

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Departamento de Genética

**Análise comparativa dos genes codificadores de AgB em duas espécies do gênero *Echinococcus* (Rudolphi, 1801) e elucidação da distribuição das mesmas no estado do RS.**

Guilherme B. dos Santos

Orientadora: Dra. Karen L. Haag

Porto Alegre  
2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Análise comparativa dos genes codificadores de AgB em duas espécies do gênero *Echinococcus* (Rudolphi, 1801) e elucidação da distribuição das mesmas no estado do RS.**

Guilherme B. dos Santos

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Faculdade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Karen L. Haag

Porto Alegre  
2009

## Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	6
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	7
1. O gênero <i>Echinococcus</i>	7
2. O <i>Echinococcus granulosus</i>	8
3. As linhagens de <i>Echinococcus granulosus</i>	11
4. O antígeno B	12
5. A equinococose – Uma endemia global	14
5.1. Europa	14
5.2. África	15
5.3. Ásia	15
5.4. América do Norte e América Central	16
5.5. Austrália	16
5.6. América do Sul	17
6. Objetivos	19
7. Justificativa	19
CAPÍTULO II: VARIABILIDADE DO GENE <i>EgAgB8/4</i> EM <i>Echinococcus granulosus</i> E <i>Echinococcus ortleppi</i> .	20
1. Materiais e Métodos	20
2. Resultados e Discussão	22
CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GÊNICA DO AgB NA FASE ADULTA DE <i>Echinococcus</i> . <i>granulosus</i> .	27
1. Material e Métodos	27
2. Resultados e Discussão	29

CAPÍTULO IV: FREQUÊNCIA DIFERENCIAL DE Echinococcus granulosus E Echinococcus ortleppi EM BOVINOS ABATIDOS NO ESTADO DO RS.	36
1. Material e Métodos	36
2. Resultados e discussões	38
 CAPÍTULO V: Conclusão	 42
 REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	 44

## RESUMO

Os parasitos do gênero *Echinococcus* apresentam uma grande diversidade genética. A espécie *E. granulosus* apresenta uma grande variação intraespecífica. Seus haplótipos têm características morfológicas e epidemiológicas únicas, sendo adaptados a hospedeiros intermediários distintos. Mesmo com os recentes esforços a taxonomia do gênero permanece em discussão. Os genes do antígeno B (AgB) de *Echinococcus* compõem uma família multigênica. A proteína secretada tem papel importante no estabelecimento do cisto hidático, modulando a resposta imune do hospedeiro. O propósito do presente trabalho foi dar continuidade à caracterização da variabilidade dos genes do AgB de *Echinococcus*, na fase larval e adulta do parasito. Este trabalho também pretendeu responder qual a frequência das espécies *E. granulosus* e *E. ortleppi* em cistos férteis de bovinos. Cistos hidáticos de ambas as espécies, apresentaram sequências de *EgAgB8/4* formando dois conjuntos claramente distintos. É provável que os “primers” utilizados tenham amplificado o gene *EgAgB8/2* não funcional de *E. ortleppi*, a exceção do clone G5-10 que parece ser uma sequência autêntica de *EgAgB8/4*. *E. ortleppi* talvez não possua o gene *EgAgB8/4* funcional. A análise dos cinco genes do AgB, a partir de um único verme adulto identificado como *E. granulosus* (G1), mostrou que a variabilidade encontrada é menor do que a relatada no mesmo organismo em sua fase larval, a exceção do gene *EgAgB8/3*. Nós acreditamos que a redução no número de variantes encontradas no verme adulto esta ligado ao baixo nível de expressão do AgB e com o menor papel na sobrevivência do verme adulto. Surpreendentemente, sequências obtidas do gene *EgAgB8/2* neste verme adulto, são idênticas às descritas para *E. ortleppi*. Nós acreditamos que ele seja resultado de fecundação cruzada entre as espécies *E. granulosus* e *E. ortleppi*. A amostragem de cistos férteis no período de 2001 a 2008 mostrou que o rebanho de bovinos do Rio Grande do Sul esta sendo invadido pela espécie *E. ortleppi* em detrimento de *E. granulosus*.

## ABSTRACT

Parasites belonging to the genus *Echinococcus* have a large genetic diversity. The *E. granulosus* species shows a high intraspecific variability. Its haplotypes have particular morphological and epidemiologic features, being adapted to distinct intermediate hosts. Even with recent efforts, the genus taxonomy remains under discussion. The *Echinococcus* antigen B (AgB) genes belong to a multigene family. The secreted protein has an important role in cyst establishment, modulating host immune responses. The aim of the present study was a further characterization of *Echinococcus*' AgB gene variability, in larval and adult stages of the parasite. This work also aimed to answer what is the frequency of *E. granulosus* and *E. ortleppi* in bovine fertile cysts. Cysts from both species, showed *EgAgB8/4* sequences that belong to two clearly distinct clusters. It is likely that the primers used amplified a non-functional *EgAgB8/2* gene of *E.ortleppi*, excepting clone G5-10, that seems to be an authentic sequence *EgAgB8/4*. *E. ortleppi* might not have a functional *EgAgB8/4*. The analysis five AgB genes from a single adult worm identified as *E. granulosus* (G1) showed a lower variability than reported for in its larval stage, excepting *EgAgB8/3*. We believe that the reduction in the number of variants found in this adult worm is linked to the low level of AgB expression and with its smaller role in the adult worm survival. Surprisingly sequences obtained for *EgAgB8/2* in this adult worm, are identical described for *E. ortleppi*. We believe that it is a result of a cross fertilization between *E. granulosus* and *E. ortleppi*. The sampling of bovine fertile cysts during years 2001-2008 showed that the cattle herd of Rio Grande do Sul is being invaded by *E. ortleppi* in detriment of *E. granulosus*.

## CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

### 1. O gênero *Echinococcus*.

A equinococose é uma zoonose causada pelo helminto *Echinococcus*, um platelminto pertencente à classe Cestoda. Na fase adulta o parasito infecta o intestino de canídeos e felinos, e em sua fase larval afeta herbívoros de várias espécies, inclusive humanos, em inúmeras regiões tanto temperadas quanto tropicais do mundo (Torgerson e Heath, 2003) (Figura 1). O homem é considerado hospedeiro acidental.

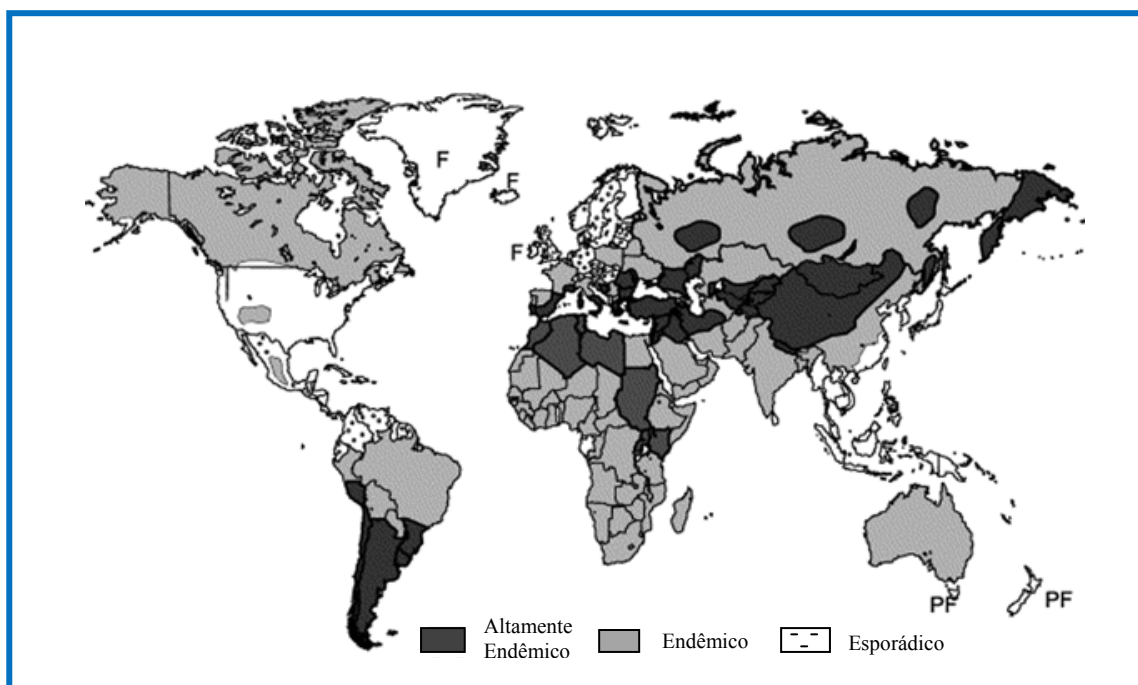


Figura 1. Distribuição geográfica do parasito *Echinococcus*. Diferentes níveis de endemia (Adaptado de Torgerson e Budke, 2003).

A taxonomia do gênero *Echinococcus* (Rudolphi, 1801) vem sofrendo inúmeras alterações ao longo das últimas décadas. Novos dados moleculares e epidemiológicos vêm fornecendo evidências para a designação de espécies que antigamente eram reconhecidas apenas como linhagens.

Tradicionalmente são reconhecidas seis espécies do gênero *Echinococcus* (Moro *et al.*, 2009), quatro delas são importantes no que diz respeito à saúde humana: *Echinococcus oligarthrus* e *Echinococcus vogeli* causam equinococose policística; *Echinococcus*

*multilocularis* causa equinococose alveolar; *Echinococcus granulosus* causa a equinococose cística. Mais recentemente duas espécies foram descritas: *Echinococcus shiquicus* (Xiao *et al.*, 2005) e *Echinococcus felidis* originalmente descrito por Ortlepp em 1937 (Hüttner *et al.*, 2008).

Dois haplótipos de *E. granulosus* são agora considerados espécies, *Echinococcus ortleppi* anteriormente denominado haplótipo G5 e *Echinococcus equinus* anteriormente denominado haplótipo G4 (Nakao *et al.* 2007). A espécie *Echinococcus canadensis* permanece indefinida (Nakao *et al.* 2007), já Saarma *et al.* 2009 divide a mesma espécie em *E. canadensis* e *E. intermedius*.

É evidente que mais estudos populacionais, morfológicos e ecológicos são necessários para a confirmação definitiva dessas espécies.

## 2. O *Echinococcus granulosus*.

O adulto de *E. granulosus* possui poucos milímetros de comprimento (3-6 mm), e raramente tem mais do que cinco proglótides (Figura 2).

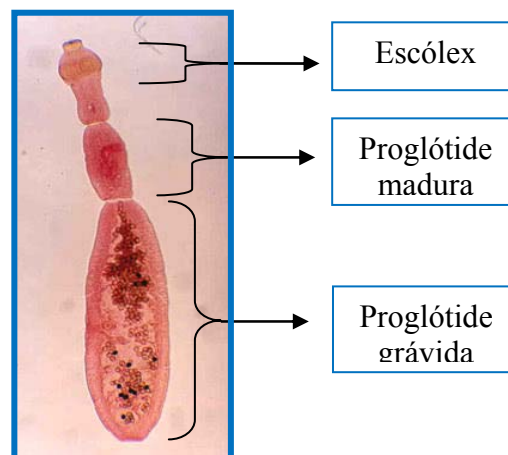


Figura 2. Fase adulta do parasito *E. granulosus* (modificado de [www.facmed.unam.mx/.../echinocadulto.jpg](http://www.facmed.unam.mx/.../echinocadulto.jpg) )

Seu hospedeiro definitivo é sempre um canídeo (cães, lobos, dingos). O verme adulto é muito mais específico em relação ao seu hospedeiro do que o metacestóide em relação ao seu hospedeiro intermediário. Fatores físicos, como a composição da bile, e



mecanismos imunológicos, são de grande importância para o desenvolvimento e maturação do verme adulto no intestino delgado de canídeos (Thompson, 1995). O *Echinococcus* maduro é hermafrodito, e, portanto, capaz de auto-fecundação. A auto-inseminação parece ser um requisito evolutivo importante para o parasito devido à dificuldade em encontrar outro verme adulto fértil. Entretanto, em cães experimentalmente infectados, já foram encontradas regiões de aglomeração. Esse comportamento agregador pode ser um indício de fecundação cruzada (Thompson, 1995). Através de análises genéticas Lymbery e Thompson (1988) sugeriram a existência tanto de auto-fecundação quanto de fecundação cruzada em *E. granulosus*. Após a fecundação do verme adulto de *E. granulosus*, estima-se que cada proglótide grávida produza de 100 a 1500 ovos (Heath e Lawrence, 1991). O embrióforo, que é espesso, impermeável e composto de queratina, é a principal camada de proteção do ovo para a oncosfera. A maioria dos ovos é liberada através da proglótide grávida ainda no trato intestinal do cão. Os ovos são expulsos do trato intestinal em diferentes estágios de maturação, sendo que ovos imaturos podem maturar no ambiente. Quando ingerido por um hospedeiro intermediário apropriado, o embrióforo sofre degeneração no estômago ou no intestino. A ativação da oncosfera ocorre quando a mesma entra em contato com pepsina (Thompson, 1995). As oncosferas de *E. granulosus* são capazes de migrar pela via linfática ou venosa. Sua localização final varia de acordo com as características fisiológicas do hospedeiro e da linhagem a que pertence o parasito (Harris *et al.* 1989). Logo que a oncosfera atinge um órgão do hospedeiro, normalmente o fígado ou o pulmão, ocorre o desenvolvimento final que leva a formação do metacestóide. O completo desenvolvimento do metacestóide origina o cisto hidático. Os cistos são externamente recobertos por tecido do hospedeiro. Sua camada mais exterior, camada adventícia, é composta de tecido conjuntivo e fibroblastos. Abaixo desta, há a camada laminar, que é elástica e acelular. Logo em seguida, tem-se a camada germinativa, um sincício, com células indiferenciadas que darão origem aos protoescólices através de reprodução assexuada (Figura 3). O cisto é preenchido pelo líquido hidático formado por proteínas do parasito e do hospedeiro. Cada protoescólice pode originar um novo adulto, reiniciando o ciclo de vida do helminto (Thompson, 1995) (Figura 4).



Figura 3. Fase larval (protoescolice) do parasito *E. granulosus* (modificado de <http://www.microscopyu.com/galleries/dicphasecontrast/>).

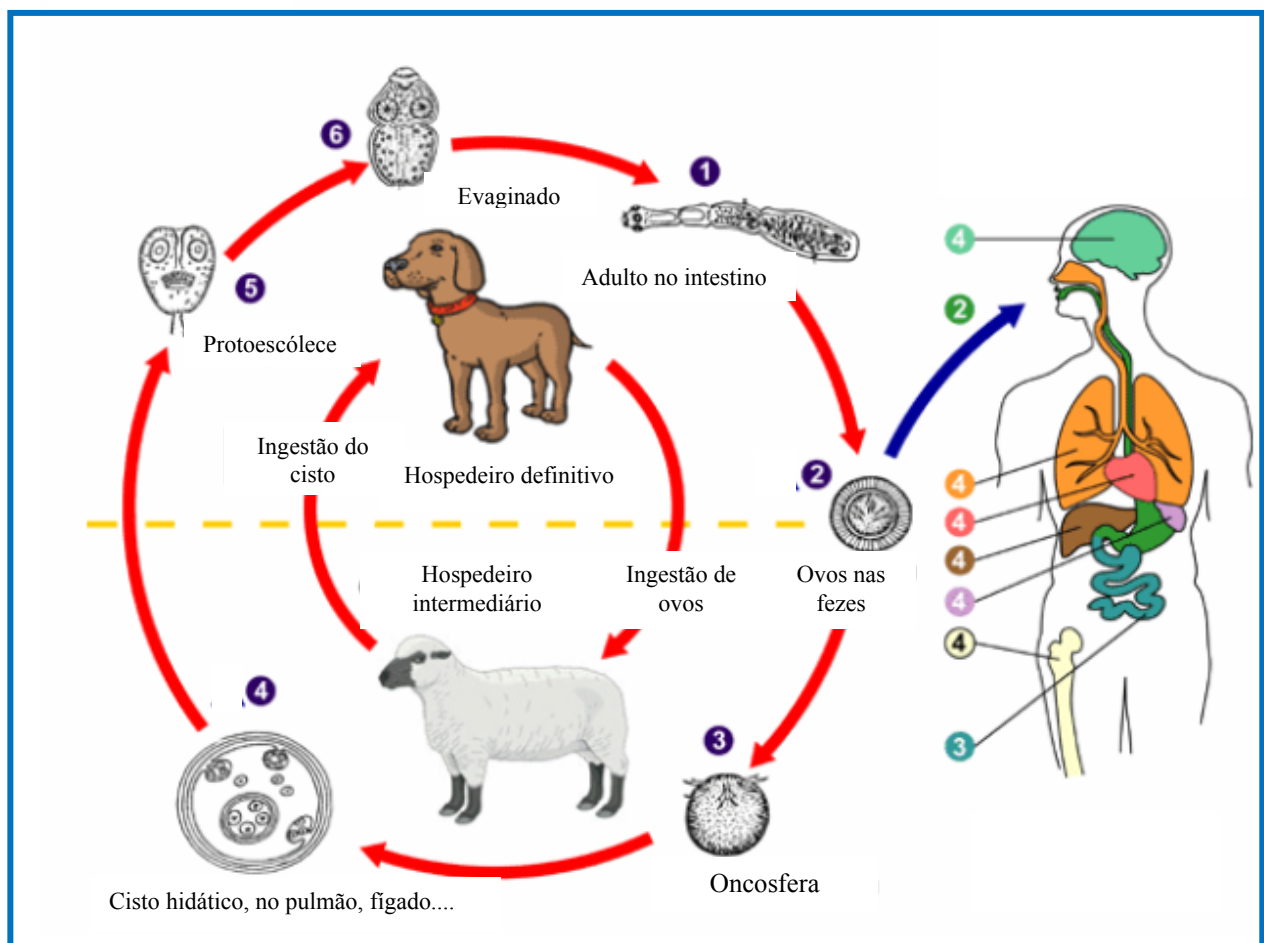


Figura 4. Ciclo de vida do *E. granulosus*. 1) Verme adulto que reside no intestino delgado do hospedeiro definitivo, normalmente um cão. 2) Os ovos são liberados junto com as fezes. 3) Os ovos ingeridos pelo hospedeiro intermediário, normalmente um ovino ou bovino, liberam a oncosfera no estômago do ruminante. 4) Formação do cisto hidático, e reprodução assexuada com formação dos protoescolices. 5) Ingestão das vísceras contendo verme em sua fase larval pelo canídeo. 6) Evaginação e fixação no intestino delgado (modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

### 3. As linhagens de *Echinococcus granulosus*.

Muitas são as células de organismos eucariontes que contêm mitocôndrias, as quais são essenciais para formação de trifosfato de adenosina (ATP). Tais organelas são autorreplicativas, pois possuem seu próprio DNA (mtDNA). O mtDNA é útil para a discriminação de organismos intimamente relacionados, devido a sua taxa de evolução relativamente rápida e a herança exclusivamente materna, além de não sofrer recombinação (McManus e Thompson, 2003). Por ser um gene mitocondrial, a Citocromo c oxidase subunidade 1 (*cox 1*) é largamente utilizada em análises moleculares, com o intuito de identificar as variantes existentes nas espécies do gênero *Echinococcus* (Bowles *et al.* 1992). Estudos moleculares usando seqüências de DNA mitocondrial identificaram inicialmente nove haplótipos distintos (G1-G9), correspondendo às linhagens de *E. granulosus* (McManus e Thompson, 2003). Os haplótipos G1, G2 e G3 são considerados uma única espécie, *E. granulosus* (Nakao *et al.* 2007). O haplótipo eqüino (G4), foi definido como *E. equinus* (Lavikainen *et al.* 2003; Romig *et al.* 2006; Nakao *et al.* 2007). O haplótipo G5 foi recentemente elevado à categoria de espécie, denominado *E. ortleppi* (Thompson e McManus, 2002; Nakao *et al.* 2007). Há ainda o haplótipo que normalmente parasita camelo (G6), dois haplótipos suínos (G7 e G9) e um haplótipo nos cervídeos (G8) (Thompson e McManus, 2002). Existe também o haplótipo G10 que parasita cervídeos na Finlândia e Suécia, o qual foi caracterizado por Lavikainen (2003).

No Sul do Brasil duas espécies do gênero *Echinococcus* são comumente encontradas: *E. granulosus* (haplótipo G1) e *E. ortleppi* (haplótipo G5) (Haag, 1997) (Tabela 1).

Tabela 1. Principais linhagens de *E. granulosus* no estado do Rio Grande do Sul. Hospedeiros intermediários conhecidos. Ocorrência global das variantes.

Haplótipo	Hospedeiros	Ocorrência geográfica
<i>E. granulosus</i> (G1)	Ovelha	Reino Unido, China, australiania, Tasmania, Quênia, Uruguai, Turquia, Jordânia, Líbano, Itália, Argentina, Brasil, Irã
	Bovino	Reino Unido, Espanha, Kenia, Tasmania, Jordânia, China, Brasil
	Humano	Austrália, Tasmânia, Jordânia, Líbano, Holanda, Kenia, Argentina, Brasil
<i>E. ortleppi</i> (G5)	Ovelha	Nepal, Brasil
	Bufalo	Índia, Nepal
	Bovino	Suíça, Holanda, Brasil

#### 4. O antígeno B

O antígeno B (AgB) é uma lipoproteína polimérica termoestável de 120-160 kDa. O AgB de *E. granulosus* é o composto antigênico mais secretado pelo parasito no estágio de metacésteioide (Oriol *et al.*, 1971; Oriol *et al.*, 1975). Medindo a concentração do antígeno B no fluido do cisto hidático de *E. granulosus*, Musiani *et al.* (1978) encontraram uma quantidade equivalente da proteína em todas as amostras de vários organismos de diferentes hospedeiros. O AgB constituía aproximadamente 90% do total de antígenos purificados.

A dissociação dessa lipoproteína origina componentes de 8, 16, 24, 32 kDa, sendo que quanto maior a massa molecular do componente, proporcionalmente menor é a sua abundância. Os componentes com 16, 24, e 32 kDa correspondem respectivamente a dímeros, trímeros e polímeros da subunidade monomérica de 8 kDa (AgB8) (Lightowlers *et al.* 1989).

O AgB é produzido pela membrana germinativa e pelos protoescoléces em grande quantidade (Lightowlers e Gottstein, 1995). É rico em  $\alpha$ -hélices, e é considerado homólogo às proteínas de helmintos que se ligam a lipídeos (HLBPs) (Monteiro *et al.* 2007). O AgB estaria envolvido no transporte e detoxificação de ácidos graxos (Saghir *et al.* 2001); porém, Chemale *et al.* 2005 acreditam que o AgB estaria relacionado a ligação, e não ao transporte de compostos hidrofóbicos, sugerindo uma possível atuação na detoxificação de xenobióticos. Considerando-se tais afirmações, aliado ao fato do AgB inibir o recrutamento de neutrófilos, acredita-se que sua função seja de considerável importância na viabilidade do parasito em face à resposta imunológica do hospedeiro (Shepherd *et al.* 1991).

O AgB é altamente imonogênico em humanos e possui grande potencial para uso em testes de imonogenicidade (Virginio *et al.* 2003). O *EgAgB8/1* tem sido recomendado como uma boa alternativa para diagnósticos de equinococose em humanos (González *et al.* 2000).

A sequência completa de um cDNA correspondente ao componente de 8 kDa do AgB foi inicialmente caracterizada no início da década de 90 por Frosh *et al.* (1994). Após análise mais minuciosa incluindo diferentes isolados, Fernández *et al.* (1996) encontraram substituições de nucleotídeos em regiões conservadas do gene. Através de comparações dos cDNAs, a nova variante, nomeada de *EgAgB8/2*, possuía 44% de similaridade na sequência de nucleotídeos e 38% na sequência de aminoácidos que compõe a proteína secretada em relação ao isolado previamente descrito por Frosh *et al.*, denominado, *EgAgB8/1*. Mais recentemente, outros dois clones de cDNA referentes aos componentes de 8 kDa do AgB, *EgAgB8/3* (Chemale *et al.* 2001) e *EgAgB8/4* (Arend *et al.* 2004) foram isolados e caracterizados. É possível que *EgAgB8/3* e *EgAgB8/4* possam ser seletivamente expressos em determinados estágios do parasito ou talvez somente em certas espécies de hospedeiros (Mamuti *et al.* 2006).

Recentemente, Mamuti *et al.* (2007) isolaram um novo gene, *EgAgB8/5*, por meio de PCR, a partir do DNA genômico de isolados de *E. granulosus*, haplótipos G1 e G6, coletados do intestino de cães.

Análises filogenéticas evidenciaram uma maior homologia entre os genes *EgAgB8/1* e *EgAgB8/3*. O mesmo foi confirmado para os genes *EgAgB8/2* e *EgAgB8/4* (Haag *et al.* 2006b). Os genes *EgAgB8/1*, *EgAgB8/3*, *EgAgB8/4* parecem evoluir por meio de seleção positiva (Haag *et al.* 2006b).

Os genes do AgB são constituídos por dois éxons e um íntron. O primeiro éxon codifica um peptídeo sinal que é clivado durante o processo de exportação celular, e não faz parte da proteína funcional. Já o segundo éxon codifica o peptídeo que é secretado. Os genes que codificam o AgB formam uma família multigênica (Chemale *et al.* 2001), ainda não completamente caracterizada, que se originaram a partir de eventos de duplicação ocorridos no início da formação do gênero *Echinococcus* (Haag *et al.* 2006b). Através da técnica de Southern blot genômico Haag *et al.* (2004) sugerem a existência de uma família multigênica com pelo menos sete genes. Há evidências de que cada um dos genes que codificam o AgB se apresenta redundante no genoma, e que o número de cópias e sua sequência de nucleotídeos são variáveis entre os indivíduos de uma população, e até mesmo entre os proscóceles de um mesmo cisto (Haag *et al.* 2004; Haag *et al.* 2006a). Badaraco (2007) sugere que plasmídeos contendo insertos do gene *EgAgB8/4* sejam sequenciados com o propósito de avaliar tal diversidade alélica, além de verificar a variação no número de repetições GT entre cada variante. Nesse estudo, Badaraco (2007) ainda sugere que o gene *EgAgB8/4* de *E. ortleppi* teria recombinado com o gene *EgAgB8/2*, e que o sítio de remoção do íntron estaria alterado.

## **5. A equinococose – Uma endemia global.**

É estimado que a equinococose cística causada pelo *E. granulosus* afete entre 2-3 milhões de pessoas no planeta, e cause danos econômicos irreparáveis (Budke *et al.* 2006). A equinococose cística afeta normalmente o fígado e pulmão em humanos, mas pode alcançar o coração, ossos, sistema nervoso, rins entre outros órgãos (Craig *et al.* 2007; Angulo *et al.* 1997). O crescimento do cisto hidático é lento, com limites bem definidos, e normalmente é tolerado pelo hospedeiro. O mesmo não ocorre com pacientes infectados com a equinococose alveolar, pois esta não possui limites externos determinados, e é mais agressiva e invasiva (Craig *et al.* 2007). A equinococose é uma das mais importantes zoonoses do mundo.

### **5.1. Europa**

Na Europa as espécies encontradas são: *E. multilocularis*, *E. granulosus* (G1, G7, G9 e G10) *E. ortleppi* (G5) e *E. equinus* (G4) (Romig *et al.* 2006).

O *Echinococcus granulosus* (G1) ocorre predominantemente nos países situados na região sul da Europa próximo ao Mar Mediterrâneo, principalmente na Espanha e Itália, e em parte da Grã-Bretanha (Eckert *et al.* 2001). Nessas localidades a espécie se mantém quase que exclusivamente através de um ciclo de vida doméstico, envolvendo cães e ovelhas. Já na Bulgária o parasito é encontrado predominantemente em lobos e chacais (Breyer *et al.* 2004).

Na Europa, o aumento da presença do parasito encontrado nas vísceras de animais abatidos é diretamente proporcional ao aumento da prevalência da hidatidose cística em humanos. Tanto na Europa quanto no restante do mundo, G1 parece ser o maior causador da equinococose em humanos (Romig *et al.* 2006).

De maneira, geral o *E. granulosus* (G1) se mantém circulante pelos países europeus. O *E. ortleppi* (G5) possui um ciclo de vida adaptado à transmissão através de bovinos. Dados de abatedouros europeus indicam que desde a década de 1980 o táxon se encontra reduzido, chegando a ser considerado extinto em muitas regiões (Eckert *et al.* 2001).

## **5.2. África**

Na África é comum a ocorrência de *E. granulosus* (G1), *E. ortleppi* (G5), *E. equinus* (G4), *Echinococcus felidis* e o haplótipo G6 que parasita camelo (Romig, 2003). No continente africano devido à existência de grandes regiões de clima árido e semi-árido, a economia é basicamente ligada à produção extensiva de bovinos, ovinos e camelos, este último frequentemente utilizado por nômades. Nos países do norte e leste africano é grande a incidência de equinococose causada por *E. granulosus* (G1), com prevalência variando entre 0,3% a 5,1% em humanos (Magambo *et al.* 2006).

Os países mais afetados pela equinococose no leste africano são: Chipre, Turquia, Irã e Omã. Já os países considerados endêmicos ao norte da África são: Argélia, Egito, Líbia, Marrocos e Tunísia. Dentre estes países, se destaca Marrocos que apresenta altos índices de prevalência tanto em animais quanto nos humanos. A prevalência em cães infectados é de 33%, já nos bovinos é de 42%. Neste país 15 a cada 100.000 pessoas possuem equinococose (Sadjjadi, 2006).

## **5.3. Ásia**

Na Ásia o parasito *E. granulosus* é intensamente endêmico e distribui-se amplamente na porção asiática da Rússia, na Índia e na Ásia central (Torgerson e Budke, 2003). Os

países que compunham a antiga União Soviética têm grandes índices de equinococose em animais e humanos. Cazaquistão, Uzbequistão, Quirguistão, Tadjiquistão e Turcomenistão são cinco ex-repúblicas soviéticas. Esses cinco países da Ásia Central possuem abatedouros pequenos, e sem inspeção veterinária adequada. Além disso, na última década houve um aumento de cães na área rural e urbana. Como resultado essa região teve um súbito aumento nos casos de equinococose. Essa zoonose alcançou índices de mais de 25/100.000 casos por habitante ao ano (Torgerson *et al.* 2006). A prevalência de ovinos infectados ultrapassa os 50%, enquanto a incidência nos canídeos de 5-30% (Torgerson *et al.* 2006).

#### **5.4. América do Norte e América Central**

Na América do Norte os haplótipos G8 e G10 são encontrados no Canadá e no Alasca, onde o ciclo de vida é quase que exclusivamente selvagem, envolvendo lobos, cães, alces e caribus (Moro e Schantz, 2006). O parasito ocorre de maneira apenas esporádica nos Estados Unidos da América (EUA). Nesse país já foi encontrado nos estados de Utah e Califórnia (Torgerson *et al.* 2003).

São poucos os relatos de equinococose no México. O caso mais recente de hidatidose cística em humanos provém do estado de Morelos e foi causado pelo haplótipo bovino (G1) (Maravilla *et al.* 2004). Recentemente os haplótipos G1 e G7 foram encontrados em suínos obtidos de abatedouros em Zacatepec, no México (Villalobos *et al.* 2007).

O *Echinococcus granulosus* é considerado raro nos países que compõem a América Central.

#### **5.5. Austrália**

O *Echinococcus* chegou à Austrália por volta de 1860 cerca de 100 anos após os primeiros rebanhos de ovinos chegarem ao país (Jenkins, 2006). A completa falta de informação, aliada à abundância de potenciais hospedeiros, fez da equinococose um dos maiores problemas de saúde pública na Austrália no decorrer de algumas décadas. Neste país o parasito mantém seu ciclo de vida por meio de hospedeiros definitivos que são selvagens, como os dingos e os cangurus, os quais possuem um índice de infecção de 25% e 65% respectivamente (Jenkins, 2002). Os cães da zona rural apresentam altos índices de prevalência entre 18% a 29%. Os hospedeiros intermediários são, geralmente, caprinos (Jenkins, 2006). Na Austrália tanto o ciclo selvagem quanto o ciclo doméstico estão ativos e os parasitos da espécie transitam entre um ciclo e outro.



## 5.6. América do Sul

Na América do Sul o *Echinococcus* é fortemente endêmico, principalmente na Argentina, no Uruguai e no Peru (Torgenson *et al.* 2003).

Na Argentina existem 50 milhões de bovinos, 7% deles com equinococose cística, 12 milhões de ovelhas, 12,5% infectadas e 2 milhões de porcos, 9,8% infectados (Guarnera *et al.* 2004). Guarnera (2001) considera que 3 milhões habitantes na Argentina estão em regiões de altíssimo risco.

No Peru as regiões onde há os maiores índices de prevalência de equinococose são no centro e sul. Na região central dos Andes Peruano são reportados 127 cirurgias por 100.000 habitantes ao ano (Moro *et al.* 1997). A prevalência da hidatidose é de 80% nos bovinos e de 89% nos ovinos. Já nos canídeos, hospedeiro definitivo, a prevalência varia entre 32% a 46% (Moro e Schantz, 2006).

A região sul do Chile apresenta os maiores índices de endemia. Os números oficiais demonstram que a taxa de incidência era de 2,2 a cada 1.000.000 habitantes entre os anos de 2000-2005 (Panamerican Health Organization, 2004). Em humanos foi encontrada a espécie *E. granulosus* (G1 e G6) (Manterola, *et al.* 2008). A prevalência entre os anos de 1990-2000 em bovinos era de 22,8%, em ovinos de 4,0% e nos eqüinos de 3,8% (Panamerican Health Organization, 2004). Tais dados condizem com o fato do Chile não possuir um programa oficial de cobertura nacional de controle e vigilância da equinococose (Panamerican Health Organization, 2004).

No Uruguai a prevalência de equinococose cística é de 3,6% nos habitantes da vila de Paloma região central do país. Nessa área a prevalência de cães infectados é de 24,8% (Cohen *et al.* 1998).

A equinococose é um importante problema de saúde pública na região sul do Brasil, mais especificamente nas áreas que fazem fronteira com o Uruguai. Essa região possui uma economia rural baseada na criação extensiva de bovinos e ovinos a qual tem intenso contato com cães (De La Rue *et al.* 2006). Dados do ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 2005 mostram que o serviço de inspeção diagnosticou 119.445 bovinos, 24.300 ovinos e 560 suínos com hidatidose cística.

A participação do Brasil na questão de controle e vigilância da equinococose principalmente na faixa de fronteira intensificou-se a partir de 2004. Entre 1995 e 2002 registrou-se 1277 internações de humanos em hospitais da região Sul (Panamerican Health Organization, 2004).

As altas taxas de prevalência em humanos e animais ocorrem em locais onde há criações de gado intensivas, onde existe um grande número de cães nas proximidades e quando o acesso às carcaças dos animais abatidos é livre aos canídeos (Romig, 2003) (Figura 5).



Figura 5. Ovelha abatida perto de cães com livre acesso às vísceras (Retirado de *Craig et al.* 2007).

Assim, é graças ao comportamento humano que o ciclo doméstico do *E. granulosus* se perpetua. Programas de controle para equinococose focam a redução de cães de rua, registro e tratamento com anti-helmíntico desses animais, além do supervisionamento rigoroso dos abatedouros. Mesmo com esses cuidados, são poucas as regiões do mundo que são completamente livres de qualquer uma das linhagens de *E. granulosus*.

*Echinococcus granulosus* é constituído por variantes genéticas. Através da análise de sequências mitocondriais há dez genótipos possíveis (G1-G10). Tais linhagens têm seu próprio ciclo de vida, hospedeiro específico, taxa de desenvolvimentos particulares, dinâmica de transmissão, antigenicidade, sensibilidade a agentes quimioterápicos e patologia característica. Assim, determinar qual linhagem está presente em determinada infecção, tanto em humanos quanto no restante dos animais, é de particular importância

para o correto desenvolvimento de vacinas, drogas para controle da helmintose, e para o empreendimento de programas de controle mais eficientes.

## **6. Objetivos**

1. Caracterização do gene *EgAgB4* em *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus ortleppi* em sua fase larval.

a) Caracterizar a região promotora de *EgAgB4* em cada uma das espécies, e verificar se o mesmo é expresso, como proposto por Badaraco (2007).

2. Caracterização das cópias dos cinco genes conhecidos de AgB de *Echinococcus granulosus* na sua fase adulta.

a) Avaliar se a diversidade de nucleotídeos no verme adulto corresponde à encontrada nos parasitos em sua fase larval.

3. Realizar um levantamento da hidatidose causada pelas duas espécies presentes no estado do RS.

a) Investigar a frequência das espécies *E. granulosus* e *E. ortleppi* em bovinos abatidos no Estado.

## **7. Justificativa**

O presente trabalho tem como intuito estudar a variabilidade dos genes do AgB de *Echinococcus*, tanto na fase larval quanto na adulta, a fim de caracterizar as distintas cópias redundantes. Esta avaliação poderá permitir um maior entendimento do papel evolutivo da redundância e diversidade genética. Este trabalho também pretende investigar e responder sobre uma possível substituição, de uma espécie por outra, dos parasitos envolvidos na hidatidose cística no RS. Isso contribuiria de forma acentuada no diagnóstico da doença, e futuramente em um planejamento mais eficaz de controle a hidatidose no nosso estado.

## CAPÍTULO II: VARIABILIDADE DO GENE *EgAgB8/4* EM *Echinococcus granulosus* E *Echinococcus ortleppi*.

### 1. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1.1. Amplificação, transformação e clonagem em vetor plasmidial do gene *EgAgB8/4* a partir de dois isolados

O DNA extraído a partir dos protoescoléces coletados de dois cistos hidáticos, um de *E. granulosus* e outro de *E. ortleppi*, presentes nas vísceras de bovinos foi utilizado como molde para amplificar o gene *EgAgB8/4* através dos “primers” OligoI que anela na região flanqueadora 5’ GGA TGG AGT ATA AGG AGC AG 3’ (direto) (Badaraco, 2007) e B4Rev.R2 que anela dentro do segundo éxon 5’ GAC ATA TTT CTT CAA CAC TTC GTG AAC 3’ (reverso) (Haag, *et al.* 2006a). Cada uma das reações continha entre 30-100 ng de DNA, 8mM de dNTPs, 20pmois de cada um dos “primers”, 3 unidades da polimerase *Pfu* (FERMENTAS ®), buffer 20mM Tris-HCL, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10mMKCL, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA e 2mM MgSO<sub>4</sub> e água mili-Q para completar o volume final de 25 ul. As amplificações foram feitas por “touchdown” pelo programa TD60-50. Este programa possui uma temperatura de anelamento inicial de 60°C, que é reduzida um grau a cada dois ciclos nos 20 primeiros ciclos do programa. Os 20 ciclos restantes ocorrem com uma temperatura de anelamento de 50°C. Todos os passos têm duração de um minuto a exceção do primeiro passo de desnaturação, que é de quatro minutos, e do último passo de extensão que tem a duração de sete minutos. Os amplicons de dois isolados correspondentes às espécies *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus ortleppi* foram clonados no vetor plasmidial Zero Blunt® TOPO ® PCR Cloning Kit (INVITROGEN ®). Após transformação por choque térmico utilizando células competentes TOP 10, as células transformadas foram plaqueadas por esgotamento em meios independentes de LB com ágar que continham 50ul/ml de Canamicina. Foram selecionadas 20 colônias de cada transformação, tendo-se o cuidado na escolha para que não fossem selecionadas colônias que possuíssem satélites ao seu redor ou mesmo em contato. A partir daí fez-se à extração do DNA plasmidial por lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001). Foram obtidas dessa forma 40 alíquotas, sendo 20 de *E. granulosus* e 20 de *E.ortleppi*. Uma amostra de 5ul do DNA

resultante da extração plasmidial foi digerida com a enzima EcoR I que cliva o plasmídeo nas regiões que flanqueiam o inserto. O fragmento obtido foi utilizado para confirmar seu tamanho em gel de agarose. Após ser confirmada a presença do inserto, o DNA foi purificado em placa de purificação a qual tem membrana de sílica, que se liga covalentemente ao DNA. Feita a purificação, o material foi seqüenciado, com o seqüenciador MegaBACE, utilizando-se os “primers” M13F 5’ GTA AAA CGA CGG CCA G 3’ e M13R 5’ CAG GAA ACA GCT ATG AC 3’. As amostras que apresentaram bom resultado foram alinhadas com o programa CodonCode Aligner v.3.0.2, para que se pudesse fazer a interpretação dos resultados.

## 1.2. Extração de DNA e RNA e síntese de cDNA

Duas amostras de protoescoléces referentes às espécies *E. granulosus* e *E. ortleppi*, provenientes de uma coleta em um frigorífico que abate bovinos, localizado na região metropolitana de Porto Alegre, foram obtidas e o DNA e o RNA foram extraídos. A partir do RNA tratado com DNase realizou-se a síntese da primeira fita de cDNA com o kit Reverse Transcription System (PROMEGA®). O cDNA e o DNA obtidos de cada um dos isolados foram utilizados como molde para amplificar o gene *EgAgB8/4* através dos “primers” AgB2F que anela após o primeiro códon 5’ TTG CTC TCG TGG CTT TCG TG 3’ (direto) (Badaraco, 2007) e B4Rev.R2 que anela dentro do segundo éxon 5’ GAC ATA TTT CTT CAA CAC TTC GTG AAC 3’ (reverso) (Haag, *et al.* 2006a). Nesse experimento foi utilizado o “primer” B2F, pois o mesmo anela dentro do primeiro éxon do gene *EgAgB8/4*. Cada uma das reações continha entre 30-100 ng de DNA, 8mM de dNTPs, 10pmois de cada uma dos “primers”, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidade da polimerase *Taq* (INVITROGEN®), buffer 20mM Tris-HCL, 50mM KCL e água mili-Q para completar o volume final de 25ul. As amplificações foram feitas por “touchdown” pelo programa TD55-45. Este programa possui uma temperatura de anelamento inicial de 55°C que é reduzida um grau a cada dois ciclos nos 20 primeiros ciclos do programa. Os 20 ciclos restantes ocorrem com uma temperatura de anelamento de 45°C. Todos os passos têm duração de um minuto a exceção do primeiro passo de desnaturação que é de quatro minutos e do último passo de extensão que tem a duração de sete minutos. O produto das amplificações foi comparado em gel de poliacrilamida.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise dos cromatogramas e do alinhamento das sequências obtidas com a amplificação do gene *EgAgB8/4* utilizando-se os “primers” Oligo I e B4Rev.R2, é possível identificar que:

(a) os amplicons de *E. granulosus* apresentam uma mutação na posição 301 em relação a sequência de AgB4, localizada dentro do segundo éxon do gene. O amplicon G1-5 tem uma transição (A-G) na posição 29. Os amplicons 5, 8 e 12 diferem dos amplicons 11 e 18 na posição 346 por meio de uma transição (C-T).

(b) as sequências de *E. ortleppi* possuem quatro mutações dentro do que seria o íntron do gene *EgAgB8/4*. Além disso, há uma inserção de três nucleotídeos nessa região. As sequências do primeiro e do segundo éxon são iguais à exceção do amplicon G5-10. A sequência G5-10 possui inúmeras mutações em relação ao restante dos amplicons de *E. ortleppi* (91% de similaridade nucleotídica), sendo mais similar aos clones de *EgAgB8/4* de *E. granulosus* (97% de similaridade nucleotídica).

Como descrito por Badaraco (2007), o sítio de remoção do “splicing” da extremidade 3’ do íntron de *E. ortleppi* apresenta uma mutação, uma adenina (A) é substituída por uma timina (T), a exceção do amplicon G5-10. Nessas sequências o sinal de “splicing” está alterado, e não poderia ser utilizado para a edição do mRNA (Badaraco, 2007). Após esta região o próximo sinal de remoção de íntron se utilizado, poderia ocorrer na posição 319-320 (Figura 6).

Observando-se a região flanqueadora 5’ das sequências, confirmou-se que os amplicons diferem entre as espécies *E. granulosus* e *E. ortleppi* em 26pb na região 5’ flanqueadora do gene em relação ao número de repetições GT. *Echinococcus ortleppi* possui uma sequência menor que *E. granulosus* em relação a região das repetições GT (Figura 6).

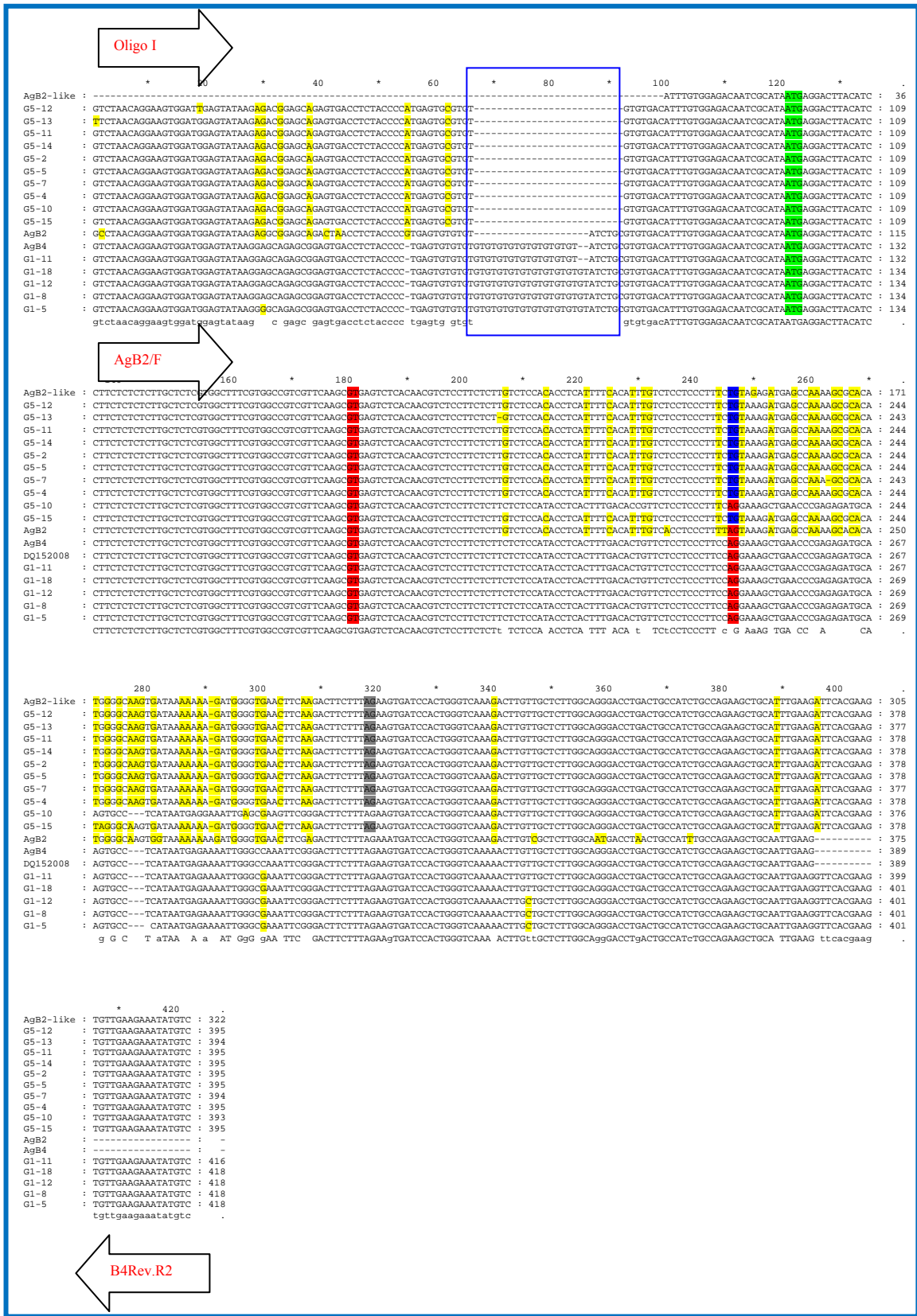


Figura 6. Alinhamento das sequências dos clones de *E. granulosus*, representado por G1 e *E. ortleppi*, representado por G5. Em verde, o primeiro códon. Em vermelho estão indicados os sítios de “splicing”. Em azul mutação no sinal de 3’ de “splicing” nas sequências de *E. ortleppi*. Em cinza o possível sítio de remoção de “splicing” dos amplicons de *E. ortleppi*. As sequências utilizadas como referência são: AgB2-like,

cópia não funcional do gene *EgAgB8/2* de *E. ortleppi*, número de acesso: AY569358; AgB4, número de acesso: DQ152008 e AgB2, número de acesso: DQ148518.

Fica evidente que os amplicons obtidos de ambas as espécies formam dois conjuntos de seqüências claramente distintas. É provável que os “primers” utilizados tenham amplificado o gene *EgAgB8/2* não funcional de *E. ortleppi*, a exceção do clone G5-10 que parece ser uma seqüência de *EgAgB8/4* (Figura 7). Todas as seqüências de *E. granulatus* se assemelham a seqüência de AgB4. Nós acreditamos que a diferença encontrada entre as ampliações do gene dos dois isolados ocorreu, pois o “primer” (direto) Oligo I anela em uma posição que parece ser conservada entre os genes.

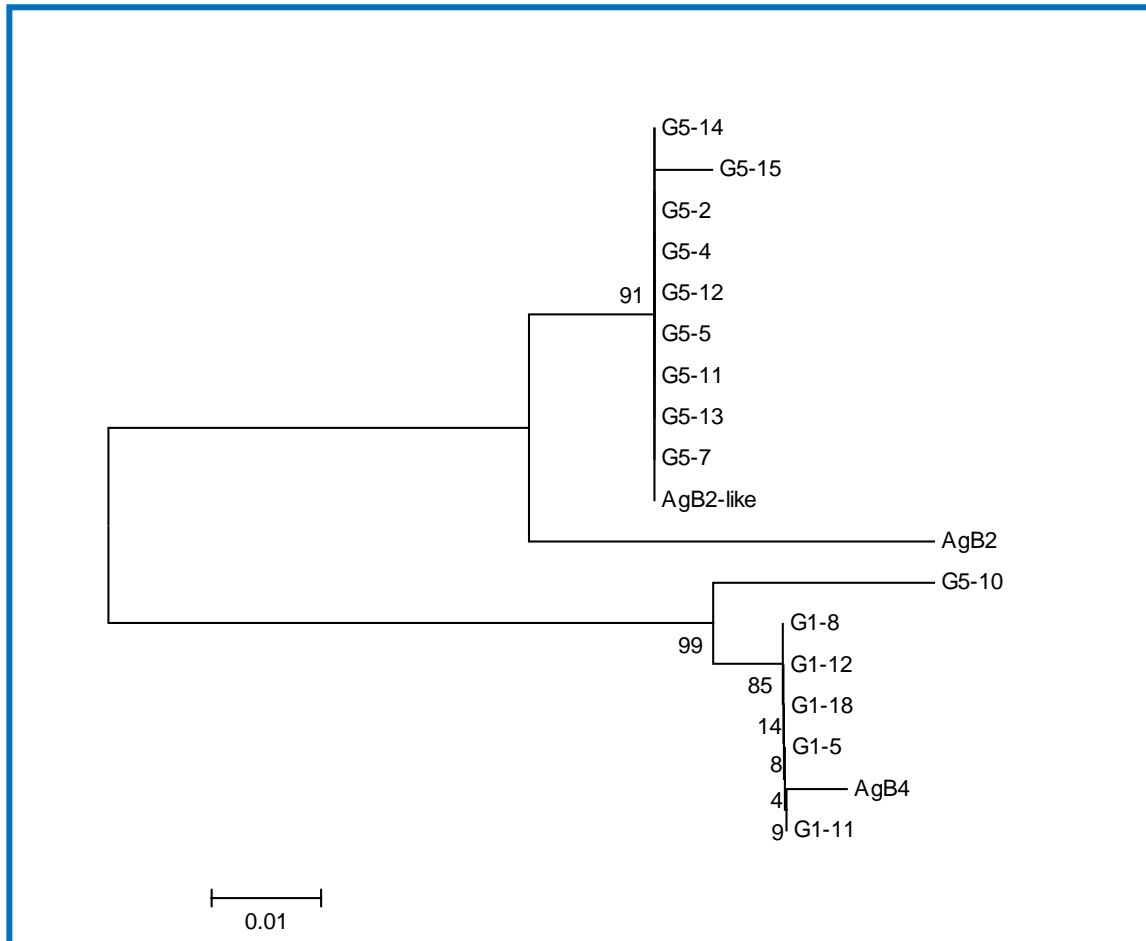


Figura 7. Árvore filogenética realçando que os clones de *E. granulatus* e o clone G5-10 agrupam com AgB4 e que os clones de *E. ortleppi* agrupam com AgB2-like. As seqüências utilizadas como referências são: AgB2-like, gene truncado, número de



acesso: AY569358; AgB4, número de acesso: DQ152008 e AgB2, número de acesso: DQ148518. Programa MEGA 3.1.

Não foi possível detectar uma grande diferença entre os produtos da amplificação de *EgAgB8/4* utilizando como molde os cDNAs de *E. granulosus* e *E. ortleppi* a partir dos “primers” B2F e B4Rev.R2. Essa diferença não ultrapassa 10pb, que é a mesma diferença encontrada entre as amplificações do gene *EgAgB8/4*, utilizando como molde o DNA total, das duas espécies (Figura 8). Dessa forma, fica evidente que a diferença entre o DNA e o cDNA das duas espécies não é devido a um possível tamanho alterado do íntron.

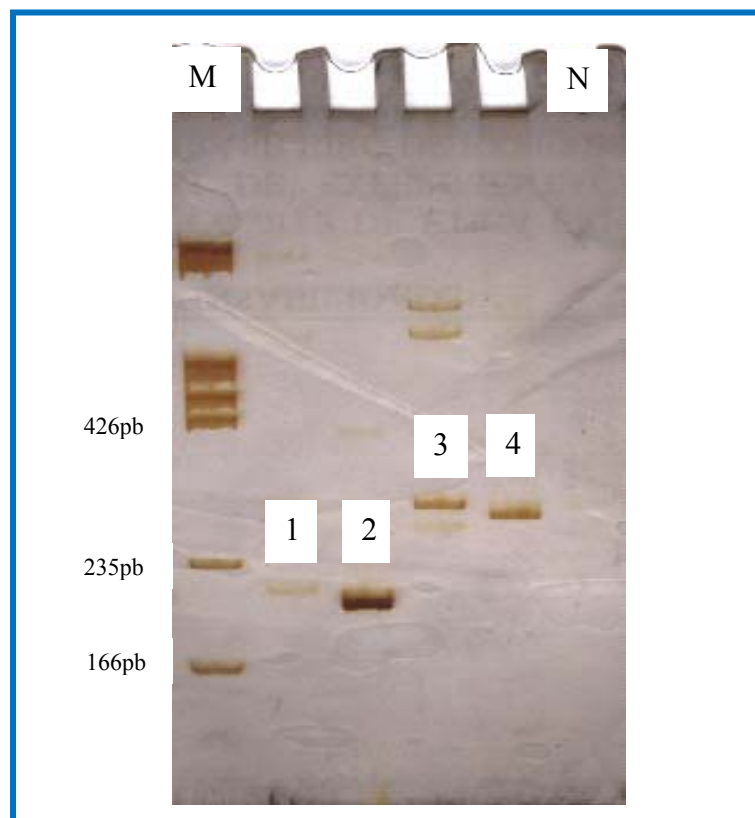


Figura 8. Gel de poliacrilamida. M) marcador Dde I. N) controle negativo. 1) cDNA de *E. granulosus*, 215pb. 2) cDNA de *E. ortleppi*, 206pb. 3) DNA de *E. granulosus*, 293pb. 4) DNA de *E. ortleppi*, 283pb.

A partir da análise dos resultados obtidos com as ampliações do cDNA de ambos os isolado nós acreditamos que:

(a) o gene *EgAgB8/4* pode estar sendo transcrito em *E. ortleppi* sem alteração do tamanho do peptídeo funcional ao contrário do que havia sido proposto por Badaraco (2007). Isso explicaria a diferença aproximada de 10pb encontrada entre as ampliações do gene a partir do DNA e do cDNA. Dessa forma, haveria a manutenção do peptídeo funcional e sua conseqüente expressão.

(b) também é possível que pela utilização dos “primers” B2F e B4Rev.R2 tenham sido amplificados o gene *EgAgB8/2* em *E. ortleppi*, já que, como observado na figura 6, as regiões onde os “primers” anelam são conservadas e idênticas entre *EgAgB8/2* e *EgAgB8/4*. Se esse for o caso *E. ortleppi* talvez não possua o gene *EgAgB8/4* funcional.

### **CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GÊNICA DO AgB NA FASE ADULTA DE *Echinococcus granulosus*.**

#### **1. MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **1.1. Amplificação dos cinco genes de AgB e controles.**

O verme adulto de *Echinococcus granulosus*, haplótipo mitocondrial G1, foi obtido de cães da cidade de Santana do Livramento, RS. Os vermes foram lavados três vezes com PBS 1x e uma vez com água destilada. Foi separado o escólex das proglótides maduras e grávidas, que formam dispensadas. Utilizando-se uma pipeta, o escólex foi coletado separadamente e colocado em tubo de 1,5ml contendo 78ul de água mili-Q e 2ul de proteinase K (20mg/ml). A amostra foi incubada a 55°C por duas horas e 95°C por 20 minutos. A solução obtida foi utilizada como molde para a reação de PCR. Algumas alíquotas da água na qual o verme foi cortado foi utilizada como controle negativo. O escólex de um único verme adulto foi utilizado como molde para amplificar os seguintes genes: *EgAgB8/1*, “primers” 5' AAA TGT TTG GCG AAG TGA AGT 3' (direto) e 5' GTA GAT GGT TTA TTG AGC AA 3' (reverso) (Haag *et al* , 2004); *EgAgB8/2*, “primers” 5' AAA GCA CAC ATG GGG CAA GTG 3' (direto) e 5' GTG TCC CGA CGC ATG ACT TA 3' (reverso) (Haag *et al* , 2004); *EgAgB8/3*, “primers” 5' GAA GGG TGT CTC TCG TCT GAT CAA CGC CAT 3' (direto) e 5' GTA GAT GGT TTA TTG AGC AA 3' (reverso) (Haag *et al* , 2004); *EgAgB8/4*, “primers” 5' CGA GAG ATG CAA GTG CCT CAT 3' (direto) e 5' GTG TCC CGA CGC ATG ACT TA 3' (reverso) (Haag *et al* , 2004); *EgAgB8/5*, “primers” 5' GAA GAT GAC ATC GAT TCG AAA G 3' “direto” e 5' GAT CGA GCT TTT GTC CTG GC 3' (reverso) (Mamuti *et al*. 2007); *Mdh*, “primers” 5' CGT TTC CTT CCA TTT CCG AA 3' (direto) e 5' TTG GTG ACA ACG GCG TGA G 3' (reverso). Cada uma das reações continha 5ul do molde, 16mM de dNTPs, 40pmois de cada uma dos primers, 6 unidades da polimerase *Pfu* (PROMEGA ®), buffer 20mM Tris-HCL, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10mM KCL, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA e 2mM MgSO<sub>4</sub> e água mili-Q para completar o volume final de 50ul. As amplificações foram feitas por um programa com 35 ciclos. Este programa possui uma temperatura de anelamento constante de 50°C. Todos os

passos têm duração de meio minuto, a exceção do primeiro passo de desnaturação, que é de cinco minutos, e do último passo de extensão que tem a duração de sete minutos.

## 1.2. Transformação e clonagem em vetor plasmidial dos genes que compõe a família multigênica do AgB e do controle *mdh*.

Os amplicons dos genes foram clonados no vetor plasmidial pCR®-Blunt II-TOPO® Cloning Kit (INVITROGEN ®). Após transformação por eletroporação utilizando células competentes TOP 10, as células transformadas foram plaqueadas por esgotamento em meios independentes de LB com ágar que continham 50ul/ml de Canamicina. Foram selecionadas 10 colônias de cada transformação. A partir daí fez-se à extração do DNA plasmidial com o kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (INVITROGEN ®). Foram obtidas 60 alíquotas, sendo dez alíquotas referentes a cada um dos genes do AgB e dez alíquotas do *Mdh*. Uma amostra de 5ul do DNA resultante da extração plasmidial foi digerida com a enzima EcoR I que cliva o plasmídeo nas regiões que flanqueiam o inserto. O fragmento obtido foi utilizado para confirmar seu tamanho em gel de agarose. O material foi seqüenciado, com o seqüenciador ABI 3730XL, utilizando-se os “primers” M13F 5’ GTA AAA CGA CGG CCA G 3’ e M13R 5’ CAG GAA ACA GCT ATG AC 3’. As amostras que apresentaram bom resultado foram alinhadas através do programa CodonCode Aligner v.3.0.2. Os amplicons de *mdh* foram utilizados como controle, pois este é um gene de cópia única.

Através da diversidade alélica obteve-se a diversidade de Shannon. Utilizou-se o teste t para comparar a diversidade de Shannon entre as fases larval e adulta do parasito por meio do programa Past (Hammer et al. 2001).

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise das seqüências obtidas dos cinco genes do AgB e do gene *Mdh* é possível observar o seguinte:

Existe apenas um tipo de seqüência do gene *EgAgB8/1* de *E. granulosus*. Não há nenhuma diferença entre o alelo encontrado e a seqüência utilizada como referência, *EgAgB1*, descrita para o haplótipo G1 (Figura 9). Esse resultado difere, em relação à diversidade, das seqüências anteriormente caracterizadas de *EgAgB8/1* em cistos hidáticos, já que na fase larval o parasito apresenta um número elevado de cópias por cisto hidático analisado (Haag, *et al.* 2004).

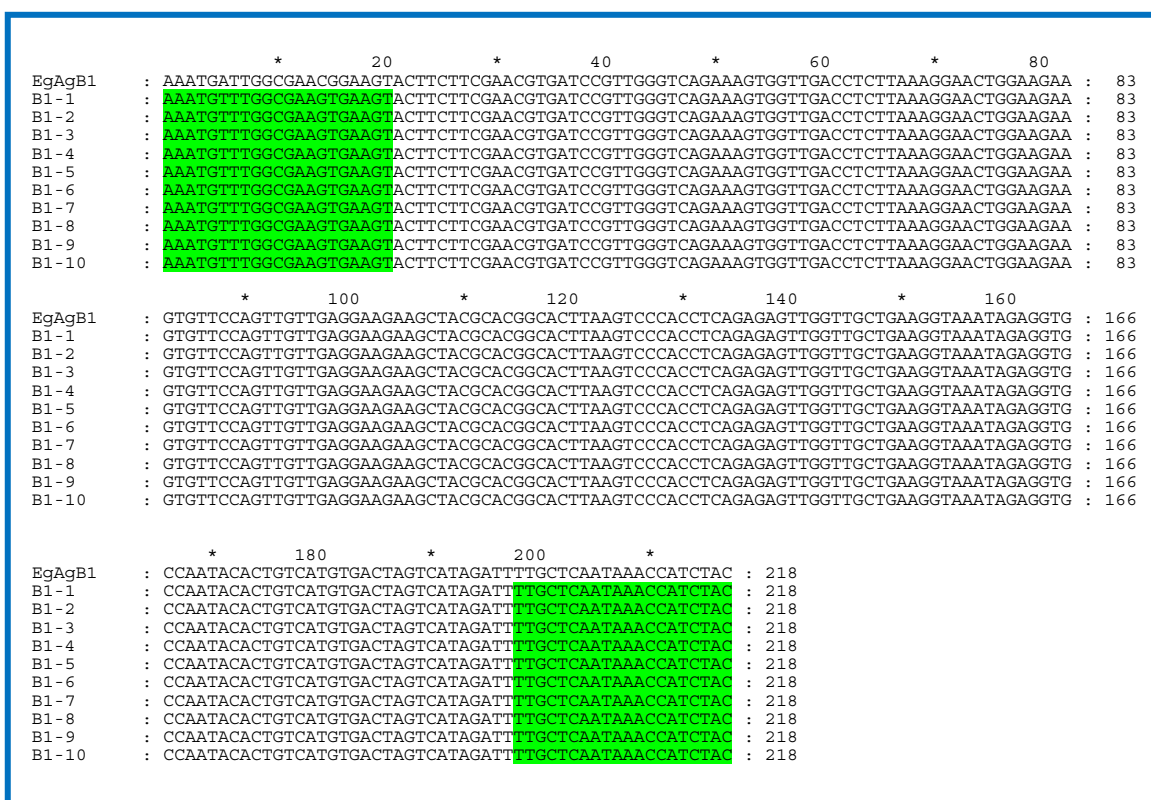


Figura 9. Alinhamento das seqüências de *EgAGB8/1*, representado por B1, de *Echinococcus granulosus*. O numero posterior a identificação do gene representa o clone do qual a seqüência foi obtida. Em verde, estão localizados os “primers” utilizados. A seqüência utilizada como referência é *EgAgB1*, número de acesso: Z26336.

As sequências analisadas de *EgAgB8/2*, *EgAgB8/4* e *EgAgB8/5* apresentam somente dois tipos diferentes de sequências. A exceção da sequência B5-10, as sequências observadas no verme adulto referente aos genes *EgAgB8/2*, *EgAgB8/4* e *EgAgB8/5* são diferentes da sequência mais frequente encontrada na fase larval do parasito *E. granulosus*, haplótipo G1.

Os isolados B2-2-10 são idênticos entre si e diferem em 23 posições em comparação com a sequência mais comumente encontrada na fase larval do parasito de *E. granulosus*, *EgAgB2G1*, o que corresponde a uma similaridade nucleotídica de 89,4%. Já isolado B2-1 difere em 24 posições, o que corresponde a uma similaridade nucleotídica de 88,9%. Todos os clones possuem uma inserção de seis nucleotídeos na posição 188-193.

Comparando-se os clones obtidos a partir da amplificação do gene *EgAgB8/2* com a sequência *EgAgB2G5*, que é um gene não funcional encontrado em *E. ortleppi*, a semelhança nucleotídica é de 100% para os clones B2-2-10 e de 99% para o clone B2-1. (Figura 10).



Figura 10. Alinhamento das sequências de *EgAgB8/2*, representado por B2, de *Echinococcus granulosus*. O número posterior à identificação do gene representa o

clone do qual a sequência foi obtida. Em verde, estão localizados os “primers” utilizados. Em amarelo, as diferenças encontradas em comparação com a sequência EgAgB2G1. Sequências utilizadas como referência: EgAgB2G1, número de acesso: L48620; EgAgB2G5, cópia não funcional do gene *EgAgB8/2* de *E. ortleppi*, número de acesso: AY569358.

Os isolados B4-1-8 e B4-10 são idênticos entre si e diferem em 17 posições em comparação com a sequência mais comumente encontrada na fase larval do parasito, EgAgB4G1, o que corresponde a uma similaridade nucleotídica de 91,9%. Esses amplicons possuem uma inserção de seis nucleotídeos na posição 189-194. Já o isolado B4-9 difere em oito posições, o que corresponde a uma similaridade nucleotídica 96,2% e possui uma inserção de três nucleotídeos na posição 189-191.

Comparando-se os clones obtidos a partir da amplificação do gene *EgAgB8/4* com a sequência EgAgB4G1.2, caracterizada como *E. granulosis*, a semelhança nucleotídica é de 100% para os clones B4-1-8 e B4-10 e é de 96,2% (Figura 11).

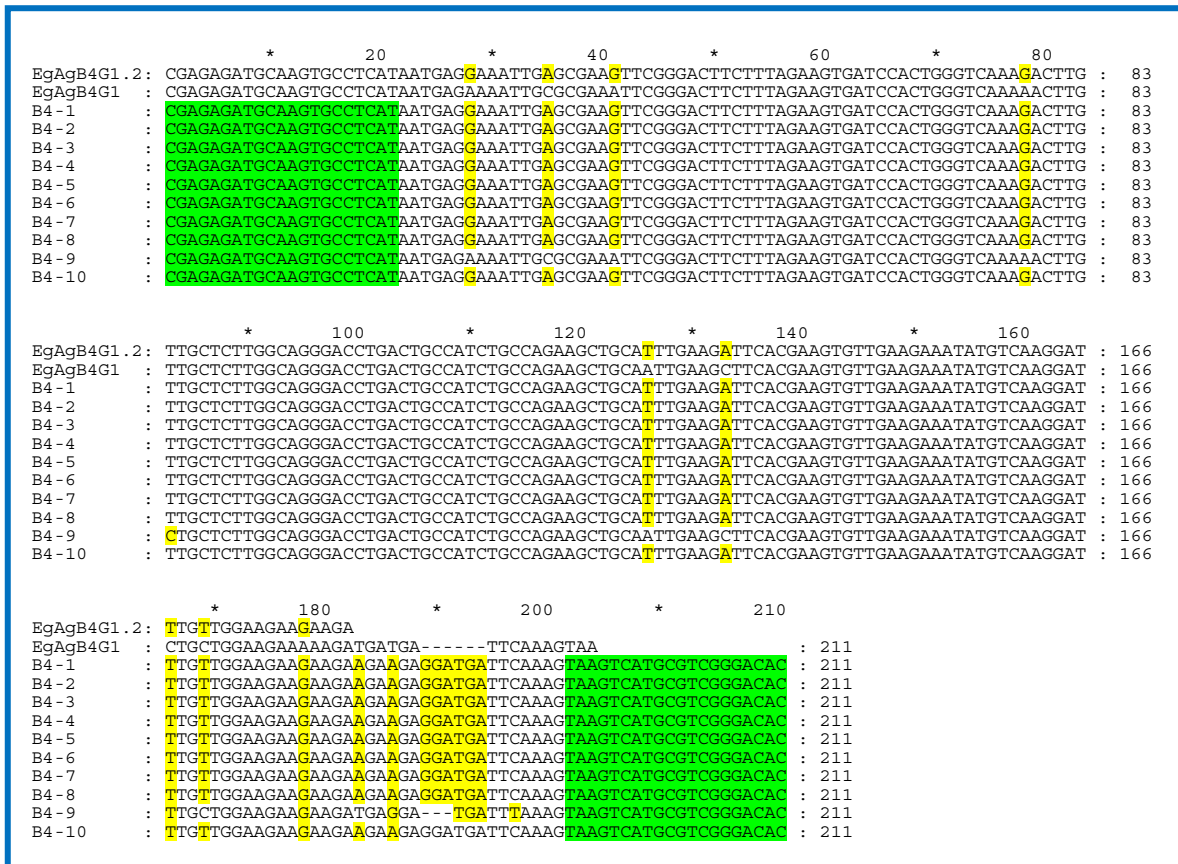


Figura 11. Alinhamento das seqüências de *EgAGB8/4*, representado por B4, de *Echinococcus granulosus*. O número posterior à identificação do gene representa o clone do qual a seqüência foi obtida. Em verde, estão localizados os “primers” utilizados. Em amarelo, as diferenças encontradas em comparação com a seqüência EgAgB4G1. As seqüências utilizadas como referência são EgAgB4G1, número de acesso: AF252859; e EgAgB4G1.2, número de acesso: FJ810072

Os isolados B5-2, B5-3, B5-4 e B5-8 são idênticos entre si e diferem em duas posições em comparação com a seqüência mais comumente encontrada na fase larval do parasito, EgAgB5, o que corresponde a uma similaridade nucleotídica de 98,7%. Já isolado B5-10, não difere da seqüência referência (Figura 12).

EgAgB5	:	GAAGATGACATCGATT	CGAAAGCGAAGAAGGGTGT	CATGAAAAGTGTAGCCGAAT	TAAAAGAATTCTTTGCAAGT	GATCCAAT	:	83
B5-2	:	GAAGATGACATCGATT	CGAAAGCGAAGAAGGGTGT	CATGAAAAGTGTAGCCGAAT	TAAAAGAATTCTTTGCAAGT	GATCCAAT	:	83
B5-3	:	GAAGATGACATCGATT	CGAAAGCGAAGAAGGGTGT	CATGAAAAGTGTAGCCGAAT	TAAAAGAATTCTTTGCAAGT	GATCCAAT	:	83
B5-4	:	GAAGATGACATCGATT	CGAAAGCGAAGAAGGGTGT	CATGAAAAGTGTAGCCGAAT	TAAAAGAATTCTTTGCAAGT	GATCCAAT	:	83
B5-8	:	GAAGATGACATCGATT	CGAAAGCGAAGAAGGGTGT	CATGAAAAGTGTAGCCGAAT	TAAAAGAATTCTTTGCAAGT	GATCCAAT	:	83
B5-10	:	GAAGATGACATCGATT	CGAAAGCGAAGAAGGGTGT	CATGAAAAGTGTAGCCGAAT	TAAAAGAATTCTTTGCAAGT	GATCCAAT	:	83
EgAgB5	:	GGGGCAAAAATTGGCT	CTATTTGCAAGGAGCT	GAAAGATTTCTCCT	TTTTGGCCAGGACAAAAGCT	CGATC	:	154
B5-2	:	GGGGCAAAAATTGGCT	CTATTTGCAAGGAGCT	GAAAGATTTCTCCT	TTTTGGCCAGGACAAAAGCT	CGATC	:	154
B5-3	:	GGGGCAAAAATTGGCT	CTATTTGCAAGGAGCT	GAAAGATTTCTCCT	TTTTGGCCAGGACAAAAGCT	CGATC	:	154
B5-4	:	GGGGCAAAAATTGGCT	CTATTTGCAAGGAGCT	GAAAGATTTCTCCT	TTTTGGCCAGGACAAAAGCT	CGATC	:	154
B5-8	:	GGGGCAAAAATTGGCT	CTATTTGCAAGGAGCT	GAAAGATTTCTCCT	TTTTGGCCAGGACAAAAGCT	CGATC	:	154
B5-10	:	GGGGCAAAAATTGGCT	CTATTTGCAAGGAGCT	GAAAGATTTCTCCT	TTTTGGCCAGGACAAAAGCT	CGATC	:	154

Figura 12. Alinhamento das seqüências de *EgAGB8/5*, representado por B5, de *Echinococcus granulosus*. O número posterior à identificação do gene representa o clone do qual a seqüência foi obtida. Em verde, estão localizados os “primers” utilizados. Em amarelo, as diferenças encontradas em comparação com a seqüência EgAgB5. A seqüência utilizada como referência é EgAgB5, número de acesso: AB260973.

As seqüências analisadas do gene *EgAgB8/3* provenientes do verme adulto de *Echinococcus granulosus* apresentam quatro cópias.

B3-14 difere em apenas uma posição em comparação com a seqüência mais comum encontrada na fase larval do parasito, EgAgB3, o que corresponde a uma similaridade



nucleotídica de 99,5%. Os isolados B3-1, B3-15 e B3-16 são idênticos entre si e diferem em 14 posições, o que equivale a uma similaridade de 93,9% com EgAgB3. Os isolados B3-5, B3-6, B3-7, B3-17 e B3-18 são idênticos entre si e diferem em 16 posições, com uma similaridade de 93% em relação a EgAgB3. Já o isolado B3-11 diverge em 15 posições, com uma similaridade de 93,5% com EgAgB3 (Figura 13).

As seqüências do gene *Mdh* são todas idênticas entre si e em relação ao alelo *Mdh.3* encontrado na fase larval do parasito de *E. ortleppi*, haplótipo G5 (Figura 14).

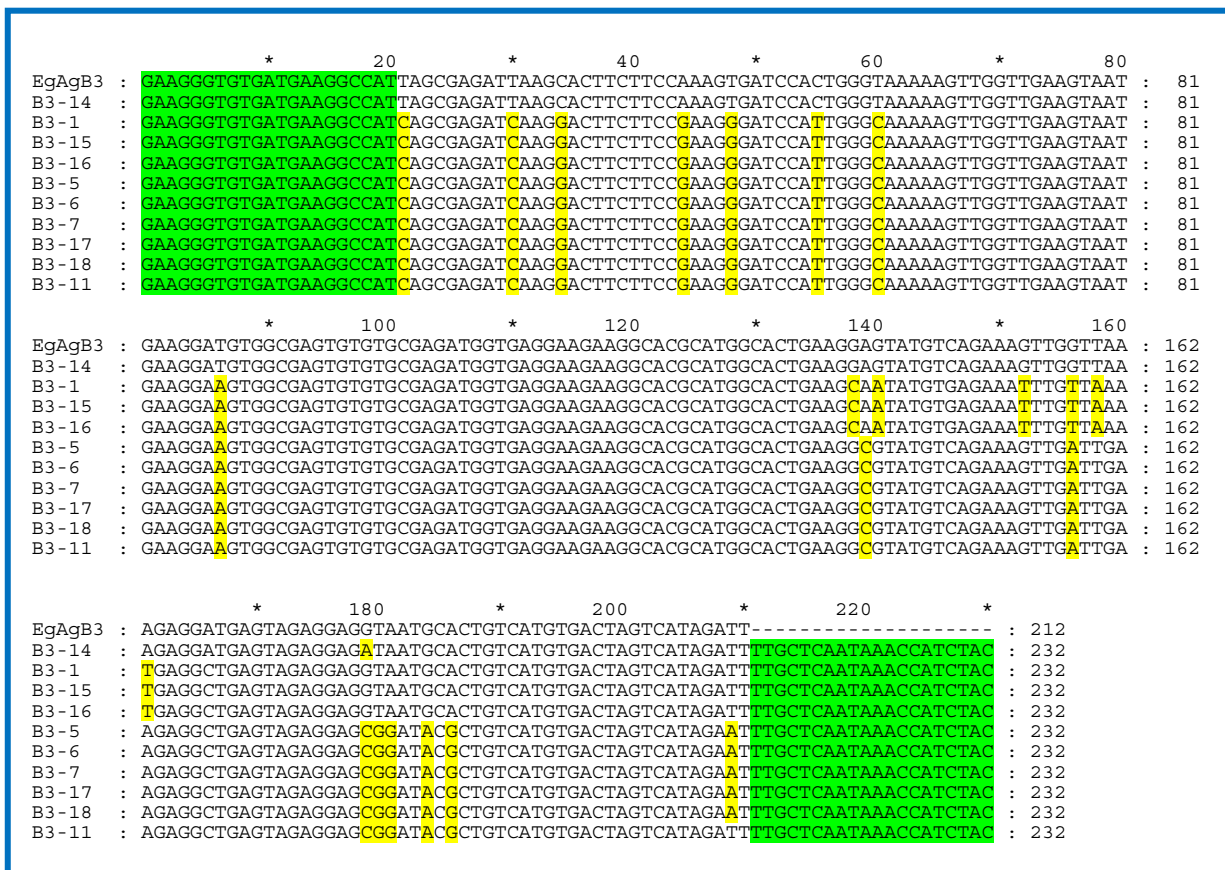


Figura 13. Alinhamento das seqüências de *EgAGB8/3*, representado por B3, de *Echinococcus granulosus*. O número posterior à identificação do gene representa o isolado do qual a seqüência foi obtida. Em verde, estão localizados os “primers” utilizados. Em amarelo, as diferenças encontradas em comparação com a seqüência EgAgB3. A seqüência utilizada como referência é EgAgB3, número de acesso: AF362442.

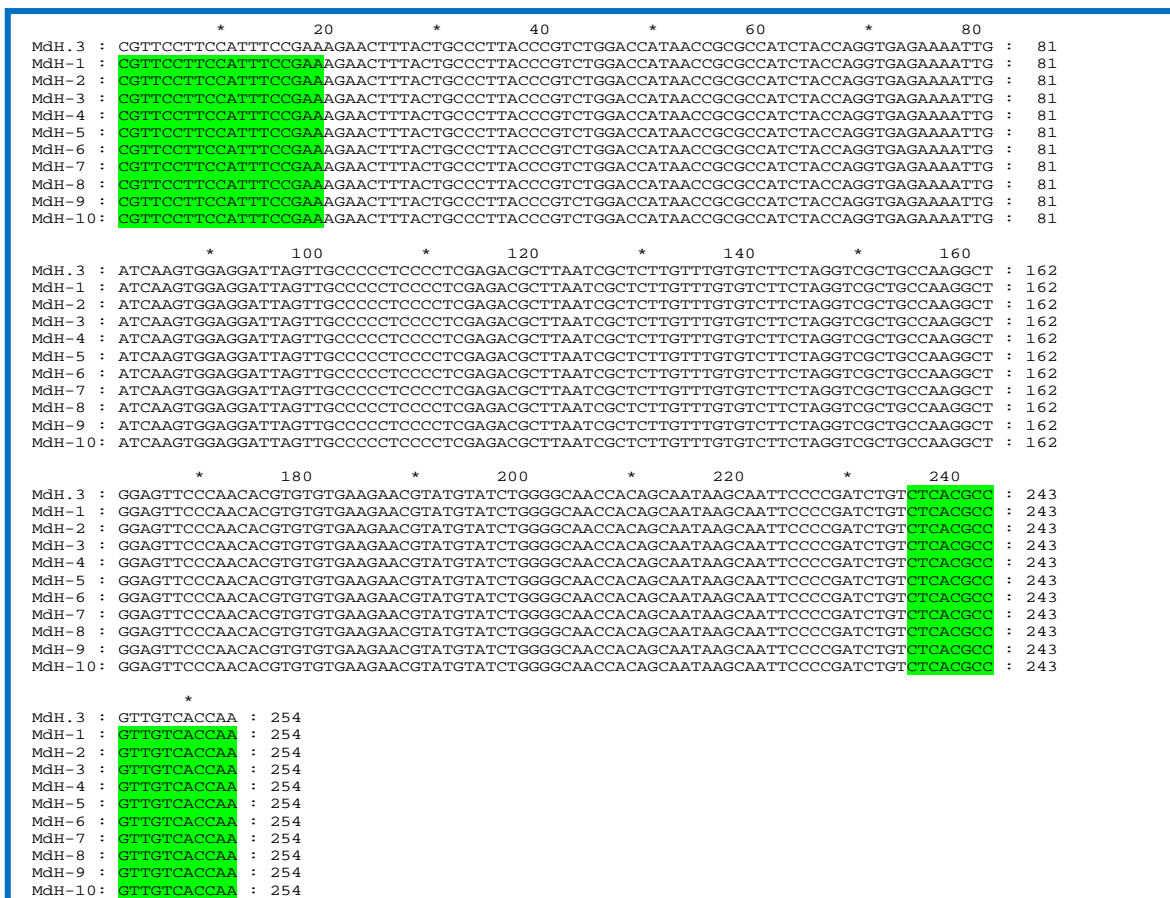


Figura 14. Alinhamento das seqüências de *Mdh* de *Echinococcus granulosus*. O número posterior à identificação do gene representa o clone do qual a seqüência foi obtida. Em verde, estão localizados os “primers” utilizados. A seqüência utilizada como referência é Mdh.3, número de acesso: EF640371.

A variabilidade encontrada nos adultos, dos genes que compõe a família gênica do AgB de *E. granulosus*, é menor do que a relatada no mesmo organismo em sua fase larval, a exceção do gene *EgAgB8/3*, o qual é expresso constitutivamente (Mamuti *et al.* 2006) (Tabela 2).

Nós acreditamos que a redução no número de cópias encontrado no verme adulto esta ligado ao baixo nível de expressão do AgB e com o menor papel na sobrevivência do verme adulto, já que esse helminto em sua fase adulta, parasita o intestino de canídeos. Através da análise das seqüências dos distintos genes que compões a família do AgB é possível verificar que algumas das seqüências, como as encontradas para o gene *EgAgB8/2* e para o gene *Mdh* são pertencentes a espécie *Echinococcus ortleppi*. Como essas seqüências provêm de um verme em sua fase adulta, é de se esperar que o

protoescólex do qual o parasito adulto se originou possuísse tais sequências. Nós acreditamos que tenha havido fecundação cruzada entre as espécies *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus ortleppi*. Não seria possível encontrar as sequências de *E. ortleppi* em um indivíduo que é caracterizado como *E. granulosus* G1, pelo haplótipo mitocondrial, a não ser que tenha ocorrido fecundação cruzada entre os vermes da fase adulta das duas espécies.

Tabela 2. Comparação entre a diversidade alélica encontrada por Haag *et al.* 2004 na fase larval do parasito com a diversidade encontrada no verme adulto. Os números indicam a quantidade de alelos diferentes encontrados em relação ao número total de sequências analisadas, as quais estão entre parênteses.

Genes	Fase Larval	Fase Adulta	Fase Larval	Fase Adulta	P*
			Diversidade de Shannon	Diversidade de Shannon	
EgAgB1	7 (24)	1 (10)	1,171	0	0,001
EgAgB2	12 (24)	2 (10)	1,936	0,3251	0,0003
EgAgB3	8 (34)	4 (10)	1,035	1,168	0,7642
EgAgB4	5 (10)	2 (9)	1,498	0,3251	0,0171
EgAgB5	-	2(5)	-	0,5004	-

\* baseado nas diferenças entre a fase larval e adulta a partir do valor do índice de Shannon.

Nós acreditamos que o aumento do número de cópias na fase larval pode ser gerado a partir de um verme adulto que não apresente uma grande variabilidade gênica em relação ao AgB. Devemos considerar que a maioria dos radicais livres encontrados dentro do cisto hidático do *E. granulosus* são de origem do hospedeiro, que libera tais substâncias na tentativa de desestabilizar e levar o cisto hidático a morte (Docampo, 1995). Os radicais livres liberados pelo hospedeiro podem causar danos em todas as classes de moléculas do parasito, podendo inclusive provocar modificações de bases e mesmo quebras nas fitas do DNA do parasito. Na tentativa de reparar esses danos graves é possível que o cisto utilize de seus mecanismos de reparo (Jun Li, *et al.* 2003). O reparo mitótico do DNA pode gerar o aumento do número de cópias na fase larval do *Echinococcus*.

## **CAPÍTULO IV: FREQUÊNCIA DIFERENCIAL DE *Echinococcus granulosus* E *Echinococcus ortleppi* EM BOVINOS ABATIDOS NO ESTADO DO RS.**

### **1. MATERIAL E MÉTODOS**

O Laboratório de Biodiversidade e Evolução possui um banco de DNA do parasito *Echinococcus* contendo 818 amostras, as quais foram obtidas de varias regiões da América do Sul, Europa e África. O material começou a ser coletado e armazenado no ano de 1997, e segue até os dias de hoje. Metade das amostras do banco são oriundas do Rio Grande do Sul. Os protoescólecis obtidos de cistos hidáticos individuais encontrados nas vísceras de bovinos foram obtidas em frigoríficos do RS.

Para este estudo foram consideradas as amostras referentes aos anos de 2001 até 2008. Cada cisto foi considerado como um indivíduo (isolado). Infelizmente, devido ao modo de coleta e dos procedimentos do frigorífico não foi possível determinar se diferentes isolados eram provenientes de um mesmo animal.

O DNA, extraído pelo método de fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001), de 297 amostras oriundas de infecções em bovinos, que pertencem ao banco de amostras do Laboratório de Biodiversidade e Evolução, foi utilizado para determinar o haplótipo mitocondrial dos isolados.

#### **1.2. Determinação dos haplótipos e análise estatística**

Para determinar os haplótipos mitocondriais das duas espécies mais frequentes do rebanho gaúcho, *E. granulosus* e *E. ortleppi*, utilizou-se a sequência da subunidade 1 da citocromo oxidase (*cox 1*). A partir do DNA total foram feitas amplificações do gene utilizando os primers 5'TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT3' (direto) e 5'TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG 3' (reverso) (Bowles *et al.* 1992). Cada uma das reações continha entre 30-100 ng de DNA, 8mM de dNTPs, 20pmois de cada uma dos primers, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidade de Taq DNA polimerase (INVITROGEN ®), 1,5mM de buffer (20nM Tris- HCL e 50mM KCL) e água mili-Q para completar o volume final de 25 ul. As amplificações foram feitas por “touchdown” pelo programa TD55-45. Os amplicons obtidos eram então submetidos à digestão com a enzima *Alu I* (INVITROGEN ®). As clivagens foram realizadas com 0,2ul de enzima, 1ul de buffer,

3,8ul de água mili-Q e 5ul de produto de PCR durante seis horas. O sítio de clivagem para a enzima de restrição *AluI* está presente somente nas seqüências de G1 e G2. Nenhuma das seqüências de outras linhagens possui tal sítio de restrição (Graichen, 2007). Esse trabalho não avaliou o haplótipo mitocondrial G3.

Os dados obtidos foram agrupados em biênios, 2001/2002, 2003/2004, 2007/2008. Utilizou-se o teste de qui-quadrado, em cada biênio, para comparar o número de isolados contendo ou não o sítio de clivagem para *Alu I*, com nível de significância de 0,05. A hipótese nula era a de que ambas as formas ocorrem na mesma frequência.

Realizou-se o teste de qui-quadrado de tendência para verifica se há uma tendência crescente na frequência de *E. ortleppi* em cistos férteis. A hipótese nula era a de que não há tendência de crescimento ou decrescimento.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição dos parasitos *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus ortleppi* varia com o passar dos anos. Há indícios de uma mudança na ocorrência das espécies no Rio Grande do Sul em bovinos, pois foi encontrada uma proporção significativamente menor de *E. ortleppi* em relação a *E. granulosus* nos anos mais recentes. O mesmo não ocorre nos posteriores. Nas coletas de 2001/2002 a frequência relativa de G1 em cistos hidáticos era de 0,74. Em 2003/2004 esta frequência caiu para 0,63; no biênio 2007/2008 verificou-se uma nova diminuição de G1 para 0,60. A diferença entre *E. granulosus* e *E. ortleppi* é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no biênio 2001/02. O mesmo não ocorre nos outros dois biênios analisados (Figura 15).

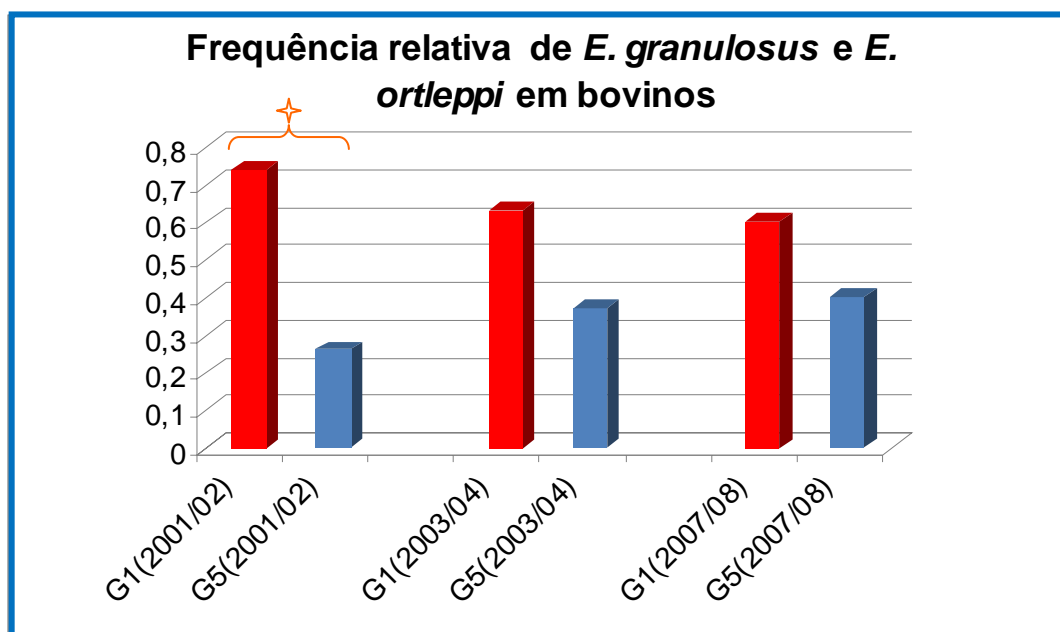


Figura 15. Frequência relativa das espécies *E. granulosus* representada por G1 e *E. ortleppi* representada por G5 ao longo dos anos em bovinos do RS. O símbolo ✨ indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre *E. granulosus* e *E. ortleppi* utilizando-se do teste de qui-quadrado.

Contudo, a partir do teste de qui-quadrado de tendência ( $p = 0,3180$ ) não se verificou um crescimento estatisticamente significativo na frequência de *E. ortleppi*, em cistos férteis, no decorrer dos anos analisados.

Fígado e pulmão foram os órgãos onde os cistos hidáticos foram encontrados. No fígado de bovino há uma ocorrência significativamente maior de *E. granulosus*, 67 dos 70 isolados ( $p < 0,05$ ). *Echinococcus ortleppi* parasita mais frequentemente o pulmão que o fígado de bovinos (Tabela 3). De La Rue *et al.* (2006) encontraram no estado do Rio Grande do Sul o parasito *E. ortleppi* apenas em pulmão de bovinos, todos os cistos hidáticos que parasitavam o fígado foram identificados como *Echinococcus granulosus*, o que coincide com os resultados encontrados no presente trabalho.

Tabela 3. Órgão infectado e número de cistos hidáticos entre os anos de 2001 a 2008.

Espécie	Hospedeiro	Órgão parasitado	Número de cistos			Somatório
			2001/02	2003/04	2007/08	2001/08
<i>E. granulosus</i>	bovino	pulmão	58	54	37	149
		fígado	24	17	26	67
<i>E. ortleppi</i>	bovino	pulmão	21	32	25	78
		fígado	1	1	1	3

Analisando a prevalência de equinococose nos bovinos abatidos no Rio Grande do Sul, 10,65% em 2001, 10,22% em 2004 e 10,20% em 2007 (dados do Ministério da Agricultura), não se percebe nenhuma alteração significativa no decorrer dos anos de 2001 a 2008.

*E. ortleppi* é uma espécie que tem morfologia única, um desenvolvimento precoce em cães se comparado aos demais haplótipos da espécie *E. granulosus*. Possui uma predileção por pulmão em seus hospedeiros intermediários, em contraste com *E. granulosus* que usualmente apresenta cistos férteis no fígado de seus hospedeiros (Thompson *et al.* 1984).

Nós sugerimos que o aumento da frequência de cistos férteis de *E. ortleppi* nos bovinos, ocorre em detrimento de *E. granulosus*, o que poderia ser um indicativo da melhor

adaptação ao hospedeiro, e uma introdução mais recente desta espécie do parasito *Echinococcus ortleppi*.

As vísceras oferecidas pelo frigorífico eram oriundas de: Aceguá, Alegrete, Arroio Grande, Bagé, Cacequi, Cachoeira do Sul, Carazinho, Dom Pedrito, Herval, Itaqui, Jaguarão, Lavras do Sul, Livramento, Pântano Grande, Quaraí, Santiago, Sentinela, São Gabriel, São Pedro do Sul, São Sepé, Triunfo, Tupaciretã e Uruguaiana (Figura 16).

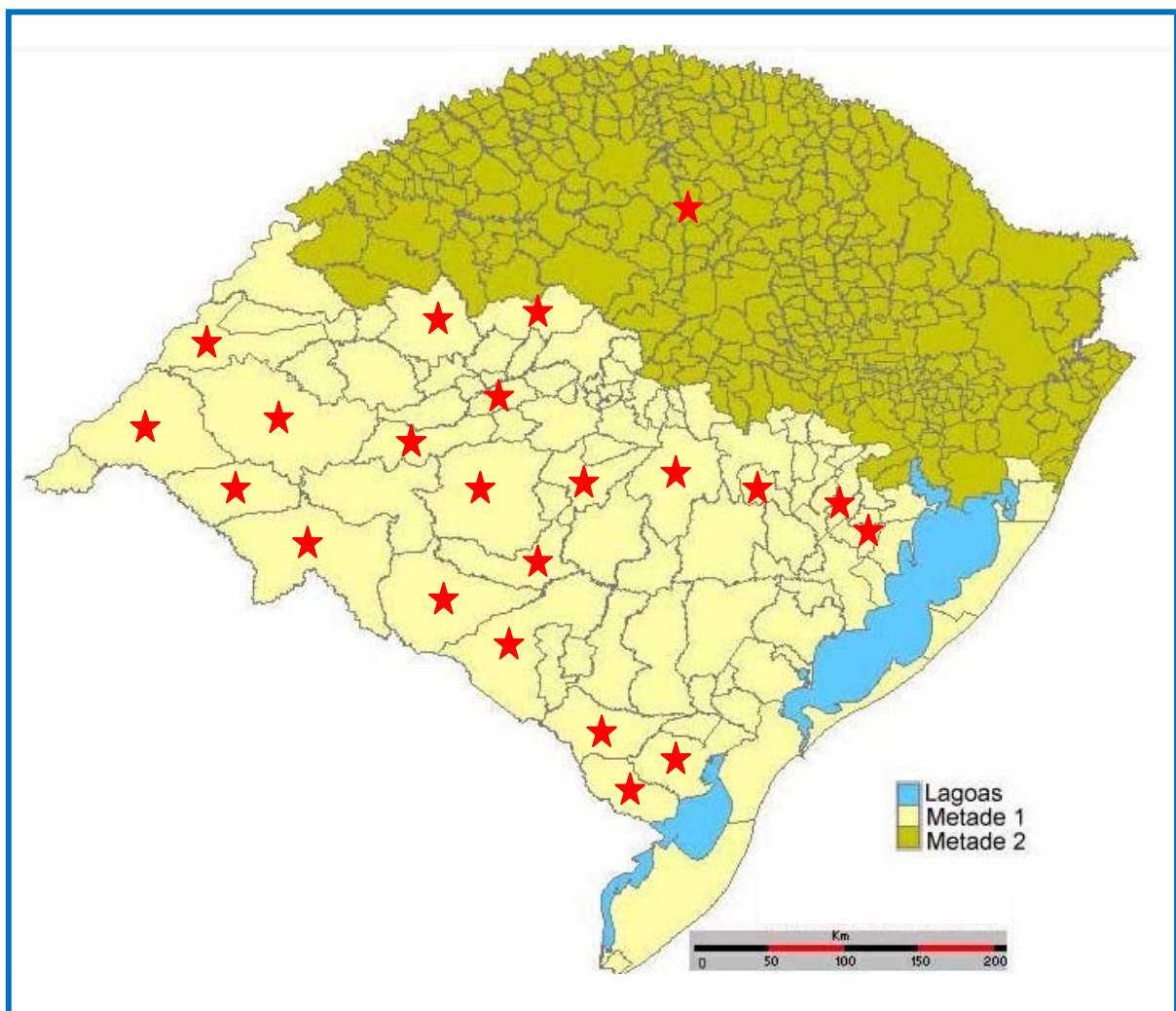


Figura 16. Localização das vísceras de bovinos obtidas através do frigorífico Rosti, estado do RS.



Fica evidente a sobreposição dos locais amostrados com os dados fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2004, referente ao efetivo bovino no estado (Figura 17). Assim, nós acreditamos que é graças ao comportamento humano que o ciclo doméstico do *Echinococcus* se perpetua no Rio Grande do Sul.

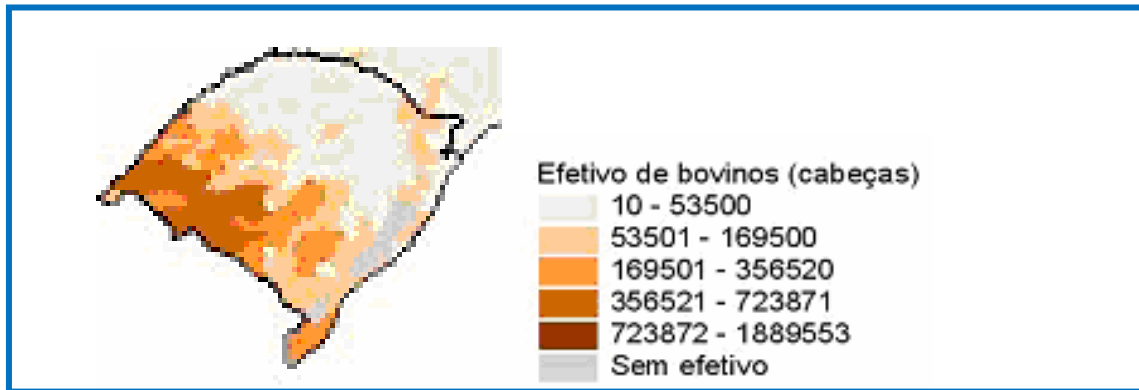


Figura 17. Dados do IBGE de 2004 mostram o efetivo bovino no estado do RS.

## CAPÍTULO V: CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou o quão diferente, entre uma espécie e outra de parasito, pode ser um mesmo gene que esta relacionado à evasão da resposta imune de um hospedeiro. Isso muito provavelmente acontece porque os antígenos de parasitos que mantêm interação direta com o sistema imune do hospedeiro se encontram sujeitos a forte pressão seletiva. É importante lembrar que cada tipo de hospedeiro, e até cada indivíduo, possui uma resposta imune única, composta de proteínas e epítomos únicos. Dessa forma, o parasito é direcionado pela seleção natural a possuir uma variedade, o mais ampla possível, de genes relacionados à sua proteção. A disputa parasito-hospedeiro influencia diretamente no processo de coevolução de ambos (Conway e Polley, 2002). *Echinococcus granulosus* é um exemplo de como a coevolução pode moldar a estrutura genética de um organismo. Haag *et al.*, 2004b sugerem que a seleção imposta pelo sistema imune do hospedeiro intermediário possa estar envolvida com a origem desta variabilidade encontrada dentro de *E. granulosus*.

É possível observar a diferença significativa de variabilidade gênica entre a fase adulta e a larval do AgB de *E. granulosus*. A diminuição de diversidade alélica no verme adulto corresponde diretamente a pouca ou nenhuma necessidade de expressão do AgB. O parasito adulto esta exposto principalmente a efeitos mecânicos e a secreções liberadas provindas do hospedeiro. Esses efeitos aliado ao fato de os canídeos possuírem um sistema imune particular e diferente dos bovinos, faz com que a pressão seletiva sobre o verme adulto seja diferente da que é exercida sobre o helminto em sua fase larval. É provável que o *Echinococcus* adulto necessite de uma gama de antígenos diferente da que lhe é exigida na fase larval. Esses antígenos específicos, muito provavelmente, não são os pertencentes à família do AgB.

A partir da análise das sequências, nós acreditamos que o verme adulto utilizado como molde para a amplificação dos genes seja um híbrido entre *Echinococcus granulosus* (G1) e *Echinococcus ortleppi* (G5) como já encontrado por Haag (1997).

A taxonomia total do gênero *Echinococcus* ainda é algo confuso, em grande parte devido a pouca informação epidemiológica disponível. Nós acreditamos que é muito provavelmente pela falta de informação e da correta divulgação que a equinococose se perpetua no Estado. Além do fato do *Echinococcus* possuir uma grande diversidade alélica na fase larval, o não conhecimento de qual espécie esta parasitando os bovinos

de nosso estado, proporciona a manutenção da equinococose em nosso rebanho. Isso pode estar ocorrendo, pois ambas as espécies possuem diferenças no período de maturação do cisto hidático e do verme adulto.

O mais urgente neste momento é a necessidade de uma maior informação em relação à equinococose, especialmente em relação à prevenção. O controle da equinococose será alcançado apenas quando houver a implementação de programas de controle mais específicos e que disponibilizem a informação ao grande público sobre o risco em nível de saúde pública e em relação às perdas econômicas geradas pela equinococose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGULO, J. C.; SNACHEZ-CHAPADO, M.; DIEGO, A.; ESCRIBANO, J.; TOMAYO, J. C.; MARTIN, L. Renal echinococcosis: clinical study of 34 cases. **The journal of urology**. v. 157, p.787-794. 1997.

AREND, A. C.; ZAHA, A.; AYALA, F. J.; HAAG, K. L. The Echinococcus granulosus antigen B shows a high degree of genetic variability. **Experimental Parasitology**. v. 108, p. 76-80. 2004.

BADARACO, J.L. (2007). *Caracterização do polimorfismo de Echinococcus granulosus em dois genes nucleares e um mitocondrial: evidências de introgressão*. Porto Alegre, UFRGS, Dissertação de mestrado.

BOWLES, J.; BLAIR, D.; MCMANUS, D. P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 54, p. 165-174. 1992.

BREYER, I.; GEORGIEVA, D.; KURDOVA, R.; GOTTSTEIN, B. Echinococcus granulosus strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. **Parasitology Research**. v. 93, p. 127-130. 2004.

BUDKE, C. M.; DEPLAZES, P.; TORGERSON, P. R. Global socioeconomic impact of cystic Echinococcosis. **Emerging Infectious diseases**. v. 12, p. 296-303. 2006.

CHEMALE, G.; HAAG, K. L.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 116, p. 233-237. 2001.

CHEMALE, G.; FERREIRA, H. B.; BARRET, J.; BROPHY, P. M.; ZAHA, A. *Echinococcus granulosus* antigen B hydrofobic ligand binding properties. **Biochimica Biophysica Acta** v. 1747, p. 189-194. 2005.

COHEN, H.; PAOLILLO, E.; BONIFACINO, R.; BOTTA, B.; PARADA, L.; CABRERA, P. Human cystic echinococcosis in a Uruguayan community: a

sonographic, serologic, and epidemiologic study. **American Journal of tropical Medicine and Hygiene**. v. 59, p. 620-627. 1998.

CONWAY, D. J.; POLLEY, S.D. Measuring immune selection. *Parasitology*. v. 125, p. 3-16. 2002.

CRAIG, P. S.; MCMANUS, D. P.; LIGHTOWLERS, M. W.; CHABALGOITY, J. A.; GARCIA, H. H.; GAVIDIA, C. M.; GILMAN, R. H.; GONZALEZ, A. E.; LORCA, M.; NAQUIRA, C.; NIETO, A.; SCHANTZ, P. M. Prevention and control of cystic echinococcosis. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 7, p. 385-394. 2007.

DE LA RUE, M. L.; DINKEL, A.; MACKENSTEDT, U.; ROMIG, T. New data os Echinococcus spp. In southern Brazil. **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 48, p. 103-104. 2006.

DOCAMPO. In: MARR, J. J. and MULLER, M. Editors. Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. **Antioxidant mechanisms**. Academic Press, London. 1995.

ECKERT, J.; SCHANTZ, P. M.; GASSER, R. B.; TORGERSON, P. R.; BESSONOV, A. S.; MOVSESSIAN, S. O.; et al. Geografic distribution and prevalence. In: ECKERT, J.; GEMMELL, M. A.; MESLIN, F. X.; PAWLOWSKI, Z. S., editors. **Manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern**. Paris: Office International des Epizooties; 2001. p. 100-142.

FERNÁNDEZ, V.; FERREIRA, H. B.; FERNÁNDEZ, C.; ZAHA, A.; NIETO, A. Molecular characterization of a novel 8 kDa subunit of Echinococcus granulosus antigen B. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 77, p. 247-250, 1996.

FROSH, P.; HARTMANN, M; MÜHLSCLEGEL, F.; FROSH, M. Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. **Molecular and Biochimecal Parasitology**. v. 64, p. 171-175. 1994.

GRAICHEN, D. A. S. Discriminação entre as linhagens ovina e bovina de *Echinococcus granulosus* através de PCR-RFLP. **XX Congresso brasileiro de Parasitologia 2007.**

GONZÁLEZ-SAPIENZA, G.; LORENZO, C.; NIETO, A. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 38, p. 3979-3983. 2000.

GUARNERA, E. A. Evaluación de costos de la endemia por *Echinococcus granulosus* em la república Argentina. **Documento de la Filial Argentina de la Asociación Internacional de Hidatidología.** 2001.

GUARNERA, E. A.; PARRA, A.; KAMENETZKY, L.; GARCIA, G.; GUTIÉRREZ, A. Cystic Echinococcosis in Argentina: Evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. **Acta Tropical.** v.92, p. 153-159. 2004.

HAAG, K. L. (1997). Análise da variabilidade genética em regiões codificadoras e não-codificadoras do genoma do parasito *Echinococcus* (Cestoda, Taeniidae): uma abordagem evolutiva. Porto Alegre, UFRGS, Tese de Doutorado.

HAAG, K.L.; ALVES-JUNIOR, L., ZAHA, A., AYALA, F.J. Contingent, non-neutral evolution in a multicelular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. **Gene.** v. 333, p. 157-167. 2004.

HAAG, K.L.; GOTTSTEIN, B.; MULLER, N.; SCHNORR, A.; AYALA, F.J. Redundancy and recombination in the *Echinococcus* AgB multigene family: is there any similarity with protozoan contingency genes? **Parasitology.** v. 133, p. 411-419. 2006a.

HAAG, K. L.; ZANOTTO, P. M. A.; ALVES, L.; GASSER, R. B.; ZAHA, A.; AYALA, F. J. Searching for antigen B genes and their adaptative sites in distinct and species of the helminth *Echinococcus*. **Infection, Genetics and Evolution.** v. 6, p. 251-261. 2006b.

HAMMER; HARPER; RYAN. Past: palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeont Electron*. 2001.

HARRIS, A.; HEATH, D. D.; LAWRENCE, S. B.; SHAW, R. J. *Echinococcus granulosus*: ultrastructure of epithelial changes during the first 8 days of metacestode development in vitro. **International Journal for Parasitology**. v. 19, p. 621-629. 1989.

HEATH, D. D.; LAWRENCE, S. B. Daily egg-production dogs infected with *Echinococcus granulosus*. **Archives de la Hidatidose**. v. 30, p. 321-328. 1991.

HÜTTNER, M.; NAKAO, M.; WASSERMANN, T.; SIEFERT, L.; BOOMKER, J. D.; DINKEL, A.; SAKO, Y.; MACKENSTEDT, U.; ROMING, T.; ITO, A. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. **International Journal Parasitology**. v. 38, p. 861-868. 2008.

JENKINS, D. J. *Echinococcus* in Australia: the role of wildlife in transmission, with particular reference to South Eastern Australia. In: CRAIG, P.; PAWLOWSKI, Z. editors. *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis an emergent and global problem*. Amsterdam. 2002. p. 327-332.

JENKINS, D. J. *Echinococcus granulosus* in Australia, widespread and doing well! **Parasitology International**. v. 55, p. 203-206. 2006.

JUN LI; ZHANG, W.; LOUKAS, A.; LIN, R.; ITO, A.; ZHANG, L.; JONES, M.; MCMANUS, D. P. Functional expression and characterization of *Echinococcus granulosus* thioredoxin peroxidase suggests a role in protection against oxidative damage. **Gene**. v. 326, p. 157-165. 2003.

LAVIKAINEN, A.; LEHTINEN, M. J.; MERI, T.; HIRVELA-KOSKI, V.; MERI, S. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. **Parasitology**. v. 127, p. 207-215. 2003.

LIGHTOWLES, M. W. e GOTTSTEIN, B. Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. In: Thompson R. C., Lymbery A. J., editors. ***Echinococcus and hydatid disease***. London: CAB International; 1995. p. 355-410.

LIGHTOWLES, M. W.; LIU, D.; HARALAMBOUS, A.; RICKARD, M. D. Subunit composition and specificity of major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. ***Molecular Biochemical Parasitology***. v. 37, p. 171-182. 1989.

LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. Eletrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australian. ***International Journal for Parasitology***. v. 18, p. 803-811. 1988.

MAGAMBO, J.; NJOROGE, E.; ZEYHLE, E. Epidemiology and control of echinococcosis in sub-Sahara Africa. ***Parasitology International***. v. 55, p. 193-195. 2006.

MAMUTI, W.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; XIAO, N.; NAKAYA, K.; ISHIKAWA, Y.; YAMASAKI, H.; LIGHTOWLERS, M. W.; ITO, A. Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. ***Parasitology***. v. 55, p. 57-62. 2006.

MAMUTI, W.; SAKO, Y.; BART, J.; NAKAO, M.; MA, X.; WEN, H.; ITO, A. Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of antigen B from *Echinococcus granulosus* genotypes 1 and 6. ***Parasitology International***. v. 56, p. 313-316. 2007.

MANTEROLA, C.; BENAVENTE, F.; MELO, A.; VIAL, M. Description of *Echinococcus granulosus* genotypes in human hydatidosis in a region of southern Chile. ***Parasitology International***. v. 57, p. 342-346. 2008.

MARAVILLA, P.; THOMPSON, R. C.; PALACIOUS-RUIZ, J. A.; ESTCOURT, A.; RAMIREZ-SOLIS, E.; MONDRAGON-DE-LA-PENÁ, C.; MORENO-MOLLER, M.; CARDENAS-MEJIA, A.; MATA-MIRANDA, P.; AGUIRRE-ALCANTARA, M.; BONILLA-RODRIGUEZ, C.; FLISSERA, A. *Echinococcus granulosus* cattle strain



identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. **Acta Tropica**. v. 92, p. 231-236. 2004.

MCMANUS, D. P.; THOMPSON, R. C. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. **Parasitology**. v. 127, p. 37-51. 2003.

MONTEIRO, K. M.; SCAPIN, S. M.; NAVARRO, M. V.; ZANCHIN, N. I.; CARDOSO, M. B.; DA SILVEIRA, N. P.; GONÇALVES, P. F.; STASSEN, H. K.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1774, p. 278-285. 2007.

MORO, P. L.; MCDONALD, J.; GILMAN, R. H.; SILVA, B. VERASTEGUI, M.; MALQUI, V.; LESCANO, G.; FALCON, N.; MONTES, G.; BAZALAR, H. Epidemiology of *Echinococcus granulosus* infection in the central Peruvian Andes. **Bulletin World Health Organization**. v. 75, p. 553-561. 1997.

MORO, P.; SCHANTZ, P. M.; Cystic echinococcosis in the Americas. **Parasitology International**. v. 55, p. 181-186. 2006.

MORO, P. L.; SCHANTZ, P. M. *Echinococcosis*: a review. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 13, p. 125-133. 2009.

MUSIANI, P.; PIANTELLI, M.; LAURIOLA, L.; ARRU, E.; POZZUOLI, R. *Echinococcus granulosus*: specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. **Journal Clinical Pathology**. v. 31, p. 475-478. 1978.

NAKAO, M.; MCMANUS, D. P.; SCHANTZ, P. M.; CRAIG, P. S.; ITO, A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. **Parasitology**. v. 134, p. 713-722. 2007.

ORIOLO, R.; ORIOLO, C. Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 24, p. 96-100. 1975.

ORIOLO, R.; WILLIAMS, J. F.; ESANDI, M. V. P.; ORIOLO, C. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. **Am J Trop Med Hyg.** v. 20, p. 569-574. 1971.

PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Hidatidosis 3ª reunion del proyecto subregional cono sur de control y vigilância de la hidatidosis. p. 1-62. 2006.

ROMIG, T. Epidemiology of echinococcosis. **Langenbecks archives of surgery.** v. 388, p.209-217. 2003.

ROMIG, T.; DINKEL, A.; MACKENSTEDT, U. The present situation of echinococcosis in Europe. **Parasitology International.** v. 55, p. 187-191. 2006.

SAARMA, U.; JOGISALU, I.; MOKS, E.; VARCASIA, A.; OKSANEN, A.; SIMSEK, S.; ANDRESIUK, V.; DENEGRİ, G.; GONZÁLEZ, L. M.; FERRER, E.; GÁRATE, T.; RINALDI, L.; MARAVILLA, P. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. **Parasitology.** V. 136, p.317-328. 2009.

SADJJADI, S. M. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. **Parasitology International.** v. 55, p. 197-202. 2006.

SAGHIR, N.; CONDE, P. J.; BROPHY, P. M.; BARRET, J. Biochemical characterization of a hydrophobic ligand binding protein from the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. **International Journal of Parasitology.** v. 31, p. 653-660. 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 3ª edição. 2001.

SHEPHERD, J. C.; AITKEN, A.; MCMANUS, D. P. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. **Molecular Biochemical Parasitology**. v. 44, p. 81-90. 1991.

THOMPSON, R. C. A.; KUMARATILAKE, L. M.; ECKERT, J. Observations on *Echinococcus granulosus* of cattle origin in Switzerland. *International Journal of Parasitology*. v. 14, p. 283-291. 1984.

THOMPSON, R. C. Biology and systematics of *Echinococcus*. In: Thompson R. C., Lymbery A. J., editores. ***Echinococcus and hydatid disease***. London: CAB International; 1995. p. 1-37.

THOMPSON, R. C.; MCMANUS, D. P. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. **Trends Parasitology**. v. 18, p. 452-457. 2002.

TORGERSON, P. R.; BUDKE, C. M. Echinococcosis – an international public health challenge. **Research in Veterinary Science**. v. 74, p. 191-202. 2003.

TORGERSON, P. R.; HEATH, D. D. Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. **Parasitology**. v. 127, p. 143-158. 2003.

TORGERSON, P. R.; OGULJAHAN, B.; MUMINOV, A. E.; KARAEVA, R. R.; KUTTUBAEV, O. T.; AMINJANOV, M.; SHAIKENOV, B. Present situation of echinococcosis in Central Asia. **Parasitology International**. v. 55, p. 207-212. 2006.

VILLALOBOS, N.; GONZÁLEZ, L. M.; MORALES, J.; DE ALUJA, A. S.; JIMÉNEZ, M. I.; BLANCO, M. A.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E.; GÁRATE, T. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolates from pigs in México. **Veterinary Parasitology**. v. 147, p. 185-189. 2007.

VIRGINIO, V. G.; HERNANDEZ, A.; ROTT, M. B.; MONTEIRO, K. M.; ZANDONAI, A. F.; NIETO, A.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis

of human cystic hydatid disease. **Clinical Experimental Immunology**. v. 132, p. 309-315. 2003.

XIAO, N.; QIU, J.; NAKAO, M.; LI, T.; YANG, W.; CHEN, X.; SCHANTZ, P. M.; CRAIG, P. S.; ITO, A. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. **International Journal of Parasitology**. v. 35, p. 693-701. 2005.