

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Diversificação dos genes do Antígeno B de *Echinococcus multilocularis* em camundongos proficientes e não proficientes quanto à resposta imune mediada por células T

Daniel Ângelo Sganzerla Graichen

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Karen Luisa Haag

Porto Alegre, abril de 2005.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de *Drosophila* e no Laboratório de Biodiversidade e Evolução com o auxílio financeiro do CNPq.

À minha mãe (*in memoriam*).

Agradecimentos

À minha orientadora Karen Haag, pela amizade, confiança e em especial por ter me dado a oportunidade de realizar este curso e este trabalho.

A meus pais, Wilson e Iraci (*in memoriam*) por terem me incentivado a estudar.

Aos meus avós, Ernesto e Rosália e aos meus tios Chico e Maristela, que propiciaram a minha vinda para Porto Alegre.

Aos meus familiares, que mesmo distante nunca deixaram de me incentivar.

Aos colegas de laboratório Raquel, Jéferson, Shaiane, André e Ana pelo companheirismo e pela amizade.

Ao meu irmão Felipe, aos amigos Adriana, Newton e Eduardo pela amizade e profícuas discussões sobre ciência.

Aos colegas do departamento pela ajuda e amizade.

Ao Elmo e Ellen.

À comunidade Santa-mariense em Porto Alegre pela grande amizade.

À UFRGS, ao PPGBM, ao CNPq, pela concessão da uma bolsa de mestrado, e a sociedade brasileira que, mesmo anonimamente, financiou meus estudos desde o ingresso no ensino fundamental até a conclusão do curso de Mestrado.

À Cris, por toda compreensão, carinho e incentivo.

Índice

Resumo	6
Abstract	8
1. Introdução	9
1.1 <i>Echinococcus</i> e a Doença Hidática	9
1.2 Antígeno B	15
1.3 Imunidade, Evasão da Resposta Imune e o Papel do Antígeno B	20
1.4 Variação Antigênica e Evasão da Resposta Imune	24
1.5 Antígenos e Seleção Diversificadora	25
2. Objetivos	30
3. Diversity of Antigen B genes in <i>Echinococcus multilocularis</i> metacestodes from T-cell proficient and non-proficient mice	31
3.1 Introduction	32
3.2 Materials and Methods	34
3.3 Results	37
3.4 Discussion	39
3.5 References	42
4. Considerações Finais	55
5. Bibliografia	61
Anexo I	72

Resumo

O antígeno B (AgB) é uma proteína polimérica de aproximadamente 160 kDa secretada durante a fase larval dos parasitos do gênero *Echinococcus*. Sua função provavelmente está relacionada com a evasão da resposta imune do hospedeiro, e tem sido relatado que seus genes apresentam alta diversidade de seqüências, mesmo dentro de um único metacestóide de *E. granulosus*. Em *E. multilocularis* o AgB é codificado por uma família multigênica composta por pelo menos cinco genes. Neste trabalho nós avaliamos o efeito do sistema imune dependente de célula T sobre a diversificação somática dos genes do antígeno B em metacestóides de *E. multilocularis* obtidos de camundongos secundariamente infectados com microcistos: uma linhagem proficiente e outra não proficiente quanto à resposta imune celular (BALB/c e nude, respectivamente). Os animais foram sacrificados após um ou dois meses de infecção para coleta da massa parasitária e extração do RNA. Após a síntese do cDNA foram feitas PCRs específicas para quatro genes (*EmAgB1*, *EmAgB2*, *EmAgB3* e *EmAgB4*) e o produto desta reação foi clonado. Os clones resultantes foram analisados quanto à presença de polimorfismo através de PCR-SSCP e os alelos descobertos foram seqüenciados. A diversidade alélica foi calculada através do Índice de Diversidade de Shannon e desvios da neutralidade foram testados através do Teste D de Tajima e através do Teste Exato de Fisher, que detecta excesso de mutações não-sinônimas em relação às mutações sinônimas. Um teste adicional, que calcula a probabilidade (através da distribuição binomial) de ocorrência das mutações não-sinônimas, foi realizado. Comparando a diversidade encontrada nos genes do AgB não encontramos evidências de que a pressão imposta pelo sistema imune esteja relacionada com a diversidade de seqüências encontrada em nosso estudo. O gene *EmAgB2* apresentou Índices de diversidade mais elevados (principalmente quando coletado do camundongo BALB/c após um mês de infecção) e também apresentou maior quantidade de *indels*. Apenas um dos alelos encontrados em nossa amostragem foi compartilhado por parasitos coletados de diferentes camundongos, sugerindo que os alelos possam ter surgido após a infecção dos camundongos. O Teste D de Tajima resultou em valores negativos em todas as análises. Entretanto, nem o Teste Exato de Fisher nem a análise da probabilidade binomial encontraram excesso de mutações não-

sinônimas para qualquer dos genes analisados. Portanto, nossos dados indicam que os genes do AgB durante a fase de metacéstóide evoluem segundo o modelo neutro e o valor D de Tajima negativo pode ser explicado devido a rápida proliferação celular do metacéstóide após a infecção secundária.

Abstract

The Antigen B (AgB) is a polymeric protein secreted during the larval stage of the *Echinococcus* flatworms. The AgB is involved with the evasion of host immune response and its genes show high variability, even inside a single *E. granulosus* metacestode. To date, five AgB genes have been reported in the *E. multilocularis* genome. In this work we analyzed the AgB diversification in *E. multilocularis* recovered from secondarily infected mice. Two different mouse strains were infected with microcysts of *E. multilocularis*: BALB/c and nude, which are T-Cell immune response proficient and non-proficient, respectively. The mice were necropsed one or two months post infection and the parasite mass was collected for RNA extraction. Following the cDNA synthesis, each AgB gene (*EmAgB1*, *EmAgB2*, *EmAgB3* and *EmAgB4*) was amplified in a specific PCR and the products of these reactions were cloned. The polymorphism present in each AgB gene was assessed by PCR-SSCP and the variant alleles were sequenced. The allele diversity for each gene was calculated by the Shannon Diversity Index and neutrality departures were tested by Tajima's D Test, and Fisher's Exact Test, which evaluates the excess of non-synonymous over synonymous substitutions. An additional test, which estimates the binomial probability of occurrence of non-synonymous mutations, was also performed. We did not find association between the AgB diversity and the immune response of the host. The *EmAgB2* gene showed the largest diversity index among the four genes (especially when collected from BALB/c at first month post infection) and it also presented a large quantity of alleles containing indels. The parasites collected from different mice do not share AgB alleles (with a single exception), and suggest that the new alleles could have arisen after the mice infection. The Tajima's D Test resulted in negative values in all analyses. However, both Fisher's Exact Test and the binomial probability analysis did not detect excess of non-synonymous mutation in our samples. Therefore, our data suggest that AgB genes evolve by the neutral model during the metacestode stage, and the negative Tajima's D value could be explained by the fast cellular proliferation of the metacestode after secondary infection.

1. Introdução

Conhecimentos sobre parasitos e suas interações com os hospedeiros sempre estiveram presentes na cultura de todas as civilizações, uma vez que as populações humanas sempre conviveram com estes organismos. Registros antigos, datando de mais de 2000 anos a.C. na China e mais de 1500 a.C. no Egito, relatam a preocupação com os parasitos ou pelo menos com as doenças provocadas por eles (Bush *et al.*, 2001).

A partir do final do século XIX, com a publicação da teoria darwiniana da evolução, a biologia passou a seguir este novo paradigma. Os estudos em parasitologia, entretanto, sempre abordaram questões funcionais e práticas, e somente a partir da segunda metade do século XX começaram a ter uma abordagem mais evolutiva e ecológica. Um marco importante desta abordagem evolucionista foi a publicação da obra de Price em 1980, a qual forneceu as bases da parasitologia evolutiva e impulsionou inúmeros estudos nesta área (Esch e Fernández, 1993).

No entanto, muitos aspectos da interação parasita-hospedeiro ainda precisam ser resolvidos. Entre estes, podemos citar a evasão da resposta imune, a qual é feita por muitos mecanismos, inclusive pela secreção de proteínas que modulam o sistema imune do hospedeiro. Uma destas proteínas, o antígeno B de *Echinococcus*, é foco deste estudo.

1.1 *Echinococcus* e a Doença Hidática

Os organismos pertencentes ao gênero *Echinococcus* (Rudolphi 1801) são vermes platelmintos da classe Cestoda. Como todos os representantes desta classe, os espécimes deste gênero são endoparasitos obrigatórios. O ciclo de vida destes animais é indireto, e para completá-lo, o organismo necessita de dois hospedeiros mamíferos. Na fase adulta o parasito vive no intestino de carnívoros, onde a relação parasitária com o animal não acarreta maiores perdas para o hospedeiro. A fase larval é chamada de cisto hidático, e infecta herbívoros, geralmente ungulados ou roedores, mas ocasionalmente, também pode infectar o

homem. Nesta fase, a relação parasitária entre os organismos é bastante danosa para o hospedeiro, podendo levá-lo à morte. A doença resultante é chamada de hidatidose ou doença hidática (Thompson, 1995).

As relações filogenéticas dentro do gênero *Echinococcus* são bastante polêmicas e, recentemente, sofreram uma reavaliação (Thompson e McManus, 2002). Embora tradicionalmente o gênero seja dividido em apenas quatro espécies (Bowles *et al.*, 1995), novas abordagens consideram que ele deve ser dividido em um número maior de espécies, levando-se em conta principalmente aspectos morfológicos, especificidade por hospedeiros e identidade genética (Thompson e McManus, 2002).

Dentro do gênero, a espécie *E. granulosus* sempre foi conhecida pela sua alta diversidade genética, fato que contribui para sua divisão em muitas linhagens, diferenciadas principalmente quanto ao hospedeiro intermediário que infectam. Um fato interessante, e que corrobora a divisão deste táxon, é que a maior parte da diversidade da espécie é encontrada na comparação entre as linhagens, e não dentro das linhagens (Bowles *et al.*, 1992, Eckert e Thompson, 1997), sendo que cada linhagem pode ser representada por um genótipo mitocondrial específico, numerado de G1 a G10 (Bowles *et al.*, 1992, Bowles e McManus, 1993, Lavikainen *et al.*, 2003).

Na nova classificação, o táxon *E. granulosus* é dividido e algumas variantes genéticas conhecidas ganham o *status* de espécie. Na atual proposta, o genótipo G4, conhecido até então como linhagem eqüina, passa a ser chamado de *E. equinus*, e a linhagem bovina, G5, agora é a espécie *E. ortleppi*. O clado contendo os genótipos G6, G7, G8, G9 e G10, aparentemente monofilético, ainda está sob investigação, já que há dúvidas se realmente é uma nova espécie, no caso, *E. canadensis* (Lavikainen *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2005). O genótipo G1, que infecta principalmente ovelhas, juntamente com os genótipos G2 e G3 representam a espécie *E. granulosus sensu stricto*. As espécies *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* e *E. vogeli* não sofreram alterações (Figura 1).

Em 2005 foi descrita uma nova espécie para o gênero, trata-se de *E. shiquicus*, uma espécie com distribuição geográfica bastante restrita e ainda pouco estudada pela comunidade científica. Sabe-se que é uma espécie

endêmica dos platôs tibetanos, e ainda se desconhece seu potencial para infectar humanos (Xiao *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006).

Devido a maior prevalência de infecções e a ampla distribuição geográfica de ocorrência, *E. granulosus* e *E. multilocularis* são as espécies mais estudadas e de maior importância médica e econômica dentro do gênero.

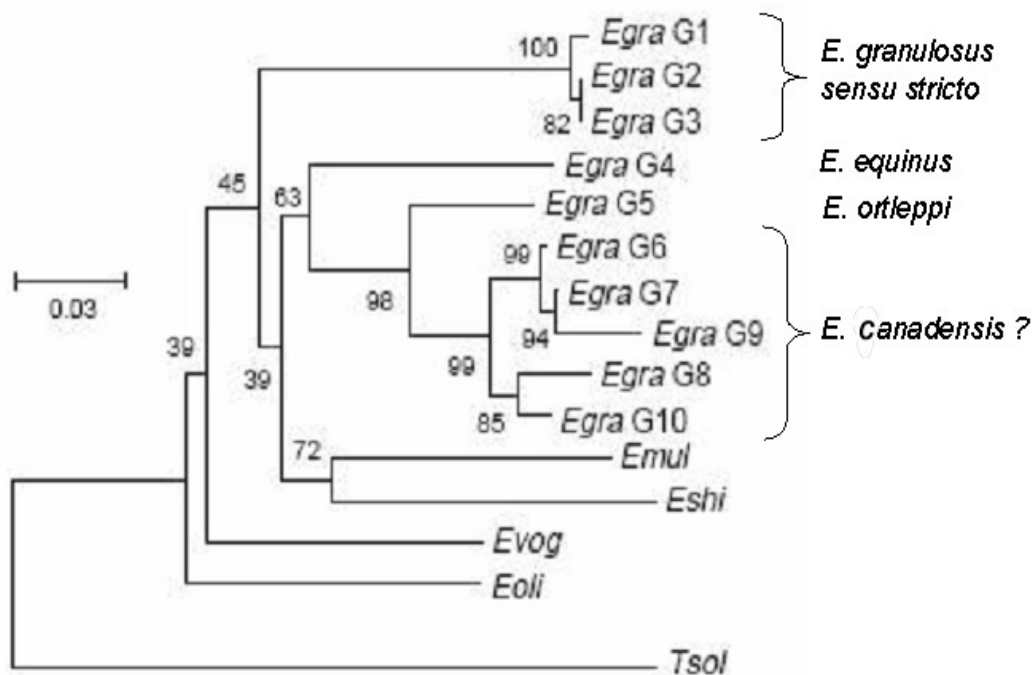


Figura 1 – Reconstrução filogenética do gênero *Echinococcus* baseada na seqüência parcial do gene mitocondrial *nad1*. A filogenia mostra a grande diversidade genética encontrada no complexo *E. granulosus* e destaca as linhagens que, recentemente, foram consideradas espécies (modificado de Xiao *et al.*, 2005). Egra = *E. granulosus*, Emul = *E. multilocularis*, Eshi = *E. shiquicus*, Evog = *E. vogeli*, Eoli = *E. oligarthrus* e Tsol = *Tenia solium*.

E. multilocularis possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em praticamente todo o hemisfério norte. As áreas com maior prevalência incluem regiões do centro e leste da Europa, grande parte do norte e leste da Ásia, estendendo-se até as ilhas do Japão, norte da América do Norte e algumas regiões do centro dos EUA (Eckert *et al.*, 2000; Romig, 2003).

Nos últimos anos as áreas com registro da presença de *E. multilocularis*, tanto na forma larval, causando a hidatidose alveolar em humanos, como na forma adulta, infectando o hospedeiro definitivo, estão se expandindo. Entretanto,

existem algumas controvérsias sobre o real motivo desta expansão. Devido à falta de estudos de longo prazo, e ao longo tempo de latência da fase larval em humanos, este aumento de registros não significa necessariamente uma expansão das áreas de risco, podendo representar apenas maior interesse no estudo do parasito e maior atenção na vigilância sanitária (Romig, 2003, Casulli *et al.*, 2005)

Contudo, ocorreu um aumento da população do hospedeiro definitivo (*Vulpes vulpes*) no centro da Europa, principalmente depois que a raiva foi controlada nestes animais. Devido a este grande aumento populacional, as raposas passaram a ocupar outros habitats, incluindo regiões urbanas e peri-urbanas. Este aumento do número de hospedeiros definitivos pode levar a um aumento da biomassa de parasitos, e isto pode estar contribuindo sensivelmente, tanto para o aumento da incidência como da dispersão da hidatidose na Europa (Deplazes *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2005)

O verme adulto de *E. multilocularis* mede de dois a cinco milímetros de comprimento, tendo o corpo dividido em escólex (cabeça) e estróbilo (corpo) com uma ou duas proglótides. O escólex possui as ventosas e o rostelo, que são as estruturas responsáveis pela fixação no intestino do hospedeiro definitivo (Thompson, 1995).

Nesta fase, *E. multilocularis* infecta um canídeo, e é no intestino destes hospedeiros que os vermes realizam a fase sexual de seu ciclo biológico. O hospedeiro definitivo mais comum é a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) que mantém o ciclo selvagem do parasito através da predação de pequenos roedores da família Arvicolidae (Figura 2), os principais hospedeiros intermediários desta espécie (Craig, 2003). Além do ciclo selvagem, *E. multilocularis* pode apresentar ciclos sinantrópicos, onde o hospedeiro definitivo pode ser o cão ou o gato doméstico e o hospedeiro intermediário o homem (Petavy *et al.*, 2000; Craig *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2006).

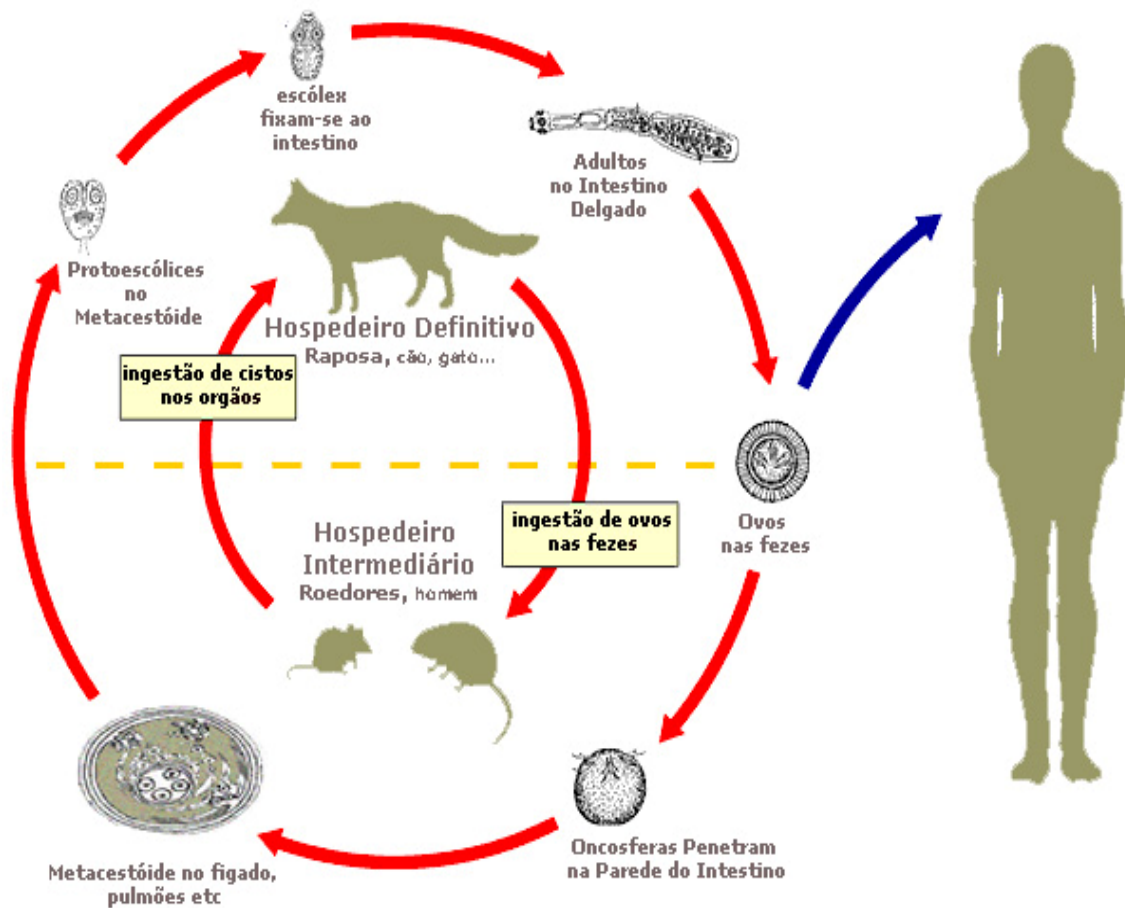


Figura 2 – Ciclo de vida de *E. multilocularis*. O verme adulto vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo (canídeos), produz ovos e os libera no ambiente junto com as fezes do hospedeiro. Cada ovo possui um embrião que, quando ingerido pelo hospedeiro intermediário (roedores e, eventualmente, humanos) a oncosfera é ativada e eclode, sendo capaz de invadir as paredes do intestino e migrar até o órgão onde se estabelecerá e formará o metacéstode. O cisto hidático produz clonalmente os protoescólices. O hospedeiro definitivo se infecta pela ingestão das vísceras contaminadas. Ao passar pelo sistema digestivo do hospedeiro definitivo, os protoescólices evaginam, expondo as ventosas e ganchos e se fixam na parede do intestino onde se desenvolverá no verme adulto.

A contaminação do ambiente e dos hospedeiros intermediários é feita pela liberação da última proglótide do verme através das fezes do hospedeiro definitivo (raposa, cão ou gato). Após a fecundação esta proglótide é repleta de ovos que, quando liberados, podem permanecer por até um ano no ambiente (Schantz *et al.*, 1995).

O hospedeiro intermediário infecta-se com a fase larval através da ingestão acidental de ovos do parasito diretamente do ambiente. Após serem ingeridos, os ovos eclodem liberando e ativando a oncosfera. A oncosfera penetra ativamente através da mucosa intestinal do hospedeiro até atingir a corrente sangüínea ou linfática, migrando então para as vísceras, principalmente fígado e pulmões (Smyth e Smyth, 1964). Após o estabelecimento da infecção, a oncosfera aumenta de tamanho e sofre uma série de transformações, caracterizando a formação do metacestóide (Thompson, 1995). O estreito contato com animais infectados e/ou a exposição a ambientes altamente contaminados são fatores de risco que aumentam as chances de infecção.

A fase larval de *E. multilocularis* é o agente etiológico da hidatidose alveolar; a forma mais grave da doença hidática. Diferentemente da hidatidose cística (causada pela infecção com *E. granulosus*), na qual é formado um cisto bem definido e preenchido por líquido, esta doença caracteriza-se pela formação de uma estrutura multivesicular complexa capaz de infiltrar tecidos e, geralmente, com capacidade de metástase. Pequenas vesículas, após se desprenderem da massa original, migram através do corpo pela corrente sangüínea ou linfática. A massa larval geralmente contém uma matriz semi-sólida ao invés de líquido.

A hidatidose alveolar é a mais grave infecção causada por helmintos em humanos, e estima-se que 95% dos portadores de hidatidose alveolar morrem, caso não sejam tratados adequadamente, dentro de 10 a 15 anos após o diagnóstico (Craig, 2003).

1.2 Antígeno B

Durante a fase de metacéstóide, o parasito cresce em tamanho devido à proliferação celular intensa e à secreção de substâncias orgânicas no interior da massa larval, formando uma matriz extracelular que varia em composição de acordo com a espécie de *Echinococcus* (Thompson, 1995).

Esta matriz, chamada de líquido hidático em *E. granulosus*, é uma complexa mistura de moléculas tanto de origem do parasito quanto do hospedeiro. Dentre os vários componentes desta mistura, encontramos sais inorgânicos, ácidos nucléicos e muitas proteínas (McManus e Bryant, 1995). Entre as proteínas mais abundantes destaca-se o antígeno B (AgB), que compõe cerca 10% da massa de proteínas do fluido (Oriol *et al.*, 1971). Em *E. multilocularis* esta matriz é uma secreção semi-sólida que, dentre outros componentes, também possui a proteína AgB.

Inicialmente isolado de *E. granulosus*, o AgB é uma lipoproteína termoestável (Oriol *et al.*, 1971) com peso molecular de aproximadamente 160 kDa (Oriol e Oriol, 1975; Lightowers *et al.*, 1989). Ela está presente no tegumento dos protoescólices, na camada germinativa, além de ser secretado abundantemente no líquido hidático (Rickard *et al.*, 1977; Sanches *et al.*, 1991).

Analisando o AgB em gel desnaturante de poliacrilamida (PAGE-SDS), Lightowers *et al.* (1989) demonstraram que a proteína nativa se distribui em bandas de 8, 16, 24, 32 kDa, apresentando um padrão tipo “escada”, sugerindo que a proteína é um polímero composto por subunidades de 8 kDa. Além disso, Gonzáles-Sapienza *et al.* (1996) purificaram e seqüenciaram os peptídeos do AgB das bandas de 8, 16, 24 e 32 kDa, e demonstraram a existência, em cada banda, dos dois peptídeos descritos até então: o peptídeo AgB1 (Shepherd *et al.*, 1991; Frosch *et al.*, 1994) e o peptídeo AgB2 (Fernández *et al.*, 1996). Por isso sugeriram que esses peptídeos seriam subunidades utilizadas para construir blocos maiores. No mesmo trabalho, os autores encontraram seqüências de peptídeos que não correspondiam aos genes descritos para a proteína e sugeriram a existência de outros genes. Mais tarde foi demonstrado por Arend *et al.* (2004) que estes peptídeos são produtos codificados pelo gene *EgAgB4*.

A estrutura tridimensional predita do AgB mostra similaridades com um grupo de proteínas de cestódeos denominado HLBP (*Hydrophobic Ligand Binding Proteins*). Estas proteínas são, em geral, imunogênicas e muitas estão envolvidas com o metabolismo, transporte ou detoxificação de ácidos graxos (Saghir *et al.*, 2001). Chemale *et al.* (2005) mostraram que AgB é eficiente em ligar-se a ácidos graxos, mas não os libera com facilidade, sugerindo que o AgB pode atuar na captura e detoxificação de metabólitos lipídicos.

O AgB foi um dos primeiros antígenos purificados a ser utilizado com o objetivo de diagnosticar a hidatidose cística (Shepherd e McManus, 1987). Entretanto, desde que começou a ser utilizado para com este objetivo, notou-se que o AgB extraído de *E. granulosus* era reativo com soro de pacientes com infecção por *E. multilocularis* (Lightowers *et al.*, 1989; Leggat *et al.*, 1992). Estes dados sempre sugeriram que *E. multilocularis* possui proteínas muito relacionadas com o AgB de *E. granulosus*, fato confirmado posteriormente (Frosch *et al.*, 1994; Haag *et al.*, 2006; Mamuti *et al.*, 2006).

A primeira seqüência nucleotídica relacionada ao AgB foi isolada de *E. granulosus* por Shepherd *et al.* (1991) e era uma seqüência de cDNA de 275 pb representando a região carboxi-terminal de um peptídeo presente na subunidade menor do AgB. Já em 1994, Frosch *et al.* isolaram um cDNA de 338 pb representando a seqüência completa deste gene, chamando de *EgAgB1*. No mesmo trabalho estes autores identificaram heterogeneidade entre as seqüências nucleotídicas do *EgAgB1* quando analisaram diferentes isolados, sugerindo a existência de polimorfismo. O primeiro éxon deste gene tem 45 pb e o segundo 210 pb interrompidos por um íntron de 92 pb (Rott *et al.*, 2000).

O segundo gene foi descrito por Fernández *et al.* (1996), *EgAgB2*. Assim como o gene *EgAgB1* tem sua seqüência interrompida por um íntron de 68 pb, tendo o primeiro éxon 60 e o segundo 210 nucleotídeos.

Chemale *et al.* (2001) e Arend *et al.* (2004) isolaram, respectivamente, o terceiro (*EgAgB3*) e o quarto (*EgAgB4*) gene do AgB em *E. granulosus*. A seqüência genômica de *EgAgB3* apresenta dois éxons com 20 e 208 pb e um íntron com 137 pb. O gene *EgAgB4* possui apenas sua seqüência parcial

publicada. Os dados disponíveis demonstram um éxon com 14 pb e outro com 196 pb, sendo que o íntron possui 68 pb.

Recentemente, Haag *et al.* (2004) sugeriram a existência de mais um gene em *E. granulosus*, designado *EgAgB5*. Ainda no mesmo trabalho, estes autores sugerem que o número de cópias dos genes do AgB em *E. granulosus* pode ser maior, já que experimentos de *Southern Blot* indicam a existência de pelo menos sete cópias neste genoma.

O primeiro relato da ocorrência dos genes do AgB em *E. multilocularis* foi feito por Frosch *et al.* (1994). Através de experimentos de hibridização de RNA (*Northern Blot*) foi demonstrado que existem seqüências similares ao *EgAgB1* sendo transcritas em *E. multilocularis*. Neste mesmo trabalho os autores clonaram e seqüenciaram o cDNA completo deste gene, *EmAgB1*. A similaridade entre as seqüências de *EgAgB1* e *EmAgB1* é de 93,9% (Frosch *et al.*, 1994).

Posteriormente, Fernández *et al.* (2002) anotaram e depositaram no GeneBank seqüências nucleotídicas de cDNA de *E. multilocularis* referentes aos genes *EmAgB2*, *EmAgB3* e *EmAgB4*. Estas seqüências apresentam similaridade superior a 90% com os genes ortólogos de *E. granulosus*. Um gene adicional, e sem ortólogo descrito em *E. granulosus*, foi caracterizado e nomeado *EmAgB5* (Mamuti *et al.* 2006).

O primeiro gene do AgB completamente caracterizado para *E. multilocularis* foi o *EmAgB1*, que como em *E. granulosus* também possui dois éxons, um de 60 pb e outro com 292 pb interrompidos por um pequeno íntron de 91 pb (Mamuti *et al.*, 2004). Como nos genes de *E. granulosus*, o segundo éxon representa a proteína secretada e apresenta heterogeneidade de seqüências. Neste trabalho, através de experimentos de clonagem, os autores analisaram transcritos de um mesmo metacestóide de *E. multilocularis* e encontram quatro seqüências diferentes de *EmAgB1*. Uma destas seqüências era mais abundante, representando 21 amostras de 24 clones analisados, enquanto as outras foram representadas apenas uma vez nesta amostragem. Em 2006, Mamuti *et al.* publicaram as seqüências genômicas completas dos genes *EmAgB2*, *EmAgB3*, *EmAgB4* e *EmAgB5* e mostraram que a estrutura destes genes é similar àquela de *E.*

granulosus com o éxon 1 codificando um peptídeo sinal e o éxon 2 codificando o peptídeo exportado.

De um modo geral, cada um dos genes do AgB é constituído por uma seqüência codificante interrompida por um pequeno íntron, que geralmente contém repetições do motivo CCT. O primeiro éxon codifica um peptídeo sinal que é clivado durante o processo de exportação celular e não faz parte da proteína funcional, enquanto o segundo codifica o peptídeo secretado (Figura 3). As repetições dos motivos CCT, presumivelmente, facilitam recombinação intergênica entre diferentes membros da família AgB.

Uma abordagem semiquantitativa foi aplicada para avaliar a expressão diferencial dos cinco genes de *E. multilocularis* em diferentes fases do desenvolvimento (Mamuti *et al.*, 2006). A expressão dos genes *EmAgB1*, *EmAgB2* e *EmAgB4* parece diminuir com a progressão do desenvolvimento do parasito, sendo fortemente expressos em vesículas germinativas, moderadamente expressos em protoescólices e fracamente expressos no verme adulto. O gene *EmAgB5* é praticamente não detectável em vesículas e protoescólices, tornando-se presente no verme adulto. O gene *EmAgB3* parece ser expresso constitutivamente durante o desenvolvimento do parasito. Estes dados indicam a possibilidade de cada peptídeo do AgB possuir um papel biológico distinto, com o peptídeo AgB5 sendo importante durante a fase adulta, o peptídeo AgB3 com importância na biologia de todas as fases do parasito e os peptídeos AgB1, AgB2 e AgB4 com importância particular durante a adaptação ao hospedeiro intermediário (Mamuti *et al.*, 2006).

Haag *et al.* (2006) mostraram que os genes do AgB estão presentes em todo o gênero *Echinococcus*. A análise filogenética das seqüências dos genes do AgB obtidas de diferentes táxons infra-genéricos separa os genes em clados referentes a cada um dos genes (figura3), sugerindo que os eventos de duplicação que geraram cada os quatro genes descritos do AgB ocorreram antes da radiação que originou as espécies do gênero. A proximidade ente os clados B1 e B3 e os clados B2 e B4 mostra ainda que os genes *AgB1* e *AgB3* são mais relacionados, o mesmo ocorrendo entre os genes *AgB2* e *AgB4* (Haag *et al.*, 2006).

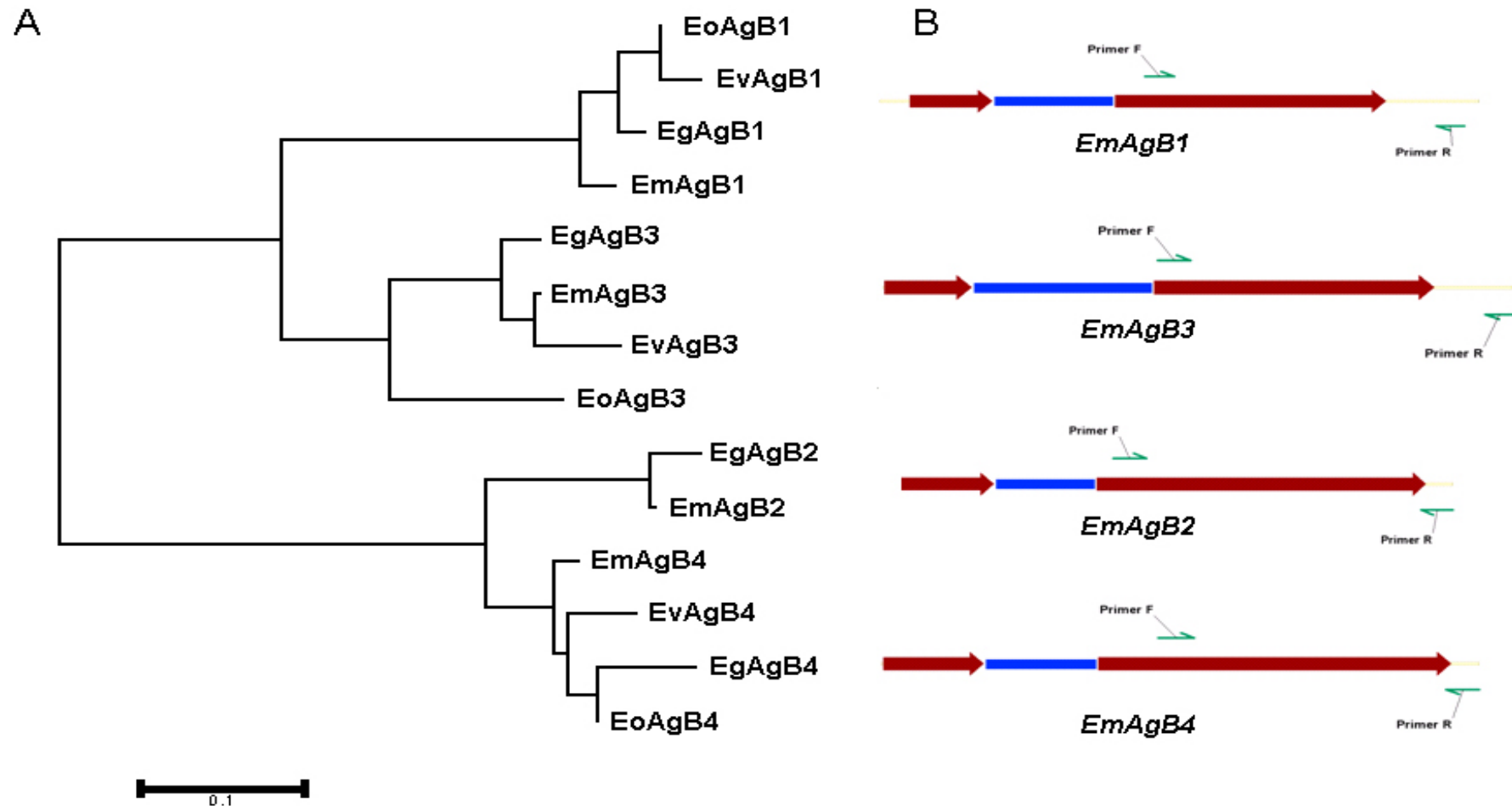


Figura 3 – Genes do antígeno B no gênero *Echinococcus*. (A) Relação filogenética entre os genes do antígeno B (AgB) de *Echinococcus*; e (B) estrutura esquemática de quatro genes do AgB de *E. multilocularis*. EoAgB1- EoAgB4 genes do AgB em *E. oligarthrus*; EvAgB1 –EvAgB4 genes do AgB em *E. vogeli*; EgAgB1 EgAgB4 genes do AgB em *E. granulosus*; EmAgB1-EmAgB4 genes do AgB em *E. multilocularis*. A reconstrução filogenética através do método Neighbor - Joining foi feita utilizando o segundo éxon de cada gene. Os *primers* indicados na Figura B referem-se aos *primers* utilizados no presente estudo (ver capítulo 2).

Comparando a similaridade de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos entre os genes do AgB de *E. granulosus* e *E. multilocularis*, Mamuti *et al.* (2006) mostrou similaridade superior a 90% entre os genes ortólogos (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação da similaridade entre as seqüências de nucleotídeos dos genes do AgB de *E. granulosus* e *E. multilocularis*. Modificado de Mamuti *et al.* (2006).

	<i>EgAgB1</i>	<i>EmAgB2</i>	<i>EgAgB3</i>	<i>EgAgB4</i>	<i>EgAgB5</i>
<i>EmAgB1</i>	92,3				
<i>EmAgB2</i>		94,3			
<i>EmAgB3</i>			92,4		
<i>EmAgB4</i>				91,3	
<i>EmAgB5</i>					-

1.3 Imunidade, Evasão da Resposta Imune e o Papel do Antígeno B

A exposição dos hospedeiros intermediários à forma infectiva de *Echinococcus* é alta nas zonas de risco, devido à alta taxa de liberação de ovos durante a infecção do hospedeiro definitivo (estima-se um único hospedeiro definitivo infectado pode liberar mais de 800 ovos do parasito a cada duas semanas). Contudo, o número de casos de hidatidose é baixo, usualmente menor que 0,1 casos por 100000 habitantes, mesmo nas regiões onde a população de parasitos é grande (Schantz *et al.*, 1995). Além disso, tem sido demonstrado que diferentes linhagens de camundongos diferem quanto ao grau de susceptibilidade à infecções experimentais (Bauder *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 2004). Estas evidências apontam para a existência de diferenças na susceptibilidade à infecção dentro das populações de hospedeiros intermediários, bem como diferenças na virulência dentro das populações de parasitos. Pelo menos parte destas diferenças deve-se a características genéticas (Zhang *et al.*, 2003).

As respostas imunológicas durante a hidatidose podem ser conceitualmente divididas em duas fases: pré-encistamento e pós-encistamento, diferindo pela ausência e posterior formação da camada laminada, que praticamente isola o metacésteide dentro do hospedeiro. A formação desta camada ocorre entre a segunda e a quarta semana após a infecção (Zhang *et al.*, 2003).

Após o estabelecimento da infecção, somente depois da segunda semana em camundongos, e da décima primeira em ovelhas, é que as primeiras imunoglobulinas G contra antígenos do cisto começam a ser detectadas. Concomitantemente ocorre um aumento dos níveis de leucócitos, principalmente de eosinófilos, linfócitos e macrófagos durante as fases iniciais de infecção com oncosferas de *E. granulosus* (Zhang *et al.*, 2003).

Analisando a resposta imunológica nas fases iniciais da infecção com *E. granulosus*, Fotiadis *et al.* (1999) encontraram uma acentuada resposta imunológica celular contra infecção primária com protoescólices. Neste trabalho os autores também relataram que camundongos sem timo (linhagem nude) foram mais susceptíveis à infecção que os camundongos controles (BALB/c).

Em 2004, Daí *et al.* demonstraram que a resposta imune celular, mediada por células CD4+ faz uma rota importante na proteção contra a infecção secundária com *E. multilocularis*, enquanto que as células CD8+ e as células B parecem ser menos importantes. Os autores analisaram diferentes linhagens de camundongos quanto à susceptibilidade a infecção secundária com microcistos de *E. multilocularis* e demonstraram que os camundongos da linhagem nude (sem timo e conseqüentemente sem células T) e os camundongos mutantes (MHC)-II I-A^{b-/-} e (TCR)-β^{-/-}, respectivamente deficientes na maturação das células CD4+ e desprovidos de células com TCR-αβ são mais susceptíveis a infecção que os camundongos MHC-I β2-m^{-/-} e os camundongos μMT desprovidos de células CD8+ e células B.

Experimentos *in vitro* têm mostrado também que neutrófilos, em associação com anticorpos, podem levar à morte oncosferas de *E. granulosus*, sugerindo uma possível rota das reações de citotoxicidade mediadas por células T, dependentes

de ativação por anticorpos na imunidade contra infecção primária por *E. granulosus* (Zhang *et al.*, 2003). Além disso, comparações feitas entre linhagens de camundongos resistentes e suscetíveis à hidatidose revelaram que uma resposta imune celular mais forte foi desenvolvida por linhagens resistentes em comparação com uma resposta mais fraca apresentada por linhagens suscetíveis (Gottstein *et al.*, 1994; Vuitton, 2003). Ainda, analisando as lesões ocasionadas durante a infecção com *E. multilocularis*, observa-se características histológicas que fortemente indicam a ocorrência de uma resposta imune celular contra o parasito (Vuitton, 2003). Existe, portanto, pelo menos nos estágios iniciais da doença, uma considerável ativação de imunidade celular contra o parasito.

A imunidade durante o desenvolvimento do cisto é caracterizada por um elevado nível de anticorpos, particularmente imunoglobulinas das classes IgM, IgG e IgE. Em pacientes portadores de hidatidose alveolar as subclasses de IgG mais abundantes são IgG1 e IgG4 reconhecendo os dois principais antígenos do cisto: antígeno 5 e AgB. Apesar de existir a ativação de células com a capacidade de infiltrar o cisto, aparentemente isto não ocasiona uma resposta inflamatória severa, e os produtos das reações destas células tendem a depositar-se na camada laminada na interface do cisto com o hospedeiro (Zhang *et al.*, 2003).

A infecção com a fase larval de *Echinococcus* é caracterizada por um longo período de permanência do metacéstóide no hospedeiro intermediário. Os casos mais extremos registrados constam de um cavalo portando um cisto de *E. granulosus* por 16 anos (Roneus *et al.*, 1982), e um homem que portou um cisto de *E. granulosus* durante 53 anos (Spruance, 1974). A habilidade do parasito sobreviver durante um tempo tão longo no hospedeiro implica na existência de estratégias, no parasito, para sobrepor ou evitar uma resposta imune protetora do hospedeiro (Damian, 1997).

É consenso que *Echinococcus* é pouco afetado pela resposta imune após o estabelecimento do metacéstóide, devido à formação da membrana laminada. Por outro lado, nota-se que em infecções naturais alguns cistos podem ser mortos durante os estágios tardios de desenvolvimento. Isto ocorre após o cisto sofrer

uma degeneração inicial, originando uma cavidade que é invadida por leucócitos do hospedeiro (Zhang *et al.*, 2003). Entretanto, isto não é evidência direta de que a morte do cisto foi devida a um fenômeno imunológico.

Em termos evolutivos, a invasão de um organismo por um agente infeccioso biológico e o controle da infecção por parte do hospedeiro, são lados opostos de uma mesma “batalha”, cujo desfecho depende de uma “corrida armamentista” mediada pela seleção natural. O resultado desta guerra pode ser observado na modelação dos genomas, tanto das espécies parasitas quanto hospedeiras. Enquanto nos hospedeiros evoluem mecanismos que visam à eliminação ou atenuação do parasito, os parasitos desenvolvem mecanismos que os possibilite permanecer ou propagar para outros hospedeiros.

O AgB é uma proteína que pode estar envolvida com a evasão da resposta imune de *Echinococcus*. Estudos iniciais demonstraram que ele inibe elastases e quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* (Shepherd *et al.*, 1991), além de induzir apoptose em células imunes de pacientes com doença hidática (Riganò *et al.*, 2002).

Em 2001, Riganò *et al.* analisaram o perfil de citocinas secretado por células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) após ativação com AgB. Eles avaliaram células de 40 pacientes infectados com *E. granulosus* divididos em dois grupos: pacientes com doença progressiva e pacientes com doença estável. Os autores encontraram que o AgB alterou a secreção de citocinas, originando um padrão do tipo Th2 (uma resposta imune associada com patogenicidade e não protetiva para o hospedeiro) principalmente nos pacientes com a forma progressiva da doença, evidenciando um papel importante do AgB na proteção do parasito.

1.4 Variação Antigênica e Evasão da Resposta Imune

Os parasitos possuem um repertório muito grande de antígenos, contra os quais o sistema imune dos hospedeiros reage provocando respostas inflamatórias que eventualmente culminam com a eliminação da infecção parasitária. A variabilidade antigênica, encontrada em muitos antígenos de parasitos, pode ser um importante mecanismo de subversão às respostas imunológicas.

Existem dois modos principais pelos quais a diversidade antigênica é alcançada pelo parasito: 1) A diversidade é mantida em nível populacional, e diferentes linhagens de parasitos têm vantagem em diferentes hospedeiros. Este tipo de mecanismo é observado em antígenos codificados por um único locus no genoma. 2) A variação antigênica é alcançada pela expressão temporalmente diferenciada de alelos alternativos, presentes e silenciados, dentro de um mesmo indivíduo. Este tipo de mecanismo requer que os antígenos sejam codificados por famílias multigênicas, que em alguns casos podem possuir centenas de genes no mesmo genoma (Nash, 2002).

Um exemplo de diversidade antigênica mantida em nível populacional é encontrado em bactérias da espécie *Streptococcus pneumoniae*. Neste parasito os principais antígenos reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro localizam-se na cápsula polissacarídica (Zysk *et al.*, 2003). Existem mais de 90 diferentes linhagens de *S. pneumoniae* que diferem na estrutura da cápsula, e cada uma induz uma resposta imune específica, que é eficiente somente contra a linhagem que gerou a infecção, e não contra as demais (Henrichsen, 1995). Por isso cada variante da bactéria atua como uma entidade imunológica distinta, e os hospedeiros podem ser re-infectado por outras linhagens bacterianas com diferentes antígenos em sua cápsula. Em casos como este, a diversidade populacional do parasito é mantida por seleção balanceadora.

Outro exemplo de variação antigênica mantida em nível populacional, mais importante em vírus, depende de altas taxas de mutação. Quando o hospedeiro é invadido por um vírus, desenvolve uma resposta imunológica adaptativa específica

que resulta na eliminação do parasito e na geração de memória imunológica. Graças a mutações que alteram o reconhecimento do vírus pelos anticorpos ele pode escapar da memória imunológica e as novas variantes podem re-infectar o mesmo hospedeiro. Este sistema está bem descrito no vírus influenza de humanos. Quando o vírus infecta um hospedeiro induz a uma forte resposta imune adaptativa, que geralmente culmina com a eliminação da infecção. Deste modo, a manutenção da espécie depende da existência de um conjunto de hospedeiros suscetíveis. Caso não surjam variantes alternativas capazes de evadir da resposta imunológica, o vírus esgotaria os possíveis hospedeiros suscetíveis e desapareceria. Assim, o surgimento de novas variantes, por mutação, garante a perpetuação do patógeno que pode re-infectar hospedeiros imunes à forma de vírus ancestral (Fitch *et al.*, 1997).

No caso onde a variação antigênica é obtida pela expressão diferencial de antígenos distintos, o exemplo mais estudado é o do protozoário *Trypanosoma brucei* (Donelson, 2003; Machado *et al.*, 2006). Durante a fase replicativa deste parasito, que ocorre no espaço extracelular do hospedeiro, ele é totalmente revestido por uma glicoproteína, VSG (*Variant-Surface Glicoprotein*). A resposta imune do hospedeiro é direcionada contra a VSG que está sendo expressa no parasito, e é muito eficiente na eliminação da infecção. Entretanto, *T. brucei* possui mais de 1000 cópias variantes dos genes que codificam esta proteína em seu genoma. Durante a infecção, alguns parasitos, alteram o alelo de VSG que está sendo expresso, escapando da resposta imune que é direcionada à VSG mais abundante (Cross *et al.*, 1998). Desta maneira, a população de parasitos no interior de um mesmo hospedeiro é mantida por um longo tempo.

1.5 Antígenos e Seleção Diversificadora

As diferentes regiões das moléculas de DNA de um organismo não se comportam evolutivamente da mesma maneira. Cada região está sujeita a diferentes forças de seleção, cuja intensidade depende principalmente da sua

função. Regiões não envolvidas na codificação de produtos gênicos evoluem segundo o modelo neutro, isto é, não existe nenhuma restrição à fixação de qualquer tipo de mutação atuando sobre estas regiões, e qualquer mudança de nucleotídeo que ocorra tem a mesma probabilidade de ser fixada. Em regiões codificadoras e regulatórias, nem toda mudança que ocorre pode ser fixada. Algumas mudanças causam alteração funcional muito grande, e estas mudanças, de um modo geral, são eliminadas por seleção purificadora (Graur e Li, 2000). Geralmente, uma alteração não-sinônima no DNA (que leva a substituição do aminoácido codificado) não é vantajosa para o organismo, uma vez que este já está perfeitamente ajustado ao seu ambiente. Desta maneira a maior parte das mutações que ocasionam troca de aminoácido não é mantida na população de parasitos, elas são eliminadas pela seleção purificadora (Nei e Kumar, 2000).

Por outro lado, alguns produtos gênicos só beneficiam o organismo se apresentarem diversidade. Isto é possível em situações onde o ambiente é muito instável, sujeito a mudanças rápidas e bruscas, situação encontrada na interface parasita-hospedeiro. As moléculas que fazem parte desta interação podem estar sujeitas a forte pressão de seleção em favor das alterações. Nessas situações, as mutações não-sinônimas são beneficiadas na evolução e podem ser mantidas e aumentar de frequência na população, este processo é conhecido como seleção diversificadora (Nei e Kumar, 2000).

Conway e Polley (2002) revisaram muitos antígenos de parasitos que sofrem seleção diversificadora. De forma generalizada pode-se notar que a maior parte dos genes que sofrem seleção por parte do sistema imune do hospedeiro codifica produtos localizados na superfície dos parasitos. Além disso, a maior parte destes genes é expressa durante a fase invasiva.

Algumas características apresentadas pela proteína AgB, em relação a sua localização, abundância e atividade biológica indicam que ela é uma proteína importante na interação com o hospedeiro: o AgB é a proteína mais abundante no metacéstóide (Oriol *et al.*, 1971), localiza-se na superfície dos protoescolíces e na

membrana laminada (Rickard *et al.*, 1977; Sanches *et al.*, 1991) e parece interferir diretamente na resposta imune do hospedeiro intermediário (Riganò *et al.*, 2001).

Os genes do AgB de apresentam uma grande diversidade de seqüências. Os primeiros estudos que analisaram as seqüências codificadoras do AgB demonstraram que existe heterogeneidade de seqüências nos genes do *EgAgB1* quando amostras de diferentes linhagens de *E. granulosus* são comparadas (Frosh *et al.* 1994). Posteriormente, Arend *et al.* (2004) e Haag *et al.* (2004) encontraram heterogeneidade nas seqüências dos genes do AgB dentro de um mesmo metacestóide e dentro de um mesmo protoescólice, respectivamente. A origem desta variabilidade ainda não é totalmente compreendida. A variação encontrada entre isolados de diferentes linhagens de *E. granulosus* pode ser devido ao fato que diferentes linhagens representam entidades biológicas distintas, e as diferenças encontradas seriam adaptações a diferentes hospedeiros intermediários (Kamenetzky *et al.*, 2005). A variação encontrada dentro de um mesmo cisto pode ser explicada ou por mutações ocorrendo durante a reprodução clonal das células no interior do cisto, ou pela presença de várias cópias do mesmo gene no genoma, embora as duas possibilidades não são mutuamente excludentes (Haag *et al.*, 2004).

Existem algumas características nos genes do AgB que podem indicar uma possível atuação da seleção diversificadora na origem de sua variabilidade. Por exemplo, a análise da diversidade nucleotídica entre os pares de genes *EgAgB1* e *EgAgB2* e entre *EgAgB2* e *EgAgB4* revelou que a diversidade nucleotídica no segundo éxon, que codifica a porção secretada da proteína, é maior do que no primeiro éxon e até maior que no íntron (Rott *et al.*, 2000; Arend *et al.*, 2004).

Mais ainda, a comparação de seqüências gênicas do gene *EgAgB1* de diferentes linhagens de *E. granulosus* sugere a ocorrência de seleção natural positiva durante a evolução deste gene. Foi observado que a maioria das substituições encontradas por pareamento das seqüências eram não-sinônimas e a divisão da taxa de mutações não-sinônimas pela taxa de mutações sinônimas

(Ka/Ks) resulta em um valor maior que um, em seis de um total de 15 comparações (Haag *et al.*, 1998).

Procurando por sítios sobre pressão de seleção ao longo da seqüência de quatro genes do AgB no gênero *Echinococcus*, Haag *et al.* (2006) mostraram um padrão complexo na evolução destes genes, com presença de alguns sítios sofrendo seleção positiva enquanto outros sofrem seleção purificadora. Neste estudo, três dos quatro genes do AgB (*AgB1*, *AgB3* e *AgB4*) mostram evidências de seleção positiva, enquanto o gene *AgB2* não desvia da hipótese de evolução neutra. De uma maneira conservativa, este estudo considerou estarem sofrendo seleção positiva somente os códons que foram detectados por três diferentes métodos (*Empirical Bayes*, FEL – *Fixed effects likelihood* e REL – *Random effects likelihood*). Assim, os códons que estão sobre pressão de seleção são: o códon 18 em *AgB1*, o códon 3 em *AgB3* e o códon 71 em *AgB4*. Uma observação importante é que o códon 18 de *AgB1* codifica um aminoácido presente em uma região imuno-reativa, provavelmente situado em uma região de íntimo contato com anticorpos, como mapeado por González-Sapienza e Cachau (2003).

Esta situação já havia sido descrita para antígenos de superfície da membrana de *Plasmodium falciparum*, que assim como o AgB, também interagem com o sistema imunológico do hospedeiro. Escalante *et al.* (1998) atribuem o alto polimorfismo encontrado em proteínas de superfície de membrana de *P. falciparum* à ação da seleção natural positiva. O alto polimorfismo nestes genes seria uma estratégia de evasão da resposta imune do hospedeiro.

Ainda, analisando seqüências do gene *EBA-175* (*Erythrocyte Binding Protein - 175*) de 30 amostras de *P. falciparum*, Baum *et al.* (2003) encontraram evidências de seleção positiva na diversificação dos genes desta proteína. Em sua amostragem, eles encontraram 17 alelos distintos, todos diferindo por substituições não-sinônimas. Esta proteína faz uma rota importante na invasão dos eritrócitos e tem sido mostrado que anticorpos contra esta proteína bloqueiam a invasão (Narum *et al.*, 2000), de modo que a diversificação desta proteína pode ter sido moldada por seleção imposta pelo sistema imune do hospedeiro.

Um modo interessante de analisar se a pressão imposta pelo sistema imune dos hospedeiros intermediários está relacionada com a diversidade de seqüências dos genes do AgB (diversidade antigênica) encontrada dentro de um mesmo metacestóide é analisar parasitos coletados de hospedeiros que difiram quanto a presença ou ausência de um sistema imune íntegro. Esta comparação pode ser feita através de infecções experimentais controladas, onde o mesmo estoque de parasitos pode ser utilizado para infectar diferentes linhagens de camundongos. Esta abordagem aproveita uma característica importante do parasito *E. multilocularis*: este parasito utiliza roedores como hospedeiros intermediários usuais e, ao contrario de *E. granulosus*, cresce rapidamente em camundongos experimentalmente infectados.

Atualmente existem muitas linhagens de camundongos deficientes em alguma rota da resposta imune. Foi amplamente demonstrado que a resposta imune celular é eficiente no controle da infecção por *E. multilocularis*, ao contrário da resposta imune humoral, a qual não é capaz de controlar o crescimento do metacestóide (Fotiadis *et al.*, 1999; Gottstein *et al.*, 1994; Vuitton, 2003, Daí *et al.*, 2004).

Neste trabalho nós utilizamos a facilidade da infecção de camundongos por *E. multilocularis* para verificar a relação entre imunidade celular e diversificação dos genes do AgB.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o processo de diversificação dos genes do AgB durante a infecção secundária de camundongos proficientes e não proficientes na resposta imune celular.

Os objetivos específicos foram:

- Testar a hipótese que a pressão seletiva exercida pela resposta imune dependente de célula T dos hospedeiros murinos de *E. multilocularis* é responsável pela diversificação dos genes do AgB;
- Verificar se a seleção diversificadora sobre os genes do antígeno B de *E. multilocularis* atua durante o desenvolvimento do metacéstóide.

3. Diversity of Antigen B genes in *Echinococcus multilocularis* metacestodes from T-cell proficient and non-proficient mice

Daniel A. S. Graichen^a, Jun Matsumoto^b, Bruno Gottstein^b, Karen L Haag^{a, c}

^a – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^b – Institute of Parasitology, Veterinary Faculty, University of Berne, Switzerland;

^c – Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Artigo em preparação.

Diversity of Antigen B genes in *Echinococcus multilocularis* metacestodes from T-cell proficient and non-proficient mice

Daniel A. S. Graichen^a, Jun Matsumoto^b, Bruno Gottstein^b, Karen L Haag^{a, c}

^a – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^b – Institute of Parasitology, Veterinary Faculty, University of Berne, Switzerland;

^c – Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

3.1 Introduction

Alveolar echinococcosis (AE) is a severe life-threatening zoonosis caused by the infection with the metacestode stage of the flatworm *Echinococcus multilocularis*. AE is characterized by the growth of a tumour-like tissue which infiltrates the host target organ. The fast growth and metastasis ability of the *E. multilocularis* metacestode lead AE to be considered the most lethal cestode infection in humans (Craig *et al.*, 1996). The larval stage of *E. multilocularis* usually infects mice, but men can be accidental hosts (Thompson, 1995). Since *E. multilocularis* uses mice as intermediate hosts, it represents an interesting model to study the infective process in the whole *Echinococcus* genus.

Experimental infection in mice showed that the *E. multilocularis* metacestode grows faster in athymic nude mice or in severely compromised immunodeficient (SCID) mice than in wild type control animals (Playford *et al.*, 1992, Dai *et al.*, 2004). Furthermore, the role of an immune response in the control of AE in human patients has been demonstrated by the rapid, fatal outcome of the infection in an immunodeficient patient co-infected with immunodeficiency virus (HIV) (Sailer *et al.*, 1997). The role of the cellular immune response in the control of the *Echinococcus* infection has been analyzed in several studies. Gottstein *et al.*

(1994) demonstrated that mouse strains resistant to *E. multilocularis* infections show a stronger cellular immune response when compared to susceptible mouse strains. The main role of the cellular immune response in the control of metacestode growth was confirmed afterwards, because mouse strains which do not develop cellular immune response also do not control the metacestode growth, while mice deficient in humoral immunity are able to control the metacestode growth (Dai *et al.*, 2004).

Antigen B (AgB) is a lipoprotein secreted during the larval stage of *Echinococcus* parasites. It was first isolated from *E. granulosus* hydatid fluid (Oriol *et al.*, 1971) where it is the most abundant protein (Oriol and Oriol, 1975). The native protein of *E. granulosus* is a 160 kDa polymer composed by 8 kDa monomers (González-Sapienza *et al.*, 1996) encoded by the AgB gene family (Chemale *et al.*, 2001).

There are five AgB genes characterized in *E. multilocularis*, *EmAgB1* – *EmAgB5* (Frosch *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 2002; Mamuti *et al.*, 2006), but only *EmAgB1* – *EmAgB4* show similarity (larger than 90%) with orthologous sequences of *E. granulosus*. Antigen B sequence variability inside a single metacestode was described for *E. granulosus* (Arend *et al.* 2004, Haag *et al.* 2004) and *E. multilocularis* (Mamuti *et al.*, 2004). This variability could be related to the evasion of immune responses (Haag *et al.* 2004); however, this has not yet been confirmed.

Several approaches have been used to examine AgB function. *In vitro* studies showed that AgB is a protease inhibitor with an ability to inhibit the recruitment of neutrophils (Shepherd *et al.*, 1991). Riganò *et al.* (2001) evaluated the cytokines secretion profile in peripheral mononuclear blood cells (PMNC) after they underwent AgB stimulation. These cells were collected from patients of two groups: with progressive and stationary cystic echinococcosis (infection with *E. granulosus*). Their results showed that AgB elicits a Th2 non-protective response preferentially in patients with progressive disease and it suggests that AgB modulates the host immune response. Besides, Chemale *et al.* (2005) analyzed

the AgB lipid binding properties and demonstrated that recombinant peptides encoded by *EgAgB1* and *EgAgB2* are able to bind but not to release fatty acids, and they suggest a lipid detoxification role for the AgB protein.

Searching for signs of natural selection on the diversity of *E. granulosus* AgB nucleotide sequences Haag *et al.* (1998) demonstrated that when *E. granulosus* samples of different lineages are analyzed, *EgAgB1* shows an excess of non-synonymous over synonymous substitutions. Additional analysis for codons under selection pressure found natural selection signatures on *AgB1*, *AgB3* and *AgB4* sequences from different species/strains of *Echinococcus*, but not in *AgB2* (Haag *et al.*, 2006). Their results suggest that nucleotide variation is related to host specificity. Interestingly, sequences originated from a single *E. granulosus* metacestode show neutrality departure for *EgAgB2*, but not for other already characterized *EgAgB* genes (Haag *et al.* 2004). The real meaning of AgB diversity is far from being completely understood.

In this work we report the *AgB* mutations originated during *E. multilocularis* secondary infections in athymic nude and BALB/c mice. We also searched for selection signatures along the sequences obtained from *EmAgB1* – *EmAgB4* transcripts expressed by these parasites.

3.2 Materials and Methods

***Echinococcus* culture and infection of mice**

Maintenance of *E. multilocularis* metacestodes (KF5 isolate) was done by serial transplantation passages in gerbils (*Meriones unguiculatus*). Microcysts were prepared according to Hemphill and Gottstein (1995). Two female 8-week-old athymic nude mice and two BALB/c mice were infected with about 100 freshly prepared microcysts in 100 μ l of Hank's Balanced Salt Solution. The nude mice are non-proficient for T-cell mediate immune response while BALB/c are mice with normal immune response. After one or two months post infection (m.p.i.) mice

were necropsed and the parasites were collected, weighted and submitted to molecular analysis.

RNA extraction, cDNA synthesis and cloning

Total parasite RNA was isolated by the single-step guanidinium thiocyanate procedure using TRIzol Reagent (Gibco) according to manufacturer instruction. Residual genomic DNA was removed from sample RNA by performing 180 minutes incubation at 37° C in the presence of RQ1 RNase-free DNase I (Promega). After heat inactivation (10 minutes at 80° C) of the DNase, RNA preparations were subjected to cDNA synthesis by applying a random oligonucleotide-hexamer primer (Promega) and AMV reverse transcriptase (Promega). Finally, complementary DNA (cDNA) was purified by using a spin column from High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics) and then eluted with 100 µl of water before use in RT-PCR analysis. The purified cDNA was used as template in PCR with gene-specific amplification conditions in 35 cycles, as follows: 30 seconds at 95° C, 30 seconds at 50° C and 60 seconds at 72° C. To control for genomic DNA contamination, a PCR was performed using RNA non-reverse transcribed as template. Four sets of PCR primers were designed from GenBank *E. multilocularis* sequences to amplify specifically each *EmAgB1* – *EmAgB4* (Table 1). One microliter of each purified RT-PCR products was cloned in a TOPO TA Vector for Sequencing (Invitrogen).

SSCP screening and sequencing

About 33 – 44 recombinant plasmids of each *EmAgB* cDNA were screened for sequence polymorphism by single strand conformation polymorphism (SSCP) after PCR amplification. Each recombinant colony was eluted in 50 µl water and heat denatured at 95° C for 5 minutes. The PCR mix was added to 5 µl of the lysate in a final volume solution of 25 µl. The PCR was carried out with the same primers and conditions used for RT-PCR. Then, 3 µl of each PCR product were denatured for 3 minutes in a buffer containing 95% formamide, 0.0125% xylene cyanole and

0.025% bromophenol blue and chilled immediately on ice. The electrophoresis was conducted in the GenePhor Electrophoresis Unit (GE Healthcare) using precasted gels (GeneGel SSCP, 12,5%), at 200 V for 2.5 hours and SSCP buffer A (GE Healthcare). The electrophoresis temperature was standardized for each *EmAgB* gene: 12° C for *EmAgB1*, *EmAgB2*, *EmAgB3*, and 5° C for *EmAgB4*. The gels were silver stained, digitalized and analyzed with the ImageMaster package (GE Helthcare). The plasmids containing inserts from different alleles, as identified by the SSCP technique, were automatically sequenced.

Data analyses

Sequence quality was assessed by Phred software at www.unb.br/electrospherogram/ and by visual inspection. The sequences were manually aligned and polymorphism analyses were done with DNAsp v 4.1 (Rozas *et al.*, 2003). The allele diversity for each AgB gene in each mouse was estimated by the Past Software (Hammer *et al.*, 2001) using the Shannon Diversity Index (SDI), where the total number of alleles is weighted by the frequency of each allele (Poole, 1974). SDIs for each gene/mouse were compared using a *t* test, where means and variances were obtained by a randomization process based on 1000 permutations (Hammer *et al.*, 2001). The *EmAgB1* - *EmAgB4* networks were obtained using the TCS software, version 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Both Tajima's D Test (Tajima, 1989) and the Fisher's Exact Test for excess of non-synonymous over synonymous substitutions (Nei and Kumar, 2000) were made with DNAsp v 4.1 (Rozas *et al.*, 2003) using the sequences sampled from each metacestode. An additional test, based in Fitch *et al.* (1997), was used to calculate the probability of a given set of mutations in a coding sequence. In this test we determined the probability for a synonymous and non-synonymous mutation set to be observed, considering the number of synonymous and non-synonymous sites present in the sequence. Therefore, in a sequence with m nucleotides in which s is the number of synonymous sites and n ($m-s$) is the number of non-synonymous sites (Nei and Gojobori, 1986) we consider that s/m is the probability of each mutation to be synonymous and n/m the probability from this mutation to be non-

synonymous. Then, we can use the binomial distribution properties to estimate the probability of a certain mutations set in a given sequence.

3.3 Results

Parasite mass recovered from experimentally infected mice

To obtain parasites that underwent different immune challenges from the host, two T cell-deficient nude mice and corresponding BALB/c controls were intraperitoneally injected with approximately 100 parasite microcysts. One month after infection the mass of parasites recovered from the hosts was relatively low and comparable for both nude and BALB/c mice (Figure 1). However, when the parasite was recovered two months after infection, the nude mouse contained a larger amount of metacestode mass than the BALB/c mouse (Figure 1). These results confirm that *E. multilocularis* metacestode growth is strongly inhibited in a host with an intact immune system.

AgB diversity and T-cell immune response

To evaluate the role of the T-cell dependent immune response on *AgB* gene diversification, we cloned and analyzed transcripts (mRNA) from the four *E. multilocularis* *AgB* genes sampled from the four mice (BALB/c 1 m.p.i., BALB/c 2 m.p.i., nude 1 m.p.i. and nude 2 m.p.i.). The total number of alleles, as well as the Shannon Diversity Index for each gene/mouse, are shown in the Table 2. The lowest allele diversity, as estimated by SDI, was obtained for *EmAgB4* from the BALB/c mouse on the first m.p.i. and for *EmAgB1* and *EmAgB3* of nude mice on the second and first m.p.i respectively, while the highest diversity values were from *EmAgB2*, on both months and mice. However the differences of SDI between genes were statistically significant only when *EmAgB2* is compared to *EmAgB3* ($p=0,0022$) and *EmAgB4* ($p=0,0003$) of the BALB/c mouse at one m.p.i. The diversity values of *EmAgB1* – *EmAgB3* were higher in the BALB/c mice on both

months, but higher in the nude mouse for *EmAgB4*. However, differences between the *EmAgB1* – *EmAgB4* diversities between parasites sampled from nude and BALB/c mice were not statistically significant (Table 2). These results do not suggest a significant relationship between *EmAgB* diversity and host T-cell immune response in secondary infected mice. Differences in *EmAgB* diversity between first and second months post infection for each gene were also not statistically significant.

AgB alleles are originated by point mutation

As expected, most nucleotide substitutions identified in our study are transitions (44 out of 50 substitutions). However, a surprising result is that six out of 26 *EmAgB2* and two out of 12 *EmAgB3* variants contain indels, which would result in a non-functional protein (Figure 2). For each AgB gene the alleles usually arise from a single point mutation. Figure 3 shows that each *AgB* variant originated independently from a single, and most frequent, standard allele. There are only four exceptions to this rule, two occurring for *EmAgB2*, one for *EmAgB3* and one for *EmAgB4*. A single *EmAgB2* is shared between two mice (clones b2w1_29 and b2n1_1) and other two *EmAgB2* allele appears twice in the same mouse (Figure 3). All other variants occurred only once and in a single mouse.

Natural selection and mice T-cell immunity

In order to determine the evolutionary significance of *EmAgB* diversity inside a single *E. multilocularis* metacestode we looked for evidences of natural selection on *AgB* variability (Table 3). To test for neutrality of mutations, we performed a Tajima's D Test using the total sample of *EmAgB* alleles collected from each mouse (Table 3). The values were all negative and statistically significant, except for *EmAgB1* in the second m.p.i. of a nude mouse and *EmAgB4* in the first m.p.i. of a BALB/c mouse. Negative and significant Tajima's D-values, caused by an

excess of rare alleles in the sample, could be explained either by an adaptive sweep resulting from diversifying selection, or by a rapid population expansion. Trying to choose between these two causes, we performed additional tests, classifying each mutation from the rare variant alleles as synonymous or non-synonymous. Both the Fisher Exact Test and our Binomial Probability Analysis would provide additional evidences about the occurrence of negative or positive (diversifying) selection, given a significant excess of synonymous or non-synonymous mutations, respectively. However our results do not indicate departure from neutrality, suggest that the excess of rare *EmAgB* alleles in each mouse is a side-effect of the cell proliferation process either during gerbil passages and cell culture or inside the host peritoneal cavity.

3.4 Discussion

Antigen B is among the most abundant and immunogenic antigens of *Echinococcus* (Oriol *et al.*, 1971; Lightowlers *et al.*, 1989). The role of AgB in the regulation of intermediate host immune response has been analyzed and the inhibition of protective immune response by AgB and consequent parasitemy maintenance has been reported (Shepherd *et al.*, 1991; Riganò *et al.*, 2001 and 2002). Parasite antigens which interact directly with the host immune system can to be submitted to strong selective pressure and can co-evolve with host immunity (Baum *et al.*, 2003).

As demonstrated by Fotiadis *et al.* (1999) and Dai *et al.* (2004), the cellular immune response is able to control the *Echinococcus* metacestode growth in mice but humoral immune response does not control metacestode proliferation; therefore BALB/c mice are more able to challenge the *E. multilocularis* metacestode growth than nude mice (Figure 1).

A high sequence (allele) diversity of *EgAgB1* – *EgAgB4* genes inside a single *E. granulosus* metacestode has been reported (Arend *et al.*, 2004; Haag *et al.*, 2004) and its origin was supposed to be related to the host-mediated immune selection pressure (Haag *et al.* 2004). Our results demonstrate that *E.*

multilocularis *EmAgB1 – EmAgB4* genes can develop high sequence diversity in a single metacestode (Figure 2 and Table 2). However, we found no significant difference between the diversity of *AgB* genes from parasite recovered from nude and BALB/c mouse strains (Table 2). Therefore, we conclude that there is no direct relationship between sequence diversity and T-cell immune challenge exerted by the host.

Unfortunately, it is not possible to ascertain if the observed mutations originated before the infection (during gerbil passages or microcyst proliferation inside the *in vitro* culture) or after the infection (during metacestode growth inside host peritoneal cavity). Most alleles arose by a single mutation from the standard sequence (Figure 3), but metacestodes from distinct mice seldomly shared a non standard allele (this happened only once for *EmAgB2*), which could be an indication that the mutations occurred after the infection. Moreover, since a similar pattern of diversity (excess of rare alleles in a single metacestode) was also described for *E. granulosus* (Haag *et al.*, 2004), where the cyst develops from only one oncosphere, we suggest that the mutations could have been originated inside the host, although we can not rule out that some mutations were already present in the microcyst population injected in the mice.

Another scenario which would explain both the present findings for *E. multilocularis* and the previous results obtained for *E. granulosus* would be an extremely high redundancy of *AgB* genes inside the genome. In this case, a single cell could bear a number of distinct *AgB* gene variants expressed in the metacestode stage. However, genomic Southern Blot for *E. granulosus* *AgB* genes do not indicate a high redundancy (Chemale *et al.*, 2001; Haag *et al.*, 2004), but we hypothesize that *AgB* genes can increase in number through gene rearrangements during metacestode growth (Haag *et al.*, submitted).

The present results do not confirm our previous hypothesis that the *Echinococcus* within-metacestode *AgB* variability would represent some form of antigenic variation mechanism. We showed that *AgB* variation is not directed to T-cell mediated immune response. Moreover, our analyses showed that the

substitution process in *EmAgB1* – *EmAgB4* alleles follows the neutral pattern, since the frequency of non-synonymous and synonymous mutations is proportional to the number of non-synonymous and synonymous sites. Two questions remain, however.

First, if the presence of variant alleles is not favoured by natural selection, how are mutations maintained? Our results of transcript quantification of *EmAgB1* – *EmAgB4* genes with the same experimental design (gene expression in BALB/c and nude mice, data not shown) demonstrate that the lowest expressed gene is *EmAgB2*. In our mutation analysis *EmAgB2* was also the most diverse gene, and a large fraction of the variant alleles contained missense frameshift mutations. The inverse relationship between the amount of expression and genetic diversity suggests that variation in *AgB* genes within a metacestode is principally maintained through a relaxation of purifying selection.

Second, what is, then, the biological significance of the *AgB* positively selected sites previously mapped by Haag *et al.* (2006)? Although the positively selected sites identified in our previous study do not seem to have a biologic significance in terms of antigenic variation within a single host, it is possible that *AgB* variation is needed at the population level. Particular *AgB* alleles might be involved in the adaptation to a particular host species. Indeed, the sequences analyzed in that study came from different *Echinococcus* strains or species, which are specialized to distinct intermediate hosts. Being able to infect a wide range of herbivorous mammals, *Echinococcus* parasites must be able to face quite distinct immune challenges, and *AgB* appears to have an important role in this process.

The present results do not imply that *AgB* is not an important for evading the murine T-cell response. Thus, our expression studies suggest that there are significant differences in the *AgB* gene transcription level between BALB/c and nude mice, especially during the early periods of infection (data not shown). We conclude from the present *AgB* diversity data, that this role in T-cell response evasion is not mediated by antigenic variation. Those conclusions should be taken with caution, however, since it applies only to secondary infections in mice. The

biological role of AgB diversity during oncosphere differentiation into a metacestode was not assessed in the present study.

3.5 References

Arend AC, Zaha A, Ayala FJ and Haag KL (2004) The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp Parasitol* 108: 76-80.

Baum J, Thomas AW and Conway DJ (2003) Evidence for diversifying selection on erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Genetics* 163: 1327-1336.

Clement M, Posada D and Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9: 1657-1660.

Chemale G, Ferreira HB, Barrett J, Brophy PM and Zaha A (2005) *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim Biophys Acta* 1747: 189-194.

Chemale G, Haag KL, Ferreira HB and Zaha A (2001) *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol* 116: 233-237.

Craig PS, Rogan MT and Allan JC (1996) Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, Alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv Parasitol* 38: 169:205.

Dai WJ, Waldvogel A, Siles-Lucas M and Gottstein B (2004) *Echinococcus multilocularis* proliferation in mice and respective parasite 14-3-3 gene expression is mainly controlled by an alphabeta CD4 T-cell-mediated immune response. *Immunology* 112: 481-488.

Fernández C, Gregory WF, Loke P and Maizels RM (2002) Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol Biochem Parasitol* 122: 171-180.

Fitch WM, Bush RM, Bender CA and Cox NJ (1997) Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 7712-7718.

Fotiadis C, Sergiou C, Kirou J, Troupis TG, Tselentis J, Doussaitou P, Gorgoulis VG and Sechas MN (1999) Experimental *Echinococcus* infection in the mouse model: pericyclic cellular immunity reaction and effects on the lymphoid organs of immunocompetent and thymectomized mice. *In Vivo* 13: 541-546.

Frosch P, Hartmann M, Muhlschlegel F and Frosch M (1994) Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Mol Biochem Parasitol* 64: 171-175.

González-Sapienza G, Nieto A, Fernández C, Orn A, Wernstedt C and Hellman U (1996) Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol* 18: 587-596.

Gottstein B, Wunderlin E and Tanner I (1994) *Echinococcus multilocularis*: parasite-specific humoral and cellular immune response subsets in mouse strains susceptible (AKR, C57B1/6J) or 'resistant' (C57B1/10) to secondary alveolar echinococcosis. *Clin Exp Immunol* 96: 245-252.

Haag KL, Alves-Junior L, Zaha A and Ayala FJ (2004) Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene* 333: 157-167.

Haag KL, Araújo AM, Gottstein B and Zaha A (1998) Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. Mem Inst Oswaldo Cruz 93: 695-702.

Haag KL, Gottstein B, Schnnor A e Ayala FJ. Upstream promoter regions reveal the complexity of the *Echinococcus granulosus* AgB multigene family. Submitted.

Haag KL, Zanotto P, Alves-Junior L, Gasser RB, Zaha A and Ayala FJ (2006) Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. Infect Genet Evol (*in press*).

Hammer Ø, Harper DAT and Ryan PD (2001) Past: palaeontological statistics software package for education and data analysis. Palaeont Electron 4: 9.

Hemphill A and Gottstein B (1995) Immunological and morphological studies on the proliferation of in vitro cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestode. Parasitol Res 81: 605–614.

Lightowers MW, Liu DY, Haralambous A and Rickard MD (1989) Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. Mol Biochem Parasitol 37: 171-182.

Mamuti W, Sako Y, Xiao N, Nakaya K, Nakao M, Yamasaki H, Lightowers MW, Craig PS and Ito A (2006) *Echinococcus multilocularis*: Developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. Exp Parasitol. 2006 (*in press*)

Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Sato N, Vuitton DA, Piarroux R, Lightowers MW, Craig PS and Ito A (2004) A Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. J Clin Microbiol 42: 1082-1088.

Nei M and Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426.

Nei M and Kumar S (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press, New York, 333 pp.

Oriol R, Williams JF, Miguela V, Esandi P and Oriol C (1971) Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am J Trop Med Hyg* 20: 569-574.

Oriol R and Oriol C (1975) Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg* 24: 96-100.

Playford M, Ooi HK, Oku Y and Kamiya M (1992) Secondary *Echinococcus multilocularis* infection in severe combined immunodeficient (scid) mice: biphasic growth of the larval cyst mass. *IntJ Parasitol* 22: 975–82.

Poole RW (1974) *An introduction to quantitative ecology*. McGraw-Hill, New York 457 pp.

Riganò R, Profuno E, Bruschi F, Carulli G, Azarrà A, Ioppolo S, Buttari B, Ortona E, Margutti P, Teggi A and Siracusano A (2001) Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect Immun* 69: 288-296.

Riganò R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Margutti P, Teggi A and Siracusano A (2002) Apoptosis modulation in PMBC from patients with cystic echinococcosis. 51st Annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygiene p. 277.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio C, Messeguer X and Rozas R (2003) DnaSP: DNA polymorphism analysis by coalescence and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

Sailer M, Soelder B, Allerberger F, Zaknun D, Feichtinger H and Gottstein B (1997) (Alveolar echinococcosis of the liver in a six-year old girl with acquired immunodeficiency syndrome. *J Pediatr* 130: 320–323.

Shepherd JC, Aitken A and McManus DP (1991) A Protein Secreted in Vivo by *Echinococcus granulosus* Inhibits Elastase Activity and Neutrophil Chemotaxis. *Mol Biochem Parasitol* 44: 81-90.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Thompson RCA (1995) Biology and systematic of *Echinococcus*. In: Thompson RCA and Lymbery AJ (eds) *Echinococcus and hydatid disease*. CAB International, Wallingford. pp 1-50.

Table 1 – Primers used to amplify each AgB gene (5'→3').

	Primer R	Primer F	Amplicon size (bp)
<i>EmAgB1</i>		CGAGGAGTATGATGAAAATGC	233
	GTAGATGGTTTATTGAGCAA		
<i>EmAgB3</i>		GTTGATGAAGTGACTAGACGAA	255
<i>EmAgB2</i>		CAAAGCACACAGGGGGCAAG	220
	GTGTCCCGACGCATGACTTA		
<i>EmAgB4</i>		CGAAAATTGAGCGAAATCCGG	191

Table 2 – Diversity of *E. multilocularis* *EmAgB1* – *EmAgB4* alleles in the infected mice. The p-value of SDI comparisons between BALB/c and nude are indicated.

	m.p.i.	<i>BALB/c</i>				<i>nude</i>				<i>P- value</i>
		n	h	ss	SDI	n	h	ss	SDI	
<i>EmAgB1</i>	1	44	5	40	0,385	44	3	42	0,193	0,346
	2	43	6	38	0,488	44	2	43	0,097	0,056
<i>EmAgB2</i>	1	42	10	33	0,883	42	5	37	0,476	0,155
	2	43	7	36	0,670	33	6	28	0,593	0,792
<i>EmAgB3</i>	1	43	3	41	0,197	44	2	43	0,097	0,503
	2	44	6	39	0,480	44	5	40	0,385	0,695
<i>EmAgB4</i>	1	44	2	43	0,097	43	4	40	0,294	0,247
	2	44	4	41	0,289	42	5	38	0,398	0,623

m.p.i., months post infection; n: number of analyzed clones; h, number of alleles; SDI, Shannon diversity index; ss, number of clones corresponding to standard allele.

Table 3 – Neutrality test results for the *EmAgB1* – *EmAgB4* alleles found in each infected mouse.

		BALB/c				nude			
		<i>(p value)</i>							
		Tajima's D	Tajima's D	Fisher's Exact Test	Binomial Probability Analysis	Tajima's D	Tajima's D	Fisher's Exact Test	Binomial Probability Analysis
	m.p.i.								
<i>EmAgB1</i>	1	-1,873	0,005	0,199	0,170	-1,477	0,037	0,786	0,2145
	2	-1,999	0,006	0,710	0,408	-1,115	0,132	----	1,00
<i>EmAgB2</i>	1	-2.176	0.000	0,618	0,3840	-1.761	0.017	0,631	0,417
	2	-1.762	0.009	0,202	0,1715	-1.888	0.004	0,707	0,404
<i>EmAgB3</i>	1	-1.479	0.033	----	1,00	-1.115	0.111	----	1,00
	2	-1.873	0.006	0,095	0,090	-1.873	0.006	0,4766	0,377
<i>EmAgB4</i>	1	-1.117	0.125	0,785	0,782	-1.710	0.011	0,481	0,479
	2	-1.708	0.010	0,518	0,399	-1.708	0.010	0,201	0,173

m.p.i., months post infection.

Figure 1

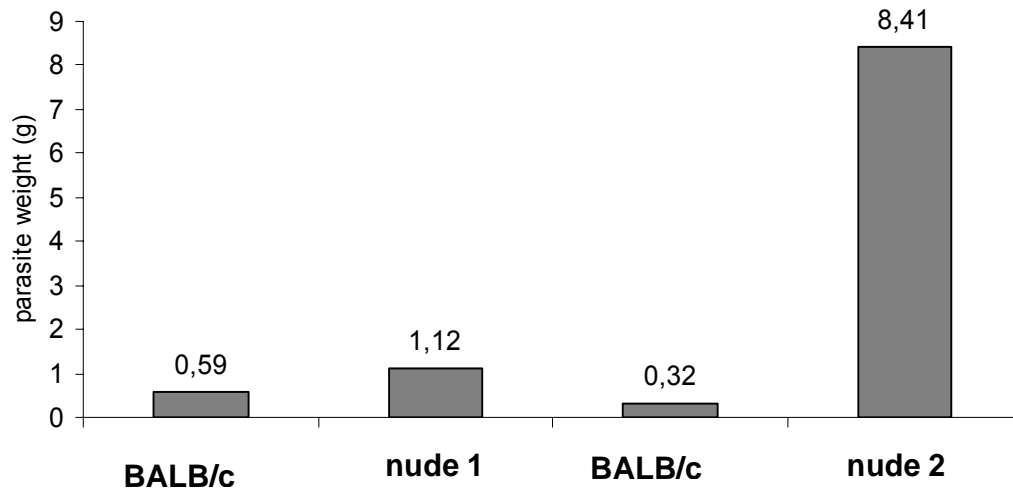


Figure 1 – Parasite weight in each mouse at one or two months post infection.

Figure 2

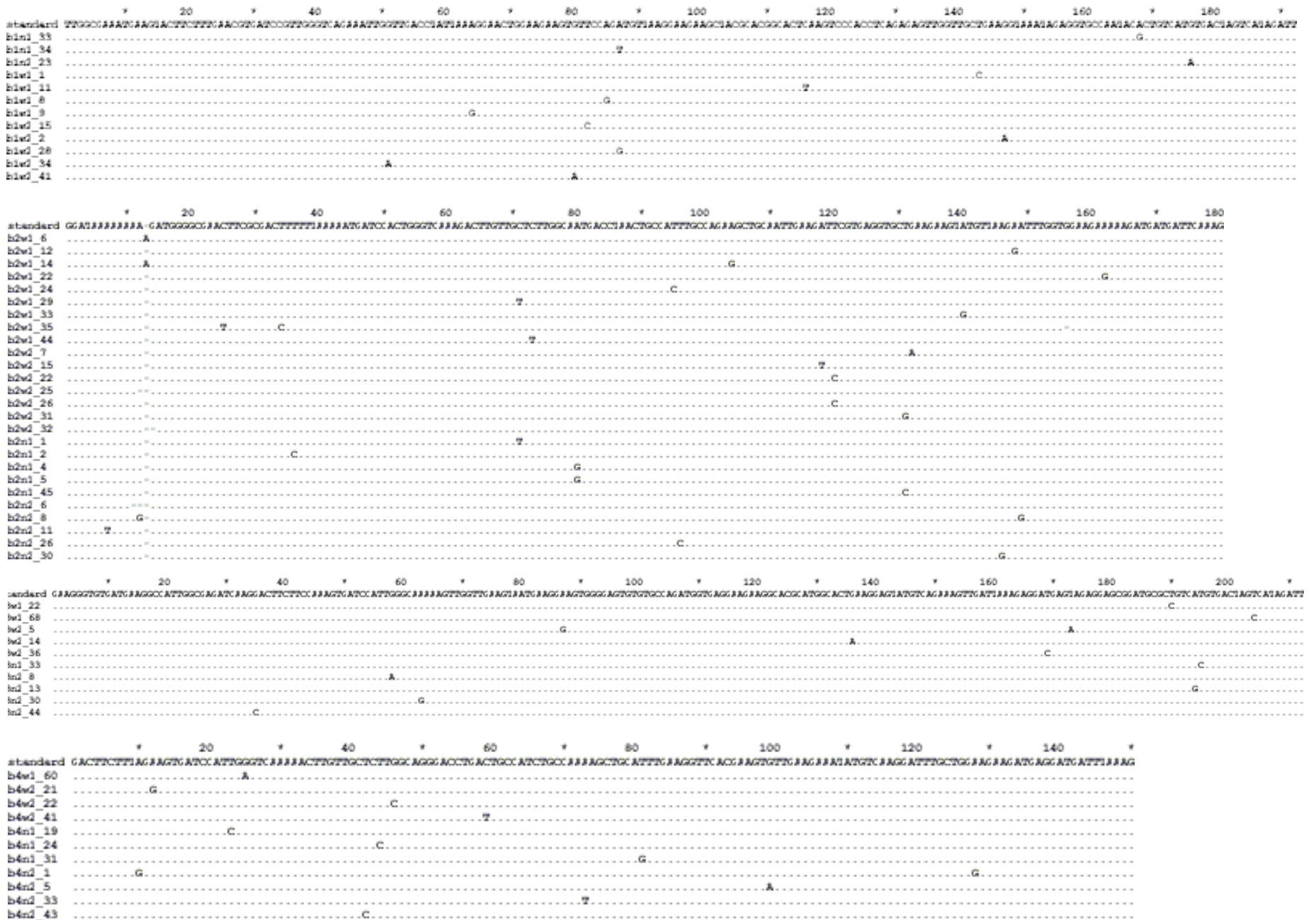


Figure 2 – Alignment of *EmAgB1* – *EmAgB4* sequences obtained from metacestodes of nude and BALB/c infected mice. Variants are denoted according to the gene (b1- b4), mouse strain (w denotes the BALB/c and n, the nude mice) and month of parasite collection (1 or 2 m.p.i.). Numbers after the underline sign indicate the respective clone.

Figure 3

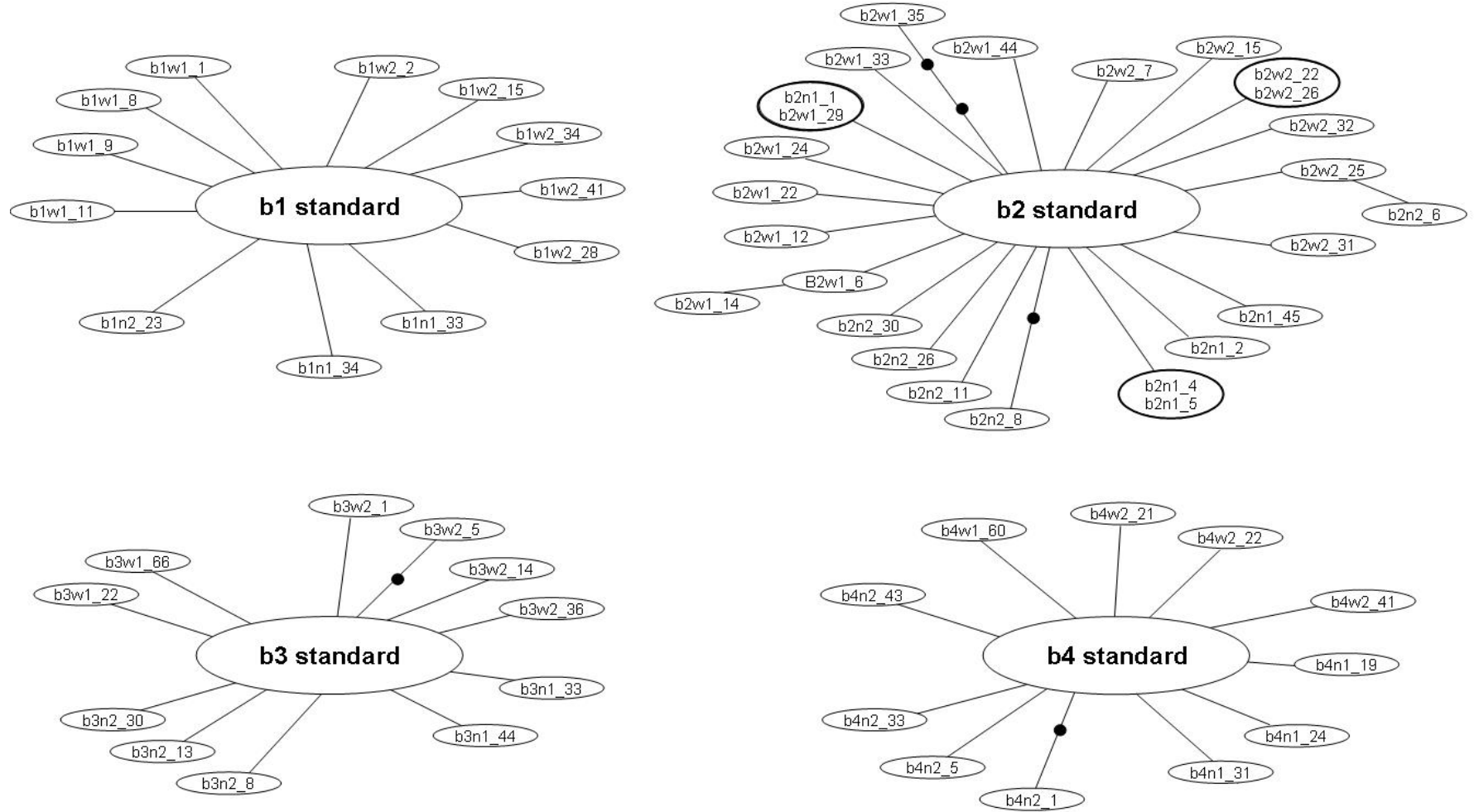


Figure 3 – *EmAgB* allele networks. The larger circles indicate the alleles obtained in our sample and dots represent the putative intermediate states, which were not found in our sample. Each line represents a single mutational step, as inferred according to a 95% confidence parsimony criterion. The standard sequences are always the most abundant in our sample, and variants appear only once, except for two variants of *EmAgB2*, which appeared twice in the same mouse or in separate mice (indicated with bold circles). Variants are denoted according to the gene (b1 - b4), mouse strain (w denote the BALB/c and n the nude mice) and month of parasite collection (1 or 2 m.p.i.). Numbers after the underline sign indicate the respective clone.

4. Considerações Finais

O antígeno B é um dos mais abundantes e imunogênicos antígenos de *Echinococcus* (Oriol *et al.*, 1971; Lightowlers *et al.*, 1989). Dentre as funções exercidas pela proteína destaca-se seu papel na modulação da resposta imune do hospedeiro intermediário. Tem-se demonstrado que o AgB desempenha um papel fundamental na inibição da resposta imune protetora e conseqüentemente na manutenção da parasitemia (Shepherd *et al.*, 1991; Riganò *et al.*, 2001; 2002).

Antígenos de parasitos que interagem diretamente com o sistema imune do hospedeiro podem estar sujeitos a forte pressão seletiva e podem participar de um processo de coevolução parasita-hospedeiro (Conway e Polley, 2002). Por exemplo, o antígeno EBA-175 de *Plasmodium falciparum* é a proteína responsável pelo reconhecimento de moléculas da superfície do eritrócito, atuando na invasão da célula, e sua capacidade em reconhecer o eritrócito é inibida pela ligação de anticorpos (Narum *et al.*, 2000). A análise populacional de seqüências deste antígeno apresenta sinais de seleção diversificadora, e esta observação é interpretada como evidência de co-evolução com o sistema imune humano (Baum *et al.*, 2003).

Como demonstrado por Fotiadis *et al.* (1999) e Dai *et al.* (2004) e agora ratificado neste trabalho, a resposta imune celular é eficiente para controlar a infecção em camundongos. Por outro lado, a resposta imune humoral não é eficiente para inibir a proliferação do metacéstóide. Desta maneira, camundongos BALB/c, os quais possuem um sistema imune íntegro, representam um desafio maior para o parasito do que camundongos nude, que não possuem timo (órgão onde ocorre a maturação dos linfócitos T) e conseqüentemente não possuem resposta imune mediada por células T.

Em *E. granulosus* tem-se demonstrado que dentro de um mesmo metacéstóide existe grande diversidade de seqüências dos genes do AgB (Arend *et al.*, 2004; Haag *et al.*, 2004) e tem-se sugerido que a seleção imposta pelo sistema imune do hospedeiro intermediário poderia estar envolvida com a origem desta variabilidade (Haag *et al.*, 2004).

Procurando por respostas sobre a origem e significado da variabilidade das seqüências do AgB observada dentro de um mesmo metacestóide, nós infectamos camundongos de duas linhagens diferentes (nude e BALB/c) com microcistos (infecção secundária) originados de um mesmo estoque de parasitos (isolado KF5), e avaliamos a diversidade de seqüências originada após um e dois meses de infecção nos parasitos recuperados de cada um dos camundongos. Como os microcistos utilizados para fazer a infecção experimental eram provenientes de um mesmo estoque, espera-se que todos fossem geneticamente semelhantes, e que as diferenças encontradas na análise após a infecção sejam devidas a fenômenos que ocorreram dentro dos camundongos.

Já que uma das necessidades deste trabalho era obter uma amostragem representativa da real diversidade dos genes do AgB dentro de cada metacestóide, era preciso analisar um grande número de seqüências transcritas dos quatro genes (*EmAgB1 – EmAgB4*). Para isso, optou-se por uma abordagem que partiu de um *screening* inicial, de um grande número de seqüências clonadas, por SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*). A técnica de SSCP mostra-se bastante sensível para detectar polimorfismos de um único nucleotídeo quando o tamanho dos fragmentos analisados não ultrapassa 400 bases (Hongyo *et al.*, 1993). Esta técnica foi desenvolvida utilizando o sistema GenePhor (GE HealthCare) que possibilita um controle preciso das condições de migração do gel. Neste sistema tanto a temperatura, as condições iônicas e o pH, que são os fatores que mais influenciam na sensibilidade da técnica de SSCP (Hayashy, 1999), podem ser estritamente controlados. Os alelos descobertos por SSCP puderam então ser automaticamente seqüenciados. O Anexo 1 mostra as fotos das análises de SSCP, destacando os alelos identificados e seqüenciados.

Os nossos resultados demonstram que, como previamente observado em *E. granulosus* (Arend *et al.*, 2004; Haag *et al.*, 2004), cada gene do AgB de *E. multilocularis* também apresenta um grande número de seqüências variantes, ligeiramente distintas, dentro de um mesmo metacestóide. Entretanto, os dados apresentados aqui mostram que a diversidade encontrada nos genes do AgB de *E. multilocularis* parece não estar diretamente relacionada com a pressão da imunidade celular imposta pelo hospedeiro, uma vez que não houve diferença

estatisticamente significativa entre a diversidade nos genes do AgB na comparação entre parasitos recuperados de camundongos BALB/c e de camundongos nude.

Em todos os genes analisados, os alelos alternativos encontrados são derivados, a partir de mutações pontuais, de uma mesma seqüência, chamada de seqüência *standard*, a qual é a mais abundante na amostragem e é compartilhada por todos os parasitos. A distribuição dos alelos variantes entre os diferentes camundongos pode ser explicada por uma origem pós-infecção das novas seqüências, uma vez que parasitos recuperados de camundongos distintos muito raramente compartilham um alelo alternativo (existe somente um caso e este ocorre em *EmAgB2*). Caso as seqüências variantes já estivessem presentes no estoque de parasitos utilizado para infectar os camundongos, seria esperado um número maior de variantes compartilhadas por mais de um camundongo, fato que não ocorre em nosso experimento. Infelizmente nós não podemos excluir totalmente a hipótese de que algumas das variantes encontradas já estivessem presentes na população de microcistos que foram utilizados para infectar os camundongos.

Outra explicação possível para a presença de seqüências alternativas é que os genes do AgB poderiam apresentar varias cópias no genoma, e estas cópias apresentariam pequenas alterações que são interpretadas como alelos distintos de um mesmo gene. Apesar de experimentos de *Southern Blot* não demonstrarem que estes genes apresentem alta redundância no genoma (Chemale *et al.* 2001; Haag *et al.*, 2004), foi sugerido que os genes do AgB podem sofrer re-arranjos durante o crescimento do metacestóide e assim aumentar seu o número de cópias (Haag *et al.*, submetido).

Para avaliar se as mutações observadas neste estudo estavam ou não estavam presentes na população de microcistos, deveria ser feito um experimento para analisar a diversidade de seqüências na população de parasitos antes da infecção e verificar se alguns dos alelos já estão na população de microcistos original ou se surgem realmente após a infecção. Outra abordagem possível seria infectar camundongos com um número menor de microcistos daquele que foi usado neste estudo, por exemplo, um único microcisto ao invés de 100. Caso a

diversidade esteja contida na população de microcistos, esta abordagem reduziria a variabilidade já existente e as variantes encontradas poderiam ser mais claramente relacionadas à origem pós-infecção. Porém, dada a baixa viabilidade dos microcistos em infecções secundárias, acreditamos que a primeira abordagem seria a mais viável.

Neste estudo nós não podemos evidenciar se o processo mutacional que origina estas novas variantes é restrito aos genes do AgB ou se é um processo que ocorre em todo o genoma. Uma maneira de testar esta hipótese é clonar e analisar produtos de outros genes do parasito, preferencialmente genes com função não relacionada àquelas do AgB, e que apresentam uma única cópia no genoma de *Echinococcus*.

O significado biológico desta variação, ainda não é compreendido, e tem-se sugerido que seria um processo análogo à variação antigênica que ocorre em outros parasitos (Haag *et al.*, 2004). Neste processo o parasito altera a expressão de proteínas altamente imunogênicas para conseguir escapar da resposta imunológica do hospedeiro (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

Anteriormente, a variação dos genes do AgB dentro de um mesmo metacésteioide de *E. granulosus* foi relacionada com seleção diversificadora, porque as seqüências encontradas dentro de um mesmo metacésteioide, quando analisadas pela estatística D de Tajima, resultaram em um valor negativo e significativo para o gene *EgAgB2* (Haag *et al.*, 2004). Estes resultados também poderiam ser explicados por outros processos de natureza demográfica, como por exemplo, uma expansão populacional (proliferação celular intensa no metacésteioide) após um processo de *bottleneck* (infecção com uma única oncosfera).

A análise de nossos dados através da estatística D de Tajima, evidenciou valores negativos e significativos para praticamente todos os genes do AgB recuperados de parasitos originados de cada camundongo infectado. Estes resultados foram interpretados como consequência do processo de proliferação celular dentro do metacésteioide. Isto porque caso a diversidade de seqüências observada nos genes do AgB fossem devido a seleção diversificadora favorecendo as novas variantes originadas durante o desenvolvimento, os alelos

favorecidos teriam que ser preferencialmente originados por mutações não-sinônimas, pois são essas mutações que vão gerar produtos peptídicos diferentes, os quais poderão ser alvo da seleção. Entretanto nossas análises não evidenciam excesso de mutações sinônimas em nenhum dos genes analisados. A partir destas evidências nós inferimos um processo de evolução estritamente neutro dos genes do AgB durante o crescimento do metacéstóide em uma infecção secundária.

A partir destas observações surgem algumas questões importantes. Primeiro, se a variação encontrada nos genes do AgB é neutra, isto é, não existe favorecimento das variantes pela seleção natural, como elas são mantidas pelo organismo? Certamente algumas variantes codificam produtos peptídicos alterados, como evidenciado pela presença de algumas seqüências com *indels* sendo transcritas e possivelmente traduzidas. Inter-relacionando nossos dados com os dados de expressão dos genes do AgB (dados obtidos por Karen Haag, comunicação pessoal) podemos constatar que o gene menos transcrito, *EmAgB2*, é o que apresenta maior diversidade de seqüências. Esta inversão da relação, com o gene menos expresso sendo o mais diverso, pode ser utilizada para interpretar que a diversidade dentro do metacéstóide é mantida por relaxamento da seleção purificadora.

Segundo, já que a variação antigênica dentro de um único metacéstóide não é corroborada por este estudo, qual o significado biológico dos sítios que sofrem seleção positiva descritos por Haag *et al.* (2006)? No presente estudo, sugerimos que a diversidade encontrada dentro de um único metacéstóide é neutra, mas é somente sobre esta diversidade que podemos fazer inferências. Entretanto, a diversidade dos genes do AgB pode ser mantida por seleção natural em nível populacional, quando o parasito tem que fazer frente a diferentes hospedeiros. A análise de Haag *et al.* (2006) avaliou seqüências de AgB obtidas de diferentes táxons infra-genéricos (espécies ou linhagens), os quais são adaptados a diferentes hospedeiros intermediários, e o AgB pode ter uma rota biológica importante nessa adaptação conforme sugerido por Haag *et al.* (1998) e Kamenetzky *et al.* (2005).

Finalmente, nossos dados dizem respeito a infecções secundárias com microcistos, e não nos permite fazer inferências sobre o papel da diversidade do AgB em outras fases do desenvolvimento ou outros modos de infecção.

5. Bibliografia

Arend AC, Zaha A, Ayala FJ e Haag KL (2004) The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp Parasitol* 108: 76-80.

Bauder B, Auer H, Schilcher F, Gabler C, Romig T, Bilger B e Aspöck H (1999) Experimental investigations on the B and T cell immune response in primary alveolar echinococcosis. *Parasite Immunol* 21: 409-421.

Baum J, Thomas AW e Conway DJ (2003) Evidence for diversifying selection on erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Genetics* 163: 1327-1336.

Bowles J, Blair D e McManus DP (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*. 54: 165-173.

Bowles J, Blair D e McManus DP (1995) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110: 317-328.

Bowles J e Mcmanus DP (1993) NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol* 23: 969-972.

Bush AO, Fernández JC, Esch GW e Seed JR (2001) *Parasitism – The diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press, Cambridge, 566 pp.

Casulli A, Manfredi MT, La Rosa G, Di Cerbo AR, Dinkel A, Romig T, Deplazes P, Genchi C e Pozio E (2005) *Echinococcus multilocularis* in red fox (*Vulpes vulpes*) of the Italian Alpine region: is there a focus of autochthonous transmission? *Int J Parasitol* 35: 1079-1083.

Chemale G, Ferreira HB, Barrett J, Brophy PM e Zaha A (2005) *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim Biophys Acta* 1747:189-194.

Chemale G, Haag KL, Ferreira HB e Zaha A (2001) *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol* 116: 233-237.

Clement M, Posada D e Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9: 1657-1660.

Conway DJ e Polley SD (2002) Measuring immune selection. *Parasitology* 125: 3-16.

Craig PS (2003) *Echinococcus multilocularis*. *Curr Opin Infect Dis* 16: 437-444.

Craig PS, Giraudoux P, Shi D, Bartholomot B, Barnish G, Delattre P, Quere JP, Harraga S, Bao G, Wang Y, Lu F, Ito A e Vuitton DA (2000) An epidemiological and ecological study of human alveolar echinococcosis transmission in south Gansu, China. *Acta Trop* 77: 167-177.

Craig PS, Rogan MT e Allan JC (1996) Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis , Alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv Parasitol* 38:169:205.

Cross GA, Wirtz LE e Navarro M (1998) Regulation of VSG expression site transcription and switching in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 91: 77-91.

Dai WJ, Waldvogel A, Siles-Lucas M e Gottstein B (2004) *Echinococcus multilocularis* proliferation in mice and respective parasite 14-3-3 gene expression is mainly controlled by an alpha beta CD4 T-cell-mediated immune response. *Immunology* 112: 481-488.

Damian RT (1997) Parasite evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology* 115: 169-175.

Deplazes P, Hegglin D, Gloor S e Romig T (2004) Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends Parasitol* 20: 77-84.

Donelson JE (2003) Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop* 85:391-404.

Eckert J, Conraths FJ e Tackmann K (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int J Parasitol* 30: 1283-1294.

Eckert J e Thompson RC (1997) Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop* 64:19-34.

Escalante AA, Lal AA e Ayala FJ (1998) Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics* 149: 189-202.

Esch GW e Fernández JC (1993) *A Functional Biology of Parasitism*. Chapman & Hall, London, 327pp.

Fernandez C, Gregory WF, Loke P, Maizels RM (2002) Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol Biochem Parasitol* 122:171-180.

Fernández V, Ferreira HB, Fernández C, Zaha A e Nieto A (1996) Molecular characterization of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Mol Biochem Parasitol* 77: 247-250.

Fischer C, Reperant LA, Weber JM, Hegglin D e Deplazes P (2005) *Echinococcus multilocularis* infections of rural, residential and urban foxes (*Vulpes vulpes*) in the canton of Geneva, Switzerland. Parasite 12: 339-346.

Fitch WM, Bush RM, Bender CA e Cox NJ (1997) Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. Proc Natl Acad Sci USA. 94:7712-7718.

Fotiadis C, Sergiou C, Kirou J, Troupis TG, Tselentis J, Doussaitou P, Gorgoulis VG e Sechas MN (1999) Experimental *Echinococcus* infection in the mouse model: pericystic cellular immunity reaction and effects on the lymphoid organs of immunocompetent and thymectomized mice. In Vivo 13: 541-546.

Frosch P, Hartmann M, Muhlschlegel F e Frosch M (1994) Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. Mol Biochem Parasitol 64: 171-175.

González-Sapienza G e Cachau RE (2003) Identification of critical residues of an immunodominant region of *Echinococcus granulosus* antigen B. J Biol Chem 278: 20179-20184.

González-Sapienza G, Nieto A, Fernández C, Orn A, Wernstedt C e Hellman U (1996) Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. Parasite Immunol 18: 587-596.

Gottstein B, Wunderlin E e Tanner I (1994) *Echinococcus multilocularis*: parasite-specific humoral and cellular immune response subsets in mouse strains susceptible (AKR, C57B1/6J) or 'resistant' (C57B1/10) to secondary alveolar echinococcosis. Clin Exp Immunol 96: 245-252.

Graur D e Li WH (2000) Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Sunderland, 481pp.

Haag KL, Alves-Junior L, Zaha A e Ayala FJ (2004) Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene* 333: 157-167.

Haag KL, Araújo AM, Gottstein B e Zaha A (1998) Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 695-702.

Haag KL, Gottstein B, Schnnor A e Ayala FJ (Submetido) Upstream promoter regions reveal the complexity of the *Echinococcus granulosus* AgB multigene family.

Haag KL, Zanotto P, Alves-Junior L, Gasser RB, Zaha A e Ayala FJ (2006) Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. *Infect Genet Evol* (*in press*).

Hammer Ø, Harper DAT e Ryan PD (2001) Past: palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeont Electron* 4: 9.

Hayashi K (1999) Recent Enhancement in SSCP. *Genet Anal* 14: 193-196.

Hemphill A e Gottstein B (1995) Immunological and morphological studies on the proliferation of in vitro cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestode. *Parasitol Res* 81: 605–614.

Henrichsen J (1995) Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 33: 2759-2762.

Hongyo T, Buzard G, Calvert RJ e Weghorst CM (1993) 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res* 21: 3637-3642.

Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM, Angel SO, Zaha A, Guarnera EA e Rosenzvit MC (2005) High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 131: 805-815.

Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V e Meri S (2003) Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127: 207-215.

Leggat GR, Yang W e McManus DP (1992) Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst by immunoblot analysis. *Trans R Soc Trop Hyg* 86: 189-192.

Lightowlers MW, Liu DY, Haralambous A e Rickard MD (1989) Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 37: 171-182.

Machado CR, Pinto LA, McCulloch R e Teixeira SMR (2006) Dna metabolism and genetic diversity in trypanosomes. *Mut Research* 612: 40-57.

Mamuti W, Sako Y, Xiao N, Nakaya K, Nakao M, Yamasaki H, Lightowlers MW, Craig PS e Ito A (2006) *Echinococcus multilocularis*: Developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. *Exp Parasitol*. 2006 (*in press*).

Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Sato N, Vuitton DA, Piarroux R, Lightowlers MW, Craig PS e Ito A (2004) A Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. *J Clin Microbiol* 42: 1082-1088.

McManus DP e Bryant C (1995) Biochemistry, physiology and molecular biology of *Echinococcus*. In: Thompson RCA e Lymbery AJ (eds) *Echinococcus* and hydatid disease, CAB International, Wallingford, pp 135-182.

Narum DL, Haynes JD, Fuhrmann S, Moch K, Liang H, Hoffman SL e Sim BK (2000) Antibodies against the *Plasmodium falciparum* receptor binding domain of EBA-175 block invasion pathways that do not involve sialic acids. *Infect Immun* 68:1964-1966.

Nash TE (2002) Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol* 48: 585-590.

Nei M e Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426.

Nei M e Kumar S (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press, New York, 333 pp.

Oriol R e Oriol C (1975) Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg* 24: 96-100.

Oriol R, Williams JF, Miguela V, Esandi P e Oriol C (1971) Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am J Trop Med Hyg* 20: 569-574.

Petavy AF, Tenora F, Deblock F e Sergent V (2000) *Echinococcus multilocularis* in domestic cats in France. A potential risk factor for alveolar hydatid disease contamination in humans. *Vet parasitol* 87: 151-156.

Playford M, Ooi HK, Oku Y e Kamiya M (1992) Secondary *Echinococcus multilocularis* infection in severe combined immunodeficient (scid) mice: biphasic growth of the larval cyst mass. *IntJ Parasitol* 22: 975-82.

Poole RW (1974) *An introduction to quantitative ecology*. McGraw-Hill, New York 457 pp.

Rickard MD, Davies C, Bout DT e Smyth JD (1977) Immunohistological localization of two hydatid antigens (antigen 5 and antigen B) in the cyst wall, brood capsules and protoescolix of *Echinococcus granulosus* (ovine and equine) and *Echinococcus multilocularis* using immunoperoxidase methods. J Helminthol 51: 359-364.

Riganò R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Margutti P, Teggi A e Siracusano A (2002) Apoptosis modulation in PMBC from patients with cystic echinococcosis. 51st Annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygiene p. 277.

Riganò R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azarrà A, Ioppolo S, Buttari B, Ortona E, Margutti P, Teggi A e Siracusano A (2001) Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. Infect Immun 69: 288-296.

Romig T (2003) Epidemiology of echinococcosis. Langenbecks Arch Surg 388:209-217.

Roneus O, Christensson D e Nilsson NG (1982) The longevity of hydatid cysts in horses. Vet. Parasitol 11: 149-154.

Rott M, Fernandez V, Farias S, Ceni J, Ferreira HB, Haag KL e Zaha A (2000) Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. Acta Trop 75:331-340.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio C, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP: DNA polymorphism analysis by coalescence and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.

Saghir N, Conde PJ, Brophy PM e Barrett J (2001) Biochemical characterisation of a hydrophobic ligand binding protein from the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. Int J Parasitol 31:653-660.

Sailer M, Soelder B, Allerberger F, Zaknun D, Feichtinger H e Gottstein B (1997) (Alveolar echinococcosis of the liver in a six-year old girl with acquired immunodeficiency syndrome. J Pediatr 130:320–323.

Sanches F, March F, Mercader M, Coll P, Muñoz Z e Prats G (1991) Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoescolícos and cysts of *Echinococcus granulosus* from human origin. Parasite Immunol 13: 583-592.

Schantz PM, Chai J, Craig PS, Eckert J, Jenkins DJ, Macpherson CNL e Thakur A (1995) Epidemiology and control of hydatid disease. In: Thompson RCA e Lymbery AJ (eds) *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, pp 233-332.

Shepherd JC e McManus DP (1987) Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. Mol Biochem Parasitol 25:143-154.

Shepherd JC, Aitken A e McManus DP (1991) A Protein Secreted in Vivo by *Echinococcus granulosus* Inhibits Elastase Activity and Neutrophil Chemotaxis. Mol Biochem Parasitol 44: 81-90.

Smyth JD e Smyth MM (1964) Natural and experimental hosts of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*, with comments on the genetics and speciation in the genus *Echinococcus*. Parasitology 54: 493-514.

Spruance SL (1974) Latent period of 53 years in a case of hydatid cyst disease. Arch Intern Med 134:741-742.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Thompson RC, Kapel CM, Hobbs RP e Deplazes P (2006) Comparative development of *Echinococcus multilocularis* in its definitive hosts. *Parasitology* 136:1-8.

Thompson RCA (1995) Biology and systematic of *Echinococcus*. In: Thompson RCA e Lymbery AJ (eds) *Echinococcus and hydatid disease*. CAB International, Wallingford. pp 1-50.

Thompson RCA e McManus DP (2002) Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18: 452-457.

Vuitton DA (2003) The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? *Acta Trop* 85:119-132.

Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS e Ito A (2005) *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol*. 35:693-701.

Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS e Ito A (2006) *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitol Int*. 55 (Suppl):233-236.

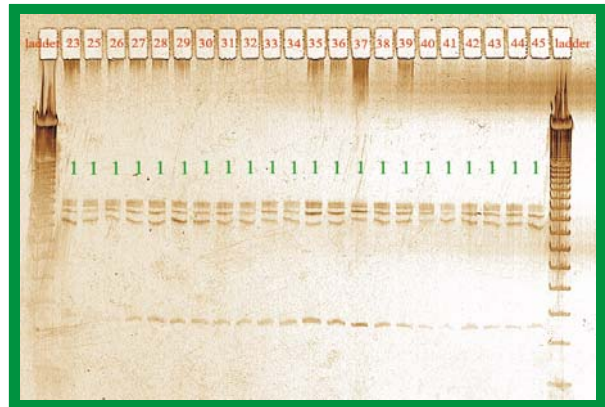
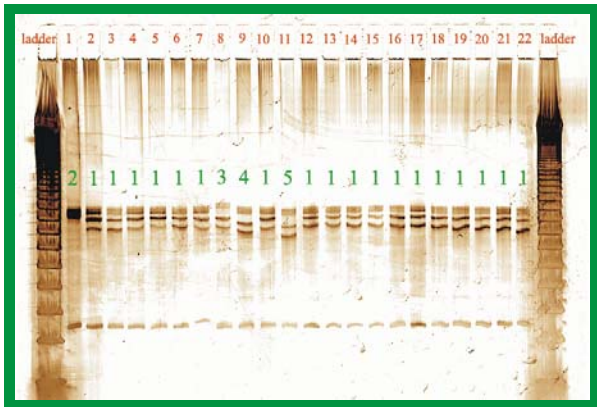
Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC., Ortiz-Ortiz L (2002) How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol*. 18: 272-278.

Zhang W, Li J e McManus DP (2003) Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev*. 16(1):18-36.

Zysk G, Bethe G, Nau R, Koch D, Grafin Von Bassewitz VC, Heinz HP e Reinert RR (2003) Immune response to capsular polysaccharide and surface proteins of *Streptococcus pneumoniae* in patients with invasive pneumococcal disease. J Infect Dis 187: 330-333.

Anexo I

A)



B)

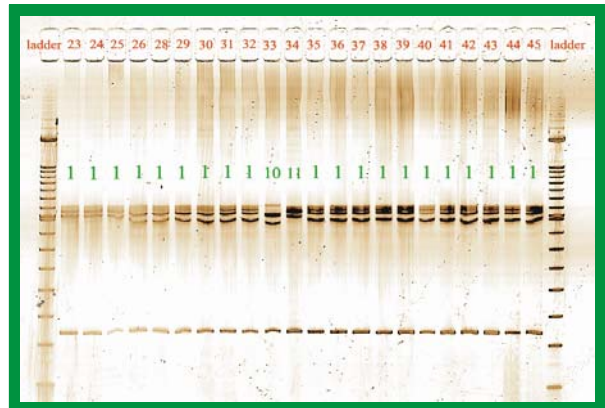
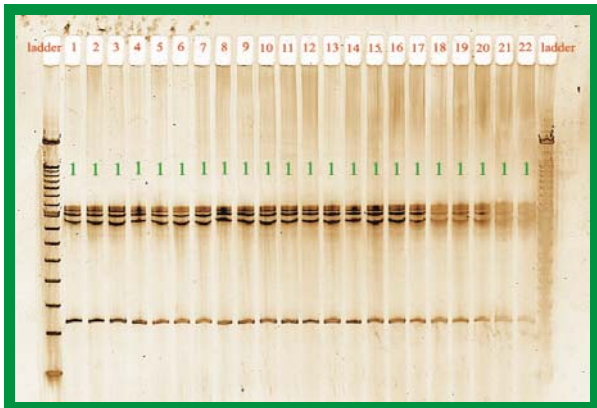
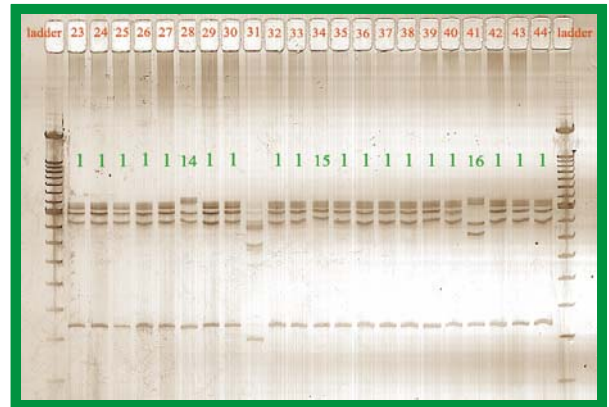
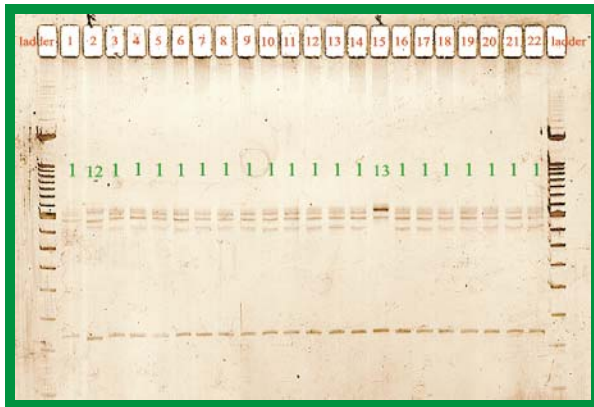


Figura 1 - Análise de SSCP dos clones de *EmAgB1* de *E. multilocularis* coletados após 1 mês de infecção. (A) clones de parasitos coletados de camundongos BALB/c e (B) clones de parasitos coletados de camundongos nude. Os números localizados no topo de cada *slot* indicam o clone analisado. Os números logo acima das bandas nos géis indicam o alelo representado por cada clone. O alelo *standard* é representado pelo número 1.

A)



B)

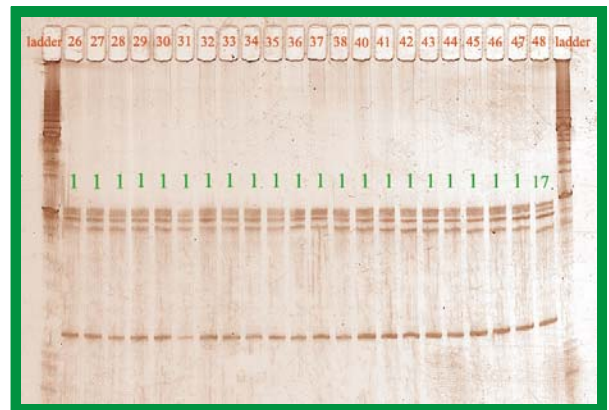
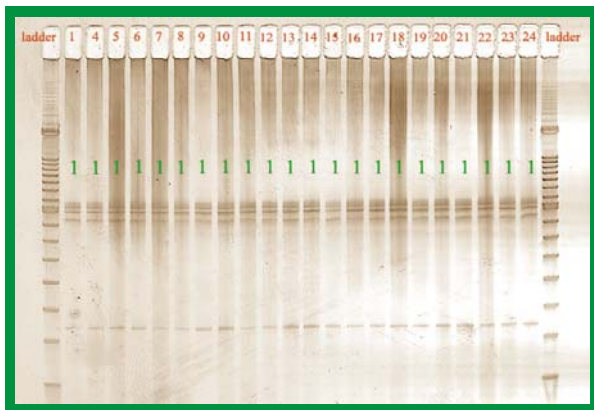
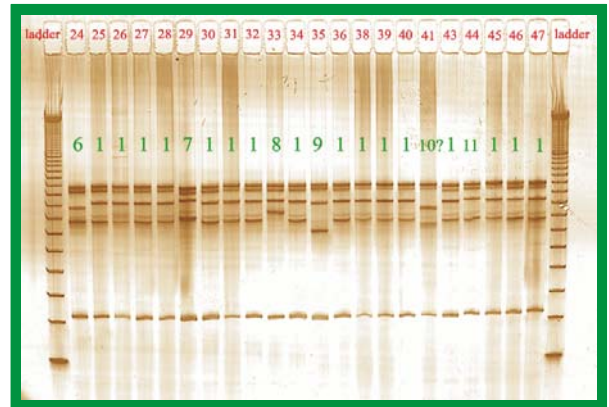
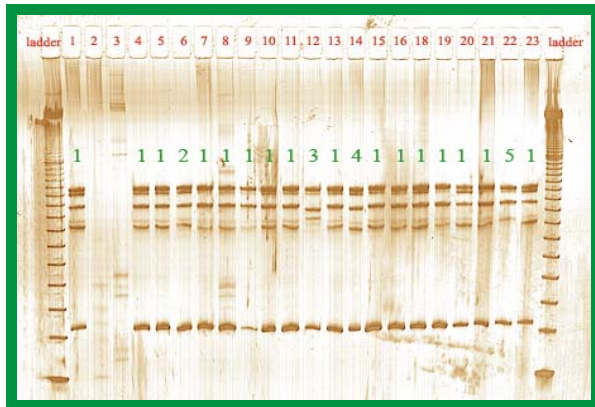


Figura 2 - Análise de SSCP dos clones de *EmAgB1* de *E. multilocularis* coletados após 2 meses de infecção. (A) clones de parasitos coletados de camundongos BALB/c e (B) clones de parasitos coletados de camundongos nude. Os números localizados no topo de cada *slot* indicam o clone analisado. Os números logo acima das bandas nos géis indicam o alelo representado por cada clone. O alelo *standard* é representado pelo número 1.

A)



B)

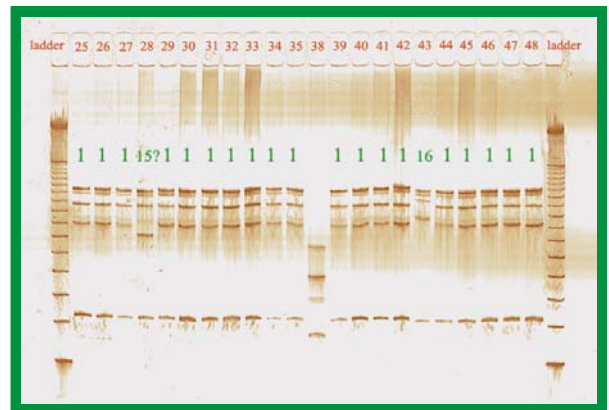
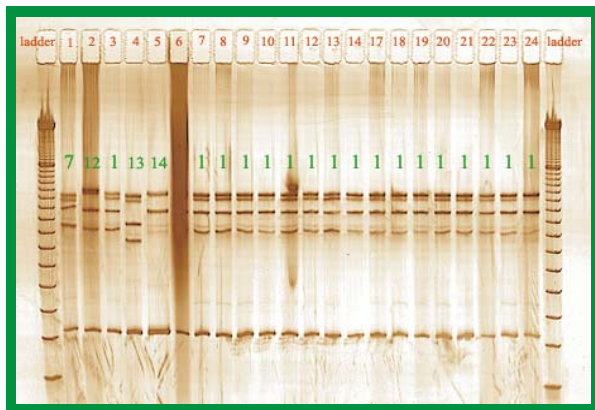
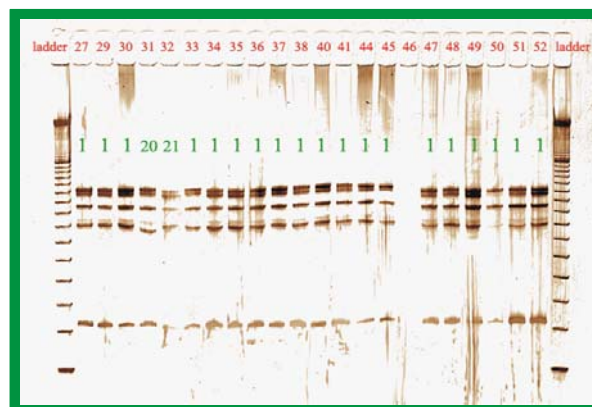
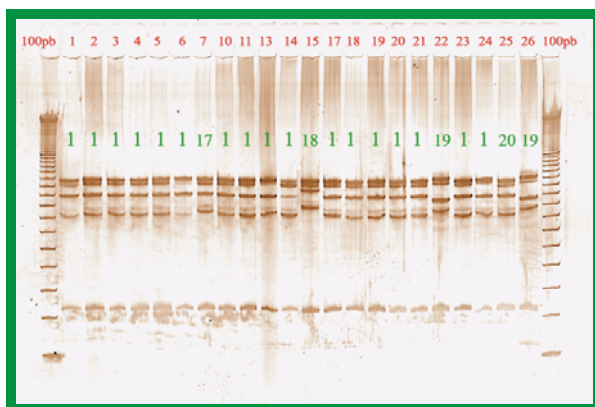


Figura 3 - Análise de SSCP dos clones de *EmAgB2* de *E. multilocularis* coletados após 1 mês de infecção. (A) clones de parasitos coletados de camundongos BALB/c e (B) clones de parasitos coletados de camundongos nude. Os números localizados no topo de cada *slot* indicam o clone analisado. Os números logo acima das bandas nos géis indicam o alelo representado por cada clone. O alelo *standard* é representado pelo número 1.

A)



B)

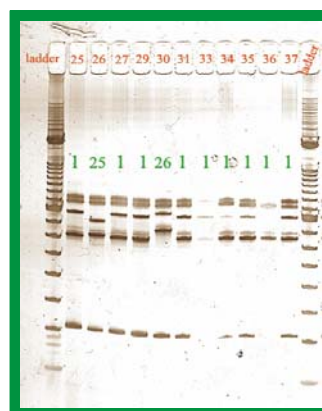
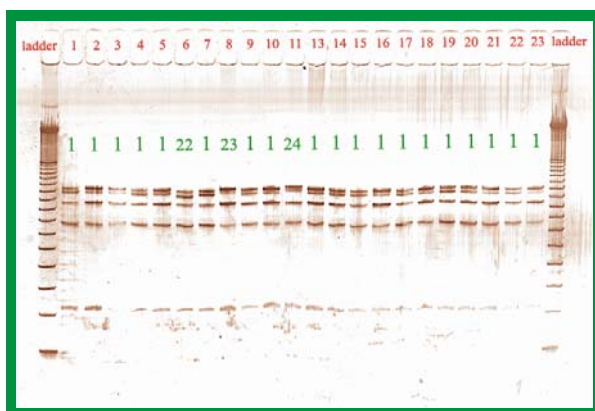
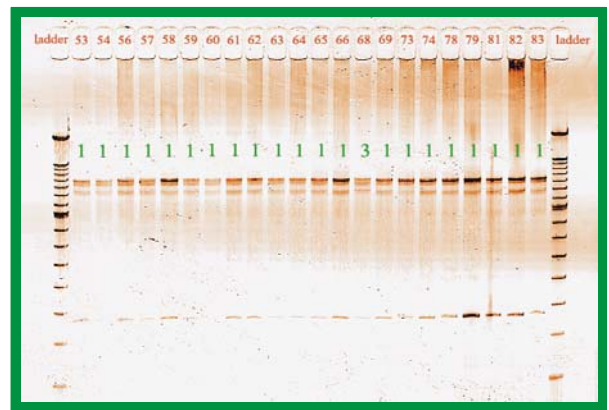
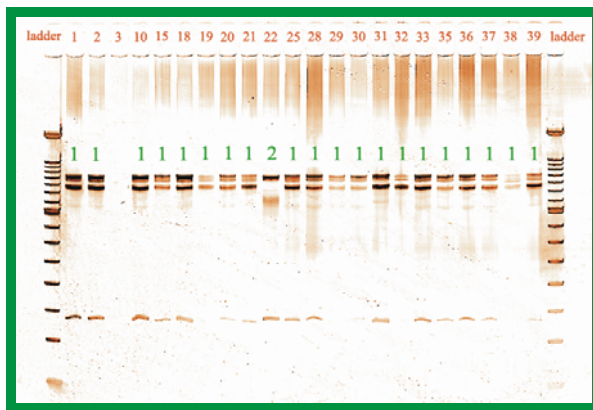


Figura 4 - Análise de SSCP dos clones de *EmAgB2* de *E. multilocularis* coletados após 2 meses de infecção. (A) clones de parasitos coletados de camundongos BALB/c e (B) clones de parasitos coletados de camundongos nude. Os números localizados no topo de cada *slot* indicam o clone analisado. Os números logo acima das bandas nos géis indicam o alelo representado por cada clone. O alelo *standard* é representado pelo número 1.

A)



B)

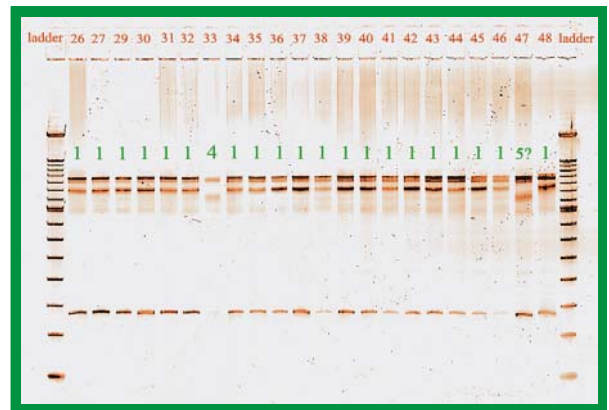
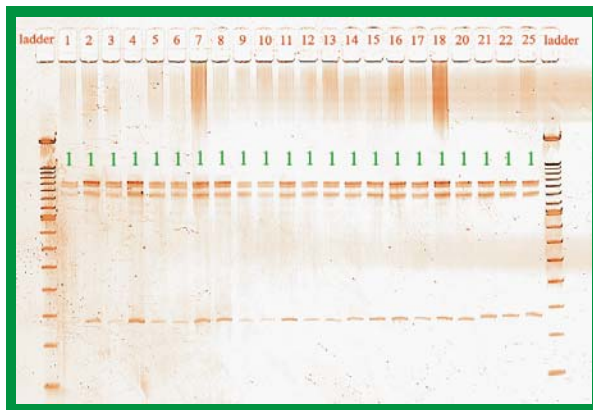
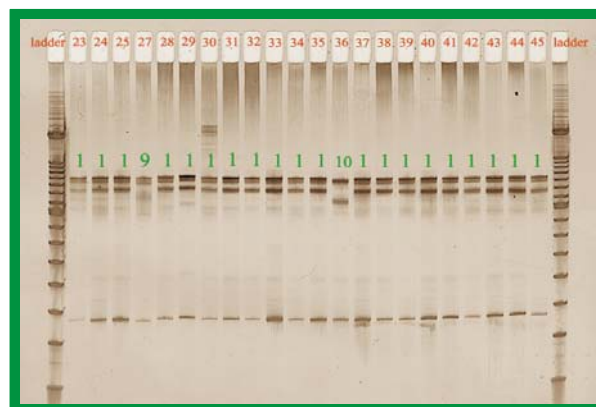
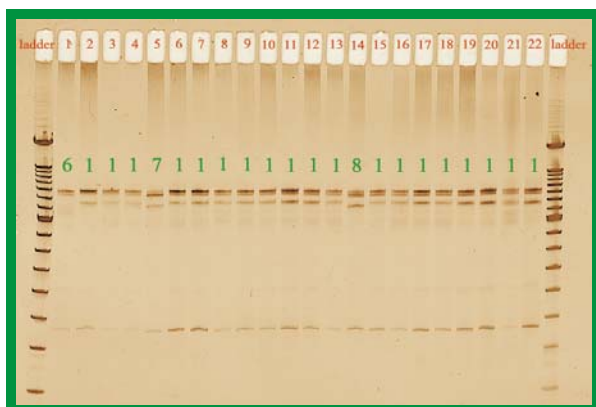


Figura 5 - Análise de SSCP dos clones de *EmAgB3* de *E. multilocularis* coletados após 1 mês de infecção. (A) clones de parasitos coletados de camundongos BALB/c e (B) clones de parasitos coletados de camundongos nude. Os números localizados no topo de cada *slot* indicam o clone analisado. Os números logo acima das bandas nos géis indicam o alelo representado por cada clone. O alelo *standard* é representado pelo número 1.

A)



B)

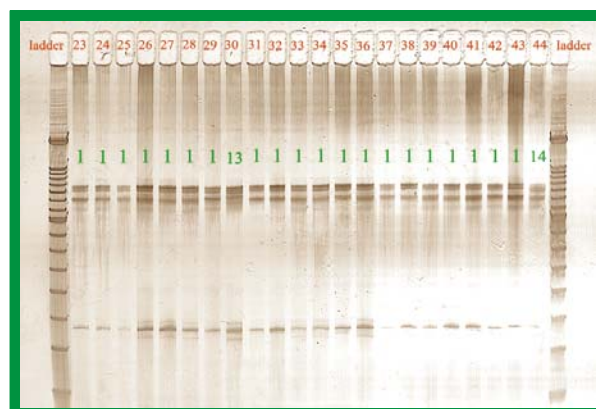
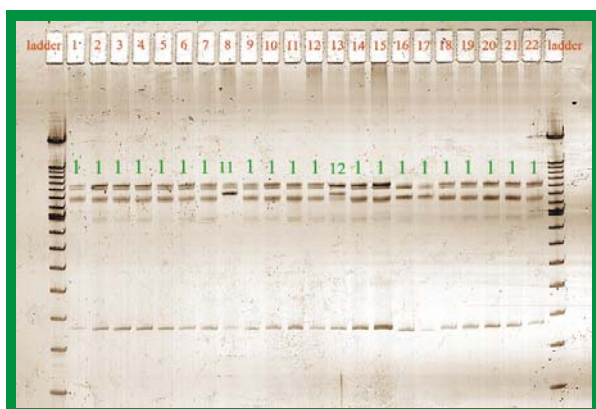
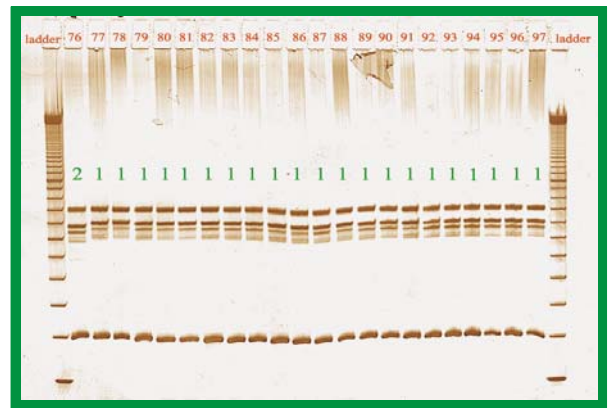
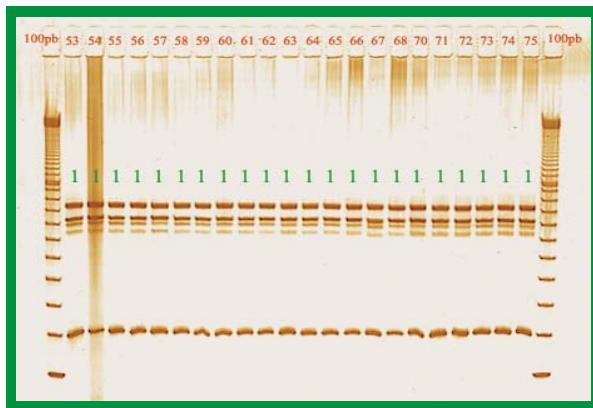


Figura 6 - Análise de SSCP dos clones de *EmAgB3* de *E. multilocularis* coletados após 2 meses de infecção. (A) clones de parasitos coletados de camundongos BALB/c e (B) clones de parasitos coletados de camundongos nude. Os números localizados no topo de cada *slot* indicam o clone analisado. Os números logo acima das bandas nos géis indicam o alelo representado por cada clone. O alelo *standard* é representado pelo número 1.

A)



B)

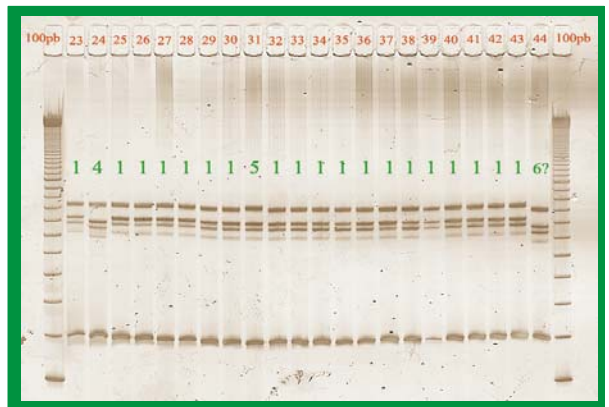
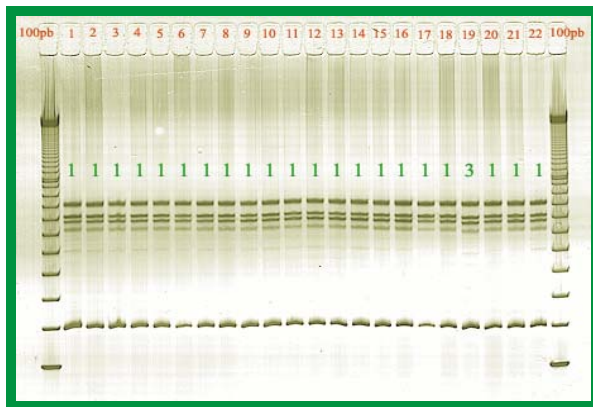
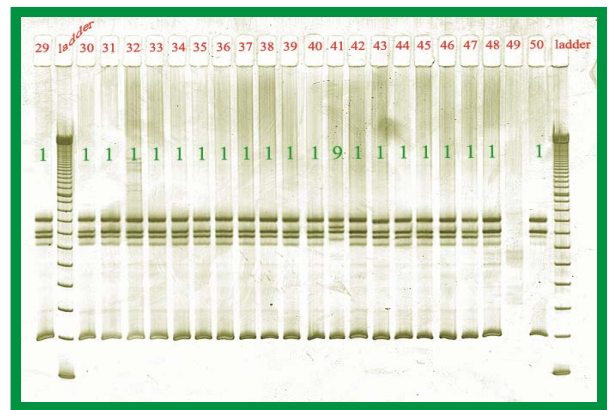
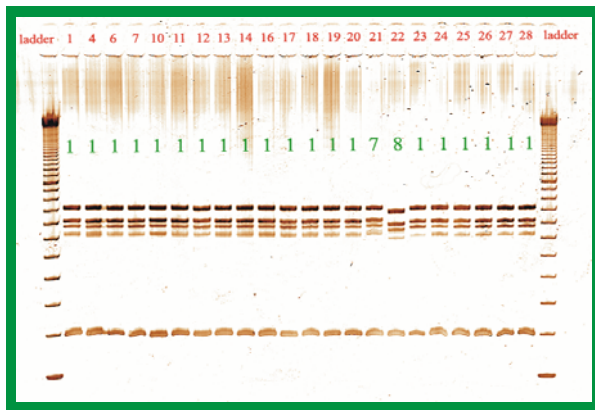


Figura 7 - Análise de SSCP dos clones de *EmAgB4* de *E. multilocularis* coletados após 1 mês de infecção. (A) clones de parasitos coletados de camundongos BALB/c e (B) clones de parasitos coletados de camundongos nude. Os números localizados no topo de cada *slot* indicam o clone analisado. Os números logo acima das bandas nos géis indicam o alelo representado por cada clone. O alelo *standard* é representado pelo número 1.

A)



B)

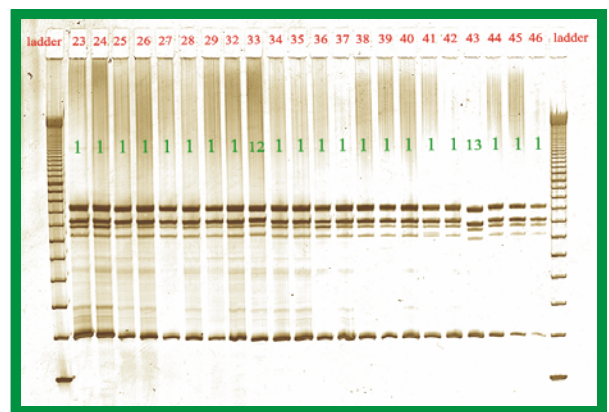
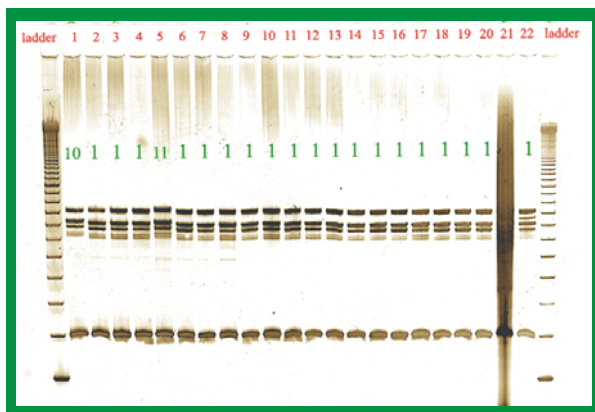


Figura 8 - Análise de SSCP dos clones de *EmAgB4* de *E. multilocularis* coletados após 2 meses de infecção. (A) clones de parasitos coletados de camundongos BALB/c e (B) clones de parasitos coletados de camundongos nude. Os números localizados no topo de cada *slot* indicam o clone analisado. Os números logo acima das bandas nos géis indicam o alelo representado por cada clone. O alelo *standard* é representado pelo número 1.