as técnicas parasitológicas de diagnóstico de tripanossomas, vem sendo substituídas por técnicas moleculares, em estudos epidemiológicos. A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), é a técnica molecular de escolha para identificação de tripanossomas em animais e em moscas (Rodrigues, 2006). Ela tem sido muito utilizada, por ser sensível e específica, permite detectar animais infectados com baixa parasitemia (Desquesnes, M. & A. Dávila, 2002).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Tripanossomose

#### 2.1.1. Etiologia

Os tripanossomas são microorganismos pertencentes ao reino Protista, filo Protozoa, sub-filo Sarcocystophora, superclasse Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Cinetoplastida, família Trypanosomatidae, género *Trypanosoma* (Connor & Van Der Bossche, 2004). O género *Trypanosoma* é dividido em duas secções, a Stercorária e a Salivária, as quais diferem no seu modo de transmissão (Connor, 1994), sendo a transmissão feita por contaminação e picada respectivamente.

Os tripanossomas da secção Stercorária desenvolvem-se na região posterior do intestino da mosca tsé-tsé, as formas infecciosas são depositadas nas fezes da mosca que as transporta e infectam o mamífero hospedeiro por contaminação e penetração através da pele. Os tripanossomas da secção Salivária desenvolvem-se cíclicamente nas zonas intermédias do tubo digestivo da mosca tsé-tsé que os transporta, e são transmitidas ao mamífero hospedeiro por intermédio de armaduras bucais especializadas, que penetram na pele do hospedeiro durante a refeição de sangue (Connor, 1994). Em África, os tripanossomas patogénicos que causam doenças ao homem e aos vertebrados pertencem à secção Salivária (Boyt, 1991; Connor, 1994). Em consequência da sua patogenicidade e da sua complexa e fascinante biologia, os tripanossomas da secção Salivária foram, e continuam sendo, objectos de intensiva pesquisa (Connor, 1994).

Segundo Boyt (1991), os tripanossomas da secção Salivária estão distribuídos em três subgéneros: *Duttonella*, *Trypanozoon*, *Nannomonas* (Tabela 1). A colocação de uma espécie de tripanossoma em um determinado subgénero é determinada pela sua morfologia diferencial e pelos locais onde estes se desenvolvem nas glossinas (Mulligan, 1970). Assim, O subgénero *Duttonella* é representado por formas monomórficas nas quais um flagelo livre está sempre presente, o cinetoplasto é grande e usualmente terminal e o seu desenvolvimento dentro das glossinas ocorre apenas na probóscide. O subgénero *Nannomonas* é representado por formas pequenas, sem flagelo livre, com cinetoplasto de tamanho médio tipicamente marginal e o seu desenvolvimento dentro das

glossinas ocorre no intestino médio e na probóscide. O subgénero *Trypanozoon* é representado por formas polimórficas, com ou sem flagelo livre, cinetoplasto pequeno e subterminal e o seu desenvolvimento dentro das glossinas ocorre no intestino médio e nas glândulas salivares (Mulligan, 1970).

Tabela 1. Classificação dos principais tripanossomas patogénicos africanos segundo Boyt, (1991).

Subgénero	Grupo	Espécie
<i>Dutonella</i>	vivax	<i>T. vivax</i>
<i>Nannomonas</i>	congolense	<i>T. congolense</i>
		<i>T. simiae</i>
<i>Trypanozoon</i>	Brucei	<i>T. brucei</i>
		<i>T. rhodesiense</i>
		<i>T. gambiense</i>
		<i>T. evansi</i>
		<i>T. equiperdum</i>

## 2.2. Morfologia básica dos tripanossomas

Embora cada espécie de tripanossomas apresente a sua morfologia diferencial, num geral eles são estruturalmente semelhantes. O parasita (figura 1) consiste numa única célula (unicelular), variando o seu tamanho entre 8-40µm. Os tripanossomas são planos, alongados e terminam em forma de filamento, diminuindo gradualmente de diâmetro. A membrana, a camada mais exterior do citoplasma, é mais densa que o restante e é suficientemente flexível para conservar uma forma definida, mas permitindo ao mesmo tempo um certo grau de movimento do corpo. Ao longo do comprimento, a membrana e o citoplasma são comprimidos para cima formando uma porção fina de tecido denominada membrana ondulante, sendo a sua margem exterior percorrida pela fibra flagelar que pode, nalgumas espécies ou tipos, continuar para além da extremidade anterior do corpo

em forma de chicote, como flagelo livre (Boyt, 1991; Connor, 1994; Connor & Van Der Bossche, 2004).

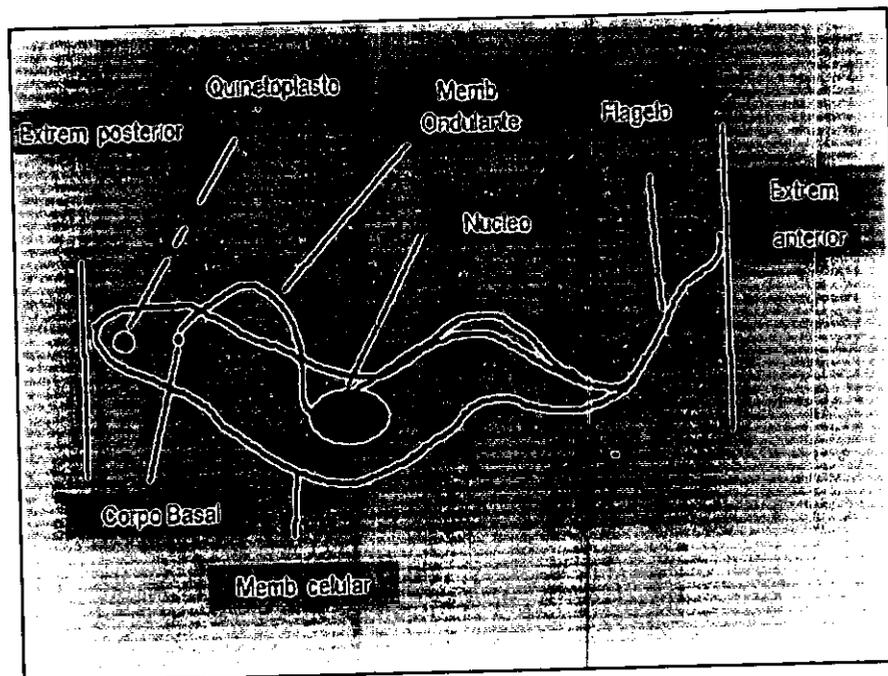


Fig. 1: Características morfológicas dos *Trypanosoma*.

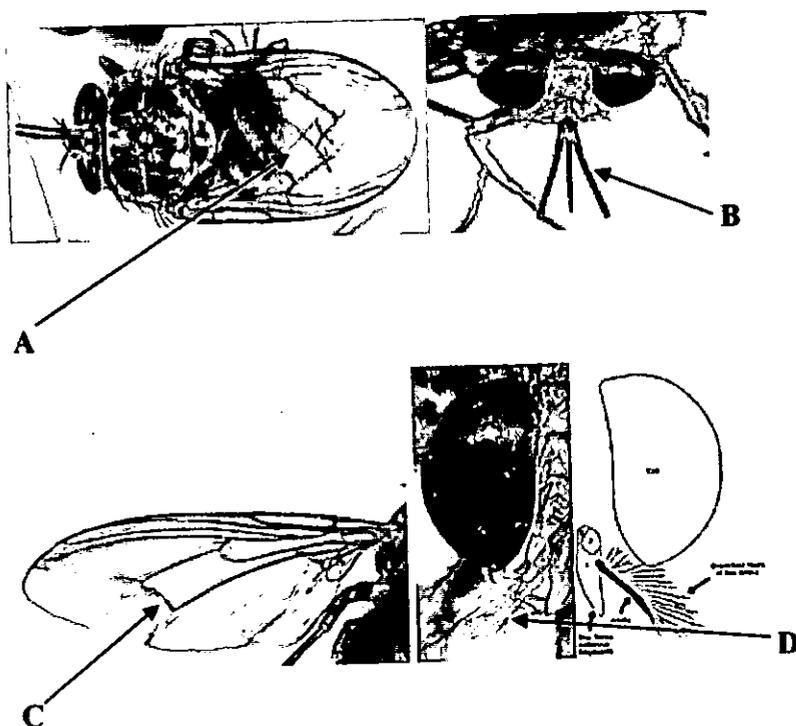
Fonte: Uilenberg (1998).

### 2.3. As moscas tsé-tsés (género *Glossina*)

As tsé-tsés (género *Glossina*) são moscas dípteras, hematófagas, que agem como vectores das várias espécies de *Trypanosoma* na África sub-Sahariana (Connor, 1994; Malele *et al.*, 2003), onde existem cerca de 22 espécies de glossinas, algumas das quais são ainda subdivididas em sub-espécies, por causa de pequenas, mas constantes diferenças anatómicas (Pollock, 1991). Estas espécies de glossinas encontram-se distribuídas em três grupos: Morsitans, Palpalis e Fusca. Em Moçambique ocorrem apenas dois grupos, o Morsitans e o Fusca (Sigauque e Jamal, em comunicação pessoal, 2007).

Uma *Glossina* adulta é semelhante a uma mosca doméstica, mas apresenta quatro características distintivas, (figura 2): a dobra das asas por cima do abdómen quando a mosca está em repouso, com a aparência de uma tesoura fechada; uma probóscide longa;

uma célula em forma de machado nas asas e aristas nas antenas com pêlos que se ramificam ([www.wikipedia.com.br](http://www.wikipedia.com.br)).



**Fig. 2.** As quatro principais características distintivas das glossinas: Asas em repouso (A), probóscide longa (B), célula em forma de machado (C) e aristas nas antenas (D).

Fonte: [www.wikipedia.com.br](http://www.wikipedia.com.br)

As moscas tsé-tsés são endémicas do continente africano (Itard, 1989), elas expandem-se por cerca de 10 milhões de Km<sup>2</sup>, (1/3) do continente, numa que compreende 37 países (Itard, 1989; Boyt, 1991; Connor, 1994), (figura 1, do anexo A1). Em Moçambique (figura 2, anexo A2) existem quatro espécies de glossinas: *Glossina morsitans morsitans*, *Glossina pallidipes*, *Glossina austeni*, *Glossina brevipalpis* e na região sul do país, particularmente no distrito de Matutuine, onde a Reserva Especial de Maputo está inserida, as espécies de glossinas existentes são *G. austeni* e *G. brevipalpis* (Sigaúque *et al.*, 2000). A *G. austeni* ocorre desde o rio Rovuma até ao rio Maputo, sendo o seu principal habitat as florestas densas, os bosques perenes e os tufos isolados ao longo

de um raio de distribuição de cerca de 200 Km da costa. A *G. brevipalpis* ocorre na zona costeira com floresta densa, particularmente na Reserva de Maputo (Sigauque e Jamal, em comunicação pessoal, 2007).

### 2.3.1. Localização dos tripanossomas nos órgãos das moscas tsé-tsés.

Existem diferenças importantes na localização dos tripanossomas dentro do vector durante o seu desenvolvimento (figura 3, anexo A3).

As glossinas ingerem os tripanossomas do sangue, ou da linfa, ao se alimentarem em um hospedeiro infectado, em seguida, os tripanossomas perdem a camada superficial glicoprotéica e, no caso do *T. brucei* e *T. congolense*, tornam-se alongados e multiplicam-se no intestino médio antes de migrarem para as glândulas salivares (*T. brucei*) e para a probóscida (*T. congolense*). Nessa altura, sofrem uma transformação, perdendo a forma tripanossómica típica, ou tripomastigota, e adquirem uma forma epimastigota. Após a multiplicação dos epimastigotas, transformam-se novamente em pequenas formas tripomastigotas, envoltos por uma camada superficial glicoprotéica. São essas as formas infectantes para o próximo hospedeiro e são denominadas tripanossomas metacíclicos. Todo o processo dura no mínimo, duas ou três semanas e os tripanossomas metacíclicos são inoculados no novo hospedeiro quando a mosca tsé-tsé se alimenta. Com o *T. vivax*, ocorre um processo semelhante de desenvolvimento cíclico, excepto que o mesmo se dá inteiramente no interior da probóscida (Connor, 1994; Connor & Van Den Bossche, 2004).

### 2.4. Epidemiologia da tripanossomose

A epidemiologia é o estudo das doenças de uma população e dos factores que determinam a sua ocorrência. A epidemiologia das tripanossomoses animais africanas está intimamente relacionada com os habitats da mosca tsé-tsé (Connor, 1994; Connor & Van Den Bossche, 2004), pois os ciclos de transmissão dos tripanossomas ocorrem ao longo dos 10 milhões de Km<sup>2</sup> infestados por este vector (Connor, 1994).

Os factores que potenciam o carácter epidemiológico das tripanossomoses são:

- A existência de um elevado número de animais selvagens hospedeiros tripanoresistentes, que constituem um enorme reservatório de tripanossomas para as glossinas (Connor, 1994);
- O facto de as glossinas, uma vez infectadas, permanecem assim por toda a sua vida, e formarem também elas um reservatório de infecções. (Connor, 1994).
- A variação antigénica, pois a instabilidade de certos antígenos dos tripanossomas nos animais infectados limita o progresso na imunidade à tripanossomose. E os antígenos variáveis incluem aqueles que podem estimular a produção de anticorpos de protecção (Mulligan, 1970).

## 2.5. Taxas de infecção de glossinas por tripanossomas

Segundo Itard (1989), as taxas de infecção correspondem à percentagem de glossinas infectadas por tripanossomas dentro de uma população. As taxas de infecção dependem dos seguintes factores:

- (i) **Capacidade vectorial da Glossina** – Que consiste na capacidade da glossina em ser infectada, em permitir o desenvolvimento completo das formas infeciosas dos tripanossomas e em transmiti-las (Itard, 1989).
- (ii) **A espécie de Glossina e a espécie de Trypanosoma** – As taxas de infecção de glossinas são baixas para as espécies de *Trypanosoma* que apresentam ciclos de desenvolvimento complexos e altas para as espécies de *Trypanosoma* com ciclos de desenvolvimento curtos (Itard, 1989).
- (iii) **O número de refeições e a idade das moscas** – Depois da primeira refeição, os tripanossomas podem facilmente penetrar a membrana peritrófica, dado que em moscas jovens estas não alcançaram ainda a consistência e tamanho definitivos. As glossinas adultas são pouco infectadas por algumas espécies de *Trypanosoma*, porém elas podem apresentar altas taxas de infecção, dado que

tiveram mais oportunidades do que as jovens de se alimentar em vários hospedeiros infectados por diferentes espécies de *Trypanosoma*.

- (iv) **A estação do ano** – Durante a estação chuvosa, as glossinas têm uma actividade máxima, com longos períodos de vida, devido às condições de temperatura e humidade favoráveis. Estas condições conduzem a uma redução do ciclo de desenvolvimento dos tripanossomas e a um aumento na infectividade. Durante a estação quente, embora as altas temperaturas aumentem a infectividade dos tripanossomas e encurtem o seu ciclo de desenvolvimento, elas são desfavoráveis para as glossinas, cuja população torna-se menor, jovem e mais localizada. Elas podem, porém, mostrar altas taxas de infecção dependendo da disponibilidade dos hospedeiros infectados (Itard, 1989).

## 2.6. A PCR na epidemiologia da tripanossomose

A sigla PCR, significa *Polymerase Chain Reaction*, que em português seria reacção em cadeia da polimerase (Saiki *et al.*, 1985; White *et al.*, 1989; Griffith *et al.*, 1992). A PCR é uma técnica que torna possível a amplificação exponencial *in vitro* de um fragmento particular de ADN, para o qual cerca de 18 a 30 pb da extremidade da sequência são conhecidos (Desquesnes e Dávila, 2002; Hartl & Jones, 2006), permitindo obter grandes quantidades desse fragmento por replicação selectiva (Hartl & Jones, 2006). A PCR foi tornada possível devido à descoberta de uma ADN polimerase resistente à temperatura, a *Taq* polimerase, uma polimerase originalmente isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus* (Dobbelaere & Roditi, 1996; Desquesnes & Dávila, 2002; Hartl & Jones, 2006). Na PCR são utilizados *primers* ou iniciadores, estes são oligonucleótidos sintéticos que devem ser complementares às sequências de nucleótidos nas extremidades do segmento de ADN alvo, para poderem flanqueá-lo. Um dos *primers* deve ser complementar à extremidade 3' da fita anti-senso – o *primer* adiante (*Forward*) – enquanto o outro *primer* – o *primer* reverso (*Reverse*) – deve ser complementar à extremidade 3' da fita com senso (Darbre, 1999, OIE, 2004).

Após 30 a 40 ciclos de PCR, o ADN é amplificado aproximadamente 270 milhões de vezes, e o produto resultante pode ser visualizado num gel de agarose, ou poliacrilamida, depois de corado com brometo de etídio e exposto a luz ultra-violeta. O tamanho específico do produto da PCR é avaliado por migração simultânea do marcador de peso molecular e do controle positivo. A falha num dos reagentes da PCR é avaliada pela utilização de um controle positivo que, por isso, deve ser corrido sistematicamente com as amostras a testar (Desquesnes e Dávila, 2002). O controle negativo deve também ser corrido sistematicamente com as amostras pois não é possível identificar uma contaminação quando esta ocorre numa amostra individual, só é possível identificar uma contaminação quando o controle negativo aparece positivo (Desquesnes e Dávila, 2002).

Os primeiros desenvolvimentos da PCR, para identificação de tripanossomas, foram publicados por Moser *et al.* em 1989, (Desquesnes & Dávila, 2002), e tem aberto grandes e extensivas possibilidades de detecção de parasitas e de patógenos em geral (Dobbelaere & Roditi, 1996).

Já foram desenvolvidos *primers* para os principais tripanossomas patogénicos: *Trypanozoon* (Masiga *et al.*, 1992), *T. vivax* (Masiga *et al.*, 1992), *T. evansi* (Artama *et al.*, 1992 citados por Desquesnes & Dávila, 2002), *Trypanosoma simiae*, *T. congolense* tipos savannah, forest, e Kilifi (Masiga *et al.*, 1992), *T. godfreyi* (Masiga *et al.*, 1996) e *Trypanosoma cruzi* (Diaz *et al.*, 1992 citados por Desquesnes & Dávila, 2002).

Um grande número de temas importantes, epidemiológicos tem sido discutido com base na aplicação da PCR para o problema da tripanossomose animal. Estes incluem (i) a estrutura da população de tripanossomas, (ii) as interações dos tripanossomas com as moscas tsé-tsés nos diferentes ecossistemas, (iii) a caracterização dos tripanossomas nas infecções naturais do gado colocado sobre diferentes sistemas de manejo, (iv) as respostas da população de tripanossomas a drogas terapêuticas administradas a animais infectados experimentalmente, (v) o monitoramento do gado e dos vectores para a presença dos tripanossomas durante os programas de controle da tripanossomose, (vi) o acesso ao desafio dos tripanossomas aos animais selvagens localizados nos parques nacionais ou áreas de conservação, (vii) a detecção de infecções mistas e o acesso a extensão da expansão dos tripanossomas infecciosos ao homem na população reservatória (Eisler *et al.*, 2004).

### 2.6.1. Alvos da PCR para a detecção de tripanossomas

As regiões ITS 1 e ITS 2 (*Internal Transcribed Spacer 1/2*) do ADN ribossomal são os alvos apropriados para o diagnóstico dos tripanossomas baseado na PCR. O uso de *primers* desenvolvidos para a região ITS permite um diagnóstico multi-espécie-específico utilizando uma única PCR (Desquesnes e Dávila, 2002; Njiru *et al.* 2005). Estas regiões, nos parasitas, constituem marcadores genéticos para a diferenciação inter-específica porque são intra-especificamente muito conservadas (Desquesnes e Dávila, 2002; Njiru *et al.* 2005) e correspondendo a sequências de múltiplas repetições tandem (Desquesnes e Dávila 2002).

A região ITS1 tem usualmente 300-800 bp de comprimento, o qual varia com a espécie, porém presume-se que seja constante dentro de cada espécie (Desquesnes *et al.*, 2001). A evolução tem indicado que os seguintes taxa de tripanossomas podem ser identificados através de um único PCR (ITS) (mesmo no caso de mistura de ADN espécie específico): *T. vivax*, *T. theileri*, *T. simiae*, *Trypanozoon*, *T. congolense savannah*, *T. congolense forest* e *T. congolense Kilifi*. Todas as espécies de *Trypanozoon* dão o mesmo tamanho de produto ITS (Desquesnes *et al.*, 2001).

O uso de *primers* para a região ITS1, no diagnóstico, é três vezes mais barato do que o uso de *primers* espécie-específicos clássicos, dado que o número de reações requeridas para cada amostra é reduzido a uma única reação (Desquesnes e Dávila 2002). Adicionalmente, o uso destes *primers* pode levar à identificação de espécies de tripanossomas não esperadas, especialmente em hospedeiros selvagens, em vectores e em amostras de campo (Desquesnes e Dávila 2002).

A aplicação da PCR oferece uma ampla gama de ferramentas e metodologias para o empreendimento das análises epidemiológicas da tripanossomose (Hide & Tait, 2004).

### **3. OBJECTIVOS**

#### **3.1. Geral**

- Detectar, e identificar, molecularmente, pelo método de PCR, espécies de *Trypanosoma* nas glossinas da Reserva Especial de Maputo.

#### **3.2. Específicos**

- Capturar e identificar as espécies de *Glossina* na Reserva Especial de Maputo.
- Identificar as diferentes espécies de *Trypanosoma* encontradas nas glossinas da Reserva Especial de Maputo.
- Determinar as taxas de infecção das glossinas por tripanossomas.

#### 4. ÁREA E LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

##### 4.1. Área de estudo

Reserva Especial de Maputo. Está situada no extremo sul de Moçambique, na margem direita do rio Maputo, ocupando uma extensão de cerca de 800 Km<sup>2</sup>. Dista 77 Km da cidade de Maputo, via Catembe, e 117 Km, via Boane (Tello, 1973), como ilustra a figura 4 do anexo B1.

O clima da região é caracterizado por ter um verão quente e chuvoso (Outubro-Março) e um inverno frio e seco (Abril-Setembro). A precipitação varia de 690 a 1000 mm (Ntumi, 2002). A temperatura média anual é de 22,6 °C (Haandrikman, 1998).

Segundo Van Wyk (1994), a R.E.M faz parte do centro de endemismo de Maputaland, e é rica em biodiversidade animal e vegetal, ocorrendo nela cerca de 100 espécies de plantas vasculares, cerca de 14 espécies de mamíferos, 23 espécies de répteis e 7 espécies de peixes de água doce (DNFFB, 1997). Podem ser encontrados na Reserva, para além de elefantes e hipopótamos, algumas espécies de antílopes como a Nyala (*Tragelaphus angasii*), Imbabala (*Tragelaphus scriptus*), Chango (*Redunca arundinum*), Cabrito Vermelho (*Cephalophus natalensis*) e Cabrito-cinzento (*Sylvicapra grimmia*), Chipene (*Raphicerus campestris*) e Cabrito-Chengane (*Neotragus moschatus*), (Hatton *et al.*, 1995 citados por Haandrikman, 1998).

A vegetação (figura 5, do anexo B2) da R.E.M é constituída principalmente por seis comunidades vegetais: mangais, vegetação dunar, planícies de gramíneas, florestas, florestas abertas e vegetação ribeirinha (De Boer *et al.*, 2000).

##### 4.2. Local de Realização do estudo

Centro de Biotecnologia da UEM. Está situado na Faculdade de Veterinária, Av. de Moçambique Km 1.5, em Maputo.

## 5. MATERIAL E METODOLOGIA

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Material de captura e identificação das glossinas

- Armadilhas Epsilon
- Frasco de odor
- Odor (acetona)
- Lupa
- Ficha de registo
- Lápis para registo
- GPS
- Pilhas para GPS
- Catana

#### 5.1.2. Material de laboratório e equipamentos

- Tubos eppendorf
- Tubos falcon
- Micropipetas de volumes variados
- Banho-maria
- Balança de precisão
- Centrífuga
- Trans-Iluminador UV
- Lamparina
- Bisturi
- Máquina fotográfica digital
- Luvas
- Fluxo laminar com luz U.V.
- Termociclador iCyclerBIORAD®
- Equipamento de electroforese
- Material de vidro de laboratório
- Papel de alumínio
- Espectofotómetro

### 5.1.3. Reagentes

#### Álcoois

- Etanol a 70%
- Etanol a 100%
- Fenol-clorofórmio-isoamil

#### Enzimas

- Proteinase
- *Taq* polimerase

#### Outros

- Agarose Invitrogen™

#### Soluções salinas

- NaCl a 6M
- MgCl<sub>2</sub>
- SDS
- Acetato de sódio

#### Tampões

- PBS
- TE

#### Nucleótidos (sintéticos)

- Marcadores de peso molecular
- *Primers* (Tabela 1)

Tabela 2. *Primers* ou oligonucleótidos

<i>Primer</i>	Sequência - 5' a 3'	Espécie	Tamanho do produto (pb)	Referência
ITS cf ITS br	CCGGAAGTTCACCGATATTG TTGCTGCGTTCTTCAACGAA	<i>T. congolense</i> tipo <i>forest</i>	710	Njiru <i>et al.</i> , 2005
		<i>T. congolense</i> tipo <i>savannah</i>	700	
		<i>T. congolense</i> tipo <i>kilifi</i>	650	
		Sub-grupo <i>Trypanozoon</i>	480	
		<i>T. simiae</i> .	400	
		<i>T. simiae tsavo</i> .	370	
		<i>T. godfreyi</i> .	300	
		<i>T. vivax</i> .	250	

## 5.2. Metodologia

### 5.2.1. Captura das Glossinas

As Glossinas foram capturadas na R.E.M., com o auxílio de armadilhas "Y" (figuras 6, anexo C1) e através de ronda de carro, segundo o método descrito por Pollock *et al.*, 1991. As armadilhas foram montadas dentro da R.E.M. Usou-se uma catana para limpar os locais onde as armadilhas foram colocadas, as coordenadas dos locais foram registadas com a ajuda de um GPS e anotadas na ficha de registo (tabela 1, anexo C2). As armadilhas consistiam numa armação de 5 ferros rodeada por um pano azul, com um frasco com acetona dentro, para atrair as moscas, e uma garrafa plástica no topo, local onde as moscas ao entrar em, ficavam presas. Todas as glossinas capturadas foram conservadas em tubos de eppendorf contendo etanol a 70% e levadas para o Centro de Biotecnologia da UEM (CB-UEM).

### 5.2.2. Identificação das Glossinas

Todas as glossinas capturadas foram enumeradas de um em diante para facilitar a etiquetagem e controle. A identificação das espécies de *Glossina* foi feita através da observação das características morfológicas distintivas, com ajuda de uma lupa, e, na mesma altura, identificou-se o sexo.

### 5.2.3. Extração de ADN

Para a extração de ADN, seguiu-se o protocolo de D'Oliveira *et al.*, 1997 (anexo E).

### 5.2.4. Quantificação do ADN

Após a extração, fez-se a quantificação do ADN no espectrofotómetro, para verificar a pureza do ADN extraído. Seguiu-se o protocolo descrito por Darbre, 1999 (anexo F). Considerou-se puro o ADN cuja razão no espectrofotómetro encontrava-se no intervalo entre 1.7 e 2.0. Abaixo deste intervalo- contaminação por ARN e acima deste- contaminação por proteínas.

### 5.2.5. PCR para a amplificação do ADN dos tripanossomas

A PCR foi feita segundo o descrito por Njiru *et al.*, 2005, com modificações nas condições da PCR, com o objectivo de aumentar a qualidade das bandas de ADN obtidas. Assim, houve alteração da concentração do cloreto de magnésio, passando esta de 2 mM para 2.5 mM por reacção, e alterou-se também o número de ciclos da PCR de 35 para 38 ciclos.

*Primers* : ITS1 cf (*Forward*); ITS1 br (*Reverse*)

- Mistura da reacção

Cada reacção tinha um volume total de 25 µl, sendo 23 µl da mistura de reacção e 2 µl de ADN. As concentrações finais dos reagentes eram: 1x tampão de PCR, 200µM dNTPs, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1µM de cada *primer*, 0.5U/µl *Taq*-polimerase. As reacções decorreram nas condições descritas na Tabela 3. Incluiu-se em cada grupo de reacção, os controis negativo (reacção sem ADN, com água no lugar deste) e positivo (reacção com ADN conhecido positivo).

Tabela 3: Condições da PCR para amplificação da região ITS1.

Etapa	Objectivo	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
1	Desnaturação inicial	94 °C	5 min	1
2	Desnaturação	94 °C	40 s	
3	Pareamento ou <i>annealing</i>	65 °C	40 s	38
4	Extensão	72 °C	90 s	
5	Extensão final	72 °C	10 min	1

### 5.2.6. Electroforese dos produtos da PCR

Todos os produtos das PCR's, incluindo os controis negativo e positivo e os marcadores de peso molecular, foram revelados por electroforese em gel de agorose a 1 %, em tampão TBE 1x (0.1M tris-base, 0.1M ácido bórico, 0.005M EDTA, pH 8.3), na presença de brometo de etídio a 0.5 µg/ml. Para a corrida, 10µl do produto da PCR foram misturados a 2 µl de azul de bromo fenol 6x, como tampão de "carregamento", e o TBE 1x foi também usado como tampão de "corrida". A corrida electroforética decorreu a 100 volts por 45 minutos. O gel foi examinado no trans-iluminador UV ligado ao computador com o programa *Quantity One*, para visualização das bandas e as imagens foram gravadas no computador. O resultado foi considerado positivo quando para cada amostra

as bandas visíveis no gel, após a electroforese, apresentassem o peso molecular esperado, ou próximo do esperado, admitindo-se variações até 15 pb.

### 5.2.7. Análise dos resultados

Calculou-se a taxa de infecção das glossinas por tripanossomas, esta foi o número total de glossinas com infecções tripanossómicas sobre o número total de glossinas:

$$Ti = \frac{N^{\circ}Gi}{NtG}$$

onde: **TI** – taxa de infecção

**N<sup>o</sup>Gi** – número de glossinas com tripanossomas

**NtG** – número total das glossinas

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Captura das glossinas

Foram capturadas duas espécies de glossinas, *Glossina austeni* e *Glossina brevipalpis* pela estudante na R.E.M. A média geral de captura diária foi de 25 glossinas/dia. Foi capturado um número total de 201 glossinas (figura 3), destas, 186 (92.54%) eram da espécie *Glossina brevipalpis*, e 15 (7.46%) eram da espécie *Glossina austeni*. O número total de machos foi de 166 (82.59%) o total das fêmeas foi de 35 (17.41%).

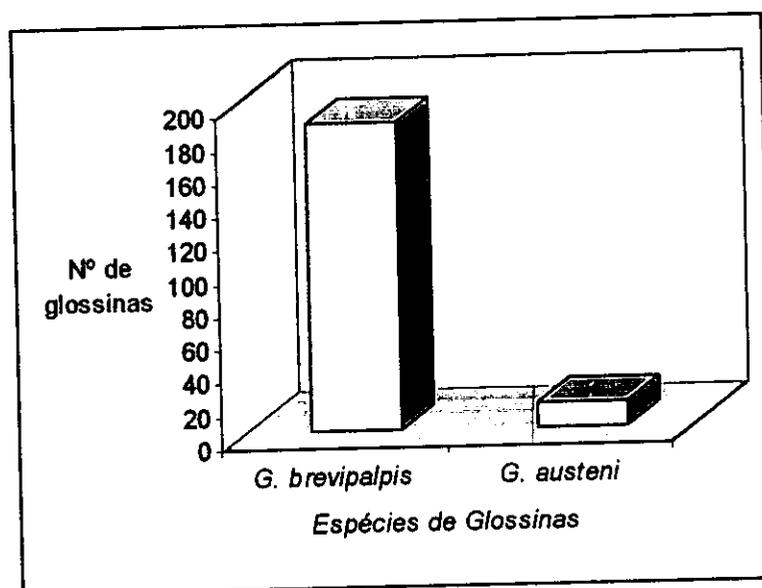


Fig. 3. Número total de glossinas capturadas por espécie.

## 6.2. PCR com primers ITS1 cf/br

Das 201 glossinas analisadas, 15 estavam infectadas por tripanossomas (tabela 4), dando uma taxa de infecção de cerca de 7.46%, as restantes 186 foram negativas.

Das 15 (7.46%) glossinas infectadas, apenas duas espécies de tripanossomas foram identificadas 10 *Trypanosoma brucei brucei* (66.7%) e 5 *Trypanosoma vivax* (33.3%).

Tabela 4. Espécies de tripanossomas identificadas através da PCR.

Espécie esperada de acordo com ITS1	Tamanho da banda ITS1	Nº total de amostras	Espécies identificadas por PCR
<i>T. congolense</i> tipo forest	710	201	0
<i>T. congolense</i> tipo savannah	700	201	0
<i>T. congolense</i> tipo kilifi	650	201	0
Sub-grupo <i>Trypanozoon</i>	480	201	10
<i>T. simiae</i>	400	201	0
<i>T. simiae tsavo</i>	370	201	0
<i>T. godfreyi</i>	300	201	0
<i>T. vivax</i>	250	201	5
Total			15

A maioria das glossinas positivas foi da espécie *G. brevipalpis* (14; 93.3%), duas fêmeas e doze machos e da espécie *G. austeni* (1; 6.7%), uma fêmea, perfazendo um total de três fêmeas e 12 machos positivos (tabela 5).

Tabela 5. Glossinas positivas, espécies de glossinas.

Código da <i>Glossina</i>	Espécie de <i>Glossina</i>	Sexo da <i>Glossina</i>	Espécie de <i>Trypanosoma</i> detectada
3	Gb	F	Tv
39	Gb	M	Tryp
73	Gb	M	Tv
87	Gb	M	Trp
110	Gb	M	Trp
115	Gb	M	Trp
124	Gb	M	Trp
126	Gb	M	Trp
128	Gb	M	Tv
142	Gb	M	Typ
144	Gb	M	Typ
176	Ga	F	Tv
179	Gb	M	Tv
196	Gb	M	Trp
198	Gb	F	Typ

Gb, *Glossina brevipalpis*; Ga, *Glossina austeni*; Tv, *T. vivax*; Typ, *Trypanozoon*

As figuras 4 e 5, são exemplos de geis de agarose para as amostras que apresentaram resultado positivo. Todos os controis, tanto os positivos como os negativos, apresentaram os resultados esperados.

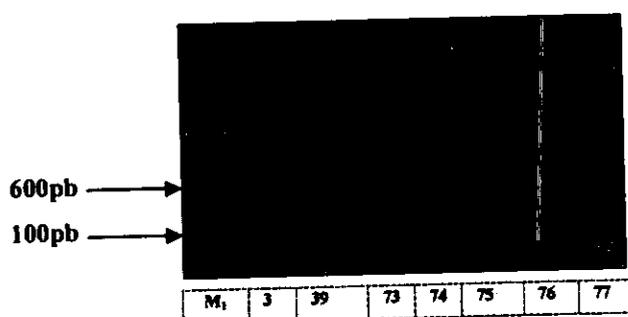


Fig. 4. Gel da agarose para algumas das amostras positivas. Note-se as amostras 74, 75, 76 e 77 apresentam-se negativas, e que a banda da amostra 3 apresentou-se ténue. A banda mais leve do marcador de peso molecular (M<sub>1</sub>) tinha um peso de 100 pb.

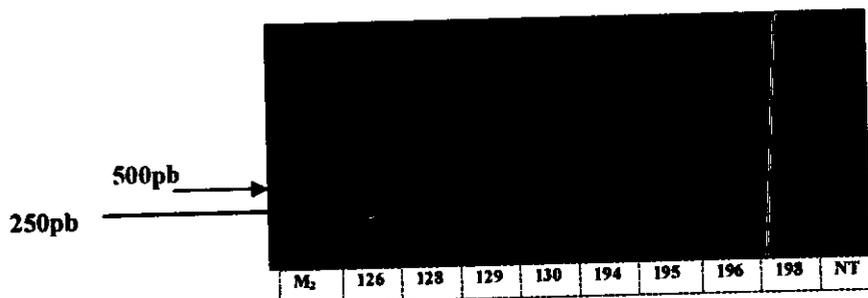


Fig. 5. Gel da agarose para algumas das amostras positivas. Note-se que as amostras 129, 130, 194, 195 foram negativas e que a banda da amostra 198 apresentou-se ténue. A banda mais leve do marcador de peso molecular (M<sub>2</sub>) tinha o peso de 500 pb.

A figura 6 abaixo, mostra o resultado do gel com todas as amostras positivas.

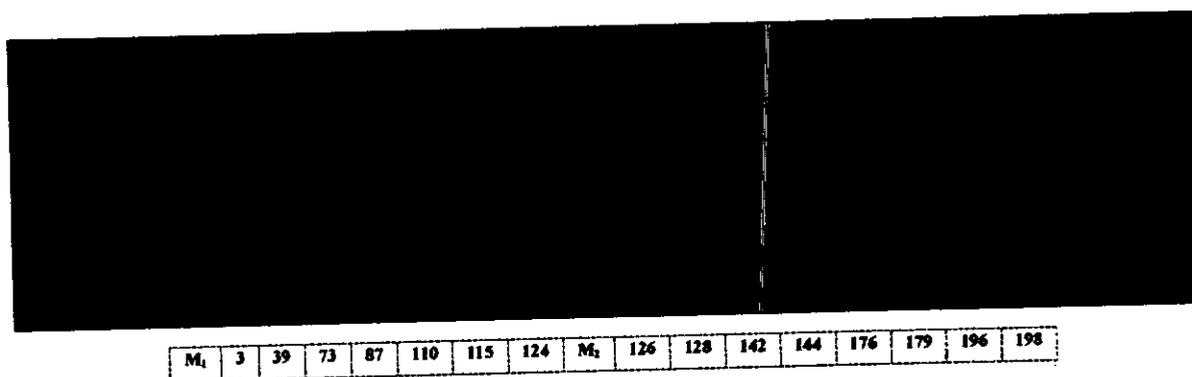


Fig. 6. Gel da agarose para todas as amostras que foram positivas. A banda mais leve do marcador de peso molecular (M<sub>1</sub>) tinha um peso de 100 pb e a do marcador de peso molecular (M<sub>2</sub>) tinha o peso de 500 pb.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Glossinas capturadas

Do total de glossinas capturadas, a proporção de fêmeas foi de 17.4% contra 82.6% de machos. Segundo Morlais *et al.* (1998), a proporção de fêmeas e de machos durante a captura de glossinas é afectada pelo método de captura. As armadilhas de captura causam taxas opostas, com uma maioria de machos (Eouzan & Ferrara, 1978 citados por Morlais *et al.*, 1998). No presente trabalho a ronda de carro foi o método de captura que garantiu maior número de amostras, 168 glossinas enquanto que nas armadilhas foram capturadas 33 glossinas. É possível que os machos sejam significativamente mais atraídos durante a ronda do que as fêmeas.

### 7.2. PCR com *primers* ITS1 cf/br

Njiru *et al.*, (2005), demonstraram que os *primers* ITS1 cf/br apresentam alta sensibilidade e especificidade, isto é, não amplificam o ADN do hospedeiro, nem do vector, e têm a capacidade de detectar todos os tripanossomas patogénicos numa única reacção de PCR, indicando o enorme potencial deste sistema como um teste universal para todos tripanossomas patogénicos. Os *primers* ITS1 cf/br, foram desenhados para amplificarem a região conservada dos genes rADN. Especificamente, ITS1 cf anela com a região 18S e ITS1 br, anela com a região 5.8S do rADN, permitindo a amplificação da região ITS1 que varia em tamanho entre as espécies de tripanossomas (Desquesnes & Dávila, 2002), e que em princípio deve diferenciar os tripanossomas pelos tamanhos em pb de suas regiões ITS.

Os resultados obtidos no presente estudo, mostram que os *primers* ITS1 cf/br, permitiram a amplificação do ADN dos tripanossomas, porém, algumas bandas produzidas nos geis de agarose foram ténues. As bandas ténues podem ter sido devidas à quantidade de ADN presente nas amostras. Baixas concentrações de ADN podem ser inferiores ao limite de detecção do teste, enquanto que as concentrações elevadas podem exercer um efeito inibidor da reacção de polimerização. Segundo Desquesnes e Dávila

(2002), no geral, as bandas fracas ou os resultados negativos estão muitas vezes associados à quantidade de ADN presente na amostra.

Todas as amostras positivas obtidas no presente trabalho, produziram uma banda simples com o tamanho compreendido entre 250 a 750 pb, em concordância com estudos prévios de detecção de tripanossomas usando estes *primers* (Adams *et al.*, 2006).

A técnica da PCR permitiu identificar uma espécie e um subgénero de *Trypanosoma* nas glossinas da R.E.M: *T. vivax* e subgénero *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. rhodesiense*, *T. gambiense*, *T. evansi*, *T. equiperdum*). A partir dos resultados de estudos epidemiológicos já realizados na zona da R.E.M. pode-se afirmar que a espécie de *Trypanozoon* encontrada é a *T. brucei brucei*.

### 7.3. Taxas de infecção das glossinas

As taxas de infecção de glossinas por tripanossomas geralmente não são muito altas. Adams *et al.*, 2006, usando *primers* ITS1 obtiveram uma taxa de infecção de 6%. Morlais *et al.* (1998), nos Camarões identificaram através da técnica de PCR, 10.4% de infecções tripanossomas em glossinas; Malele *et al.* (2003), identificaram também através da técnica de PCR, 24% de probóscides de glossinas infectados por tripanossomas. No presente trabalho, a taxa de infecção das glossinas da Reserva Especial de Maputo por tripanossomas foi de 7.5% para *G. brevipalpis* e 6.7% para *G. austeni*, sendo estas taxas próximas das geralmente encontradas neste tipo de trabalho. Segundo Adams *et al.* (2006), algumas amostras positivas podem apresentar resultados negativos e este facto pode ser devido a presença de inibidores como as proteinases ou outras substâncias do intestino médio das moscas.

Segundo Malele *et al.*, (2003), as diferentes espécies de *Glossina* apresentam diferentes taxas de infecção por tripanossomas possivelmente, devido ao facto de as diversas espécies se alimentarem em hospedeiros diferentes ou devido a preferência ou probabilidade de encontro com o hospedeiro dentro do habitat. Assim, 60% das refeições da *G. austeni* são retiradas do porco do mato e os restantes dos bovinos e do cabrito do mato, enquanto a *G. brevipalpis* retira cerca de 40% das suas refeições do hipopótamo,

30% do porco do mato, 10% do búfalo e o restante de outros animais (Pollock, 1991). 14 (93.3%) das glossinas positivas eram da espécie *G. brevipalpis* e 1 (6.7%) era da espécie *G. austeni*, contudo, a espécie *G. brevipalpis* foi capturada em maior número em relação a *G. austeni* (figura 3), não sendo por isso possível relacionar a taxa de infecção ao factor espécie.

As taxas de infecção de glossinas por tripanossomas são geralmente mais altas em fêmeas do que em machos na mesma área, dado que o tempo de vida dos machos é menor (um mês) em relação ao das fêmeas (dois meses), (Itard, 1989). Segundo Njiru *et al.* (2004), as diferenças nas taxas de infecção por tripanossomas entre machos e fêmeas de glossinas, pode ser a reflexão da suscetibilidade discrepante dos dois sexos à infecções tripanossómicas, com as fêmeas sendo mais susceptíveis em relação aos machos pela sua longevidade e frequência na alimentação. Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com as constatações destes autores, uma vez que as fêmeas apresentaram a taxa de infecção de 9% (em 35 fêmeas) e os machos de 7% (em 166 machos).

Um aspecto bastante curioso neste estudo, foi o facto de não se ter encontrado nenhuma espécie de *T. congolense* em nenhuma das 201 glossina, em contraste com o facto de no distrito de Matutuine, onde têm sido feitos trabalhos de prospecção de tripanossomas em sangue de bovinos e outros animais, a espécie *T. congolense* ter sido consistentemente a mais predominante. Em estudos realizados no distrito de Matutuine, Sigauque *et al.*, (2000), tiveram uma percentagem de infecção de 73% para *T. congolense* em relação a 13.5% para *T. vivax*, 5.7% para *T. brucei* em bovinos.

## 8. CONCLUSÕES e RECOMENDAÇÕES

### 8.1. Conclusões

- Na Reserva Especial de Maputo ocorrem pelo menos duas espécies de glossinas (*G. brevipalpis* e *G. austeni*), e estas espécies encontram-se infectadas por tripanossomas.
- O método de PCR permitiu detectar e identificar duas espécies de tripanossomas nas glossinas da R.E.M: o *Trypanosoma vivax*, em *G. brevipalpis* e *G. austeni*, e o *Trypanosoma brucei brucei* em *G. brevipalpis*.
- A taxa de infecção por tripanossomas, das glossinas da Reserva Especial de Maputo encontrada no presente trabalho foi de 7.46%.

### 8.2. Recomendações

- A realização de trabalhos de detecção e identificação de tripanossomas em glossinas através de técnicas moleculares noutras regiões do país dado que em Moçambique nunca foram realizados trabalhos do género.
- A realização de trabalhos para verificar a influência das estações do ano na densidade das glossinas e nas espécies de tripanossomas encontradas.
- Estabelecer um desenho experimental que nos permita responder, a que factores se deve a ausência de positividade ao *Trypanosoma congolense* nas glossinas da R.E.M.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Adams, E., I. Malele, A. Msangi & W. Gibson. (2006). Trypanosome identification in wild tsetse populations in Tanzania using generic primers to amplify the ribosomal RNA ITS1 region. *Acta Tropica*. 100: 103 – 109.

Boyt, W.P. (1991). *Tripanossomoses Animais em África- Diagnóstico, Tratamento e Prevenção- Manual Prático*. FAO.

Connor, R. J., (1994). African animal trypanosomiase. 165-180 pp. In: Coetzer, J. A., G. R. Thomson, R. C. Tustin & N. P. Kriek. (1994). *Infectious Diseases of Livestock-With special reference to Southern Africa*. Vol. 1. 723 pp. Oxford.

Connor, R.J., & P. Van Den Bossche. African animal trypanosomoses. In: Coetzer, J.A., Tustin, R.C. (2004). *Infectious diseases of livestock*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 1. South Africa: Oxford University Press.

Darbre, D. P. (1999). *Basic Molecular Biology: essential techniques series*. John Wiley & Sons Ltd. England. 194 pp.

DCB. (2000). *Mapa de Vegetação da Reserva de Elefantes de Maputo*. UEM. Maputo.

De Boer, W. F., C. P. Ntumi. A. U. Correia & J. M. Mafuca. (2000). Diet and Distribution of Elephant in the Maputo Elephant Reserve, Mozambique. *Afr. J. Ecol.* 38: 188-201.

Desquesnes, M., G. McLaughlin, A. Zoungrana & A. Dávila. (2001). Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. 31: 610 – 614.

Desquesnes, M. & A. Dávila. (2002). Application of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Veterinary Parasitology*. 109: 213-231.

DNFFB. (1997). Plano de Maneio da Reserva Especial de Maputo. 1997-2001. Direcção Nacional de Floresta e Fauna Bravia. Maputo.

Dobbelaere, D. & I. Roditi. (1996). Molecular Biological Techniques. In: Kaufmann, J. (1996). *Parasitic Infections of Domestic Animals- A Diagnostic Manual*. Birkhauser Verlag- Berlin.

D'Oliveira, C., M. van der Weide, P. Jscquiet, F. Jongejan. (1997). Detection of *Theileria annulata* by PCR in ticks (Acari: Ixodidae) collected from cattle in Mauritania. *Experimental & Applied Acarology*. 21: 279-291.

Eisler, M. C., R. H. Dwinger, P. A. Majiwa & K. Picozzi. Diagnosis and epidemiology of African animal trypanosomiasis. In: Maudlin, I., P. Holmes & M. Miles.(2004). *The trypanosomiasis*. 595 pp. CABI publishing.

Griffith R., P. S. Walsh, G. Dollinger & H. Higuchi. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 10 (4): 178

Haandrikman, V. H. (1998). Vegetation and Elephants in Reserva Especial de Maputo Mozambique. MSc Thesis. Agricultural University of Wageningen.

Hartl, D. L., & E. W. Jones. (2006). *Essential Genetics- A Genomics perspective*. 4ª edição. Jones and Bartlett publishers.

Hide, G., & A. Tait .Genetics and molecular epidemiology of trypanosomes. In: Maudlin, I., P. Holmes & M. Miles.(2004). *The trypanosomiasis*. 595 pp. CABI publishing.

Itard, J. African Animal Trypanosomoses. In: Shah-Fischer, M., & R. R. Say. (1989). Manual Of Tropical Veterinary Parasitology. 465pp.

Jamal, S., I. Sigauque, C. Macuamule, L. Neves, B.L. Phenzhorn, T. Marcotty & P.V. Van Den Bossche, (2005). The susceptibility of *T. congolense* isolated in Zambezia Province, Mozambique, to isometamidium chloride, diminazene aceturate and homidium chloride. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 72 (4): 333-8.

Kaufmann, J. (1996). Parasitic infection of domestic animal. Library of Congress. Washington. USA. pp 11, 22-63, 74.

Malele, I., L. Craske, C. Knight, V. Ferris, Z. Njiru, P. Hamilton, S. Lehane, M. Lehane & W. Gibson. (2003). The use of specific and generic primers to identify trypanosome infections of wild tsetse flies in Tanzania by PCR. Infection, Genetics and Evolution. 3: 271– 279.

Masiga, D. K., A. Smyth, P. Hayes, T. Bromidge & W. Gibson. (1992). Sensitive detection of Trypanosomes in tsetse by DNA amplification. International Journal for Parasitology. 22: 909 – 918.

Masiga, D.K., J.J. McNamara & W.C. Gibson (1996). A repetitive DNA sequence specific for *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi*. Vet. Parasitol. 62, 27–33.

Mesquita, R. A., E. K. Anzai, R. N. Oliveira & F. D. Nunes. (2001). Evaluation of three methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA by means of the PCR technique. Pesqui Odontol Bras. 15 (4): 314-319.

Morlais, I., P. Grebaut, J. Bodo, S. Djoha, G. Cuny & S. Helder. (1998). Detection and identification of trypanosomes by polymerase chain reaction in wild tsetse flies in Cameroon. Acta Tropica. 70: 109 – 117.

- Mulligan, H. W. (1970). The African Trypanosomiases. 823pp.
- Nagel, P. (1995). Environmental monitoring handbook for tsetse control operations. 311pp.
- Njiru, Z. K., J. N. Makumi, S. Okoth, J. M. Ndungu & W. C. Gibson. (2004). Identification of trypanosomes in *Glossina pallidipes* and *G. longipennis* in Kenya. Infection, Genetics and Evolution. 4: 29-35.
- Njiru, Z. K., C. C. Constantine, S. Guya, J. Crowther, J. M. Kiragu, R.C.A. Thompson & A. M.R. Dávila. (2005). The use of ITS1 Rdna PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. Parasitol Res. 95: 186-192.
- Ntumi, C. P. (2002). Space and habitat use by Elephant (*Loxodonta africana*) in the Maputo Elephant Reserva. MSc Thesis. University of Pretoria, South Africa.
- OAU. (2001). Pan African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign (PATTEC).
- OIE. (2004). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 5<sup>th</sup> edition disponível em <http://www.oie.int/> acessado à 20. 05. 07.
- Pereira de Almeida, J. L., M. Ndao, B. Goossens & S. Osaer. (1998). PCR primer evaluation for the detection of trypanosome DNA in naturally infected goats. Veterinary Parasitology. 80: 111-116.
- Picozzi, K., A. Tilley, E.M. Fèvre, P.G. Coleman, J.W. Magona, M. Odiit, M.C. Eisler & Welburn S.C. (2002). The diagnosis of trypanosome infections: applications of novel technology for reducing disease risk. African Journal of Biotechnology. 1 (2): 39-45.

Pollock, J. N. (1991). Manual de preparação de pessoal de controlo das tsés-tsés-  
Biologia sistemática e distribuição das tsé-tsés; técnicas. 1º Vol.

Rodrigues, A. (2006). Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em equinos. Dissertação  
de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

Sigaúque, I., P. V. Den Bossche, M. Moiana, S. Jamal & L. Neves. (2000). The  
distribution of tsetse (Diptera: Glossinidae) and bovine trypanosomosis in the Matutuine  
District, Maputo Province, Mozambique. Onderstepoort Journal of Veterinary Research.  
67:167-172.

Saiki R. K., S. Scharf, F. A. Faloona, B. K. Mulls, T. G. Horn, H. A. Erlich & N.  
Arnheim. (1985). Enzymatic amplification of globins genomic sequences and restriction  
site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 230: 1350-1354.

Tello, J.L.L. (1973). Reconhecimento Ecológico da Reserva Especial dos Elefantes de  
Maputo. Veterinária de Moçambique. 6 (2): 133-186.

Uilenberg, G. (1998). A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of african  
animal trypanosomosis. M-27 ISBN 92-5-104238-1. Rome.

Van Wyk, A. E. (1994). Maputaland-Pondoland Region. South Africa, Swaziland and  
Mozambique. In (Eds) Centres of Plant diversity. A guide and Strategy for their  
conservation. Vol. 1. WWF & IUCN 227-235.

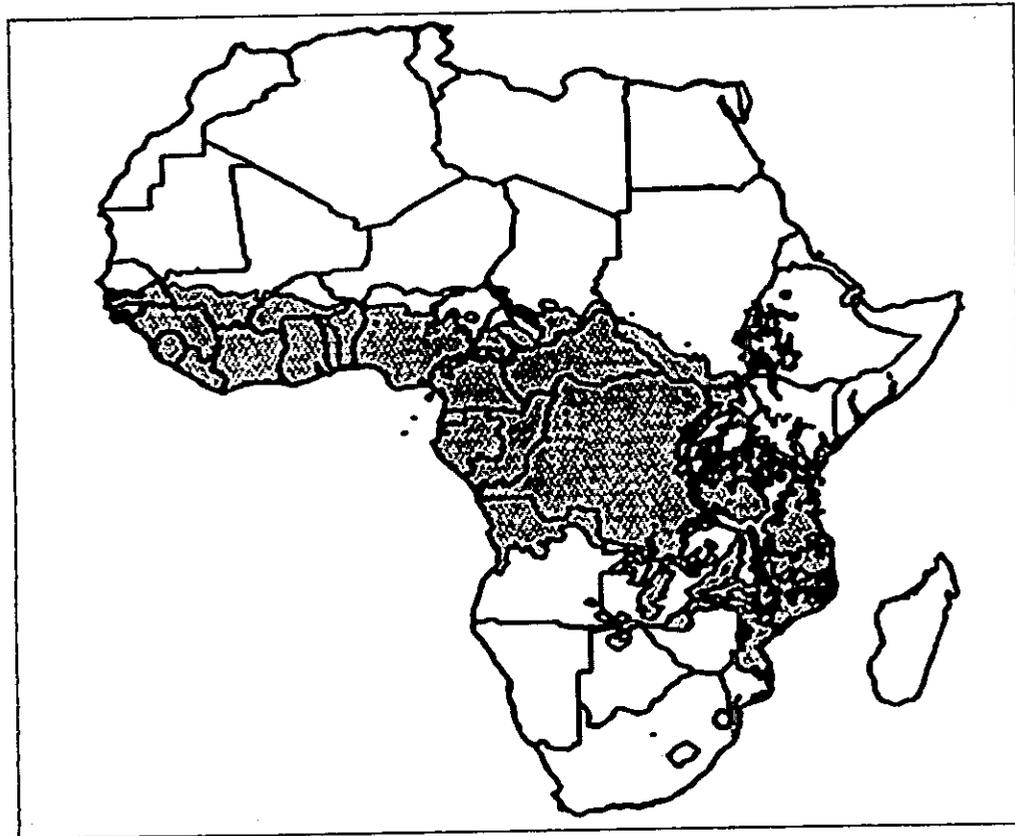
White, T. J., N. Arnheim & H. Erlich (1989). The Polymerase Chain Reaction. Trends in  
Genetics. 5 (6): 18-9.

**Sites:**

1. [www.wikipedia.com.br](http://www.wikipedia.com.br).
2. <http://www.oie.int/>

# ANEXOS

**Anexo A1: Distribuição da mosca tsé-tsé em África (o cinturão tsé-tsé)**



**Fig. 1.** 37 países africanos habitados pela mosca tsé-tsé, tornando-se zonas de incidência natural de espécies de *Trypanosoma* patogénicos africanos.

**Fonte:** Uilenberg, 1998.

Anexo A2: Distribuição das moscas tse-tse no Sul de África, e no sul de Moçambique em particular.

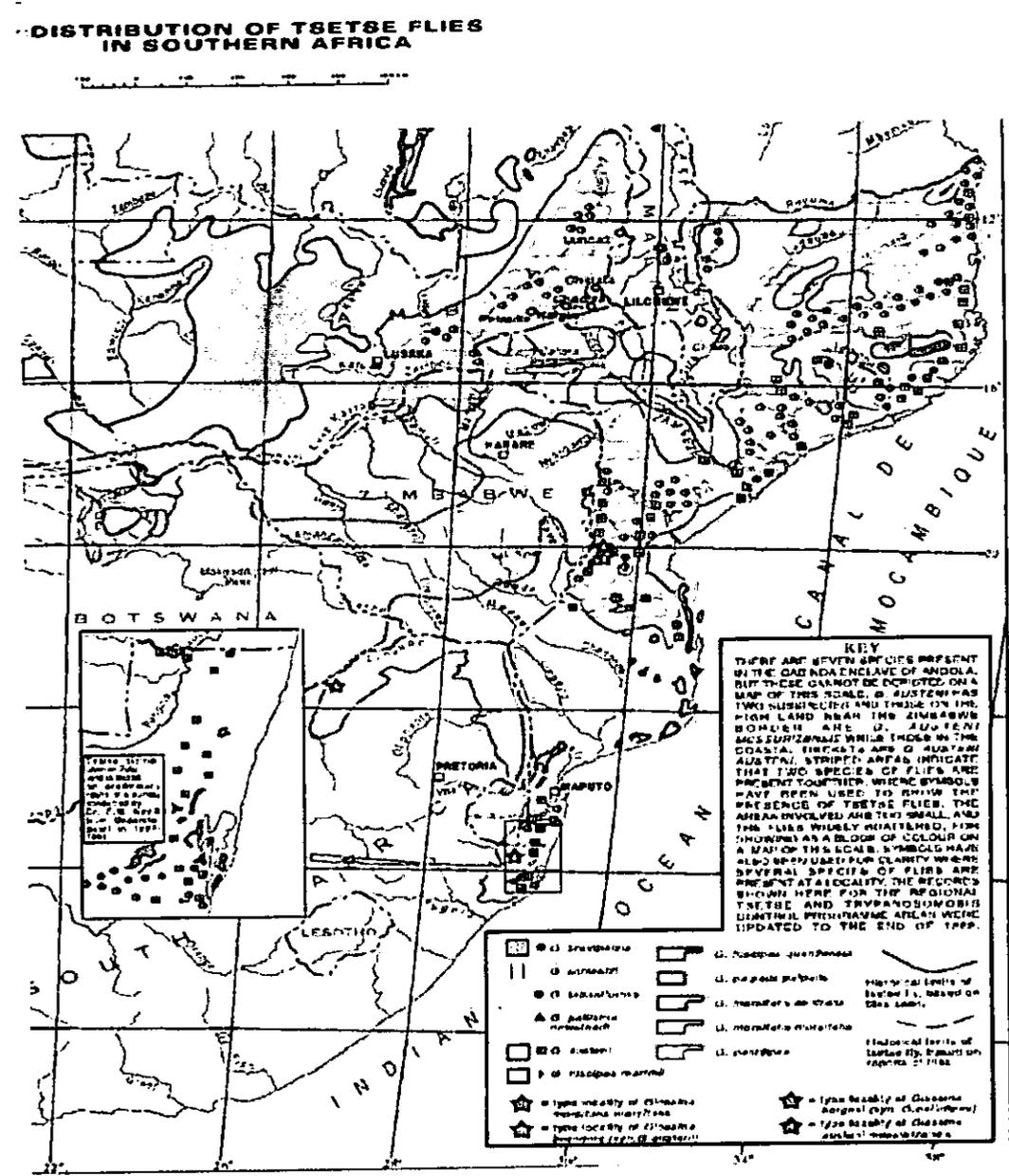
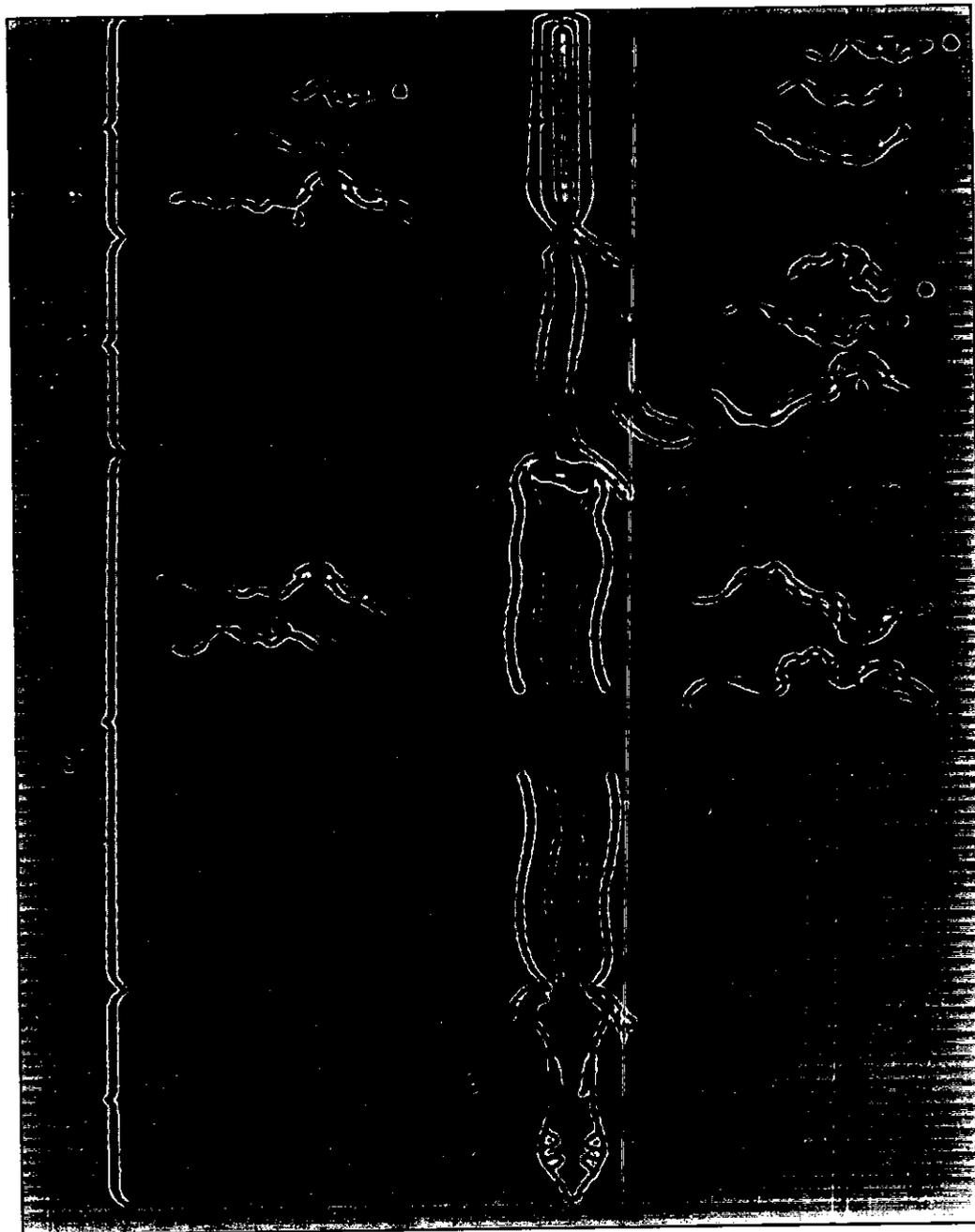


Fig. 2. Mapa da distribuição da mosca tse-tse em Moçambique, particularmente na zona sul do país.  
 Fonte: Jamal (2005).

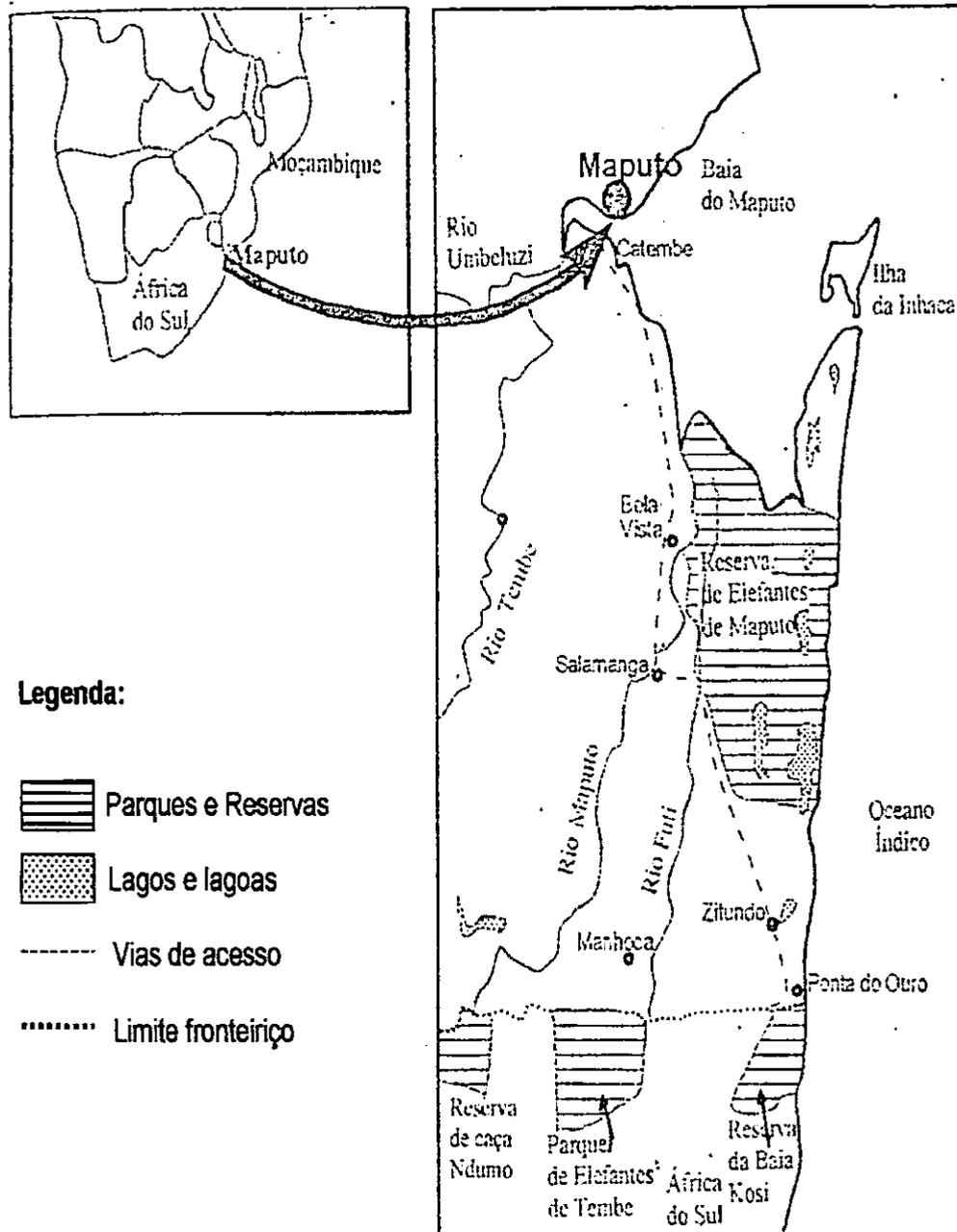
**Anexo A3. Localização das diferentes espécies de tripanossomas dentro dos órgãos da mosca tsé-tsé.**



**Fig. 3.** Localização das diferentes espécies de tripanossomas nos órgãos das glossinas.

**Fonte:** Connor, 1994.

**Anexo B1: Localização geográfica da Reserva Especial de Maputo.**



**Fig. 4.** Mapa da Reserva Especial de Maputo.

**Fonte:** De Boer, 2000.

Anexo B2: Vegetação da Reserva Especial de Maputo.

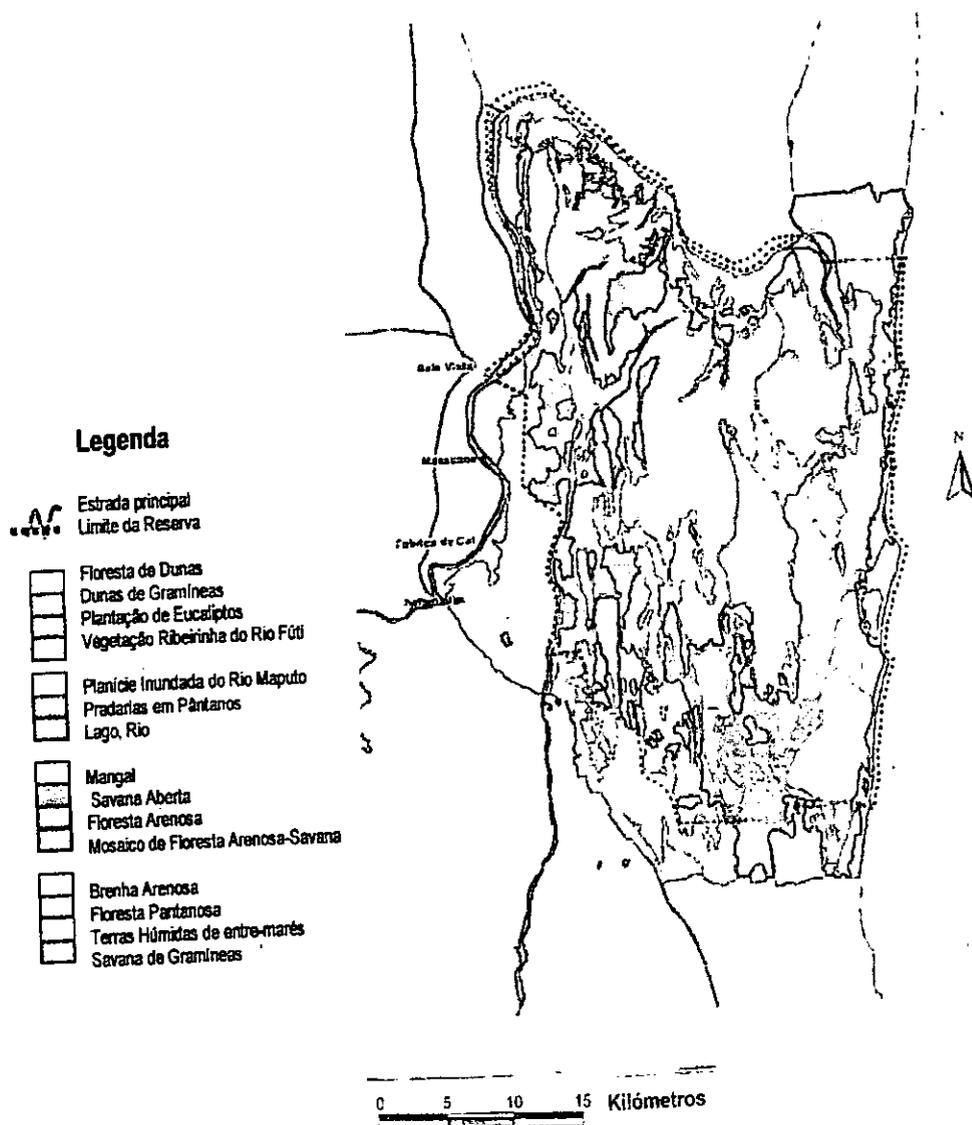


Fig. 5. Mapa de vegetação da Reserva Especial de Maputo.

Fonte: DCB, 2000.

Anexo C1: Armadilhas para a captura de glossinas.

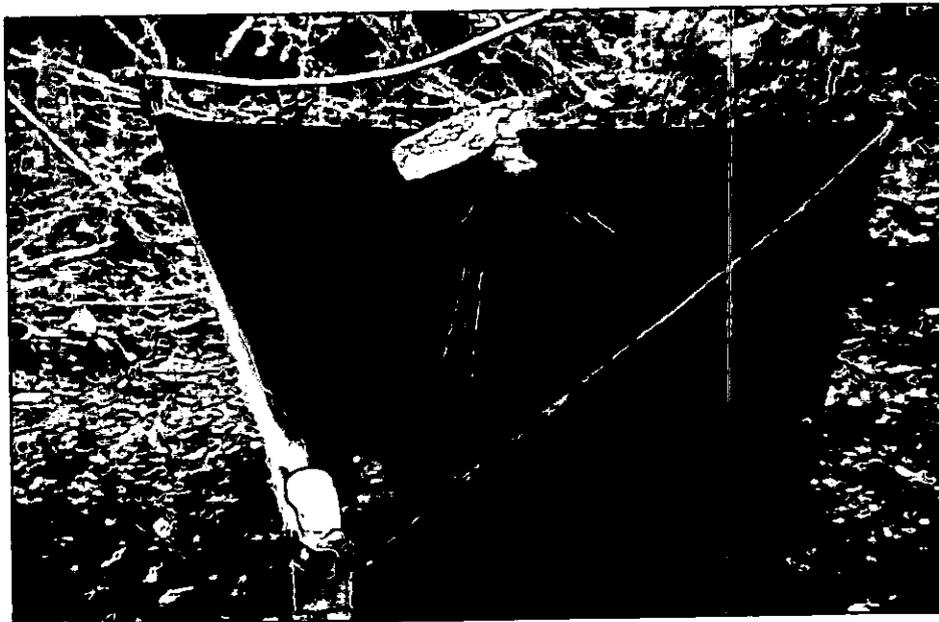


Fig. 6. Armadilha Y.

## Anexo C2: Coordenadas dos locais de captura das glossinas

Co-ord x (Long.)	Co-ord y (Lat.)	Total Glossinas capturadas	Co-ord x (Long.)	Co-ord y (Lat.)	Total Glossinas capturadas
22/04/07			26°35'23,8"	32°50'47,2"	1
32°50'31,2"	26°38'32,9"	5	26°35'5,3"	32°50'47,7"	
32°48'27,2"	26°48'20"	2	26°35'1,7"	32°50'48,9"	3
32°48'78,7"	26°48'30,7"	0	26°34'59,5"	32°50'48,2"	1
32°48'27"	26°47'49"	1	26°34'56,4"	32°50'51,8"	1
32°48'31,7"	26°47'52,5"	0	26°34'48,7"	32°50'55,1"	3
32°49'29,9"	26°44'40,7"	2	26°34'46"	32°50'56,2"	8
32°49'36"	26°38'52"	0	26°34'34,2"	32°50'55,3"	2
32°50'47,6"	26°35'32,4"	1	26°34'39,9"	32°50'56,4"	2
32°50'39,8"	26°36'18,5"	3	10/12/07		
32°50'31,2"	26°38'32,9"	4	26°34'34,3"	32°50'58,9"	6
08/12/07			26°34'31,4"	32°51'0,7"	6
26°36'18"	32°50'46,6"	2	26°34'23,2"	32°51'03,3"	2
26°35'30,4"	32°50'47"	2	26°34'15,4"	32°51'4,5"	2
26°34'45,7"	32°50'13,2"	4	26°34'26,2"	32°51'2,1"	4
26°33'12,1"	32°51'25,8"	4	26°34'30,2"	32°51'0,9"	6
26°32'12,3"	32°51'34,8"	2	26°34'33,1"	32°51'0,0"	3
26°30'31,4"	32°48'14,7"	2	08/12/07		
26°30'29,2"	32°47'55,7"	4	26°35'34,8"	32°50'48,7"	3
26°30'30"	32°47'18,7"	2	26°35'11,7"	32°50'47,4"	3
26°29'53,1"	32°47'10,2"	2	26°35'06,4"	32°50'47,3"	2
26°29'46,6"	32°46'57,8"	1	26°35'4,3"	32°50'48,5"	2
26°29'51,3"	32°47'10,1"	4	26°34'59,5"	32°50'48,8"	2
26°30'34"	32°47'19,7"	2	26°34'49,2"	32°50'54,6"	2
26°30'32,6"	32°47'56,6"	3	26°34'47,3"	32°50'55"	3
26°29'36,5"	32°48'55,4"	1	26°34'43,3"	32°50'55,4"	3
26°29'5,4"	32°49'4,3"	1	26°34'40,7"	32°52'57,6"	4
26°33'20,7"	32°54'24,5"	2	26°34'38,6"	32°50'59"	3
26°34'27,7"	32°51'1,0"	4	26°34'18,7"	32°54'3,3"	4
26°34'29,9"	32°51'0,6"	1	26°34'21,6"	32°51'3,8"	4
26°34'43,1"	32°50'38,7"	4	26°34'23,3"	32°51'2,6"	6
26°34'46,6"	32°50'50,2"	2	26°34'27,1"	32°51'1,9"	2
09/12/07			26°34'27,2"	32°51'1,6"	2
26°35'32,2"	32°50'46,5"	1	26°34'29"	32°51'1,6"	2
26°34'44,1"	32°50'57"	1	26°34'33,4"	32°50'58,3"	2
26°34'52,1"	32°48'52"	2	26°34'43,8"	32°50'54,1"	1
26°34'34,3"	32°50'58,9"	3	26°34'51,4"	32°50'53,2"	3
26°34'27,8"	32°51'01,9"	5	26°34'56"	32°50'51,3"	2
26°30'4,4"	32°50'57"	1	26°36'5,3"	32°50'25,2"	2
26°32'32,1"	32°42'52"	2			
26°35'07,3"	32°51'26"	3			
26°	32°47'20,7"	2			
26°	32°51'46,8"	2			



Anexo E: Protocolo de extracção de ADN descrito por D'Oliveira *et al.*, 1997.

1. Lavam-se as moscas duas vezes em etanol a 70% por imersão e agitação (e.g. num tubo falcon). Usa-se um tubo por mosca.
2. Lavam-se as moscas duas vezes em ddH<sub>2</sub>O por imersão num tubo falcon 50ml (1 tubo por mosca) absorve-se em papel de filtro o excesso de ddH<sub>2</sub>O em cada mosca.
3. Corta-se cada mosca longitudinalmente e coloca-se uma das metades num tubo tipo eppendorf de 1.5ml e adiciona-se 200µl de PBS (Phosphate Buffer Saline). Coloca-se a outra metade no respectivo tubo com etanol a 70% e conserva-se. Esteriliza-se o material de dissecação à chama, entre cada mosca.
4. Ferve-se durante 10min em bloco de aquecimento ou em banho maria a 100°C. Arrefece-se durante 5min e faz-se um *short spin* (Centrifugação rápida) para remover as gotas da tampa.
5. Adiciona-se 20µl de SDS a 10% (Sodium Dodecyl Sulphate) e vortexa-se (misturar rapidamente no aparelho de vortex).
6. Centrifuga-se a 14000rpm (ou velocidade máxima da centrífuga) durante 5min. Transfere-se o sobrenadante para um novo tubo de 1.5ml.
7. Adiciona-se 200µl de fenol-clorofórmio-isoamil (25:24:1). Vortexa-se por 10 segundos e centrifuga-se a 14000rpm durante 5min.
8. Transfere-se a fase aquosa (fase superior) para um tubo de 1.5ml novo, previamente preenchido com 200µl de fenol-cloroformio-isoamil (25:24:1). Vortexa-se por 10 segundos e centrifuga-se a 14000rpm durante 5min. Transfere-se a fase aquosa para um tubo de 1.5 ml novo. Tendo-se o cuidado de não perturbar a interfase.
9. Adiciona-se 17.5µl de acetato de sódio a 3M e 440µl de etanol a 100%. Vortexa-se e incuba-se a -80 °C durante 30min, ou a -20°C *overnight* (toda a noite).

10. Centrifuga-se a 14000rpm a 4°C durante 15min. Remove-se o sobrenadante.
11. Lava-se o pellet com 500µl de etanol a 70% a -20°C. Centrifuga-se a 14000rpm a 4°C durante 5min.
12. Remove-se o sobrenadante com cuidado para não perturbar o pellet. Seca-se em estufa a 37°C *overnight* ou em liofilizador.
13. Elui-se o ADN em 20µl de TE. Vortexa-se e conserva-se a -20°C.

**Anexo F:** Protocolo de quantificação de ADN descrito por Segundo Dabre, 1999.

1. Diluir 5µL de ADN amostral em 95 µL de água MilliQ autoclavada
2. Calcular o factor de diluição ( $V_{\text{total do diluído}} / V_{\text{amostra}} = \text{Factor de diluição}$ ).
3. Completar o volume mínimo da cuveta com com água MilliQ para calibrar o espectrofotómetro e ler a DO a 260nm e 280nm ( a leitura deve ser 0000).

Atenção: Manipular a cuveta com cuidado de modo a não tocar na área da cuveta atravessada pela luz no espectrofotómetro durante a análise de absorvância

4. Descartar a água.
5. Virar a amostra diluída na cuveta e ler a DO no espectrofotómetro a 260nm e 280nm.
6. Calcular o ratio  $DO_{\lambda_{260}} / DO_{\lambda_{280}}$  e interpretar os valores:
  - $DO_{\lambda_{260}} / DO_{\lambda_{280}} \leq 1.8 \rightarrow$  amostra de ADN contaminada com ARN
  - $DO_{\lambda_{260}} / DO_{\lambda_{280}} [1.8, 2.0] \rightarrow$  amostra pura de ADN
  - $DO_{\lambda_{260}} / DO_{\lambda_{280}} \geq 2.0 \rightarrow$  contaminação por proteínas
7. Calcular a concentração do ácido nucléico usando a fórmula:  
$$(DO_{\lambda_{260}} - DO_{\lambda_{280}}) \times 50 \times \text{fator de diluição} = [\text{ADN}] \text{ em mg mL}^{-1}$$