

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Antígeno B de *Echinococcus*: Instabilidade genômica, variação no verme
adulto e anticorpos policlonais**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Daniel Ângelo Sganzerla Graichen

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Karen Luisa Haag

Porto Alegre, abril de 2011

“O homem nasceu para aprender, aprender tanto quanto a vida lhe permita”
(Guimarães Rosa).

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biodiversidade e Evolução do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Pesquisa do Instituto de Parasitologia da Universidade de Berna, Suíça. Também contamos com a colaboração do Laboratório de Fungos Filamentosos e do Laboratório de Cestódeos, ambos pertencentes ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Aos professores orientadores deste trabalho, Karen Haag e Bruno Gottstein, pelo apoio, confiança e ensinamentos;

Aos demais professores que colaboraram de alguma maneira para a realização deste trabalho, Augusto Schrank, Arnaldo Zaha, Norbert Müller, Andrew Hemphill, Lavínia Faccini e Mario de la Rue;

Aos funcionários do PPG Genética e Biologia Molecular, Elmo e Ellen pela presteza e disposição em ajudar em tudo que fosse possível

Aos colegas do departamento de genética, que mesmo anonimamente contribuíram para minha formação, apresentando seminários que propiciaram uma formação mais ampla e completa;

Aos colegas do centro de biotecnologia, em especial, ao Martin, Karina L, Lu, Aline, Helier e Edi, pelas trocas de informações sempre muito úteis;

Aos colegas do instituto de Parasitologia da Universidade de Berna, Maria, Dorothea, Thierry, Karin, Nashrin, Chiaki e, especialmente, ao Markus e Britta, que tornaram a minha vida longe de casa muito menos complicada;

Aos colegas do Laboratório de Biodiversidade e Evolução, Ana, Pedro, Andressa e, especialmente, ao Guilherme pela ajuda, apoio e pela amizade.

À minha família, pela confiança depositada em mim e por mesmo sem compreender o que eu faço entender a minha escolha pela ciência;

À comissão de pós-graduação, pela paciência e apoio;

À Cris, que durante todo o tempo foi a pessoa que mais me apoiou e ajudou, obrigado pelo carinho, compreensão e incentivo.

Para Cris, por tudo o que representa.

Sumário

Resumo	9
Abstract.....	11
Capítulo 1: Introdução e revisão bibliográfica.....	13
1. <i>Echinococcus</i> e a equinococose.....	13
2. Mecanismos parasitários de reposta aos hospedeiros.....	23
3. Instabilidade genômica como estratégia evolutiva.	29
4. Antígeno B – Função, Expressão e Diversidade	32
Capítulo 2: Justificativas científicas e objetivos.....	41
1. Justificativas.....	41
2. Objetivos	41
Capítulo 3: Manuscrito 1	43
Genomic instability of <i>Echinococcus</i> inferred from Antigen B gene numbers.....	43
Abstract.....	44
Author summary	45
1. Introduction	46
2. Materials and Methods.....	48
2.1 Parasite materials	48
2.2 Southern blots.....	49
2.3 AgB quantification in single protoscoleces.....	50
2.4 In silico survey for AgB-related sequences on <i>E. multilocularis</i> genome.....	51
3. Results	51
3.1 Genomic organization of AgB loci in <i>E. granulosus</i> and <i>E. ortleppi</i>	51
3.2 Metacestode heterogeneity in AgB number of copies.	52
3.3 Genome analysis reveals putative AgB genes	53
4. Discussion.....	54
5. References.....	59
Legends to figures	65
Figure 1.....	66
Figure 2.....	67
Figure 3.....	68

Figure S1	69
Table S1	70
Table S2	72
Capítulo 4:	74
Seqüências de verme adulto de <i>Echinococcus</i> revelam baixa heterogeneidade de seqüências do AgB e possível caso de hibridação	74
1. Introdução	75
2. Material e Métodos	77
2.1 Material Biológico	77
2.2 Métodos moleculares	77
2.3 Métodos estatísticos	80
3. Resultados	80
3.1 Análise das seqüências dos genes controle	80
3.2 Variantes dos genes do AgB	81
3.3 Comparação entre a diversidade dos genes do AgB nos estágios de metacestóide e adulto	84
4. Discussão	86
4.1 Mistura entre <i>E. granulosus sensu stricto</i> e <i>E. ortleppi</i>	86
4.2 Número de cópias dos genes do AgB	87
4.3 Diversidade de seqüências do adulto	88
5. Referências Bibliográficas	90
Capítulo 5: Manuscrito 3	101
Produção de anticorpos policlonais contra subunidades específicas do Antígeno B de <i>Echinococcus granulosus</i>	101
1. Introdução	102
2. Materiais e métodos	104
2.1 Produção dos antígenos	104
a) Clonagem, expressão e purificação de Antígeno B recombinante (recAgB) em <i>Escherichia coli</i>	104
b) Seleção e síntese de oligopeptídeos representativos de AgB1-5	108
2.2 Imunização em camundongos, coleta do soro e Western Blot	115
3. Resultados e discussão	115
3.1 Os plasmídeos recombinantes não foram eficientes para expressar recAgB.	115
3.2 A inserção do gene GFP ao construto aumentou o nível de expressão	116

3.3	Reposta imune contra o recAgB e oliAgB: reação cruzada é uma marca das moléculas relacionada ao AgB	119
4.	Comentários finais	122
5.	Referencias Bibliográficas	123
Capítulo 6: Considerações finais		128
1.	Conclusões	128
2.	Dificuldades e limitações	131
2.1	Diferentes estágios de <i>Echinococcus</i>	131
2.2	Produção de antígenos e anticorpos	133
3.	Instabilidade genômica e geração de diversidade	136
4.	Diversidade genética do verme adulto e especiação em <i>Echinococcus</i>	139
5.	Perspectivas	141
Bibliografia Geral		143

Resumo

Parasitas pertencentes ao gênero *Echinococcus* são platelmintos que necessitam de dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida. Durante a fase larval expressam abundantemente uma proteína chamada Antígeno B (AgB), que é uma lipoproteína oligomérica com massa molecular de aproximadamente 150 kDa formada por subunidades de 8 kDa. As subunidades do AgB são codificadas por pelo menos cinco genes (*AgB1-5*), com similaridade superior a 70%. A função da proteína nativa tem sido relacionada com a modulação da resposta imune do hospedeiro intermediário, ocasionando um viés para a resposta Th2 e com a detoxificação de metabólitos lipídicos no interior do cisto. Neste trabalho, foi avaliada a ocorrência de rearranjos entre os loci gênicos *AgB1-5* durante a fase larval de *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi* através de *Southern blot* e de variação do número de cópias dentro de um mesmo cisto de *E. granulosus sensu stricto* por qPCR. Também foram determinadas a diversidade de seqüências destes cinco genes durante a fase adulta de *E. granulosus sensu stricto* através de clonagem e o seqüenciamento de produtos de PCR obtidos a partir de um único verme, bem como foram desenvolvidos anticorpos policlonais contra a proteína recombinante dos cinco genes descritos e contra um peptídeo sintético representante do gene *AgB2*.

As diferenças na organização dos genes do AgB entre cistos foram analisadas em três isolados de *E. granulosus sensu stricto* e três isolados de *E. ortleppi* por *Southern blot*. O padrão de bandas de hibridização revelou que esta família gênica contém pelo menos nove genes em *E. granulosus sensu stricto* e dez em *E. ortleppi*. Foram observadas diferenças entre os cistos de *E. ortleppi* quanto ao padrão de bandas de *AgB3*, o que indicaria a ocorrência de rearranjos. A análise do número de cópias dos genes *AgB1-5* em protoescóleces de um único cisto revelou uma grande heterogeneidade no número de cópias de todos os genes do AgB analisados, muitas vezes superiores a 10 vezes entre os protoescóleces. A grande divergência entre os protoescóleces sugere que o mecanismo responsável pela variação origine elementos de DNA instáveis.

A diversidade de seqüências dos genes do *AgB1-5* do verme adulto foi menor que a encontrada na fase larval. Interessantemente, o verme adulto analisado neste trabalho apresentava seqüências típicas de duas espécies, *AgB2* e *Mdh* de *E. ortleppi* e *AgB1*, *AgB3*, *AgB4* e *AgB5* além do haplótipo mitocondrial de *Cox1* de *E. granulosus sensu stricto*. Esta é a primeira vez que um verme adulto, possivelmente híbrido, de *Echinococcus* é encontrado, e indica que o intercruzamento entre *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi* pode gerar organismos viáveis.

A síntese de anticorpos contra cada uma das cinco subunidades do AgB descritas foi obtida pela inoculação de proteína recombinante (recAgB1-5) em camundongos BALB/c. Embora todas as proteínas recombinantes tenham sido imunogênicas, observou-se reação cruzada entre elas, e apenas os anticorpos contra recAgB3 e recAgB4 foram mais reativos contra a proteína inoculada. Para melhorar a especificidade dos anticorpos, sintetizou-se oligopeptídeos de 12-15 aminoácidos representativos de cada subunidade acoplados a uma proteína carreadora (oliAgB1-5) e imunizaram-se camundongos BALB/c. A análise do soro obtido dos camundongos revelou que dos cinco peptídeos testados, apenas oliAgB2 foi imunogênico e apresentou uma resposta específica.

Abstract

Parasites belonging to the genus *Echinococcus* are flatworms that require two hosts to complete their lifecycle. During their larval stage, *Echinococcus* abundantly expresses a protein called antigen B (AgB), which is a 150 kDa oligomeric lipoprotein composed by 8 kDa subunits. AgB is encoded by at least five genes (*AgB1-5*) with similarity above 70%. The function of native protein has been related to the modulation of host immune responses leading towards a Th2 cellular response bias. The protein is also involved with detoxification of lipid metabolites inside the cyst. In this study we evaluated the occurrence of rearrangements within *AgB1-5* loci on metacestodes of *E. granulosus sensu stricto* and *E. ortleppi* using Southern blot and the variation at AgB number of copies within an *E. granulosus sensu stricto* cyst by qPCR. We also analyzed the sequence diversity of these five genes during the adult stage of *E. granulosus sensu lato* by cloning and sequencing PCR products obtained from a single adult worm. Finally, we have developed antibodies against *AgB1-5* recombinant proteins (recAgB1-5) and against a synthetic peptide representative of subunit AgB2.

The differences in AgB gene organization among isolates were analyzed in three *E. granulosus sensu stricto* and three *E. ortleppi* cysts. The banding pattern revealed that this gene family contains at least nine genes in *E. granulosus sensu stricto* and ten in *E. ortleppi*. Differences in the *AgB3* banding pattern were observed among the *E. ortleppi* cysts, which would indicate the occurrence of rearrangements. The *AgB1-5* number of copies analysis in protoscoleces from a single cyst revealed a large heterogeneity of all AgB genes analyzed, often more than 10 times between protoscoleces. The large divergence among protoscoleces suggests that the mechanism responsible for copy number variation originates unstable DNA elements.

The sequence diversity of AgB within an adult worm was lower than that found in the larval stage. Interestingly, the adult worms examined in this study showed typical sequences of two species: *AgB1*, *AgB3*, *AgB4* and *AgB5*, as

well as the *Cox1* mitochondrial haplotype, are similar to *E. granulosus sensu stricto* sequences and *Mdh* and *AgB2* were identical to those described for *E. ortleppi*. That is the first time that an adult worm of *Echinococcus* possibly hybrid is found, and it may indicate that the cross fertilization between *E. granulosus sensu stricto* and *E. ortleppi* generates viable organisms.

Antibodies against each of the five subunits of AgB described were obtained by inoculating BALB/c mice with recombinant proteins recAgB1-5. Although every recombinant protein was immunogenic, we observed cross-reaction between them, and only the response against recAgB3 and recAgB4 showed some specificity. To improve the antibody specificity, we synthesized oligopeptides of 12-15 amino acids representative of each AgB subunit (oliAgB1-5) coupled to a carrier protein and used these antigens to immunize BALB/c mice. Analysis of serum obtained from mice showed that only one of five oligopeptides tested (oliAgB2) was immunogenic, and it leads to a specific response.

Capítulo 1: Introdução e revisão bibliográfica

1. *Echinococcus* e a equinococose

Os organismos pertencentes ao gênero *Echinococcus* Rudolphi 1801 são vermes platelmintos da classe Cestoda. Como todos os representantes desta classe, as espécies do gênero são vermes endoparasitos obrigatórios. Seu ciclo de vida é indireto, e para completá-lo *Echinococcus* necessita de dois hospedeiros vertebrados mamíferos. Na fase adulta, vive no intestino de carnívoros, onde não acarreta maiores perdas para o hospedeiro. A fase larval é chamada de metacestóide e infecta mamíferos herbívoros, geralmente ungulados e roedores e, acidentalmente, o homem. Nesta fase, *Echinococcus* é bastante danoso para seus hospedeiros, podendo levá-los à morte. A doença daí resultante denomina-se equinococose (Thompson, 1995).

As relações filogenéticas dentro do gênero *Echinococcus* ainda não estão completamente resolvidas, e têm sido objeto de muitos estudos (Thompson e McManus, 2002; Nakao *et al*, 2007; Hüttner *et al*, 2008; Saarma *et al*, 2009). Embora tradicionalmente o gênero fosse dividido em apenas quatro espécies, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* e *E. vogeli* (Bowles *et al*, 1995), novas abordagens consideram que ele deva ser dividido em um número maior de espécies.

Há muito, observou-se a existência de uma grande diversidade dentro do táxon *E. granulosus*, e essa diversidade foi associada a diferenças nos hospedeiros intermediários utilizados por cada variante, de modo que cada variante representaria uma linhagem adaptada a um determinado hospedeiro intermediário (Thompson e Lymbery, 1988). Quando se começou a caracterizar os haplótipos mitocondriais destas variantes, observou-se que cada linhagem estava associada com um diferente haplótipo e a espécie *E. granulosus* foi subdividida em várias linhagens de acordo com o seu haplótipo (por exemplo: haplótipo G1 – linhagem ovina, haplótipo G5 – linhagem bovina) (Bowels *et al*, 1992). Além disso, o acúmulo de seqüências de DNA de *Echinococcus* nos

bancos de dados permitiu que as comparações entre as linhagens fossem refinadas. Através deste refinamento, conclui-se que as diferenças encontradas entre algumas linhagens desta espécie são tão grandes quanto as diferenças encontradas entre essa espécie e outras do gênero, fato que justificaria a categorização destas linhagens como espécies válidas (Thompson e McManus, 2002).

Na nova classificação, o antigo táxon *E. granulosus* (nesta tese chamado *Echinococcus granulosus sensu lato*) é dividido, e algumas variantes genéticas conhecidas ganham o *status* de espécie. Na atual proposta, o haplótipo mitocondrial G4, conhecido até então como linhagem eqüina, passa a ser chamado de *E. equinus*, e a linhagem bovina, caracterizada pelo haplótipo G5, agora é a espécie *E. ortleppi*. O clado contendo os haplótipos G6, G7, G8, G9 e G10, aparentemente monofilético, ainda está sob investigação, uma vez que há dúvidas se realmente é uma nova espécie, no caso, *E. canadensis* (Lavikainen *et al*, 2008; Saarma *et al*, 2009). O haplótipo G1, que infecta, principalmente ovelhas, juntamente com os haplótipos G2 e G3 representam a espécie *E. granulosus sensu stricto*. As espécies *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* e *E. vogeli* não sofreram alterações.

Na Figura 1, são mostradas as filogenias mais recentemente inferidas para o gênero *Echinococcus*. Neste estudo, os autores compararam as árvores construídas a partir das seqüências do genoma mitocondrial completo e a partir de cinco genes nucleares (*elongation factor 1 alpha, ef1; transforming growth factor beta receptor kinase, tgf; thioredoxin peroxidase th; calreticulin, cal e ezrin-radixin-moesin-like protein, elp*). Apesar das diferenças entre elas, como por exemplo, a posição basal de *E. multilocularis* e *E. shiquicus* na topologia baseada nos genes nucleares em comparação com sua posição interna na filogenia mitocondrial, as duas topologias demonstram que *E. granulosus sensu lato* possui variantes que podem ser classificadas como *E. granulosus sensu stricto* *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. equinus* e até mesmo como *E. intermedius* (Saarma *et al*, 2009).

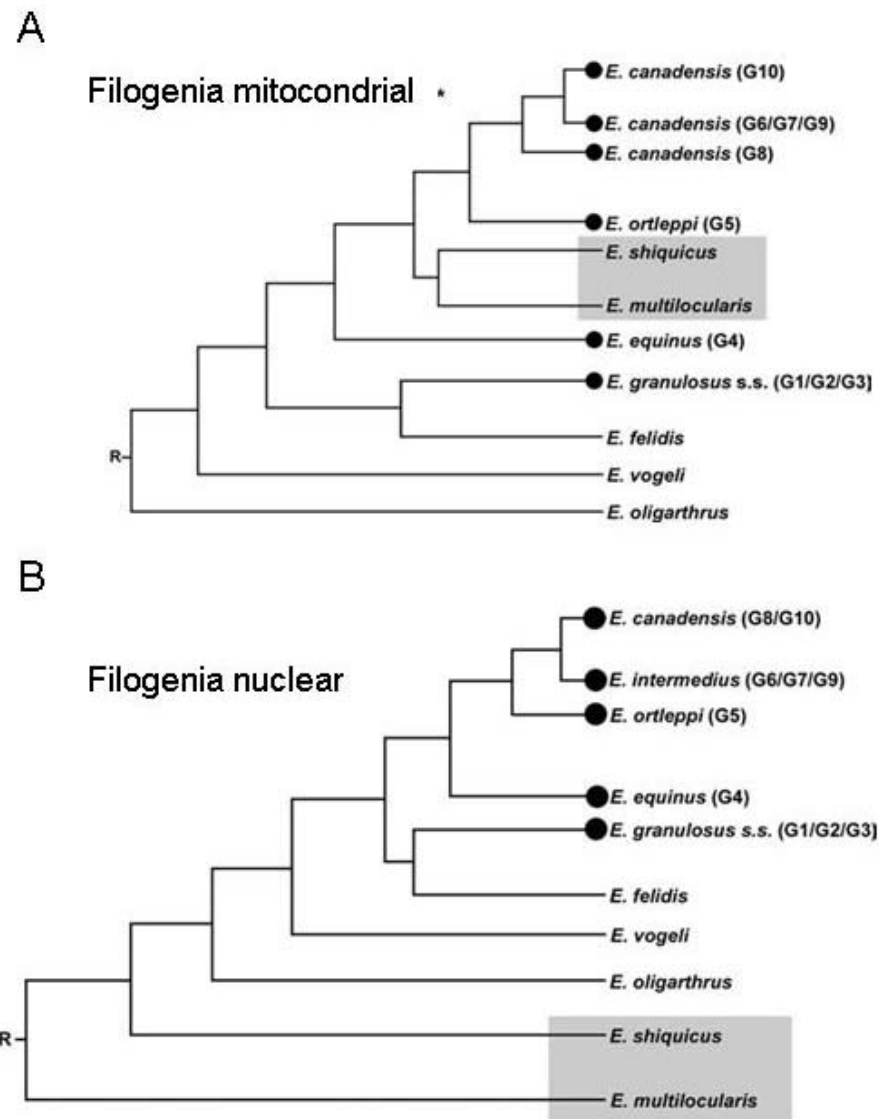


Figura 1: Topologia das relações filogenéticas obtidas para o gênero *Echinococcus* a partir do **(A)** genoma mitocondrial (Nakao *et al*, 2007 e Hüttner *et al*, 2008 em relação a posição de *E. felidis*) e de **(B)** cinco genes do genoma nuclear (Saarma *et al*, 2009). A posição de *E. multilocularis* e *E. shiquicus* estão indicadas com um retângulo cinza e os pontos pretos representam as espécies que correspondiam ao táxon *E. granulosus sensu lato*. Modificado de Saarma *et al* (2009).

Devido aos esforços de coleta feitos por parasitólogos em regiões geográficas até então não estudadas quanto à presença de parasitos do gênero *Echinococcus*, tem-se encontrado novas espécies dentro deste gênero. Em 2005, Xiao *et al*, descreveram uma nova espécie originária dos platôs tibetanos. Esta espécie, denominada *E. shiquicus*, é endêmica desta região e relacionada a *E. multilocularis*, embora suficientemente diferente para ser considerada uma nova espécie. Pesquisas realizadas nas pradarias africanas também validaram uma espécie de *Echinococcus* descrita na década de 1930 e praticamente esquecida desde então (Ortlepp, 1937). Pesquisando em fezes de leões (*Panthera leo*), foram re-encontrados ovos de helmintos, cuja análise molecular revelou pertencerem a uma diferente espécie de *Echinococcus*: *E. felidis* (Hüttner *et al*, 2008).

Em virtude da grande incidência de infecções e da ampla distribuição geográfica de ocorrência, *E. granulosus sensu lato* e *E. multilocularis* são as espécies mais estudadas e de maior importância médica e econômica dentro do gênero. No estado do Rio Grande do Sul, são encontradas as espécies *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi*, além de haver um registro para a presença de *E. canadensis* (representado pelo haplótipo mitocondrial G7) (Badaraco *et al*, 2008).

Histórias evolutivas distintas, com adaptações a diferentes hospedeiros intermediários, caracterizam as diferentes espécies dentro do clado *E. granulosus sensu lato* (Thompson e McManus, 2002). Analisando as seqüências completas do DNA mitocondrial de 10 espécies/linhagens de *Echinococcus* (incluindo seis espécies/linhagens pertencentes ao clado *E. granulosus sensu lato*, entre elas *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi*) Nakao *et al* (2007) ponderou que as diferentes linhagens de *Echinococcus* analisadas apresentavam diferenças genéticas suficientes para serem consideradas entidades distintas. Neste contexto, a separação das linhagens de *E. granulosus sensu lato* em novas espécies seria totalmente aceitável. Além disso, a existência de vários ciclos envolvendo hospedeiros diferentes intermediários seria uma evidência do isolamento evolutivo das diferentes

espécies pertencentes ao clado *E. granulosus sensu lato* (Thompson e McManus, 2002).

A radiação evolutiva do clado *E. granulosus sensu lato* pode ter sido favorecida por características intrínsecas à biologia do parasito, como a ocorrência de autofecundação (Smyth e Smyth 1964). O fato de *Echinococcus* possuir um estágio larval com grande capacidade proliferativa (reprodução assexual culminando na formação de milhares de protoescólices no interior do cisto hidático) aumenta as probabilidades de variações adaptativas elevarem suas freqüências na população (Moore e Brooks, 1987). Além disso, a natureza aglomerativa dos vermes adultos dentro do intestino delgado do hospedeiro definitivo faz com que muitos vermes geneticamente idênticos vivam em simpatria (Lymbery *et al*, 1989). Desta maneira, mesmo eventos de fecundação cruzada teriam as mesmas conseqüências da autofecundação.

Entretanto, a análise de marcadores moleculares tem revelado que a ocorrência de heterozigotos não é tão rara em *Echinococcus* como prevê a ausência de fecundação cruzada, e indivíduos heterozigotos têm sido encontrados consistentemente em vários trabalhos (Lymbery *et al*, 1997, Haag *et al*, 1999, Badaraco *et al*, 2008 e Haag *et al*, 2010). Por exemplo, Haag *et al* (1999) estudaram 110 isolados de *Echinococcus* do Brasil e não encontraram ausência significativa de heterozigotos, sugerindo que os vermes podem realizar fecundação cruzada. Além disso, o mesmo trabalho encontrou a presença de cinco genótipos potencialmente híbridos entre *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi* (Haag *et al*, 1999). Uma hipótese alternativa para explicar a formação de linhagens e a conseqüente especiação dentro do clado *E. granulosus sensu lato* é que *Echinococcus* sofre pressão seletiva por parte do hospedeiro intermediário e que, portanto, está adaptado a ele (Rausch *et al*, 1986). Nesta hipótese, a autofecundação não é necessária para a formação de linhagens, e a fecundação cruzada pode fornecer novas combinações gênicas que acelerariam as mudanças adaptativas.

Assumindo-se que a autofecundação seja relativamente freqüente entre organismos do gênero *Echinococcus*, não podemos ignorar a possibilidade de espécies incipientes dentro do gênero trocarem material genético quando

compartilharem o mesmo hospedeiro definitivo (Haag *et al*, 1999). Este pode ser o caso entre as espécies *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi*. Apesar de apresentarem características moleculares e morfológicas distintas, estas espécies ainda possuem considerável grau de compatibilidade genética para possibilitar a ocorrência de hibridação. Haag *et al* (1999) encontraram indivíduos heterozigotos com alelos das duas espécies, e Badaraco *et al* (2008), estudando as frequências de dois diferentes marcadores moleculares encontraram evidências de introgressão, em ambos os marcadores, sugerindo que possa ocorrer fecundação cruzada entre indivíduos de espécies diferentes.

Dentro deste contexto, embora *E. ortleppi* e *E. granulosus sensu stricto* apresentem considerável grau de divergência em seus genomas e sejam adaptados a hospedeiros intermediários diferentes (Thompson e McManus, 2002), podendo ser considerados duas entidades evolutivas distintas (Nakao *et al*, 2007), eles ainda apresentam compatibilidade genética e podem, quando em simpatria, trocar material genético (Haag *et al*, 1999, Badaraco *et al*, 2008). Entretanto, o trânsito mundial de animais, impulsionado pelo comércio, colocou em contato parasitos que historicamente não se encontravam, possibilitando a hibridação.

Embora existam algumas diferenças morfológicas entre as espécies de *E. granulosus sensu lato*, os vermes adultos de todas as espécies medem não mais do que 5 mm de comprimento, tendo o corpo dividido em escólex (cabeça) e estróbilo (corpo) com três ou quatro proglotes. O escólex (cabeça) tem quatro ventosas e um rostelo fixo com um duplo círculo de pequenos ganchos que são responsáveis pela fixação no intestino do hospedeiro definitivo (Thompson, 1995). Nesta fase, o parasito infecta canídeos (geralmente o cão doméstico) e é no intestino destes hospedeiros que os vermes realizam a fase sexual de seu ciclo biológico (Figura 2 A).

A contaminação do ambiente e dos hospedeiros intermediários ocorre pela liberação da última proglote do verme através das fezes do animal. Após a reprodução esta proglote encontra-se repleta de ovos que, quando liberados, podem permanecer viáveis por até um ano no ambiente (Schantz *et al*, 1995; Thevenet *et al*, 2005). Estima-se que um cão infectado por um verme de

Echinococcus libere cerca de 800 ovos a cada duas semanas. Sendo que um cão pode conter vários milhares de vermes adultos em seu intestino a contaminação do ambiente por um único cão infectado é enorme (Schantz *et al*, 1995).

O hospedeiro intermediário infecta-se por ingerir acidentalmente ovos oriundos diretamente do ambiente. Após a ingestão, os ovos eclodem liberando e ativando a oncosfera. A oncosfera é o embrião hexacanto dos tenídeos que já se encontra completamente desenvolvida no interior do ovo no momento da infecção. Ela é liberada passivamente no interior do estômago do hospedeiro intermediário e torna-se ativada pelo contato com as enzimas digestivas do hospedeiro intermediário. Após a ativação, a oncosfera penetra a mucosa intestinal até atingir a corrente sangüínea ou linfática, migrando então para as vísceras, principalmente fígado e pulmões (Smyth e Smyth, 1964). Depois do estabelecimento da infecção, a oncosfera sofre uma série de transformações, incluindo a degradação dos seus ganchos, a formação de uma cavidade interna e das camadas laminar e germinativa, aumentando drasticamente de tamanho e originando o cisto hidático.

O metacestóide de *E. granulosus sensu lato*, quando completamente desenvolvido, forma um cisto totalmente preenchido com o líquido hidático. O cisto consiste em uma camada interna denominada germinativa. Esta é nucleada, com uma estrutura sincicial ligada à camada laminar através de microtríquias. A camada laminar é secretada pelas células da camada germinativa, consistindo principalmente de carboidratos, e forma uma barreira acelular, separando o parasito do hospedeiro. Revestindo toda essa estrutura, está a camada adventícia, produzida pela resposta imunológica do hospedeiro (Gottstein e Hemphill, 1997) (Figura 2 B).

A proliferação assexual da camada germinativa leva à formação de cápsulas prolíferas. Dentro destas ocorre, também por proliferação assexuada, a formação dos protoescóceles. O ciclo se completa quando o hospedeiro definitivo ingere vísceras de animais contaminados com o metacestóide fértil,

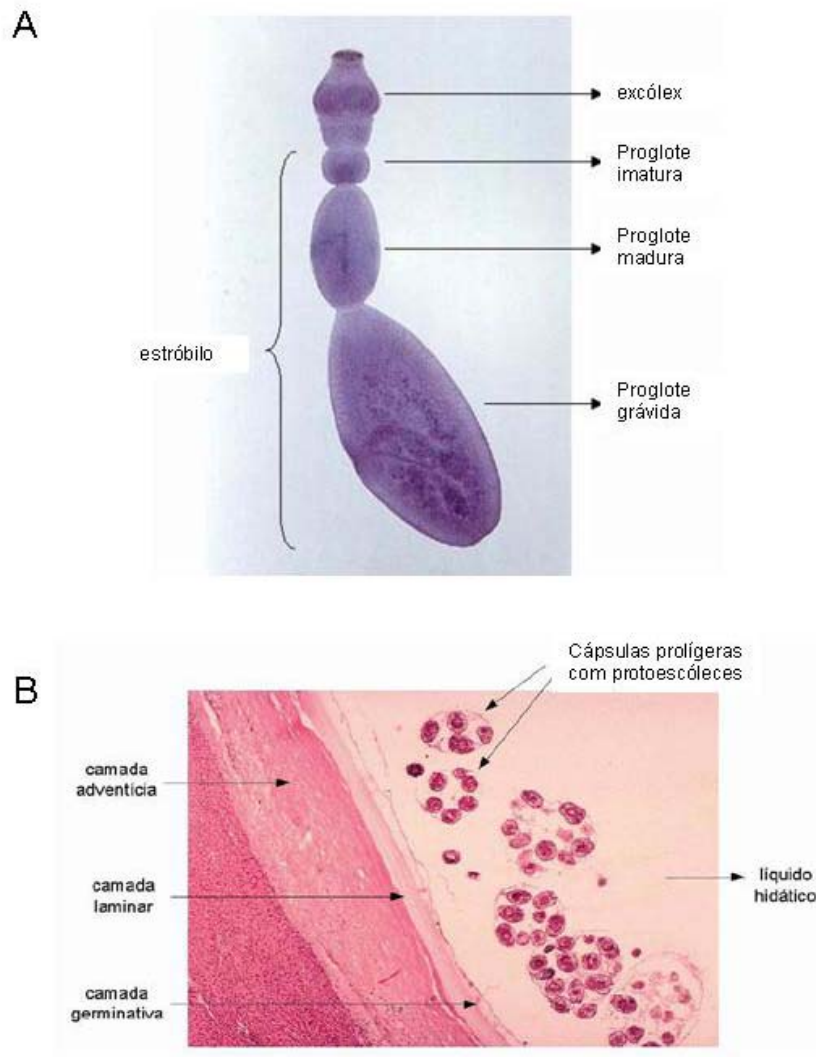


Figura 2:

A) Verme Adulto de *E. granulosus sensu lato* mostrando as suas principais características morfológicas. No último segmento, encontram-se os ovos do parasito, que em seu interior possuem a oncosfera já desenvolvida. (modificado de http://www.cmpt.ca/photo_album_parasitology/parasitology_photos_4_ces.htm)

B) Corte transversal de um cisto hidático de *E. granulosus sensu lato* mostrando os principais componentes deste estágio, como por exemplo, os protoescoléces que são as estruturas infectantes ao hospedeiro definitivo. (modificado de http://www.med-chem.com/para/pom_0603.html)

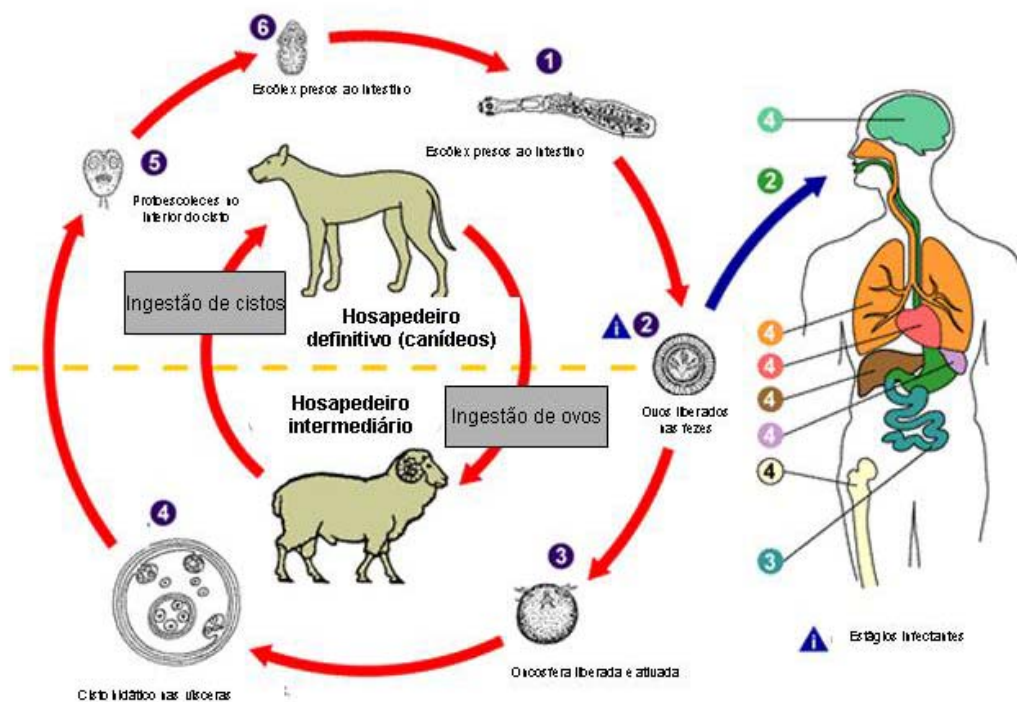


Figura 3: Ciclo de Vida de *E. granulosus sensu lato*. Os vermes adultos (1) vivem no intestino delgado dos hospedeiros definitivos (geralmente canídeos) onde realizam a fase sexual do ciclo de vida. Os ovos (2) são liberados no ambiente com as fezes e podem ser ingeridos pelos hospedeiros intermediários (herbívoros, geralmente ovinos, bovinos, caprinos, eqüinos ou cervídeos). Após serem ingeridos pelos herbívoros, os ovos eclodem e liberam a oncosfera (3) que ativamente penetra na parede do intestino do hospedeiro intermediário até atingir a corrente sanguínea ou linfática. Ao atingir um órgão (4), a oncosfera se estabelece e desenvolve um cisto (4), chamado de cisto hidático. O desenvolvimento do cisto progride e da parede interna do cisto brotam as cápsulas prolíferas, da qual se originam também por brotamento os protoescoléces (5). O hospedeiro definitivo infecta-se através da ingestão de vísceras dos hospedeiros intermediário contendo cistos hidáticos. Após a ingestão, os protoescoléces evaginam expondo os ganchos rostellares (6) e prendem-se na parede do intestino do hospedeiro definitivo, transformando-se em vermes adultos (1). Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Echinococcosis.htm>.

ou seja, com protoescoléces no líquido hidático (Thompson e McManus, 2001) (Figura 3).

A infecção com a larva de *E. granulosus sensu lato* causa a equinococose cística, que é uma das zoonoses mais importantes, devido, principalmente, a sua ampla distribuição geográfica e ao grande impacto econômico sobre a saúde pública e veterinária (Torgerson e Budke, 2003). Sua incidência é maior em áreas com forte associação entre a criação animal e as comunidades rurais, sendo, portanto, endêmica em muitas regiões, incluindo o sul da América do Sul, onde a precariedade da vigilância sanitária contribui para a manutenção do ciclo do parasito (Schantz *et al*, 1995).

Um levantamento feito no ano de 2004 em oito municípios gaúchos, localizados próximo da fronteira com o Uruguai, apontou que cerca de 30% do rebanho de ovinos e 25% do rebanho bovino estavam infectados com *E. granulosus sensu lato* e foram registrados oficialmente 716 casos de infecção de humanos entre 1981 e 1999 (PAHO Annual Report 2004 *apud* Moro e Schantz, 2006). Infelizmente, no Brasil, os casos de equinococose humana não são de notificação obrigatória, de maneira que apenas uma parcela dos casos é registrada nas estatísticas oficiais. Tendo em vista esta realidade, o estado do Rio Grande do Sul pode ser considerado uma área endêmica para esta zoonose.

Na Argentina, a prevalência de equinococose em humanos é estimada em 1,9 em 100.000 indivíduos. Entretanto, este número pode ser maior em áreas onde a pecuária é mais intensa e onde as condições sanitárias são mais precárias, como em certas regiões da Patagônia, onde a prevalência pode chegar a 14.000 casos em 100.000 indivíduos (Kamenetzky *et al*, 2002). No Quênia, outro país onde a doença é endêmica, a prevalência é de 220 casos em 100.000 indivíduos (Dinkel *et al*, 2004). Talvez, a região mundial onde a equinococose cística tenha maiores índices de incidência seja o Peru. Na região central dos Andes Peruanos foram reportadas 127 cirurgias por 100.000 habitantes em um único ano (Moro *et al*, 1997). A prevalência da equinococose em animais é alta nesta região e chega a 80% nos bovinos e a 89% nos

ovinos. Já em canídeos, hospedeiro definitivo, a prevalência varia entre 32% e 46% (Moro e Schantz, 2006).

O significado clínico e econômico desta parasitose restringe-se à fase da infecção com o metacestóide (uma vez que a infecção com o verme adulto é praticamente assintomática), quando ocorre o crescimento de uma massa cística que causa compressão em órgãos e tecidos vizinhos, e/ou de reações de hipersensibilidade (Schantz, 1989).

Entretanto, qualquer estratégia que vise controlar a transmissão da equinococose cística deve ser empregada no controle da infecção no hospedeiro definitivo, pois este possui um enorme potencial de contaminação do ambiente e transmissão do parasito.

2. Mecanismos parasitários de reposta aos hospedeiros

A principal força motora na evolução de organismos parasitos é a adaptação aos seus hospedeiros. A história de vida dos parasitos é em grande parte determinada pela história de vida do hospedeiro. Desde a sincronização da reprodução até a localização no ambiente, depende dos hábitos dos hospedeiros. Isso é bem demonstrado no caso das filárias da espécie *Wuchereria bancrofti*, as quais sincronizam seus hábitos de acordo com os hábitos de seus hospedeiros intermediários. Quando estão infectando seus hospedeiros definitivos (neste caso o homem), as microfilárias vivem nos dutos linfáticos, mas migram para o sangue periférico, onde podem ser ingeridas por mosquitos (hospedeiro intermediário). Nas regiões onde os hospedeiros intermediários possuem hábitos noturnos (mosquitos do gênero *Culex* e *Anopheles*), as microfilárias migram para o sangue periférico durante a noite, em outras regiões onde o hospedeiro intermediário possui hábitos crepusculares e diurnos (mosquitos do gênero *Aedes*) as microfilárias migram para a circulação periférica durante o período de maior atividade desses hospedeiros, ou seja, durante o amanhecer e entardecer (Pichon e Treuil, 2004).

Os parasitos, entretanto, não são apenas coadjuvantes neste processo. Existem muitos exemplos na literatura que demonstram alterações de características dos hospedeiros devido à ação de parasitos (Cézilly *et al*, 2010). Por exemplo, quando uma formiga (hospedeiro intermediário) infectada com o trematódeo *Dicrocoelium dendriticum* escala folhas de grama sem motivos aparentes para tanto (Libersat *et al*, 2009) expondo-se a ser ingerida por ruminantes (hospedeiro definitivo), ou quando ratos (hospedeiro intermediário) infectados com *Toxoplasma gondii* simplesmente passeiam por lugares repletos de urina de gatos (hospedeiro definitivo), um lugar que deveria ser evitado por roedores (Vyas *et al*, 2007). Podemos notar que os parasitos são excelentes manipuladores de seus hospedeiros, conseguindo, assim, maximizar sua transmissão.

Em *Echinococcus*, foram usados dados de ecologia para mostrar que o parasito *E. granulosus sensu lato* consegue, mesmo que de maneira indireta, maximizar sua transmissão de alces para lobos. Os cistos deste parasito, geralmente, localizam-se no fígado e nos pulmões, podendo diminuir o *fitness* dos hospedeiros, geralmente não os levando a morte. De acordo com o modelo teórico, quanto maior for a agregação de cistos em um determinado hospedeiro, maior é a probabilidade de ele ser predado. Assim, áreas com grande predação devem apresentar baixa agregação de cistos por animal. Joly e Messier (2004) analisaram a quantidade de cistos hidáticos por animal em áreas com baixa, média e alta taxa de predação, e confirmaram que em altas taxas de predação existe baixa agregação de cistos hidáticos por hospedeiro analisado. Desta maneira, sugeriu-se que o parasito contribui para sua transmissão por alterar o *fitness* de seus hospedeiros.

De maneira geral, os hospedeiros evoluem mecanismos para livrarem-se de parasitos, seja evitando a infecção (por possuírem uma pele mais grossa ou moléculas antiparasitárias em mucosas, por exemplo) ou combatendo os invasores que conseguem passar pelas primeiras barreiras, por meio da ação do sistema imune.

Uma vez estabelecida a infecção, os parasitos de vertebrados têm que confrontar com uma importante arma de defesa dos hospedeiros: o sistema

imune. Entretanto, os parasitos evoluíram mecanismos capazes de enfrentar estes desafios impostos pelo hospedeiro. Podem-se agrupar as estratégias parasitárias de combate ao sistema imune em três tipos fundamentais: i) neutralização das defesas dos hospedeiros, ou através de um bloqueio mecânico protegendo as partes vitais do parasito (parede de um cisto, por exemplo) ou através da neutralização bioquímica de moléculas de defesa (radicais livres, por exemplo) secretadas pelo hospedeiro ii) evitar a resposta imune protetora, seja através de variação antigênica ou de mimetismo molecular; iii) modulação efetiva da resposta imune do hospedeiro afim de tornar o ambiente menos hostil e mais permissivo para o desfecho do ciclo de vida (Haag *et al*, 2008).

Dentre os mecanismos de variação antigênica, pode-se ainda reconhecer dois tipos, i) um baseado em uma estratégia populacional, onde a diversidade é mantida em diferentes linhagens, as quais têm vantagens em diferentes hospedeiros; ii) outro baseado na expressão temporalmente diferenciada de alelos alternativos, presentes e silenciados dentro de um mesmo indivíduo ou dentro de um mesmo hospedeiro. Este mecanismo requer que os antígenos sejam codificados por famílias multigênicas, que em alguns casos podem possuir centenas de cópias no mesmo genoma (Nash, 2002).

Bactérias da espécie *Streptococcus pneumoniae* constituem um exemplo de variação antigênica através de uma população. Neste parasito, os principais antígenos reconhecidos pelo 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 que induzem, cada qual, a uma resposta imune específica, que é eficiente somente contra a linhagem que gerou a infecção (Henrichsen, 1995). Portanto, cada variante da bactéria atua como uma unidade imunológica distinta, e os hospedeiros podem ser re-infectados por outras linhagens bacterianas com outros antígenos em sua cápsula. Esta estratégia não impede que o hospedeiro elimine o parasito, mas evita que o hospedeiro, uma vez infectado, torne-se definitivamente imune ao parasito.

A variação antigênica também pode ser mantida em uma população através do surgimento contínuo de novas variantes (Cobey e Koelle, 2008). Fitch *et al* (1997) demonstraram que as altas taxas de mutação do vírus da influenza de humanos garantem a sua perpetuação. Quando o vírus enfrenta um sistema imunológico de um hospedeiro ele é rapidamente eliminado e deixa para trás uma forte memória imunológica. Caso não surjam variantes alternativas capazes de evadir da resposta imunológica gerada por outros vírus, o vírus rapidamente esgotaria sua gama de hospedeiros potenciais e desapareceria. Assim, o surgimento de novas variantes, por mutação, garante a perpetuação do vírus, que pode re-infectar hospedeiros imunes à forma de vírus ancestral.

Outros organismos encontraram uma maneira diferente de garantir a manutenção da espécie através da variação antigênica. Estes organismos expressam diferencialmente antígenos distintos em sua superfície. Um exemplo bem caracterizado deste tipo de estratégia ocorre no protozoário *Trypanosoma brucei* (Donelson, 2003). Durante a sua fase replicativa, 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 variante de VSG que está sendo expressa pelo parasito que conseguiu se replicar abundantemente. Esta resposta imune é muito intensa e, geralmente, acabaria com a infecção. Entretanto, alguns parasitos alteram o alelo de VSG que está sendo expresso e escapam da resposta imune (Cross *et al*, 1998). Desta maneira, através da variação da expressão dos mais de 1000 alelos de VSG presentes em um único genoma, o parasito consegue manter a infecção por um longo tempo.

Os helmintos são considerados mestres na manipulação da resposta imune de seus hospedeiros (Hewitson *et al*, 2009). Uma característica familiar das infecções parasitárias causadas por helmintos é sua persistência, e existem evidências na literatura sobre parasitos que sobreviveram em humanos por décadas (Cox, 1996). Esta persistência é, no mínimo, admirável, uma vez que o parasito possui milhares de moléculas estranhas ao hospedeiro, e, portanto, potencialmente imunogênicas. Além disso, muitas moléculas

secretadas pelo parasito durante seu metabolismo normal podem ser alvo de resposta imune por parte do hospedeiro.

Essa aparente tolerância dos hospedeiros em portar parasitos em seu interior é na verdade conseqüência de uma guerra molecular, na qual o parasito secreta moléculas que interferem com o sistema imune para torná-lo menos hostil (Schmid-Hempel, 2008). Tem sido demonstrado que inúmeros parasitos manipulam a resposta imune do hospedeiro, alterando o padrão de citocinas expressadas pelas células de defesa e evitando uma resposta protetora do hospedeiro (Maizels e Yazdanbakhsh, 2003). Em pacientes infectados com *Shistosoma haematobium*, por exemplo, a reação imunológica contra antígenos do parasito é bastante diminuída em comparação com pacientes não infectados. Além disso, estimulação de células do sistema imune dos pacientes infectados com antígenos solúveis de *S. haematobium* apresenta diminuição da secreção da citocina IL5 (interleucina 5), citocina associada com reação imune protetora contra o parasito (Grogan *et al*, 1998).

A resposta imune montada pelos hospedeiros contra os parasitos, portanto, nem sempre é eficiente na eliminação do invasor. De uma maneira bastante simplificada, mas também bastante didática, pode-se classificar as células T ativadas de organismos infectados em dois tipos: Th1 e Th2 (Harnett, 2005). Essa classificação é baseada no padrão de secreção de citocinas pelas “células T *helper* CD4” após a ativação por antígenos. Células T *helper* ativadas do tipo 1 (células Th1) secretam grande quantidade de interferon gama (IFN- γ), IL2 e IL12, todas citocinas associadas a uma resposta inflamatória. Estas citocinas ativam macrófagos e neutrófilos, e estão elevadas em hospedeiros resistentes a parasitos. Células T *helper* do tipo 2 (Th2 células) secretam grandes quantidades de IL4, IL10 além de TGF- β (*Transforming growth factor beta*), citocinas associadas a respostas alérgicas e não protetoras contra parasitos. Estas duas rotas alternativas de ativação são antagônicas, de maneira que a ativação preferencial de uma rota por determinado conjunto de antígenos inibe a ativação da rota oposta (Maizels e Yazdanbakhsh, 2003). Na Figura 4, mostra-se um esquema simplificado do processo de ativação das células T *helper* por helmintos parasitas.

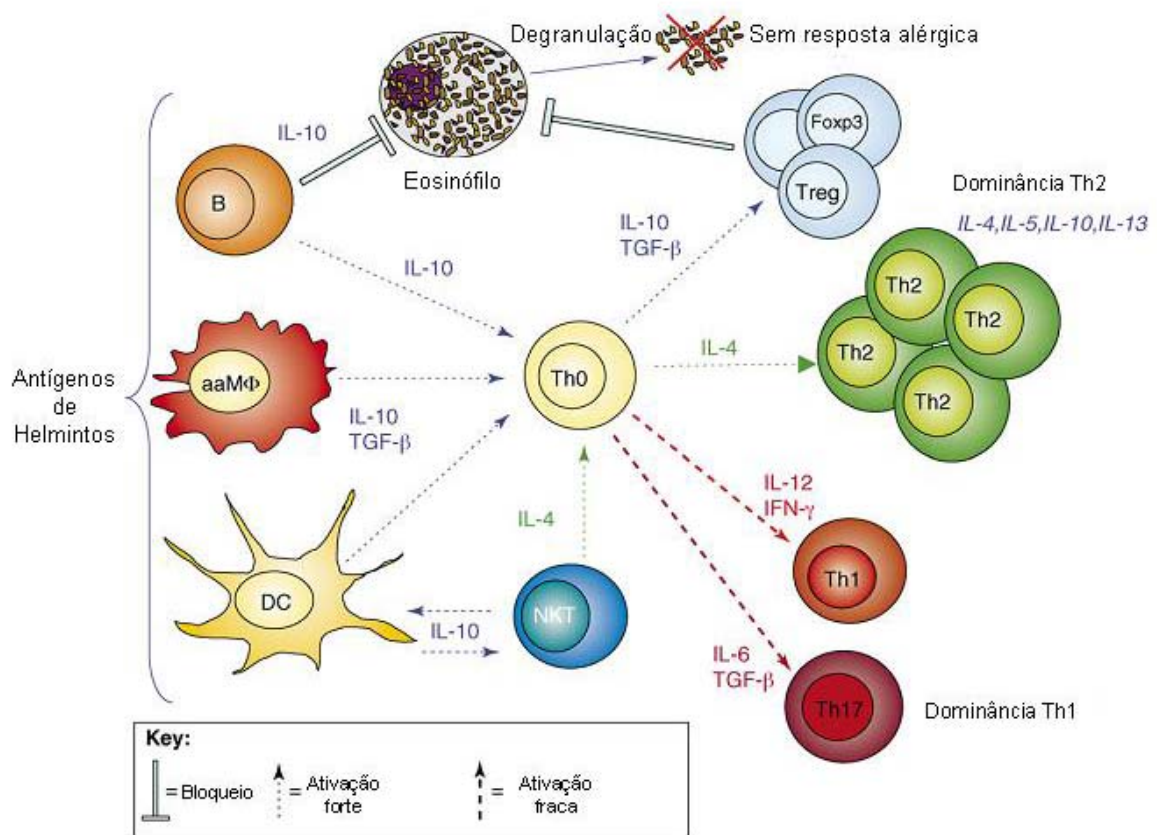


Figura 4: Esquema simplificado dos mecanismos de modulação da resposta imune do hospedeiro por helmintos. Antígenos de helmintos modificam as células do sistema inato de resposta imune (DC = Células dendríticas, aaMφ = Macrófagos, B = células B do tipo 1) diminuindo a secreção de moléculas pró-inflamatórias e ativando a secreção de moléculas imunorreguladoras, como TGF-β, e IL10. Isto resulta na geração de células T regulatórias (Treg), as quais estão envolvidas na imunossupressão, expansão da população de células Th2 e repressão da proliferação de células T inflamatórias (Th1 e Th17). (Modificado de Zaconne *et al*, 2008).

Neste processo de enfrentamento com os seus hospedeiros, *Echinococcus* evoluiu diferentes mecanismos que maximizam sua probabilidade de completar o ciclo de vida. Depois de estabelecida a infecção no hospedeiro intermediário, o parasito desenvolve uma camada laminar de polissacarídeos que funciona como uma primeira barreira contra a entrada de células e moléculas dos hospedeiros (Gottstein *et al*, 2002). Embora não garanta uma proteção completa, esta barreira evita que células do sistema imune do hospedeiro entrem no cisto e destruam-no (Gottstein *et al*, 2006).

Não fugindo à regra dos helmintos, *Echinococcus* também é mestre na arte de manipular o sistema imune do hospedeiro. Durante a infecção do hospedeiro intermediário, o parasito *Echinococcus* secreta algumas moléculas que atuam no escape da resposta imune protetora do hospedeiro intermediário. Talvez a mais importante destas moléculas seja o AgB (Siracusano *et al*, 2008).

Como será detalhado no item 4 da introdução, o AgB possui muitas propriedades imunomoduladoras que devem auxiliar na sobrevivência do parasito. O AgB inibe o recrutamento (Shepherd *et al*, 1991) e a produção de radicais livres por neutrófilos (Virgínio *et al*, 2007). Além disso, o AgB bloqueia a resposta imune inflamatória contra o parasito, por ativar a secreção de citocinas estimuladoras de células Th2 (Riganò *et al*, 2001, Riganò *et al*, 2004).

3. Instabilidade genômica como estratégia evolutiva.

Várias linhas de evidências sugerem que dentro de um genoma algumas regiões estão sujeitas à instabilidade. Os rearranjos genômicos ocasionados por esta instabilidade são importantes na geração de variabilidade e contribuem para a evolução das espécies (Metcalf *et al*, 2007). Entretanto, a maior parte dos estudos referentes à instabilidade genômica não são relacionados com suas conseqüências evolutivas, mas focam as alterações sofridas por células somáticas (principalmente humanas) durante o curso de

vida da célula. Este grande interesse deve-se ao papel crucial desse fenômeno na geração de neoplasias (Little, 2010).

Instabilidade genômica refere-se a uma ampla gama de alterações genéticas, desde mutações pontuais em *hotspots* até rearranjos cromossômicos, e podem ser divididas em classes de acordo com o evento gerador e suas conseqüências. A maior delas, *Instabilidade Cromossômica*, refere-se a alterações no número de cromossomos devido a perda ou aquisição de cromossomos extras, sendo causada por erros durante a migração mitótica dos cromossomos. *Instabilidade de Micro ou Minissatélite* refere-se a expansões ou contrações do número de repetições do DNA repetitivo, sendo causadas geralmente por deslizamento do aparato de replicação do DNA, por erros de reparo do DNA ou por recombinação mitótica homóloga. A *Instabilidade Associada a Mutações* é caracterizada por ocasionar substituições de bases nitrogenadas e micro inserções ou deleções. Esses eventos geralmente são causados por erros de incorporação de bases durante a replicação ou por falhas no processo de correção. Outro mecanismo de instabilidade parecido com o anterior, mas levando a rearranjos, é a *Instabilidade Associada a Rearranjos*. Este fenômeno refere-se a eventos que levam à descontinuidade entre duas regiões cromossômicas adjacentes, geralmente ocasionadas por erros durante os eventos de recombinação utilizados para a correção de mutações ou para corrigir danos de quebra nas fitas do DNA (Aguilera e Gómez-Gonzalez, 2008).

Embora a instabilidade genômica esteja fortemente relacionada com eventos deletérios, muitos organismos utilizam-se desse mecanismo durante o seu metabolismo normal. Em 1968, Brown e Dawid descreveram um fenômeno interessante em oócitos de *Xenopus laevis*, um modelo usado para estudar biologia do desenvolvimento. Existem cerca de 1000 cópias de rDNA em um genoma diplóide de *X. laevis*. Estas cópias estão localizadas em duas regiões distintas do genoma e são organizadas em repetições em tandem de cópias dos genes ribossomais. Devido à grande quantidade de rRNA presente em oócitos maduros, foi calculado que utilizando somente as 1000 cópias genômicas seriam necessários 450 anos para sintetizar todo o rRNA presente em um úncio oócito. Os autores demonstraram que o núcleo do oócito de *X.*

laevis contém centenas de nucléolos, cada um contendo moléculas de DNA circular dos genes de codificadores dos rRNAs. Uma vez formados pela excisão da molécula original do genoma, estes elementos circulares se replicam por um mecanismo de círculo rolante e garantem uma quantidade muito grande de rDNA molde pra sintetizar todo o rRNA presente no oócito maduro.

Outros organismos se valem de rearranjos genômicos para eliminar, seletivamente, partes do genoma desnecessárias em determinada fase do ciclo de vida. Isto ocorre em ciliados do gênero *Paramecium* (Bétermier, 2003). Nestes organismos, o genoma é separado em dois núcleos: o micronúcleo, que contém seqüências ditas germinativas e que são permanentes durante todo o ciclo de vida do organismo, e o macronúcleo poliplóide, também chamado de núcleo vegetativo, o qual é parcialmente destruído durante a fase sexual dos ciliados. Durante a fase vegetativa, o micronúcleo é silenciado e o macronúcleo sintetiza todos os RNAs necessários para as funções metabólicas do *Paramecium*. Uma vez que o organismo entra no ciclo reprodutivo, grandes porções do DNA do macronúcleo são seletivamente deletadas e as seqüências restantes ficam difundidas no citoplasma. Após a conclusão da fase reprodutiva o micronúcleo dirige a reestruturação do macronúcleo, restabelecendo o status inicial (Jahn e Klobutcher, 2002).

Um caso clássico de instabilidade genômica, com características fortemente adaptativas, foi relatado em mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus*. Nestes mosquitos, a resistência a compostos organofosforados, os quais são usados como inseticida, pode ser ocasionada pelo efeito de enzimas esterases, as quais são codificadas a partir dos genes *est α 2* e *est β 2*. O número de cópias destes dois genes foi avaliado em mosquitos de uma linhagem sensível e de uma linhagem resistente a inseticidas. Foi observado que o número de cópias de ambos os genes avaliados estava aumentada em cerca de 80 vezes nos mosquitos resistentes. Como os níveis de mRNA e proteína destes dois genes também estava aumentada na linhagem resistente, a amplificação destes genes foi associada com a aquisição de resistência nestes mosquitos (Paton *et al*, 2000).

Alguns parasitos também utilizam estratégias baseadas em instabilidade genômica no confronto com as defesas dos hospedeiros. *Trypanosoma brucei*, o agente causador da doença do sono, enfrenta a resposta imune do hospedeiro através de variação antigênica. O mecanismo de variação antigênica das proteínas de superfície deste parasito (VSG, descritas no item 1.2) envolve a translocação de seqüências gênicas de VSG de regiões genômicas onde ela está silenciada para regiões genômicas onde a transcrição ocorre. Durante este processo, que depende de quebras das fitas de DNA, podem ocorrer erros nos mecanismos de recombinação, fato que garante que novas seqüências de VSG sejam formadas (Morrison *et al*, 2009).

Em *E. granulosus sensu lato*, foram reportadas algumas evidências que indicam algum nível de instabilidade genômica. Em 2001, Rosenzvit *et al* descreveram a existência de um elemento genético variável entre as espécies de *Echinococcus*. A variação do número de cópias deste elemento é bastante grande, variando de menos de 10 cópias em *E. granulosus sensu stricto* até mais de 20000 em *E. canadensis*. O fato interessante é que quando os autores analisaram diferentes indivíduos pertencentes à mesma espécie eles também encontram heterogeneidade em relação ao número de cópias deste elemento entre os indivíduos. Como a função deste elemento repetitivo é desconhecida, não puderam ser feitas inferências sobre o significado desta variação. Posteriormente, Haag *et al* (2006a) reportaram grande variação no número de cópias dos genes do AgB entre indivíduos da mesma espécie em *E. granulosus sensu stricto*, *E. multilocularis* e em *E. ortleppi*. As causas e conseqüências desta heterogeneidade ainda não estão esclarecidas.

4. Antígeno B – Função, Expressão e Diversidade

Durante a fase de metacestóide, 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, é uma mistura complexa de moléculas tanto de

origem do parasito, mas também de origem do hospedeiro. Dentre os principais componentes desta mistura encontramos sais inorgânicos, ácidos nucleicos, além de muitas proteínas (McManus e Bryant, 1995). Entre as proteínas mais abundantes, destaca-se o AgB, que compõe cerca de 10% da massa de proteínas do fluido (Oriol *et al*, 1971).

O AgB nativo é uma lipoproteína termoestável (Oriol *et al*, 1971) com peso molecular de aproximadamente 120-160 kDa (Oriol e Oriol, 1975; Lightowlers *et al*, 1989,). O AgB, até o momento, foi localizado no tegumento dos protoescoléces, na camada germinativa, além de ser secretado abundantemente no líquido hidático (Richard *et al*, 1977; Sanches *et al*, 1991).

Análises em gel desnaturante de poliacrilamida (PAGE-SDS), Lightowlers *et a.* (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 seja um polímero composto por subunidades de 8 kDa. Além disso, Gonzáles-Sapienza *et al* (1996) purificaram subunidades do AgB de 8, 16, 24 e 32 kDa, e em cada extrato foi confirmada a presença do peptídeo AgB1 (Shepherd *et al*, 1991; Frosch *et al*, 1994) e do peptídeo AgB2 (Fernandez *et al*, 1996). Este fato levou os autores a sugerirem que os peptídeos codificados a partir de cada um destes peptídeos seriam subunidades utilizadas para construir blocos maiores.

O AgB é um dos mais importantes antígenos utilizados para o imunodiagnóstico de equinococose (Lightowlers e Gottstein, 1995), e é considerado específico para o gênero *Echinococcus* (Maddison *et al*, 1989).

Os genes que codificam o AgB estão representados em vários loci no genoma de *Echinococcus*, constituindo uma família gênica (Chemale *et al*, 2001). Cinco genes do AgB já foram amplamente estudados e caracterizados em *E. granulosus sensu lato*, *AgB1* (Frosch *et al*, 1994), *AgB2* (Férnandez *et al*, 1996), *AgB3* (Chemale *et al*, 2001), *AgB4* (Arend *et al*, 2004) e *AgB5* (Mamuti *et al*, 2007). A transcrição no metacéstóide de cada um destes genes foi confirmada pelo isolamento de seus respectivos cDNAs, entretanto, mais evidências experimentais são requeridas para acessar se estas distintas

isoformas realmente codificam subunidades presentes no AgB nativo. Haag *et al* (2004) sugeriram que o número de genes do AgB pode ser ainda maior, já que experimentos de *Southern Blot* indicam a existência de pelo menos sete loci no genoma de *E. granulosus sensu stricto*. No mesmo trabalho, os autores encontraram seqüências de um gene adicional, relacionado à *AgB3* e que foi apenas parcialmente caracterizado, sendo chamado nesta tese de *AgB5/Haag*. Análises em outras espécies de *Echinococcus* revelaram que todas elas possuem genes homólogos a *AgB1*, - 4, indicando que os genes codificadores dessas subunidades surgiram e se diversificaram antes da especiação que levou à formação do complexo de espécies encontrado atualmente (Haag *et al*, 2006b).

Todos os genes da família AgB contêm uma estrutura muito similar, constituída por uma pequena seqüência aberta de leitura (*Open Reading Frame* - ORF), interrompida por um íntron, que geralmente contém repetições do motivo CCT. O primeiro éxon codifica um peptídeo sinal, enquanto o segundo codifica a proteína secretada. As repetições dos motivos CCT poderiam facilitar recombinação intergênica de diferentes membros da família do AgB.

A primeira seqüência relacionada ao AgB foi isolada de *E. granulosus sensu lato* por Shepherd *et al* (1991) e tratava-se uma seqüência de cDNA de 275 pb representando a região carboxi-terminal de uma das subunidades de 8 kDa. Já em 1994, Frosch *et al* isolaram um cDNA de 338 pb representando a seqüência completa dessa mesma subunidade chamando-a de *AgB1*. O primeiro éxon tem 45 pb e o segundo 210 pb interrompidos por um íntron de 92 pb (Frosch *et al*, 1994; Rott *et al*, 2000). No mesmo trabalho, Frosch *et al* identificaram heterogeneidade entre as seqüências nucleotídicas do *AgB1* presentes em diferentes isolados, sugerindo a existência de polimorfismo.

O gene para uma segunda subunidade, *AgB2*, foi inicialmente descrito por Fernandez *et al* (1996), através da caracterização de um cDNA. A seqüência genômica, assim como a do gene *AgB1*, é composta por dois éxons interrompidos por um íntron de 68 pb, tendo o primeiro éxon 60 e o segundo 210 nucleotídeos (Rott *et al*, 2000).

Chemale *et al.* (2001) e Arend *et al.* (2004) isolaram o terceiro (*AgB3*) e o quarto gene (*AgB4*) desta família em *E. granulosus sensu lato*. A seqüência genômica de *AgB3* apresenta dois éxons com 20 e 208 pb e um íntron com 137 pb. As seqüências disponíveis do gene *AgB4* demonstram um éxon incompleto com 14 pb e outro com 196 pb, sendo que o íntron possui 68 pb. Em um trabalho baseado em PCR e clonagem, Haag *et al* (2004) encontraram uma seqüência adicional, muito similar aos genes do AgB em estrutura e composição de bases, a qual foi classificada com um novo gene, denominado provisoriamente de *AgB5*.

O sexto gene a ser descrito foi o *AgB5*, e as seqüências disponíveis deste gene indicam uma estrutura bastante similar aos anteriormente descritos, sendo composto por dois éxons divididos por um íntron de 60 pb. Até o momento, este gene foi descrito em três espécies, *E. multilocularis*, *E. granulosus sensu stricto* e *E. canadensis* (haplótipo G6). A seqüência do segundo éxon corresponde a 224 pb e quando comparado com os outros genes do AgB, forma um agrupamento intermediário aos grupos *EgAgB2/4* e *EgAgB1/3*, caracterizando esta seqüência como pertencente a um gene adicional (Mamuti *et al*, 2007). Na figura 5, mostra-se as relações entre os genes do AgB descritos.

Posteriormente, devido à descoberta de outros loci gênicos e à reclassificação dos genes dentro da família AgB, notou-se que a família AgB podia ser dividida em cinco sub-famílias gênicas, cada uma correspondente aos genes descritos até o momento (Mamuti *et al*, 2007). Neste novo contexto, levando-se em consideração a grande similaridade das seqüências do loci *AgB5/Haag* (Haag *et al*, 2004) com as do loci *AgB3* (Chemale *et al*, 2001), este loci foi reclassificado como um gene da sub-família *AgB3*, sendo provisoriamente chamado de *AgB5/Haag* (Mamuti *et al*, 2007). Recentemente, um trabalho baseado em PCR e seqüenciamento encontrou dez grupos de seqüências relacionadas ao AgB, divididas em 5 subfamílias, sugerindo que a família gênica seja composta por 10 genes e confirmando o agrupamento em cinco subfamílias (Zhang *et al*, 2010).

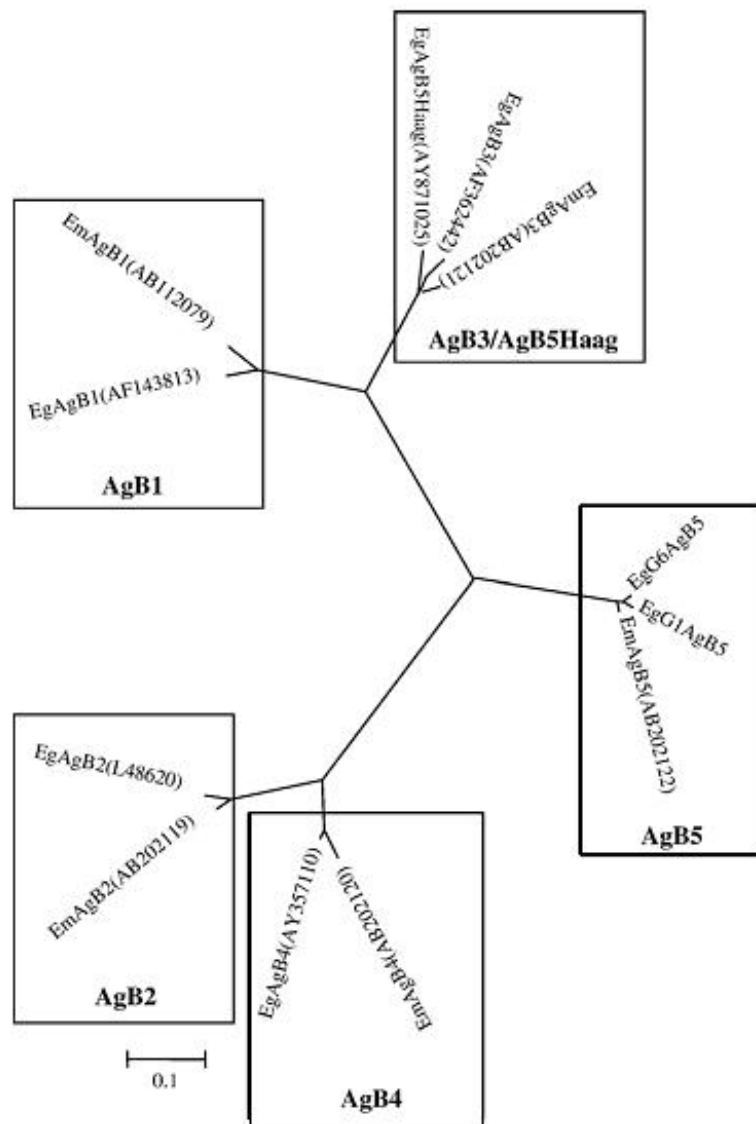


Figura 5: Reconstrução filogenética obtida a partir da análise de seqüências do segundo éxon dos cinco genes do AgB descritos (o número de acesso das seqüências esta representado entre parênteses). A filogenia foi obtida a partir do método de *Neighbour Joining* e utilizou seqüências de *E. granulosus sensu stricto*, *E. canadensis* e *E. multilocularis*. Na figura, notamos que os genes *AgB1* e *AgB3* formam um agrupamento bem como os genes *AgB2* e *AgB4*. A similaridade entre os genes *AgB1* e *AgB3* em *E. granulosus sensu stricto* é em torno de 63% e entre *AgB2* e *AgB4* em torno de 72%. *AgB5* apresenta similaridade variando de 42% com *AgB2* até 54% com *AgB3*. Modificado a partir de Mamuti *et al* (2007).

Várias abordagens foram utilizadas para acessar a função do AgB. Estudos *in vitro* demonstraram que ele inibe elastases e a quimiotaxia de neutrófilos (Shepherd *et al.*, 1991), além de induzir apoptose em células do sistema imune de pacientes com equinococose cística (Siracusano *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que ele reduz a secreção de radicais livres em neutrófilos, podendo ter um importante papel na sobrevivência do parasito (Virginio *et al.*, 2007).

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* *senso stricto* divididos em dois grupos: com doença progressiva e com doença estável. Os autores encontraram que o AgB alterou a secreção de citocinas, originando um padrão do tipo Th2, com aumento de secreção de IL4 e IL13 e decréscimo na secreção de IL12, principalmente nos pacientes com a forma progressiva da doença, evidenciando um papel importante do AgB na proteção do parasito. Em 2007, Riganò *et al* demonstraram que o AgB é capaz de interferir com a diferenciação de monócitos em células dendríticas, as quais são necessárias para a apresentação de antígenos e geração de uma reposta imune adaptativa. Além disso, ele altera a maturação de células dendríticas já diferenciadas, levando-as a produzir IL4, citocinas relacionada com a resposta Th2 e diminuir a produção de IL12, citocina relacionada à reposta Th1.

Além disso, o AgB também pode estar relacionado com o metabolismo de lipídeos. A estrutura tridimensional predita do AgB mostra similaridades com um grupo de proteínas de cestóides 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 o AgB é eficiente em ligar-se a ácidos graxos, mas não os libera com facilidade, sugerindo que o antígeno B pode atuar na captura e detoxificação de metabólitos lipídicos.

Uma abordagem semi-quantitativa foi aplicada para avaliar a expressão diferencial dos genes do antígeno B de *E. multilocularis* em diferentes fases do

desenvolvimento (Mamuti *et al*, 2006b). A expressão dos genes *AgB1*, *AgB2* e *AgB4* aparentemente diminui com a progressão do desenvolvimento do parasito, sendo fortemente expressos em vesículas germinativas, moderadamente expressos em protoescóleces e fracamente expressos no verme adulto. O gene *AgB5*, é praticamente não detectável em vesículas germinativas e protoescóleces, tornando-se presente no verme adulto. O gene *AgB3* é expresso constitutivamente durante o desenvolvimento do parasito. Estes dados indicam a possibilidade de cada peptídeo 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*, 2006b).

Os genes do *AgB* 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 *AgB1* quando amostras de *Echinococcus granulosus sensu stricto* de diferentes regiões geográficas foram comparadas (Frosch *et al*, 1994). Já em 1998, foi demonstrada a existência de heterogeneidade nas seqüências do gene *AgB1* entre as espécies de *E. granulosus sensu stricto*, *E. ortleppi*, *E. equinus* e *E. canadensis* (Haag *et al*, 1998).

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 protoescólex, respectivamente. Nos trabalhos citados acima, foram encontradas muitas seqüências ligeiramente divergentes (substituições de apenas um nucleotídeo) em todos os genes do *AgB* conhecidos até então. No trabalho de Haag *et al* (2004), por exemplo, em um mesmo metacestóide foram encontradas oito, cinco, onze e sete seqüências variantes dos genes *AgB1-4*, respectivamente (de um total de 24, 25, 10 e 39 seqüências analisadas, respectivamente). A origem desta variabilidade ainda não é totalmente compreendida.

A variação encontrada entre as seqüências do *AgB* de diferentes linhagens de *E. granulosus sensu lato* poderia ser explicada pelo fato de que

as linhagens representam entidades biológicas distintas, as quais evoluíram em contato com diferentes hospedeiros intermediários (Kamenetzky *et al*, 2005, Haag *et al*, 2006b). De fato, Haag *et al* (2006b) demonstraram que a evolução dos genes *AgB1*, *AgB3* e *AgB4* foi adaptativa. A variação encontrada dentro de um mesmo cisto poderia ser originada por mutações que ocorrem durante a reprodução clonal das células no interior do cisto (diferenças entre células), mas também poderia representar a presença de várias cópias ligeiramente diferentes do mesmo gene no genoma, embora as duas possibilidades não sejam mutuamente excludentes (Haag *et al*, 2004).

Existem algumas evidências nos genes do AgB que indicam uma possível atuação da seleção diversificadora durante a evolução destes genes. Por exemplo, a análise da diversidade nucleotídica entre *AgB1* e *AgB2* 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. A diversidade dos aminoácidos do AgB mostrou-se maior que a diversidade nucleotídica (Rott *et al* 2000).

Mais ainda, a comparação de seqüências do gene *AgB1* de diferentes espécies de *Echinococcus* sugere a ocorrência de seleção positiva (Haag *et al*, 1998). Foi observado que a maioria das substituições encontradas por pareamento das seqüências eram não-sinônimas, e o número relativo de substituições não sinônimas e sinônimas (Ka/Ks) foi maior do que 1, em seis de um total de 15 comparações. Além disso, Haag *et al* (2006b) mapearam códons dos quatro genes do AgB que estariam sofrendo seleção diversificadora, e encontram sítios sofrendo seleção positiva nos genes *AgB1*, *AgB3* e *AgB4* mas não no gene *AgB2* (Haag *et al*, 2006b).

Entretanto, analisando as mutações originadas durante a proliferação celular do estágio larval de *E. multilocularis* em camundongos proficientes e não-proficientes quanto a resposta celular mediada por célula T (uma resposta capaz de, eficientemente, inibir o crescimento larval de *Echinococcus*) Graichen *et al* (2007) não encontraram excesso de mutações não-sinônimas nos genes do AgB, nem em parasitos recuperados de camundongos proficientes nem em parasitos recuperados de camundongos não-proficientes.

Desta maneira, não foi possível evidenciar a presença de seleção diversificadora sobre as mutações originadas nos genes do AgB durante o crescimento larval dentro do hospedeiro intermediário e nem de correlacionar a seleção das mutações diretamente com a resposta imune mediada por células T. Este fato sugere que a seleção sobre diversidade de seqüências do AgB observada no metacésteioide seja muito fraca para ser detectada pelos métodos utilizados, sendo observável somente depois de várias gerações.

O significado biológico da grande variabilidade para os genes do AgB dentro de um mesmo indivíduo ainda não é totalmente compreendido, podendo estar relacionado com mecanismos adaptativos do parasito a seus hospedeiros ou simplesmente ser um subproduto do metabolismo celular.

Através de experimentos de PCR em tempo real, comparando isolados da mesma espécie, foi observado que os genes do AgB apresentam um variado número de cópias (Haag *et al*, 2006a). Esta redundância de cópias de um mesmo gene poderia representar uma estratégia do parasito para aumentar os níveis de expressão de determinados genes, ou um mecanismo gerador de variabilidade. Os mecanismos subjacentes a esta variação ainda não foram elucidados.

Capítulo 2: Justificativas científicas e objetivos

1. Justificativas

Os genes do AgB de *Echinococcus* representam um sistema genético com grande diversidade (Haag *et al*, 2004, Kamenetzky *et al*, 2005). Além disso, foi verificado que um mesmo organismo possui variantes ligeiramente diversas de um mesmo gene (Arend *et al*, 2004, Haag *et al*, 2004). Também tem sido demonstrado que o número de cópias dos genes é polimórfico dentro de uma mesma população (Haag *et al*, 2006a). A compreensão sobre as causas e mecanismos de origem desta hipervariabilidade ainda necessita de esclarecimentos sobre a formação dos alelos variantes e sobre a causa da variabilidade no número de cópias

A diversidade encontrada nos genes do AgB tem sido relacionada à evasão da resposta imune do hospedeiro intermediário (Riganò *et al*, 2001). Baseado no fato de que os genes do AgB apresentam um espectro de expressão mais amplo que o pensado anteriormente, isto é, a expressão de alguns genes desta família gênica não está restrita à fase larval, mas estende até a fase adulta (Mamuti *et al*, 2006b, Zhang *et al*, 2010), torna-se necessário elucidar se a enorme heterogeneidade de seqüências encontrada nestes vermes na fase larval também está presente na fase de verme adulto

Além disso, uma profunda compreensão do papel do AgB na biologia de *Echinococcus* depende da elucidação das propriedades físico-químicas e da localização de cada uma de suas subunidades.

2. Objetivos

Dentro deste contexto, originalmente propusemos os seguintes objetivos para a presente tese:

- Testar a hipótese de expressão diferencial dos genes do AgB em várias fases do desenvolvimento de *Echinococcus granulosus sensu stricto*: ovo, oncosfera, verme adulto imaturo, verme adulto maduro, membrana germinativa e protoescólex;
- Detectar a presença de cada peptídeo nas diferentes fases do desenvolvimento;
- Verificar a ocorrência da amplificação do número de seqüências genômicas de cada um dos genes do AgB nestas fases;
- Confirmar a heterogeneidade observada no número de cópias de cada gene quando se analisa indivíduos diferentes de uma mesma população;
- Determinar a variabilidade de seqüências do AgB durante a fase de verme adulto;
- Testar a hipótese de seleção diversificadora na origem da variabilidade das seqüências do AgB em cada etapa do desenvolvimento.

Capítulo 3: Manuscrito 1

Manuscrito submetido à revista Plos: Neglected and Tropical Disease.

Genomic instability of Echinococcus inferred from Antigen B gene numbers.

Daniel A. S. Graichen¹, Norbert Muller², Bruno Gottstein², Karen L. Haag^{3,4*}

1 Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2 Institute of Parasitology, Veterinary Faculty, University of Berne, Switzerland

3 Department of Evolutionary Biology, Zoological Institute, University of Basel, Switzerland.

4 Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author:

Karen L. Haag, E-mail karen.haag@unibas.ch, Tel. +41 (61) 267-0374, Fax. +41 (61) 267-0362

Abstract

Background: Antigen B (AgB) is an *Echinococcus* cross-talk protein encoded by a multigene family. It is well known for showing a marked polymorphism across isolates from distinct *Echinococcus* strains and species, a trait that has been attributed to the ability of parasites to adapt to different intermediate hosts species. However, AgB sequence heterogeneity does not always correlate to distinct host origin or parasite isolate, since it may also be found among specific amplicons obtained from a single cyst (isolate). The causes and consequences of within isolate AgB diversity remain unclear. One explanation posits that because the gene family is very large, distinct copies from the same genes do not evolve in concert. The genomes of both *E. multilocularis* and *E. granulosus* do not support this view, however.

Methodology/Principal Findings: To investigate the hypothesis of genetic instability as a mechanistic basis for within isolate AgB variation, we performed quantitative PCR experiments on single protoscoleces for AgB1-5 genes. Examining samples of six and seven protoscoleces from two *E. granulosus* cysts, we found large diversity in AgB number of copies. Relative quantifications using the single copy *mdh* gene as a standard show a 10-fold copy number variation among protoscoleces from the same and from different cysts. Our Southern blot experiments show less polymorphism in AgB copy number, but we inferred at least nine loci in *E. granulosus* and 10 in *E. ortleppi*. For *E. ortleppi* we found a polymorphic AgB3 hybridization pattern. Additional but more indirect evidence of genomic instability was found in the *E. multilocularis* genome database, where we identified a set of nine canonical AgB genes and one pseudogene, plus 34 AgB-related sequences that could provide sites for heterologous recombination and/or gene conversion. A new putative AgB gene, which we named AgB6, was also found in the *E. multilocularis* genome.

Conclusions/Significance: The evidence provided here suggests that the genome of *Echinococcus* may be more unstable than previously thought, thus challenging us to rethink our approaches for studying the molecular biology of this parasite. AgB is associated with the parasite's ability to escape its host's immune response and is also supposed to buffer xenobiotic metabolites. Gene amplification might be an alternative way to enhance gene expression and to generate variant antigens. Our results evidence that we are still at the beginning of a detailed understanding of AgB genetics.

Author summary

Several studies on the genetic diversity of *Echinococcus* AgB genes have shown that a single organism can harbor many slightly different variants of the same gene and that the number of AgB genes varies among isolates. The mechanism behind gene number polymorphism, however, is unknown. In this paper we provide evidence for variation in the number of AgB gene numbers among protoscoleces generated asexually within a single cyst, a phenomenon that can only be explained by genomic instability in the form of gene amplification, associated with somatic mutations. The *E. multilocularis* genome database and our Southern blots on *E. granulosus* and *E. ortleppi* genomic DNA show that the AgB family is comprised of a basic set of nine to ten genes. We characterize a new putative AgB gene in *E. multilocularis* named AgB6.

1. Introduction

Antigen B (AgB) is a parasite cross-talk molecule and one of the most abundant proteins in the cyst fluid of the Cestode *Echinococcus* [1]. It appears to play a role in long-term parasite survival by modulating host immune responses [2]. The native protein of about 160 kDa is an oligomer composed of eight kDa subunits [3, 4] that are encoded by a gene family [5]. Until now, five genes have been described as belonging to the *AgB* gene family (*AgB1* to 5) [6, 7, 5, 8, 9]. Within the *AgB* genealogy, the *AgB1-3* and *AgB2-4* gene pairs have a close relationship, with similarities of 63% and 82%, respectively [8]. *AgB5* forms a separate clade in the tree, and has a nucleotide sequence similarity ranging from 42 percent with *AgB2*, to 54 percent with *AgB3* [9]. *AgB5* transcripts are predominantly found in the adult stage, whereas *AgB3* is constitutively expressed [10, 11]. Amongst the other known family members, *AgB3* shows the highest levels of transcription in *E. granulosus* [11] but not in *E. multilocularis*, where *AgB4* is more expressed [12].

Previous studies have suggested that there are at least seven loci in both the *E. granulosus* and *E. multilocularis* genomes [13, 14]. Recently, Zhang *et al* [11] suggested that the *AgB* family could comprise upwards of 10 loci in *E. granulosus*; however, these findings are based on PCRs followed by cloning and sequencing, a method that does not distinguish variation among loci from allelic polymorphism. In other words, this estimate might be inflated by allelic variation. Indeed, a great deal of genetic diversity has been shown in *Echinococcus AgB* genes. Kamenetzky *et al* [15] and Haag *et al* [16] described *AgB* nucleotide polymorphisms among hydatid cysts obtained from different host species and suggested that they might be related to the adaptation to particular hosts. *AgB* genetic diversity has been also found within a single hydatid cyst [8] and even within a single protoscolex [13], resembling some sort of antigenic variation, a phenomenon known for microparasites. Metacestodes from nude mice (devoid of T-cell immune responses) infected with *E. multilocularis* vesicles did not, however, show significant differences in *AgB* variability compared to parasites from BALB/c controls [12]. Although metacestodes from both hosts consistently showed a number of slightly

different variants for the same gene, variability during parasite development was interpreted as side-product of cellular proliferation (somatic hypermutation), since no footprints of positive selection could be found in these DNA sequences [12]. Nevertheless, it is not possible to exclude that *AgB* variability within a single host may play some adaptive role.

Interestingly, *AgB* genes are also diverse in copy numbers. Having found a large amount of polymorphism in the number of *AgB* genes among different cysts, Haag *et al* [17] proposed the hypothesis that *AgB* genetic diversity and genomic instability leading to variation in number of copies could be linked. Clues suggesting genomic instability have already been found for other *Echinococcus*. For example, a study of polymorphic satellites in *Echinococcus* isolates from Argentina found a great disparity in the number of copies among different *Echinococcus* species—ranging from six to seven in *Echinococcus granulosus* (G1 haplotype) to 23,000 in *Echinococcus canadensis* (G7 haplotype) [18]. Furthermore, the authors found intraspecific polymorphism in the number of repeats among isolates from both species. Later, extensive intraspecific variability of *AgB* copy numbers was also demonstrated for *E. multilocularis*, *E. granulosus* and *E. ortleppi*, although the mechanism behind this remarkable feature is still unknown [17].

It has long been noted that the genome is not a static entity. The more familiar examples of this mutability are the presence of innumerable active, transposable elements [19] and immunoglobulin diversification during mammal development [20]. However, many other organisms also take advantage of genomic plasticity to control their development, either by amplifying the number of genes (i.e. rDNA genes are amplified in *Xenopus* oocytes [21], as well as genes encoding eggshell structural proteins in *Drosophila* [22]), or by rearranging the chromatin (i.e. *VSG* genes in African trypanosomes [23], scrambled genes from ciliates [24]).

Genomic instability is key for genome remodeling and can lead to genomic variation, even inside isolineages. Extensive variation in the abundance of W1 and W2 elements was found in a clonal population of *Schistosoma mansoni*; this could only be explained by genomic instability at meiotic and mitotic levels

[25]. Although genomic instability is usually a random process, it can sometimes be controlled, as during immunoglobulin diversification (26). The mechanisms behind genetic instability are diverse and may include the presence of mutation and recombination hotspots, the presence of an active transposon, or the presence of defective enzymes involved in DNA repair, replication and checkpoint processes [26]. Moreover, instability itself plays an important role in evolution by generating new gene variants and promoting genetic polymorphism within populations [27], allowing for natural selection.

A common form of genomic instability associated with genomic rearrangements is gene amplification [28]. It is noteworthy that when genomic instability leads to gene number variation, it is also frequently associated with increased levels of expression of the target genes, for example in tumor tissues [29], or with generation of variability, as has been demonstrated for the variable region of the antibody genes in mammals [30]. In *VSG* genes from *Trypanosoma brucei*, for example, gene rearrangements associated with genomic instability are related both to the production of new *VSG* alleles, which is linked to parasite survival, and to the control of gene expression by translocating genes to appropriated (expressed) genomic regions [31].

In this article, we report a large variation of *AgB* gene copies inside the genome of single *E. granulosus* protoscoleces that were isolated each from two cysts of the same genotype. This heterogeneity of *AgB* gene numbers further demonstrates the genomic instability of *Echinococcus* metacestodes. We discuss the possible causes and implications of these findings.

2. Materials and Methods

2.1 Parasite materials

The larval stages of *Echinococcus* were collected from naturally infected animals in southern Brazil where both *E. granulosus* (haplotype G1) and *E. ortleppi* (haplotype G5) are endemic. Cysts were collected in commercial slaughterhouses and kept at 4°C until dissection. All sampled animals were

intended for slaughter and were already dead (for beef production) when the parasite samples were obtained. Protoscoleces were isolated by aseptic puncture, left for decantation and then washed three times in 1X phosphate buffered saline (PBS). All parasites were stored in RNeasy Lysis Buffer (Quiagen Inc) at -20° C until they were needed. The parasite species of each cyst was determined according to its mitochondrial haplotype, assessed by the partial sequence of the *cox1* gene [32].

2.2 Southern blots

In order to obtain a large amount of high quality DNA, we performed a two-step protocol. Initially, the DNA from protoscoleces from a single cyst was isolated using a standard phenol-chloroform protocol. To eliminate phenol residues that could inhibit the digestion assay, a second purification step was carried out using a commercial kit for DNA isolation (Invitrogen Inc). After purification, DNA concentration was quantified with a NanoDrop instrument (Thermo Scientific Inc) and stored at -20° C until use. Three isolates from each mitochondrial haplotype were chosen for digestion with *Hae* III. Four micrograms of the purified genomic DNA were digested for 10 hours, run in an 0.8 percent agarose gel at 2V/cm for 12 hours, and then transferred to a nylon membrane by capillarity. The hybridization protocol was performed according to Sambrook and Russel [33] at 55° C, probing each gene individually. We performed four 10-minute washing steps with decreasing SSC concentration (5X, 2X, 1X and 0,5X) at 55° C. Probes were obtained by cloning the second exon of *E. granulosus* *AgB* genes into plasmids and using them as templates to generate cytosine-radio-labeled PCR fragments. There is one *Hae*III restriction site inside *AgB3* and another in *AgB5* genes (these sites are located 26 and 18 nucleotides away from the probe end, respectively). Due to their small size and the high stringent hybridization and washing conditions used, the significance of these restriction sites was considered irrelevant and insufficient to generate a positive signal in our Southern Blot experiments. Detection was conducted using the Pharos System (BioRad) according to the equipment instructions.

2.3 AgB quantification in single protoscolecemes

Thirteen single protoscolecemes were isolated from two different *E. granulosus* cysts (genotype G1) isolated from different animals. DNA preparation was done by incubating each protoscolex in a 100 µl solution containing 2 ng of proteinase K at 55° C for 2 hours, followed by 15 minutes at 95° C. After digestion, materials were stored at -20 °C until use. Real time PCR reactions were performed in triplicate using 4 µl of protoscolex solution as a template and 5 µl of SyberGreen Master Mix (Corbett life Science). Six sets of specific primers were used (25 mM). As primers for *AgB1-4* and *mdh* were previously used by Haag *et al* [17] in similar quantitative PCRs, we designed the following primer pair for *AgB5*: GAA GAT GAC ATC GAT TCG AAA G (forward) and GAT CGA GCT TTT GTC CTG GC (reverse). The PCR program was carried out in a Rotorgene 6000 machine (Corbett life Science) and consisted of an initial 94° C denaturation step lasting 15 minutes, followed by 40 cycles of 94° C for 30 s, 55° C for 15 s, 72° C for 15 s and 82° C for 1 s. Fluorescence measurements were taken at 82° C. To exclude the possibility of cross-amplification of related AgB genes, we tested the specificity of each primer set by high resolution melting analysis. This was done by heating the amplicons in steps of 0.1° C from 70° C to 95° C followed by fluorescence measurement. The number of copies of each *AgB* gene was estimated by comparing their template count with that obtained for the *mdh* single copy gene according to the method described by Haag *et al* [17]. An additional normalization step was used to generate a comparative scenario among protoscolecemes. For each cyst and primer pair used, the smallest fluorescence measurement taken from a protoscolex was set at 1, allowing the relative number of copies in others protoscolecemes to be calculated in relation to this measurement. A one-way ANOVA test was carried out to determine the statistic significance of the results.

2.4 In silico survey for AgB-related sequences on *E. multilocularis* genome

In order to find further evidence for redundancy in the *AgB* gene family, we conducted a detailed *in silico* survey in the *E. multilocularis* genome sequence database. First, we performed a similarity search using the BLASTn and/or tBLASTx tool provided by the Wellcome Trust Sanger Institute at the website <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/Echinococcus>. The second exons from *EmAgB1-5* genes were used as query (HM357145, HM357146, HM357147, HM357148, HM357149), and we chose sequences matching at least 100 nucleotides with similarity higher than 50 percent for more detailed analysis. Once selected, *AgB*-related sequences were aligned with ClustalX software [34], and the properties of each sequence were analyzed as described below. The presence of ORFs was analyzed with the tool ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>), and the amino acid sequences were determined using the software GeneDoc [35]. Sequences without an ORF were excluded from posterior analysis. Additional genetic elements (intron, splicing sites and promoters) were inferred using Bioedit [36] and a neural network promoter prediction algorithm (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). The phylogenetic relationship among the selected sequences was inferred using the MrBayes software [37] with deduced amino acid and mRNA sequences.

3. Results

3.1 Genomic organization of AgB loci in *E. granulosus* and *E. ortleppi*

To analyze the genomic organization of *AgB* genes in different *E. granulosus* and *E. ortleppi* metacestodes, we performed Southern blot hybridizations individually using the second exon of each *AgB* gene as a probe. Cross-reactivity was observed between gene pairs *AgB1,3* and *AgB2,4* (Fig. 1), which share approximately 65 percent and 82 percent similarity, respectively, within the probe sequence. We did not find variation in *AgB4* and *AgB5* banding

patterns, either among *E. granulosus* or *E. ortleppi* isolates. Five genetic loci could be inferred from the *AgB1/3* hybridizations in both species. Although all *E. granulosus* isolates presented the same pattern for *AgB1/3*, every *E. ortleppi* isolate showed a distinctive pattern (Fig. 1). Moreover, isolate number 5 (Fig. 1, lane 12), identified as *E. ortleppi* by the mitochondrial *cox1* haplotype (data not shown), showed an *AgB1/3* pattern identical to *E. granulosus*. For the gene pair *AgB2/4*, two loci were identified in *E. granulosus*, while one *E. ortleppi* isolate showed three loci when the *AgB2* probe was used (Fig. 1, lane 12). *Echinococcus* isolates from both species presented two identical hybridization bands for *AgB5*. In total, nine *AgB*-related bands were found for *E. granulosus* and ten for *E. ortleppi*, leading us to infer that at least nine and ten loci are present in each genome, respectively.

Surprisingly, the single copy *mdh* gene showed a two-banded hybridization pattern in one *E. granulosus* isolate (Fig. 1, lane 7). We interpret it as heterozygosity, rather than duplication, because each band also appears in each of the two other *E. granulosus* isolates (lanes 8 and 9). This polymorphism occurs in *E. ortleppi* as well (see lanes 11 and 12 in Fig. 1).

3.2 Metacestode heterogeneity in *AgB* number of copies.

To verify whether all protoscoleces of an *E. granulosus* cyst contain the same number of *AgB* genes, we conducted a quantitative PCR experiment. A high resolution melting analysis confirmed that our primer sets are specific, resulting in only one amplicon per primer set (not shown). The estimated number of *AgB* genes varied extensively among protoscoleces within a cyst. In cyst A, the number of copies was dramatically increased for every *AgB* gene in protoscolex number 6, but not in others (Fig. 2). For cyst B, we observed a more complex scenario. In protoscolex number 13, an increased number of copies was found for *AgB2-5* genes but not for *AgB1*. Protoscolex number 8 presented an increased number of copies for genes *AgB3*, *AgB4* and *AgB5* but not for *AgB1* and *AgB2*. Protoscolex number 10 displayed an excess of *AgB1* copies only, and number 9 showed fewer *AgB2* copies than other protoscoleces

(Fig. 2). The number of *AgB* genes among protoscoleces seemed to be largely variable. In cyst A the number of copies varied from less than 5X (*AgB4*) to about 20X (*AgB1* and *AgB5*). Variation in cyst B was slightly more accentuated, reaching more than 30X for *AgB4*.

3.3 Genome analysis reveals putative *AgB* genes

Unfortunately, there is only a single, incomplete genome database available for the *Echinococcus* genus, hindering comparative studies to assess genomic instability directly. Nevertheless, we searched the latest assembly of the *E. multilocularis* genome (Version 1 of August, 13th 2010) for additional data on *AgB* redundancy that could be relevant to genomic instability. As described previously [14], all canonical *AgB* sequences are located on scaffold 29 (Table S1) and consist of one *EmAgB1* gene (A3, on Table S1), one *EmAgB2* (B6), three *EmAgB3* (C9, C10 and C11), one *EmAgB4* (D5) and one *EmAgB5* (E2). There is also an *EmAgB2*-related pseudogene in scaffold 29 (B7 sequence) that lacks the intron and a promoter element. Furthermore, this sequence contains an insertion of five nucleotides before the second exon, which causes a frameshift (Fig. S1). Our BLASTn analyses revealed 34 additional *AgB*-related sequences in the *E. multilocularis* genome (four related to *EmAgB1*, 11 to *EmAgB2*, nine to *EmAgB3*, seven to *EmAgB4* and three to *EmAgB5*) that were distributed over 23 different scaffolds and one contig (Table S1). From the 34 sequences, 19 were longer than 100 nucleotides and showed a similarity higher than 50 percent to the canonical sequences. These sequences are presumed to be noncoding, since the region comprising 200 nucleotides upstream or downstream from the matching region contains several stop codons in all six reading frames.

Scaffold 7, which contains a large internal duplication of approximately 30 Mbp, was unique in that two identical *AgB*-related sequences separated by 14,147 bp (named A1 and A2) were found here (Fig. S1A). These two sequences were identified using *AgB1* as a query (see Table S1), and they contain the typical elements of other *AgB* genes (Fig. S1B): a first exon of 48 bp

encoding a signal peptide, an intron of 225 bp, and a second exon of 185 bp, which is 50 percent similar to the second exon of *EmAgB3* and *EmAgB4*. The presence of apparently integral promoters—including the TATAA element located -67 to -17 bp upstream from the first methionine—suggests that the genes are functional (Fig. S1B). A translated BLAST search (tBLASTx) results in an E-value not lower than e^{-7} with other member of the *E. multilocularis* *AgB* family, confirming their homology. The proteins deduced from these genes (Fig. S1C) show a similarity of 36.9 percent with *EmAgB3* (sequence C11) and 36.2 percent with *EmAgB4* (sequence D6). A BLASTn search on the GenBank database using the second exon of A1/2 as a query did not return any similar nucleotide sequence, but a tBLASTx search revealed that its putatively encoded protein is closely related to a *Taenia crassiceps* immunodiagnostic antigen expressed at the metacystode stage (U07150, [38]) with amino acid similarity of 93 percent, a score of 522 and an E-value of $3e^{-27}$. Similarly large tBLASTx scores and E-values were obtained for *Taenia solium* low molecular weight antigens, by using the second exon of A1/2 as a query.

A bayesian phylogenetic analysis of the ORFs found in our survey of the *E. multilocularis* genome revealed that sequences A1 and A2 might belong to the *AgB* gene family (Fig. 3), which we named *EmAgB6a* and *EmAgB6b*. Unfortunately, their corresponding mRNAs are not found in any *E. multilocularis* EST library. Sequence B7 located on scaffold 29 probably represents a pseudogene, since it lacks promoter elements and the predicted protein is truncated by several stop codons. Because it does not contain the intron, it is possibly derived from the insertion event of a reverse transcribed mRNA.

4. Discussion

The variation observed in our *AgB1/3* Southern blots for *E. orteppi* clearly indicates the occurrence of genome rearrangements. Since the *E. multilocularis* genome contains three *AgB3* genes [14], redundancy may provide favorable conditions for these rearrangements. Indeed, footprints of gene conversion involving *EgAgB3* genes had previously been found, and estimates of relative

AgB3 copy number variation of pooled protoscoleces from six *E. orteppi* cysts showed a variation from 7 to 117 [17]. The hybridization experiments show nine *AgB* loci in *E. granulosus* and 10 in *E. orteppi*. These numbers are larger than those suggested for *E. granulosus* by Haag *et al* [13] and Chemale *et al* [5] based on genomic Southern blots; they are also larger than those suggested for *E. multilocularis* by Brehm *et al* [14], based on the available genome database (see Table S2). Previous Southern blots performed by our group did not include an *AgB5* probe, which might explain the differences. However, it is possible that other loci remain undiscovered. Two reasons may explain why the genomic organization of *AgB* loci is not yet fully understood: 1.) If genes are located in repetitive complex regions or organized *in tandem*, Southern blot patterns may hide several copies under the same band. Indeed, the genome of *E. multilocularis* shows a large genome duplication containing genes *AgB6a*; and 2.) Other sequences with lower similarities to the canonical *AgB* genes might be present in the genome and not yet included in the family.

Our results based on genomic Southern blots (Table S2) partially agree with Zhang *et al*'s estimate of 10 *AgB* loci in *E. granulosus* based on PCR [11]. Although the number of *AgB1/3* loci inferred by hybridization fits the PCR-based study, we inferred one additional *AgB5* locus. Furthermore, we found only two *AgB2/4* loci in *E. granulosus*, whereas the PCR-based study estimated three sequences in this cluster, which equals our estimate for *E. orteppi*. It is not possible to rule out that *AgB* gene organization and number is polymorphic in all *Echinococcus* species, since the number of isolates included in our Southern blots is still too small for evaluating polymorphism.

Previous mining of the *E. multilocularis* genome dataset identified seven functional *AgB* loci [14]. Here, our exhaustive analysis identifies a duplicated locus (*EmAgB6*) and a pseudogene related to *EmAgB2*, supporting the idea of a more numerous gene family.

To investigate whether *AgB* copy number variation within *E. granulosus* cysts [17] is caused by genomic instability, we estimated the number of *AgB* copies among individual protoscoleces using quantitative real-time PCR. Although the ultimate cause of gene number polymorphism must be some form

of genomic instability [26], it was not clear whether it is an intrinsic characteristic of protoscolex proliferation, or an event that happens rarely. Interestingly, we found large heterogeneity of *AgB1-5* copy numbers among protoscolexes of two different cysts.

DNA replication, as well as protein and RNA synthesis, are known to occur in a regionalized manner within metacestodes [39]. By analyzing cells in replication using incorporation of [3H]-thymidine, it was found that protoscolexes develop from patches of proliferating cells in the germinal layer of the hydatid cyst, while most of the other cells of the germinal layer are in a resting state. DNA replication thus seems to be more accelerated within a single protoscolex in the body. Our results imply, however, a lack of synchronization in DNA replication not only among cells of a single protoscolex, but also within the genome of a single cell. In other words, our results can only be explained by gene amplification, a form of genome instability. Gene instability has already been demonstrated for schistosome parasites [25]. Repetitive elements designated W1, W2 and D9 were previously considered sex-specific (occurring only in females, the heterogametic sex), but were later shown to occur in both sexes in different strains in a polymorphic manner [40]. Furthermore, these polymorphisms seem to be generated during asexual reproduction through a process mediated by recombination [41].

Gene amplification may occur as an intrachromosomal (repetitive) element or extrachromosomal (circular, episome) element. It can also occur as an element associated, but not directly linked, to the chromosome (activation of multiple initiation sites during DNA replication) [42]. Duplication mediated by intrachromosomal elements is often more stable during DNA segregation and arises by initial double strand breaks, followed by sister chromatid fusion and repeated breakage–fusion–bridge cycles. This process is seen in the duplication of the dihydrofolate reductase locus (DHFR) in the culture of CHO cells [43] and in the amplification of esterase genes in the insecticide-resistant *Culex pipiens* [44]. Extrachromosomal elements are more unstable than intrachromosomal elements, and they are created by a rolling circle replication resulting in many extrachromosomal copies, as described for the rDNA genes in *Xenopus* oocytes [21]. Sometimes extrachromosomal elements are converted

into stable elements by acquiring chromosomal characteristics [45]. The selective activation of replication origins within the same S-phase leads to an onion-skin-like structure observed during amplification of the chorion genes in Diptera (22). The high variation in the number of duplications observed among protoscolecetes within a single cyst in our qPCR experiments supports the hypothesis of unstable gene amplification.

Our *in silico* study on the *E. multilocularis* genome database revealed 42 sequences with a similarity to *AgB* of higher than 50 percent—33 of them larger than 100 bp, which may represent vestiges of ancient duplications and could play a role in erroneous recombination or gene conversion. These sequences are dispersed across the genome, whereas the canonical sequences are all located on scaffold 29 [14]. Nevertheless, we found an additional nonfunctional sequence in scaffold 29 that lacks the intron and promoter elements. A similar case of a sequence identical to the canonical *AgB2* gene, but lacking the intron, had been previously reported for *E. granulosus* [8]. These findings suggest that another mechanism of gene duplication could play a role in *AgB* gene instability, which resembles the insertion of a retrotranscribed mRNA. Thus, the *AgB* family seems to have evolved by series of duplications, since a large duplicated region containing a putative *AgB* gene, here named *EmAgB6a* and *EmAgB6b*, was found on scaffold 7. The fact that we did not find high redundancy in the *E. multilocularis* genome database does not necessarily contradict our qPCR results. Additional *AgB* copies might be present in a complex chromosomal region that could not yet be assembled, or in extrachromosomal low molecular weight elements (episomes).

What would be the biological relevance of *AgB* gene number variation within *E. granulosus* cysts? Recurrent alterations in copy numbers have been reported among several parasites often associated with drug resistance. Several gene amplification events were found in *Leishmania major* in response to drug challengers [46; 47]. In most of these cases, the target gene is selectively amplified as an extrachromosomal circle element in response to the chemical injury [at 48]. In *Trypanosoma brucei*, drug resistance can be associated with stable amplification of a complete 6Mb chromosome bearing the inosinate dehydrogenase gene [45], and resistance of *Plasmodium vivax* to

mefloquine arises with the selective intrachromosomal amplification of multidrug-resistant gene 1 (*pfmdr1*) [49]. Gene amplification clearly represents an adaptive strategy in a selective environment. Non-radically operated patients with echinococcosis do actually undergo massive drug therapy for long periods (cystic echinococcosis, daily for at least six months; alveolar echinococcosis, life-long), and acquired drug resistance [50] may be one reason why benzimidazole therapy fails to completely cure some of the cystic echinococcosis patients and most of the alveolar echinococcosis patients.

Furthermore, the persisting nature of hydatid cysts allows secondary metabolites to accumulate, many of them potentially toxic. Considering that AgB is supposed to be an important component of the *Echinococcus* xenobiotic buffering system [51], increasing *AgB* number of copies could be a way of producing larger amounts of protein and protecting the parasite from these metabolites and/or inactivate chemotherapeutical components such as benzimidazoles. It is not clear whether variation in copy numbers is actually an additional mechanism for controlling AgB expression. The antigen is known to be less transcribed in parasites that proliferate in mice devoid of T-cell immune responses (nude), especially during the beginning of infection [12], but we never found a correlation between *AgB* transcription and gene numbers.

In conclusion, we have provided evidence of genome instability in *Echinococcus*. Gene amplification and hypermutation explain why so many *AgB* variants are found in single metacestodes [8;13;12]. The mechanistic basis of these processes, as well as their function, is yet to be understood.

Acknowledgments

We thank the Swiss National Science Foundation (grant no. 3100A0-111780) and Brazilian CNPq (process no. 472329/2008-1) for financial support. We are indebted to Dr Augusto Schrank for providing us the laboratory resources to perform our Southern blots. Daniel A. S. Graichen received fellowships from CNPq and CAPES (Brazil).

5. References

- 1- Siracusano A, Margutti P, Delunardo F, Profumo E, Riganò R, *et al* (2008) Molecular cross-talk in host-parasite relationships: the intriguing immunomodulatory role of *Echinococcus* antigen B in cystic echinococcosis. *Int J Parasitol* 38: 1371-1376.
- 2- Riganò R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Delunardo F, *et al* (2007) *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun* 75: 1667-1678.
- 3- González-Sapienza G, Nieto A, Fernández C, Orn A, Wernstedt C, *et al* (1996) Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol* 18: 587-596.
- 4- Monteiro KM, Scapin SM, Navarro MV, Zanchin NI, Cardoso MB, *et al* (2007) Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim Biophys Acta* 1774: 278-285.
- 5- Chemale G, Haag KL, Ferreira HB, Zaha A (2001) *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol* 116: 233-237.
- 6- Frosch P, Hartmann M, Muhlschlegel F, Frosch M (1994) Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Mol Biochem Parasitol* 64: 171-175.
- 7- Fernandez V, Ferreira HB, Fernández C, Zaha A, Nieto A (1996) Molecular characterization of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Mol Biochem Parasitol* 77: 247-250.

- 8- Arend AC, Zaha A, Ayala FJ, Haag KL (2004) The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp Parasitol* 108: 76-80.
- 9- Mamuti W, Sako Y, Bart JM, Nakao M, Ma X, *et al* (2007) Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of antigen B from *Echinococcus granulosus* genotypes 1 and 6. *Parasitol Int* 56: 313-316.
- 10- Mamuti W, Sako Y, Xiao N, Nakaya K, Nakao M, *et al* (2006) *Echinococcus multilocularis*: Developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. *Exp Parasitol* 113: 75-82.
- 11- Zhang W, Li J, Jones MK, Zhang Z, Zhao L, *et al* (2010) The *Echinococcus granulosus* antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e784.
- 12- Graichen DAS, Gottstein B, Matsumoto J, Müller N, Zanotto PMA, *et al* (2007) Expression and diversity of *Echinococcus multilocularis* AgB genes in secondarily infected mice: evaluating the influence of T-cell immune selection on antigenic variation. *Gene* 392:98-105.
- 13- Haag KL, Alves-Junior L, Zaha A, 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.
- 14- Brehm K (2010) *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitol* 137: 537-55.
- 15- Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM, Angel SO, Zaha A, *et al* (2005) High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol* 131: 805-815.

- 16- Haag KL, Zanotto PM, Alves-Junior L, Gasser RB, Zaha A, *et al* (2006) Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. *Infect Genet Evol* 6: 251-261.
- 17- Haag KL, Gottstein B, Muller N, Schnorr A, Ayala FJ (2006) Redundancy and recombination in the *Echinococcus* AgB multigene family: is there any similarity with protozoan contingency genes? *Parasitol* 133: 411-419.
- 18- Rosenzvit MC, Canova SG, Kamenetzky L, Guarnera EA (2001) *Echinococcus granulosus*: intraspecific genetic variation assessed by a DNA repetitive element. *Parasitol* 123: 381-388.
- 19- Bonnivard E, Higuete D (2009) Fluidity of eukaryotic genomes. *C R Biol* 332: 234-240.
- 20- Maizels N (2005) Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet* 39: 23-46.
- 21- Brown DD, Dawid IB (1968). Specific gene amplification in oocytes. Oocyte nuclei contain extrachromosomal replicas of the genes for ribosomal RNA. *Science* 160: 272-280.
- 22- Spradling AC (1981) The organization and amplification of two chromosomal domains containing *Drosophila* chorion genes. *Cell* 27: 193-201.
- 23- Morrison LJ, Marcello L, McCulloch R (2009) Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. *Cell Microbiol* 11: 1724-1734.
- 24- Bétermier M (2004) Large-scale genome remodeling by the developmentally programmed elimination of germ line sequences in the ciliate *Paramecium*. *Res Microbiol* 155: 399-408.

- 25- Grevelding CG (1999) Genomic instability in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 101: 207-216.
- 26- Aguilera A, Gómez-González B (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. Nat Rev Genet 9: 204-217.
- 27- Zhao Y, Epstein RJ (2008) Programmed genetic instability: a tumor-permissive mechanism for maintaining the evolvability of higher species through methylation-dependent mutation of DNA repair genes in the male germ line. Mol Biol Evol 25: 1737-1749.
- 28- Claycomb JM, Orr-Weaver TL (2005) Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression. Trends Genet 21: 149-162.
- 29- Monni O, Bärlund M, Mousses S, Kononen , Sauter G, *et al* (2001) Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 5711-5716.
- 30- Dreyer WJ, Bennett JC (1965) The molecular basis of antibody formation: a paradox. Proc Natl Acad Sci U S A 54: 864-869
- 31- Donelson JE (2003) Antigenic variation and the African trypanosome genome. Acta Trop 85: 391-404.
- 32- Bowles J, Blair D, McManus DP (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol 54: 165–173.
- 33- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344p.
- 34- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple

- sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876-4882.
- 35- Nicholas KB, Nicholas HBJ (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.
- 36- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. *Nucl Acids* 41: 95-98.
- 37- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- 38- Zarlenga DS, Rhoads ML, al-Yaman FMA (1994) *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol* 67: 215-223.
- 39- Galindo M, Paredes R, Marchant C, Miño V, Galanti N (2003) Regionalization of DNA and protein synthesis in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*. *J Cell Biochem* 90: 294-303.
- 40- Quack T, Doenhoff M, Kunz W, Grevelding CG (1998) *Schistosoma mansoni*: the varying occurrence of repetitive elements in different strains shows sex-specific polymorphisms. *Exp Parasitol* 89: 222-227.
- 41- Bayne CJ, Grevelding CG (2003) Cloning of *Schistosoma mansoni* sporocysts in vitro and detection of genetic heterogeneity among individuals within clones. *J Parasitol* 89: 1056-1060.
- 42- Stark GR (1984) Gene amplification. *Ann Rev Biochem* 53:447-491.
- 43- Schimke RT (1984) Gene amplification, drug resistance, and cancer. *Cancer Res* 44: 1735-1742.
- 44- Gullemaud T, Makate N, Raymond M, Hirst B, Callaghan A (1997) Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Insect Mol Biol* 6: 319-327.

- 45- Wilson K, Berens RL, Sifri CD, Ullman B (1994) Amplification of the inosinate dehydrogenase gene in *Trypanosoma brucei gambiense* due to an increase in chromosome copy number. *J Biol Chem* 269: 28979-28987.
- 46- Ubeda JM, Légaré D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, *et al* (2008) Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol* 9: R115.
- 47- Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, *et al* (1992) Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 12: 2855-2865.
- 48- Beverley SM (1991) Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 45: 417-444
- 49- Preechapornkul P, Imwong M, Chotivanich K, Pongtavornpinyo W, Dondorp AM, *et al* (2009) *Plasmodium falciparum* pfmdr1 amplification, mefloquine resistance, and parasite fitness. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 41509-41515.
- 50- Morris DL, Taylor DH (1990) *Echinococcus granulosus*: development of resistance to albendazole in an animal model. *J Helminthol* 64: 171-174.
- 51- Chemale G, Ferreira HB, Barrett J, Brophy PM, Zaha A (2005) *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim Biophys Acta* 1747:189-194.

Legends to figures

Figure 1 – *AgB1-5* and *mdh* Southern blot hybridizations of four micrograms of DNA from three *E. granulosus* (lanes 7-9) and three *E. ortleppi* isolates (lanes 10-12) digested with *HaeIII*. Lanes 1-6 correspond to the controls for hybridization specificity (2ng of recombinant plasmids containing *AgB1-5* and *mdh* inserts, respectively).

Figure 2 – Variation in *AgB1-5* number of copies across 13 protoscoleces isolated from two *E. granulosus* cysts (A and B). The number of *AgB* gene copies was accessed by qPCR in comparison with the single copy *mdh* gene. After normalization (see material and methods), the statistical significance was accessed by one-way ANOVA (asterisks indicate $p < 0.05$). Squares include the upper and lower quartiles, with each protoscolex shown in a different color; bars indicate the maximum and minimum values.

Figure 3 – Bayesian genealogy of *E. multilocularis* *AgB* genes found in the genome database. The unrooted tree was inferred using the MrBayes software with the GTR invariant-gamma model and full mRNA sequences. The numbers on each branch correspond to posterior probabilities.

Figure S1 – *EmAgB6a* and *b* (A1 and A2). (A) Schematic representation of genes location on scaffold 7. (B) *EmAgB6* sequence, indicating the intron (green), as well as the transcription and translation consensus elements (red). The putative promoter is shown on orange background. (C) Alignment of the 9 putative *AgB*-related proteins encoded by the *E. multilocularis* genome. The signal peptide is shown on orange background and the *EmAgB6* dissimilar amino acids are shown in red.

Figure 1

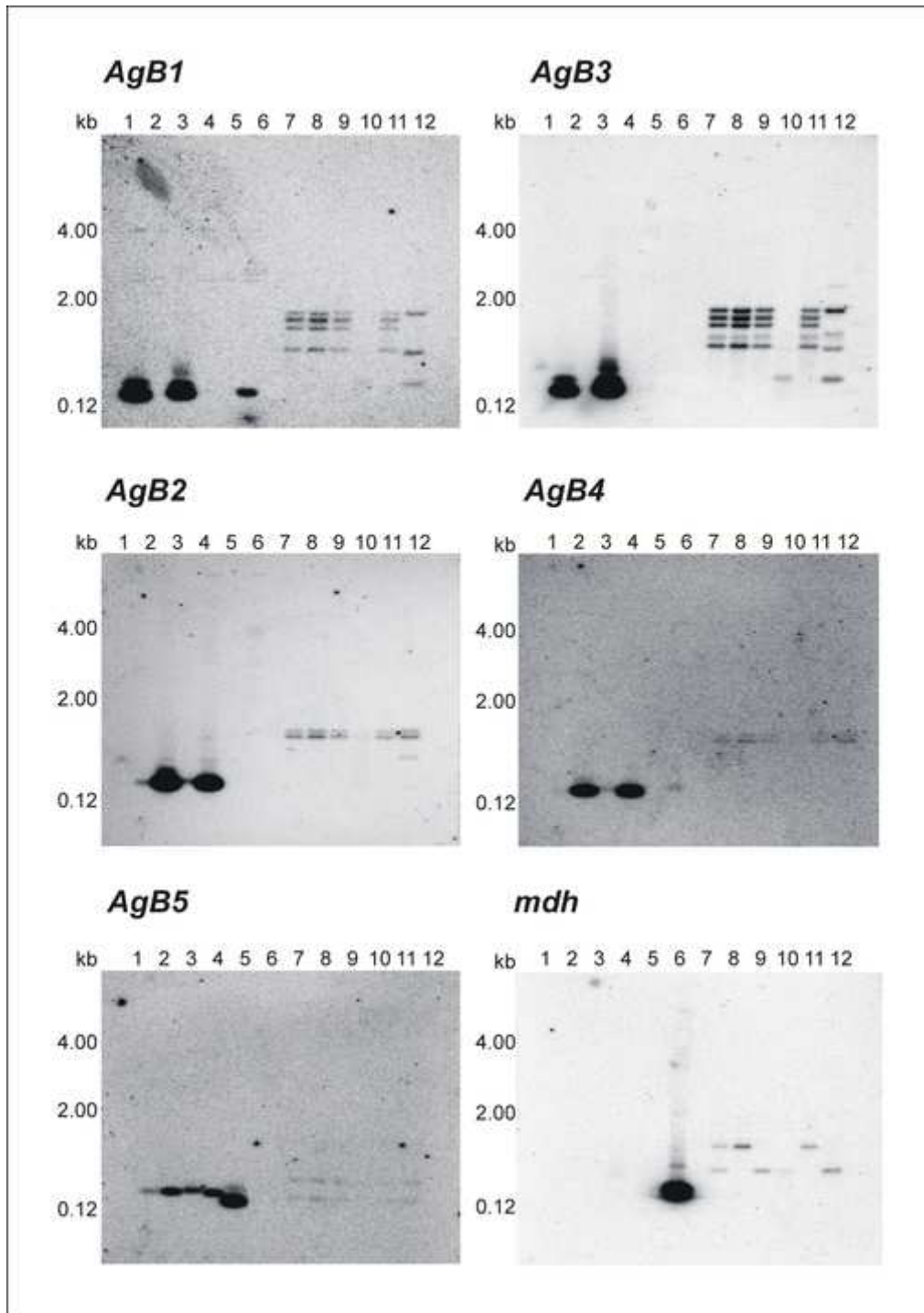


Figure 2

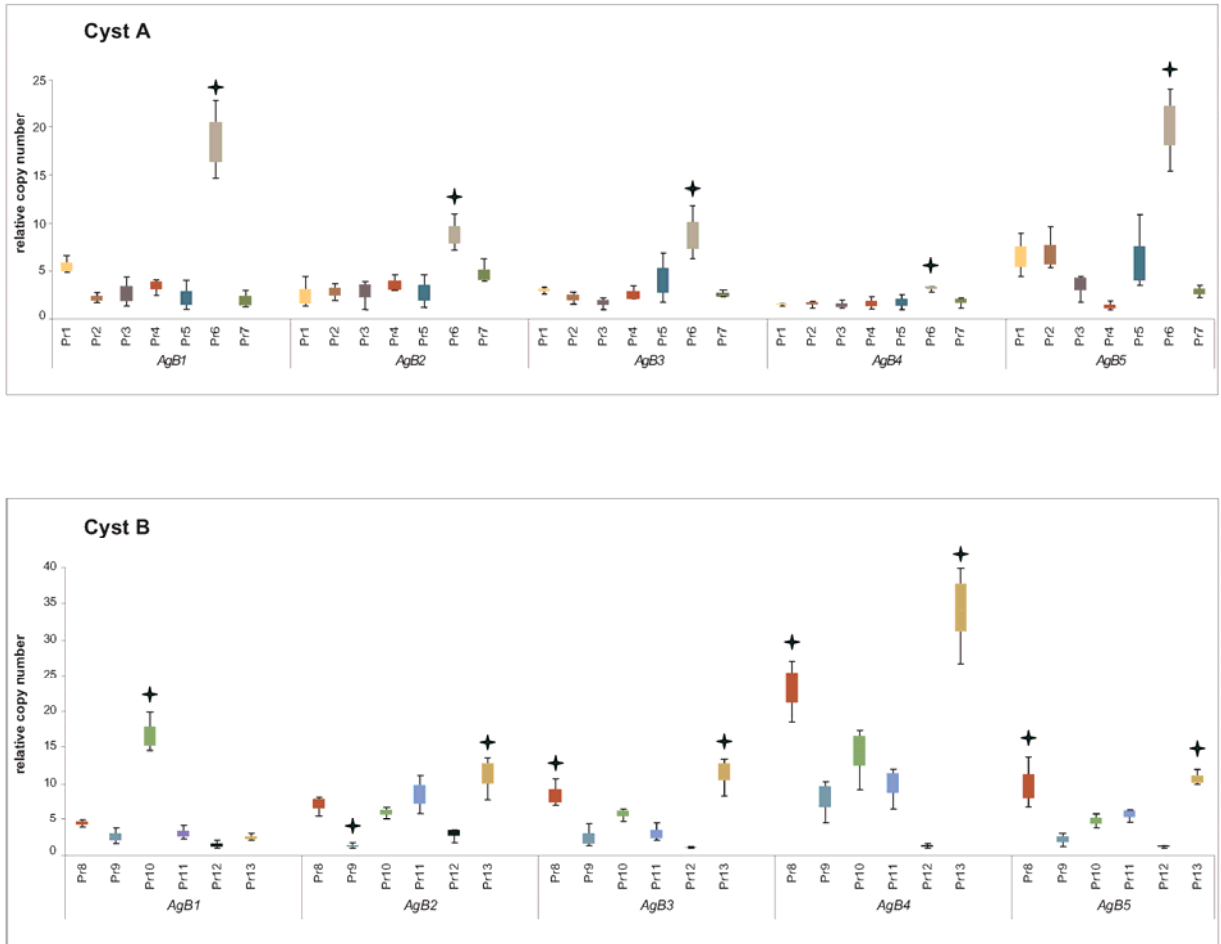


Figure 3

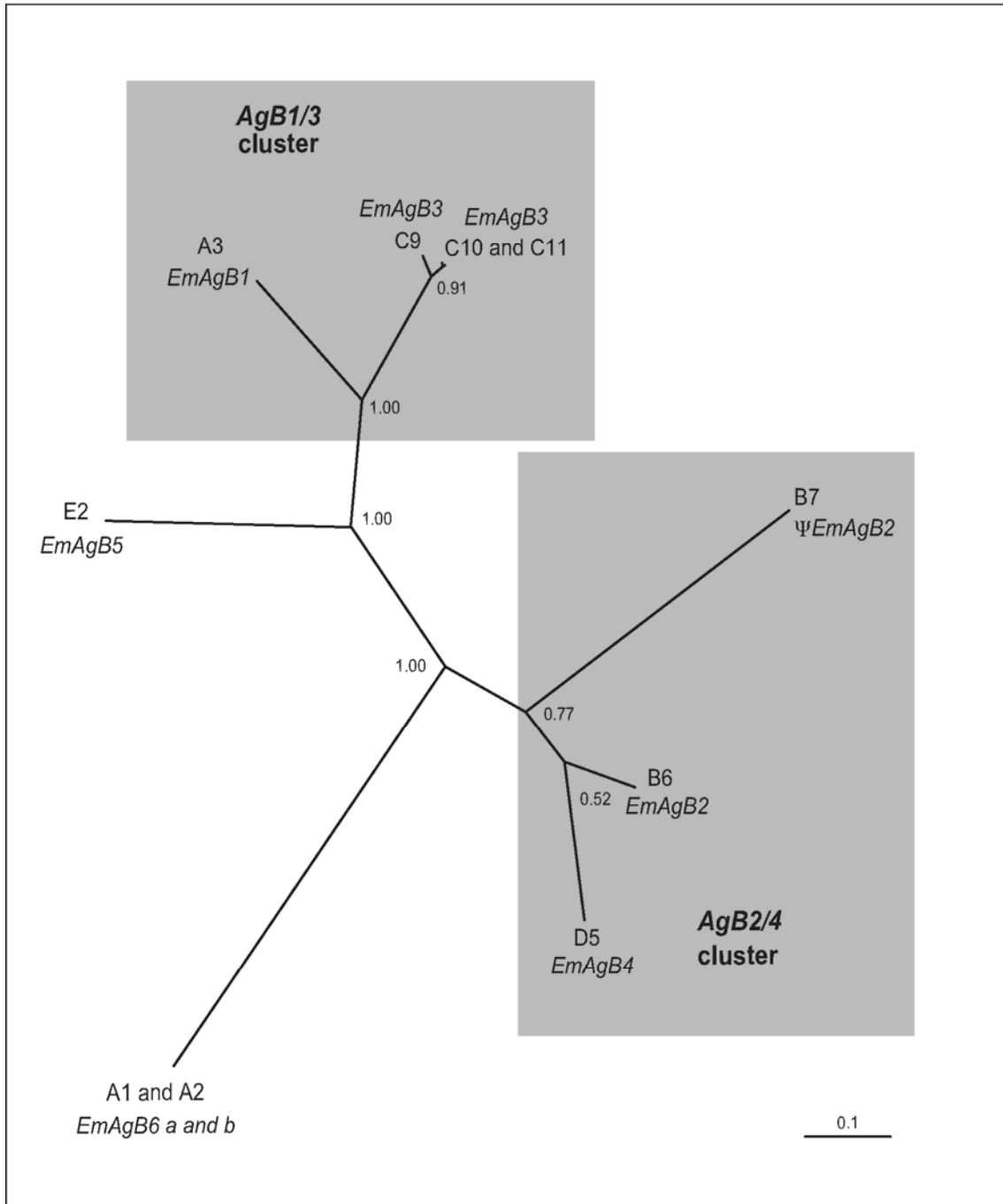
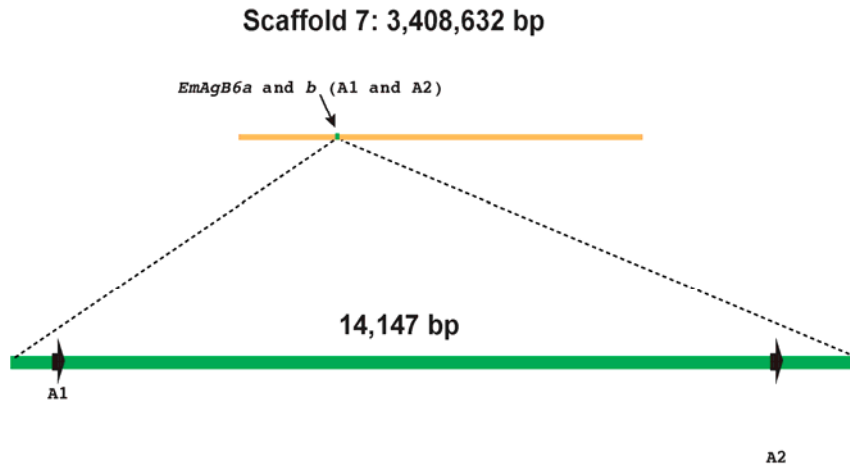


Figure S1

A)



B)

```

                *      20      *      40      *      60      *      80      *
EmAgB6 : GCGACCGGAAGTTGAGCGTATATATAAGAGCGGCAGGTCCTTAACAGACCAAGCCGCATTGATCAAAGTAAAAAATAGATGGAGCCTCCGGCTTCT
                100      *      120      *      140      *      160      *      180      *
EmAgB6 : CGCCCTTGCCATCCTCGCTATTACCGTGTGCGCTGCCTCTGCTGAGTAAGTGTTCGCCTCCCTCATTACTTAAACGGGTAAAAGCTAAATGCATC
                200      *      220      *      240      *      260      *      280      *
EmAgB6 : TATCTAACCTTCTTATCTTCGCCGTTTCCATTAGCGAAAAGGTACGCGTGAGCCAACCTATCCGAAGCTTTGGTTAACGCTATCTTACTTTTGT
                300      *      320      *      340      *      360      *      380
EmAgB6 : TTTTTTCGACGCTTGCTTAATGCTTTCCAFTTGATAAATGCTACTTCTCTAGTAGACATCTGATGATCCGAAGAAGGAAATAATGATGCTAAT
                *      400      *      420      *      440      *      460      *      480
EmAgB6 : GGGTGAGACGCGCTCGCTTCTTCAGGGAGGATCCTTTGGGTCAGAAGATTGTTGACCACTTTCGAAGCTGGTCTCCATCTGCAAGGCTCTCAGAGAG
                *      500      *      520      *
EmAgB6 : CGAGTAAGGAAACGTCTCGGAGAGTACTTGAAGGTTCTGAGAATGAATAA
    
```

C)

```

                *      20      *      40      *      60      *      80      *
EmAgB3_C9 : MKFCMLLALALVSFVVVARADDEVTQTKKGVKMAISEIKHFFQSDPLGKKLVEVMKEVGSVCQMRKKARMALKEYVRKLIKED-----
EmAgB3_C10 : MKFCMLLALALVSFVVVARADDEVTQTKKGVKMAISEIKHFFQSDPLGKKLVEVMKEVGSVCQMRKKARMALKEYVRKLIKED-----
EmAgB3_C11 : MRFCMLLALALVSFVVVARAGDDEVTQTKKGVKMAIGEIKDFFQSDPLGKKLVEVMKEVGSVCQMRKKARMALKEYVRKLIKED-----
EmAgB1_A3 : MRFCLLLALALVSFVVVTQADDG-LTSTSRSMKMLGEMKYFFERDPLGQKLVDLLKELEEVFQMLRKKLRALKSHLRELVAEGK-----
EmAgB5_E2 : MKLYIILALALVAFVAIALAEDDIDSKSKKGVKMSVAELKEFFASDPMGQKLAAICKELKDFLLARTKARSALRDYVKRLMDEGE-----
EmAgB2_B6 : MRNYVLLSLALVAFVAVVQAKDEPKAHLGQGIKKRWGELRDFKNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQKIREVLKRYVKNLVEEKDDDSK
EmAgB4_D5 : MRTCILLSLVAFVAVVQAKAEPERCKCL-IMRKLSEIRDFFRSDPLGQKLVALGRDLTAICQKLHLKVEHLKRYVKDLLEEDDLK
EmAgB6a_A1 : MGASGFLALALAIITVTS---DDP---KKEIMMLMGETRRFFREDPLGQKIVDHFQELVSICKALRERVRKRLGEYLGLENE-----
EmAgB6b_A2 : MGASGFLALALAIITVTS---DDP---KKEIMMLMGETRRFFREDPLGQKIVDHFQELVSICKALRERVRKRLGEYLGLENE-----
    
```

Table S1

Table S1: BlastN search results for AgB-related sequences* in the *E. multilocularis* genome database. Numbers in parenthesis are the length of similarity region. Identities are shown in percentages.

	<i>EmAgB1</i>	<i>EmAgB2</i>	<i>EmAgB3</i>	<i>EmAgB4</i>	<i>EmAgB5</i>
Scaff. 1			C1: 1779049-1779153 (104bp) 62%	D1: 3866182-3866299 (125bp) 65%	
			C2: 5892197-5892253 (56bp) 67%	D2: 6767008-6767061 (53bp) 70%	
Scaff. 2		B1: 3400623-3400715 (92bp) 66%			
Scaff. 4		B2: 526333-526474 (141bp) 58%			
Scaff. 5			C3: 633345-633130 (215bp) 67%		
Scaff. 7	A1: 1133914-1134003 (89bp) 67%		C4: 2277180-2277312 (132bp) 59%		
	A2: 119767-119856 (89bp) 67%				
Scaff. 9				D3: 2053370-2053449 (79bp) 68%	
Scaff. 10				D4: 2048615-2048780 (165bp) 61%	
Scaff. 11			C5: 1359386-1359501 (115bp) 61%		
Scaff. 12			C6: 963839-964000 (161bp) 57%		
Scaff. 14			C7: 838764-838893 (129bp) 61%		E1: 63368-63439 (74bp) 68%
			C8: 543281-543377 (96bp) 65%		
Scaff. 15		B3: 458738-458851 (113bp) 66%			
Scaff. 16		B4: 345989-346145 57%			

			(156bp)							
			B5: 1330785-1330828 (43bp)	75%						
Scaff. 29	A3: 644647-644826 (179bp)	#####	B6: 640734-670943 (209bp)	95%	C9: 662953-663151 (198bp)	99%	D5: 646327-646506 (179bp)	#####	E2: 666938-667135 (198bp)	100%
			B7: 651839-651971 (132bp)	72%	C10: 659160-659358 (198bp)	99%				
					C11: 653793-653993 (200bp)	96%				
Scaff. 33	A4: 478874-479020 (146bp)	62%								
Scaff. 40							D6: 436241-436428 (187bp)	59%		
Scaff. 41									E3: 20166-20213 (49bp)	75%
Scaff. 46			B8: 156954-15702 (73bp)	67%						
			B9: 365255-365317 (62bp)	62%						
Scaff. 49			B10: 193768-193857 (89bp)	66%						
Scaff. 72							D7: 129499-129623 (124bp)	62%		
Scaff. 92			B11: 992240/99309 (69bp)	64%						
			B12: 132682-132736 (54bp)	66%						
Scaff. 93					C12: 125135-125270 (135bp)	61%				
Scaff. 96	A5: 21417-21556 (139bp)	62%								
Scaff. 142			B13: 38762-38840 (78bp)	67%						
Scaff. 164							D8: 24917-25022 (105bp)	63%		
Contig 2542									E4: 3442-3568 (139bp)	63%

*Sequences longer than 100bp are shown in a green background

Table S2

Table S2: Number of AgB loci estimated by different studies.

Study	Chemale <i>et al</i> (2001)	Haag <i>et al</i> (2004)	Brehm (2010)	Zhang <i>et al</i> (2010)	Haag <i>et al</i> (2006)			Present study			
Method	Southern blot	Southern blot	Genome mining	PCR & cloning	Quantitative PCR			Southern blot	Quantitative PCR	Genome mining	
Species	<i>E. granulosus</i>	<i>E. granulosus</i>	<i>E. multilocularis</i>	<i>E. granulosus</i>	<i>E. granulosus</i>	<i>E. ortleppi</i>	<i>E. multilocularis</i>	<i>E. granulosus</i>	<i>E. ortleppi</i>	<i>E. granulosus</i>	<i>E. multilocularis</i>
<i>AgB1</i>			1	1	1 to 2	1 to 3	1 to 2			1 to 24	1
<i>AgB3</i>			3	4	5 to 17	7 to 117	3 to 25			1 to 13	3
Subtotal			4	5	up to 19	up to 120	up to 27	5	5	up to 37	4
<i>AgB2</i>			1	1	1 to 2	1 to 3	1			1 to 14	2*
<i>AgB4</i>			1	3	1 to 2	4 to 12	10 to 69			2 to 40	1
Subtotal			2	4	up to 4	up to 15	up to 70	2	3	up to 54	3
<i>AgB5</i>			1	1				2	2	1 to 24	1
<i>AgB6</i>											2
Total	3	7	7	10	up to 23	up to 135	up to 97	9	10	up to 115	10

References from Table S2

Brehm K (2010) *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitol* 137: 537-55.

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

Haag KL, Alves-Junior L, Zaha A, 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, Zanotto PM, Alves-Junior L, Gasser RB, Zaha A, *et al* (2006) Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. *Infect Genet Evol* 6: 251-261.

Zhang W, Li J, Jones MK, Zhang Z, Zhao L, *et al* (2010) The *Echinococcus granulosus* antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e784.

Capítulo 4: Manuscrito 2

Manuscrito em preparação

Seqüências de verme adulto de Echinococcus revelam baixa heterogeneidade de seqüências do AgB e possível caso de hibridação

Daniel A. S. Graichen, Guilherme B. dos Santos, Mario L. de La Rue,
Karen L. Haag

1. Introdução

Com raras exceções, parasitos da classe Cestoda têm um ciclo de vida indireto, isto é, necessitam de pelo menos dois hospedeiros, um ou mais para a fase larval (hospedeiro intermediário) e outro para a fase adulta (hospedeiro definitivo). Os adultos são invariavelmente hermafroditos e habitam o intestino delgado dos seus hospedeiros definitivos, onde produzem milhares de ovos gerados por reprodução sexuada. Ao contrário dos adultos, as larvas instalam-se nos mais variados órgãos dos hospedeiros intermediários (Smyth e McManus, 1989). A presença de um estágio larval proliferativo é relativamente rara entre cestóides, mas dentro da família *taeniidae* aproximadamente metade das espécies conhecidas apresentam algum grau de multiplicação assexual no estágio larval (Moore e Brooks, 1987). Dentre todos os estágios larvais de tenídeos, o cisto hidático é o que apresenta a maior capacidade proliferativa (Torgerson *et al*, 2009).

Parasitos do gênero *Echinococcus* utilizam dois hospedeiros mamíferos, um carnívoro (definitivo) e um herbívoro (intermediário), sendo que a transmissão se dá através da relação presa-predador. O estágio adulto de *E. granulosus sensu stricto*, a espécie mais comum do gênero, ocorre em canídeos, geralmente o cão doméstico, e o estágio larval ocorre nas vísceras de ungulados, principalmente fígado e pulmões de bovinos e ovinos, onde se desenvolve na forma de um cisto preenchido por líquido, contendo milhares de protoescóleces produzidos assexuadamente (Thompson, 1995). A presença de dois estágios altamente proliferativos (adultos produzindo milhares de ovos e cistos produzindo milhares de protoescóleces) é uma característica marcante de *Echinococcus*, que permite ao parasito maximizar a exploração de seus hospedeiros (Trouvé *et al*, 2003). Tal característica pode ser a principal causa do surgimento de linhagens intra-específicas (Smyth e Smyth, 1964), pois a proliferação assexuada no estágio larval permitiria a amplificação populacional de novas mutações. Por outro lado, a produção de muitos protoescóleces igualmente viáveis no interior do cisto ocasiona que o hospedeiro definitivo portará muitos vermes geneticamente idênticos vivendo em íntimo contato, de

maneira que a própria reprodução cruzada apresente características similares à autofecundação.

O crescimento do cisto hidático no interior do hospedeiro intermediário é acompanhado por uma forte resposta imunológica por parte deste, sendo que dentre as proteínas mais abundantes e imunogênicas do parasito encontra-se o Antígeno B (Oriol *et al*, 1971). O Antígeno B (AgB) é uma proteína oligomérica (Lightowlers *et al*, 1989) codificada por uma família multigênica (Chemale *et al*, 2001). Até o momento, já foram caracterizados cinco genes do AgB em *E. granulosus sensu stricto*, *AgB1* (Frosch *et al*, 1994), *AgB2* (Fernandez *et al*, 1996), *AgB3* (Chemale *et al*, 2001), *AgB4* (Arend *et al*, 2004) e *AgB5* (Mamuti *et al*, 2007). Entretanto, a família gênica pode conter mais membros, uma vez que experimentos de *Southern blot* apresentam um padrão de hibridização complexo, revelando pelo menos nove *loci* gênicos (Graichen *et al*, submetido) e análises baseadas em PCR revelam abundância de seqüências que poderiam ser interpretadas como genes distintos (Zhang *et al*, 2010).

O seqüenciamento de insertos clonados dos genes do AgB obtidos por PCR revelou que um mesmo metacestóide (cisto hidático) apresenta um número considerável de pequenas variantes de um mesmo gene, geralmente contendo uma ou poucas substituições de nucleotídeos (Arend *et al*, 2004, Haag *et al*, 2004, Mamuti *et al*, 2004, Graichen *et al*, 2007). A diversidade do AgB poderia estar representando: 1) variações entre cópias repetidas de um gene dentro de um único genoma ou 2) mutações somáticas geradas durante as inúmeras divisões celulares ao longo do desenvolvimento de um metacestóide (variações entre genomas de células distintas). Experimentos de *Southern blot* genômicos em *E. granulosus sensu stricto* (Chemale *et al*, 2001, Haag *et al*, 2004, Graichen *et al*, submetido), bem como o genoma disponível de *E. multilocularis* (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Echinococcus/multilocularis/genome/>) sugerem que o número de cópias de genes do AgB é limitado, e não explica a quantidade de variação encontrada. Portanto, as substituições devem ser de origem somática. Foi sugerido que tal diversidade seria adaptativa, estando relacionada à evasão da resposta imune do hospedeiro intermediário (Haag *et*

al, 2004, Arend *et al*, 2004), mas a falta de evidências de seleção positiva sobre as variantes sugere que a diversidade seja um mero subproduto da alta proliferação celular na fase larval (Graichen *et al*, 2007). Se essa hipótese for verdadeira, então, a diversidade de seqüências de genes do AgB encontrada na fase adulta deve ser menor do que na fase larval. O objetivo do presente trabalho foi testar esta premissa.

2. Material e Métodos

2.1 Material Biológico

Vermes adultos de *Echinococcus sp.* foram coletados de cães naturalmente infectados no município de Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. Os cães foram purgados pela admissão oral de 3 mg de bromidrato de arecolina para cada quilo de animal (Farias *et al*, 2004). Coletaram-se as fezes com conteúdo mucoso, oriundas do intestino delgado, onde se determinou a presença de parasitas através da observação direta das fezes sobre uma bandeja de fundo escuro. Quando presentes, os vermes do gênero *Echinococcus* foram coletados com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. Posteriormente, foram lavados três vezes em PBS 1X (tampão salino de fosfato) e estocados em RNAlater (Sigma) a -20° C até o uso. A espécie de *Echinococcus* foi determinada pelo seqüenciamento de parte do gene mitocondrial *Cox1*, de acordo com Bowles *et al* (1992).

2.2 Métodos moleculares

Depois de descongelados, os vermes foram lavados uma vez com PBS 1X e, em seguida, lavados com água destilada. Um único verme adulto foi micro dissecado a fim de separar o escólex e o estróbilo das proglotes maduras e grávidas, as quais foram dispensadas. Utilizando-se uma pipeta, o segmento escólex/estróbilo foi coletado em tubo de 1,5 ml contendo 78 µl de água mili-Q e 2 µl de proteinase K (20 mg/ml). A amostra foi incubada a 55°C por duas

horas e a 95°C por 20 minutos. A solução obtida foi utilizada diretamente como molde para a reação de PCR. Algumas alíquotas da água na qual o verme foi dissecado foram coletadas e utilizadas como controle negativo da presença de DNA oriundo de outros vermes ou de degradação de tecidos do parasito.

Somente o segundo éxon dos genes *AgB1-5* foi amplificado utilizando os primers descritos na Tabela 1. As reações de PCR foram ajustadas segundo critérios do fabricante da enzima DNA polimerase utilizada e consistiram de 5 µl do molde (extrato de *Echinococcus*), 16 mM de dNTPs, 40 pmois de cada uma dos primers, 6 unidades da DNA polimerase *Pfu* (PROMEGA®), buffer 20 mM Tris-HCL, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCL, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA e 2 mM MgSO₄ em um volume final de 50 µl. As amplificações foram feitas por um programa com 35 ciclos, utilizando temperatura de anelamento constante de 50° C e extensão de 68° C por 30 segundos. Um passo adicional de 7 minutos a 68° C foi adicionado ao final do PCR.

Os amplicons foram clonados em um vetor plasmidial (Topo ZeroBlunt Kit, Invitrogen) e selecionaram-se 10 colônias de cada experimento para serem analisadas por seqüenciamento. Os plasmídeos foram purificados com o kit PureLink Plasmid Mini kit (Invitrogen) e automaticamente seqüenciados (ABI Prism 3730xl, Macrogen, South Korea). Amplificou-se ainda um gene de cópia única, *Mdh* (Malato desidrogenase) não relacionado com o AgB para utilização como controle da eficiência da correção de eventuais erros durante o PCR.

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação do segundo exon dos genes *AgB1-5* e do gene *Mdh*.

	<i>Primer direto</i>	<i>Primer reverso</i>	<i>Tamanho do Amplicon (bp)</i>
<i>AgB1</i>	AAA TGT TTG GCG AAG TGA AGT	GTA GAT GGT TTA TTG AGC AA	218
<i>AgB3</i>	GAA GGG TGT CTC TCG TCT GAT CAA CGC CAT		223
<i>AgB2</i>	AAA GCA CAC ATG GGG CAA GTG	GTG TCC CGA CGC ATG ACT TA	232
<i>AgB4</i>	CGA GAG ATG CAA GTG CCT CAT		211
<i>AgB5</i>	GAA GAT GAC ATC GAT TCG AAA G	GAT CGA GCT TTT GTC CTG GC	154
<i>Mdh</i>	CGT TTC CTT CCA TTT CCG AA	TTG GTG ACA ACG GCG TGA G	254

2.3 Métodos estatísticos

A qualidade das seqüências foi acessada pelo programa SeqMan implementado no pacote Lasergene (DNASTAR, Inc) e as seqüência contendo regiões inaccuradas foram reseqüenciadas. O alinhamento foi realizado pelo programa ClustalX (Thompson *et al*, 1997), seguindo os parâmetros padrões de alinhamento. Os valores estatísticos de diversidade das seqüências foram obtidos utilizando o programa DNASP versão 5.0 (Librado e Rozas, 2009). A diversidade de seqüências observada em um único verme adulto foi comparada com a diversidade previamente reportada em um único metacestóide por Haag *et al* (2004). Pelo fato de as seqüências obtidas por Haag *et al* (2004) incluírem também o íntron e parte do primeiro éxon, reduziu-se o tamanho destas seqüências e utilizou-se somente o segmento que corresponde às seqüências obtidas no presente estudo. Além disso, assumiu-se que as seqüências classificadas como *AgB5* naquele artigo são variantes relacionadas ao gene *AgB3*, e neste trabalho estas seqüências são chamadas de *AgB5/Haag*. As seqüências encontradas por Zhang *et al* (2010) também foram comparadas qualitativamente com as encontradas neste estudo. A construção do dendrograma foi feita pelo programa MEGA 5 (Tamura *et al*, 2011), utilizando o algoritmo UPGMA, considerando a proporção de diferenças entre as seqüências (*p-distance* e *Pairwise-Deletion*). As seqüências utilizadas para construir o dendrograma são as mesmas mostradas nos alinhamentos da figura complementar.

3. Resultados

3.1 Análise das seqüências dos genes controle

O haplótipo mitocondrial do verme adulto analisado no presente estudo, inferido através de sua seqüência de *Cox1*, classifica o indivíduo como *E. granulosus sensu stricto* (haplótipo G1). Entretanto, a seqüência do gene *Mdh* encontrada neste indivíduo é raramente encontrada em *E. granulosus sensu stricto* (alelo *Mdh3* GenBank EF640371), com freqüências variando de 0 a 4%, mas muito freqüente em *E. ortleppi* (G5) e *E. canadensis* (G6 e G7), onde as

freqüências desse alelo variam de 95% a 100% (Badaraco *et al*, 2008). A clonagem seguida de seqüenciamento revelou uma população homogênea de amplicons obtidos para este gene de cópia única, ou seja, os 10 clones seqüenciados eram idênticos (Figura complementar 1 F).

3.2 Variantes dos genes do AgB

As seqüências dos genes *AgB1-5* obtidas no presente estudo foram alinhadas e comparadas com os dados previamente obtidos de um único metacestóide (Haag *et al*, 2004) e de um único verme adulto (Zhang *et al*, 2010). Em nossa amostragem, o gene *AgB1* apresentou uma única seqüência nos 10 clones analisados (Figura 1), que difere da seqüência mais abundante encontrada por Haag *et al* (2004) (AY773091) e da seqüência obtida por Zhang *et al* (2010) (GU166202), mas já havia sido descrita anteriormente para *E. granulosus sensu stricto* (Z26336, Figura complementar 1 A).

Para *AgB2* foram encontradas duas seqüências que diferem apenas por uma transversão (G – T). Contudo, estas seqüências diferem consideravelmente daquelas de *AgB2* descritas por Haag *et al* (2004) e Zhang *et al* (2010). As seqüências obtidas no presente estudo apresentam um indel de um nucleotídeo na posição 31 (Figura complementar 1 B), outro de 6 nucleotídeos nas posições 184 a 189, além de várias substituições de nucleotídeos. Interessantemente, essas variantes nunca haviam sido encontradas anteriormente em *E. granulosus sensu stricto*, mas sim em *E. ortleppi*, com 99,5% e 100% de similaridade (AY569358)

AgB4 também apresentou apenas duas variantes, as quais se distinguem por 10 substituições de nucleotídeos e um indel de 3 nucleotídeos nas posições 187 a 189 (Figura complementar 1 D). Na região amplificada neste estudo, uma das seqüências, *AgB4_9* apresenta 100% de similaridade com três seqüências encontradas no estudo de referência, incluindo a mais freqüente (AY871027), e 99,5% de similaridade com a seqüência *AgB4/1* de Zhang *et al* (2010). O outro grupo de seqüência apresenta similaridade média de 94% com as seqüências de *AgB4* obtidas no estudo de referência, mas apresenta similaridade de 99,5%

com a seqüência chamada AgB4/2 no mesmo estudo de Zhang *et al* (2010) (Figura 1)

Em relação ao *AgB3*, foram encontradas cinco seqüências distintas no estágio adulto, que puderam ser agrupadas em três classes (Figura 1). Uma destas (*AgB3_14*) corresponde ao principal alelo *AgB3* obtido do metacestóide no estudo de Haag *et al* (2004) (AY871041), enquanto as outras quatro apresentam divergência de 14 a 16 nucleotídeos e uma destas (clone *AgB3_5*) apresenta um indel de 4 nucleotídeos (Figura complementar 1C). Estas quatro seqüências separam-se em dois grupos (Figura 1), um deles relacionado ao gene *AgB5/haag* (AY871009), posteriormente designado como um locus variante de *AgB3* (Mamuti *et al*, 2007). Devido ao fato de que as seqüências apresentadas por Zhang *et al* (2010) compreendem apenas 124 dos 232 nucleotídeos do segundo éxon de *AgB3*, apenas dois subtipos de seqüências podem ser inferidos através do alinhamento gerado no presente estudo (Figura 1).

Foram encontradas somente duas seqüências variantes de *AgB5* divergindo em uma transição (C – T) e uma transversão (G – T). Estas seqüências apresentaram 98, 7% e 100% de similaridade com a seqüência descrita por Mamuti *et al* (2007) (AB260973) (Figuras 1 e complementar 1E).

Figura 1

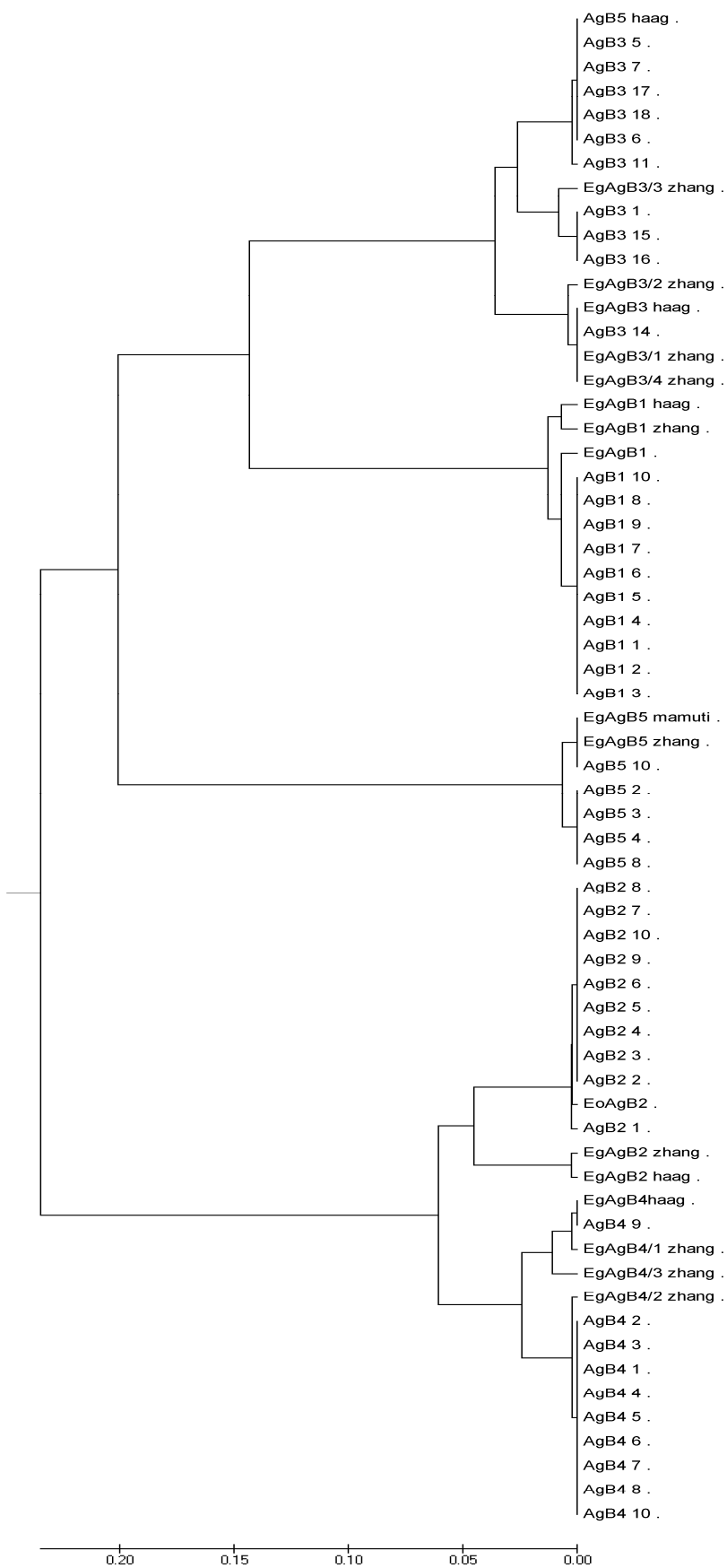


Figura 1. Dendrograma de distância (UPGMA, p-distance e pairwise-deletion) das diferentes seqüências encontradas nos genes do AgB dentro de um único verme adulto. As seqüências denominadas como *_haag* foram retiradas de Haag *et al* (2004) e as denominadas como *_zhang* foram retiradas de Zhang *et al*, (2010).
EgAgB1_haag: AY773091; *EgAgB1_zhang*: AY871019; *EgAgB1*: Z26336;
EgAgB2_haag: AY871040; *EgAgB2_zhang*: AY569341; *EoAgB2*: AY569358;
EgAgB3_haag: AY871041; *AgB5_haag*: AY871009; *EgAgB3/1_zhang*: AY871026;
EgAgB3/2_zhang: AY871015; *EgAgB3/3_zhang*: DQ137844; *EgAgB4_haag*:
AY871027; *EgAgB4/1_zhang*: AY357114, *EgAgB4/2_zhang*: AY569350;
EgAgB4/3_zhang: AF252859; *EgAgB5_mamuti*: AB260973; *EgAgB5_zhang*:
AB260973.

3.3 Comparação entre a diversidade dos genes do AgB nos estágios de metacestóide e adulto

Nós comparamos a diversidade de seqüências do segundo exón do AgB obtidas de um único verme adulto com aquelas oriundas de um único metacestóide obtidas por Haag *et al* (2004) (Tabela 2). O gene *AgB1* apresentou 4 seqüências variantes no metacestóide, mas foi monomórfico no verme adulto. Os genes *AgB2* e *AgB4* apresentaram nove e seis seqüências no estágio larval, respectivamente, e apenas duas no estágio adulto. Enquanto as duas de *AgB2* são muito similares (apenas uma substituição), as duas seqüências de *AgB4* encontradas no estágio adulto diferem consideravelmente entre elas (10 substituições e um indel de três nucleotídeos). O gene *AgB3* apresentou sete diferentes seqüências no estágio larval e quatro no estágio adulto, que puderam ser agrupadas em três diferentes subclasses. *AgB5* foi analisado pela primeira vez quanto sua diversidade e não pôde ser comparado com o estágio larval, apresentando duas seqüências no estágio adulto.

Tabela 2 – Comparação entre a diversidade dos genes do AgB nas fases larval e adulta. n=nº de clones analisado; h=nº haplótipos (variantes); s=nº sítios segregantes; k=nº médio de diferenças de nucleotídeos; π =diversidade de nucleotídeos; hd=diversidade haplotípica; sd=desvio padrão.

	Larva						Adulto					
	n	h	s	k	π (sd)	hd (sd)	n	h	s	k	π (sd)	hd (sd)
AgB1	25	4	5	0.400	0.0018 (0.0010)	0.230 (0.110)	10	1	0	0	0	0
AgB2	24	9	9	0.667	0.0031 (0.0008)	0.565 (0.121)	10	2	1	0.200	0.0009 (0.0007)	0.200 (0.154)
AgB3	25	7	30	10.533	0.0490 (0.0050)	0.707 (0.073)	10	4	24	9.556	0.0442 (0.0100)	0.711 (0.117)
AgB4	39	6	4	0.304	0.0014 (0.0006)	0.243 (0.091)	10	2	10	2.000	0.0094 (0.0073)	0.200 (0.154)
AgB5	-	-	-	-	-	-	5	2	2	0.800	0.00521 (0.0062)	0.400 (0.237)

Embora os tamanhos amostrais sejam diferentes, podemos notar que no estágio adulto o único gene que apresenta quantidade de seqüências maior que dois (valor compatível de um heterozigoto para um único loci) é o gene *AgB3*, cujas seqüências formam três agrupamentos distintos (Figura 1), enquanto que no estágio larval todos os genes apresentam múltiplas seqüências. Estes dados indicam que a diversidade de seqüências no verme adulto tende a ser menor do que no estágio larval.

4. Discussão

4.1 Mistura entre *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi*

A ocorrência de fecundação cruzada entre indivíduos de diferentes linhagens ou espécies de *Echinococcus* e as suas conseqüências biológicas têm sido motivo de amplo debate (Lymbery *et al*, 1997, Haag *et al*, 1999, Badaraco *et al*, 2008). O verme adulto analisado neste estudo apresentou haplótipo mitocondrial idêntico ao encontrado em parasitos da espécie *E. granulosus sensu stricto* e nunca em parasitos de outras espécies de *Echinococcus*, sendo inclusive um critério utilizado na identificação de espécies dentro deste gênero (Saarma *et al*, 2009). Entretanto, no genoma nuclear deste indivíduo encontramos seqüências genéticas típicas de outras espécies de *Echinococcus*, como o alelo *Mdh3* do gene *Mdh*, encontrado em altas freqüências em *E. ortleppi* e *E. canadensis*, e que quando encontrado em *E. granulosus sensu stricto* pode ser interpretado como devido a introgressão ocasionada por fecundação cruzada entre indivíduos de diferentes espécies (Badaraco *et al*, 2008). Além disso, a análise do gene *AgB2* apresentou seqüências observadas antes somente em *E. ortleppi*. Analisados em conjunto, estes dados podem ser interpretados como um caso de hibridação entre parasitos de *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi*. Esta é a primeira vez que um possível caso de hibridação é descrito para um verme adulto de *Echinococcus*. Este resultado é muito relevante, pois indica que o protoescólex que se desenvolveu em verme adulto resultou de um evento de fecundação cruzada entre *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi*, dando origem a um

cisto viável. Estes dados mostram que o cruzamento entre estas duas espécies pode gerar híbridos viáveis e férteis.

A presença de um estágio larval altamente proliferativo pode ser responsável pela grande formação de linhagens observado no clado *E. granulosis sensu lato* (Smyth e Smyth, 1964). Entretanto, este processo não é definitivo, e só se mantém se houver isolamento reprodutivo por um tempo suficientemente longo. Especiação é um processo contínuo. Quando duas espécies separadas que ainda compartilham suficiente grau de similaridade genética são postas em contato elas podem eventualmente entrecruzar e gerar uma prole híbrida. Uma vez que esta prole apresenta viabilidade, ela pode fazer parte da população e acabar com a clara separação que existia anteriormente entre as duas espécies originais, ou, eventualmente, se tornar uma nova espécie híbrida.

E. ortleppi e *E. granulosis sensu stricto* apresentam considerável grau de divergência em seus genomas e são adaptados a hospedeiros intermediários diferentes (Thompson e McManus, 2002), podendo ser considerados duas entidades evolutivas distintas (Nakao *et al*, 2007). Entretanto, o trânsito mundial de animais, impulsionado pelo comércio, colocou em contato parasitos que historicamente não se encontravam, possibilitando, assim, a hibridação.

4.2. Número de cópias dos genes do AgB

Desde a sua descoberta como antígeno imunodominante nos anos 70 (Oriol *et al*, 1971), o AgB já teve cinco loci gênicos completamente caracterizados (Mamuti *et al*, 2006a). Apesar deste relativo pequeno número de genes caracterizados, experimentos de Southern blot mostram que deve haver pelo menos nove diferentes loci relacionados ao AgB em *E. granulosis sensu stricto* e dez cópias em *E. ortleppi* (Graichen *et al*, submetido). Além disso, abordagens genômicas demonstraram que em *E. multilocularis* estão presentes sete loci funcionais de genes diretamente relacionados ao AgB, sendo que estes sete loci podem ser agrupados em cinco subfamílias, cada uma correspondente aos 5 genes caracterizados anteriormente (Brehm, 2010). Uma

análise menos restrigente encontrou mais duas seqüências em *E. multilocularis* que formam outra subfamília, *EmAgB6* (Graichen *et al*, submetido). Nota-se, portanto, que a caracterização dos loci compondo a família AgB ainda não está completa.

Analisando as seqüências publicadas até então e as originárias de um único verme adulto e de um único protoescólex, Zhang *et al* (2010) dividiu as seqüências do AgB em 10 diferentes grupos, que foram interpretadas como 10 diferentes loci, todos pertencentes às cinco subfamílias do AgB. O dendrograma apresentado na Figura 1, com as seqüências obtidas em nosso estudo, permite dividir as seqüências do AgB obtidas de um único verme adulto em cinco classes principais: as seqüências obtidas com os primers para *AgB3* podem ainda ser agrupadas em três diferentes subclasses. e as do gene *AgB4* e *AgB5* em duas subclasses cada, o gene *AgB1* é monomórfico e o *AgB2* apresenta apenas uma pequena diferença, de modo que cada um forma um grupo homogêneo. Se considerarmos que estas classes representam loci gênicos distintos obteremos nove loci relacionados ao AgB presentes neste indivíduo, o mesmo número obtido em experimentos de Southern blot (Graichen *et al*, submetido). Entretanto, esta abordagem baseada unicamente em PCR e seqüenciamento não permite separar polimorfismo alélico de seqüências oriundas de diferentes loci e nem explica se as pequenas alterações dentro dos grupos de seqüências são devido a polimorfismo alélico ou a diferentes loci.

4.3. Diversidade de seqüências do adulto

Experimentos baseados em PCR utilizando DNA proveniente de larvas de *Echinococcus* têm revelado uma grande quantidade de seqüências dos genes do AgB levemente divergentes, mesmo quando um único indivíduo é analisado (Arend *et al*, 2004, Haag *et al*, 2004, Mamuti *et al*, 2004, Graichen *et al*, 2007). Estas diferenças podem ser relacionadas com mutações somáticas originadas durante o intenso processo de multiplicação celular que ocorre no interior do hospedeiro intermediário durante o crescimento do metacestóide (Graichen *et*

al, 2007). Uma proposta diferente sugeriu que a variabilidade intra-individual encontrada nos genes do AgB é fruto de redundância genética (Zhang *et al*, 2010), entretanto, este argumento é baseado exclusivamente em experimentos de PCR, que não excluem a possibilidade de as variações encontradas serem de fato polimorfismos alélicos. Além disso, este argumento não explica por que genes que seriam cópias únicas (como o *AgB1*) também apresentarem variações de seqüências (Haag *et al*, 2004, Mamuti *et al*, 2004, Graichen *et al*, 2007).

Apesar de prejudicada pela abordagem baseada em PCR e pelo limitado número de clones analisados, a diversidade haplotípica observada no verme adulto foi inferior à diversidade observada no estágio larval, exceto para o gene *AgB3* (Tabela 2). Devido à falta de dados disponíveis sobre as diferenças pontuais dentro de cada classe alélica no trabalho de Zhang *et al* (2010) não foi possível realizar esta comparação com os dados obtidos por ele.

A diversidade haplotípica reduzida observada no verme adulto em comparação com o estágio larval deve-se à proliferação celular menos intensa apresentada pelo verme adulto, especialmente o escólex, em relação àquela do estágio larval, levando a supor que a oportunidade para ocorrer mutações é relativamente menor durante o estágio adulto. A análise apresentada no trabalho de Haag *et al* (2004) também reportou a diversidade de seqüências do AgB de protoescóleces individuais de um mesmo cisto e pôde-se observar que diferentes protoescóleces apresentam seqüências divergentes, fazendo com que a diversidade de seqüências total do cisto seja um somatório da diversidade dos protoescóleces individuais. Deste modo, as diferentes seqüências encontradas dentro de um verme adulto representariam a diversidade encontrada e um único protoescólex do conjunto de protoescóleces de um cisto e apenas parcialmente a diversidade total observada dentro de um cisto hidático.

Portanto, a menor diversidade encontrada no verme adulto em relação ao metacestóide deve-se ao fato de que o conjunto de diferentes seqüências originadas por mutações somáticas dentro do cisto hidático seja distribuído diferentemente entre os protoescóleces (Haag *et al*, 2004), de maneira que

cada protoescólex porte apenas parte da diversidade de seqüências encontradas em um metacestóide. Como cada verme adulto é originário de um único protoescólex, a diversidade do verme adulto é ruído de um processo de diversificação ocorrido durante o estágio larval.

5. Referências Bibliográficas

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.

Badaraco JL, Ayala FJ, Bart JM, Gottstein B e Haag KL. (2008) Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. *Exp Parasitol.* 119:453-459.

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

Brehm K (2010) *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitol* 137: 537-55.

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.

Farias LN, Malgor R, Cassaravilla C, Bragança C e de la Rue ML. (2004) Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 46:153-156.

Fernandez 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.

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

Graichen DAS, Gottstein B, Matsumoto J, Müller N, Zanotto PMA, Ayala FJ e Haag KL. (2007) Expression and diversity of *Echinococcus multilocularis* AgB genes in secondarily infected mice: evaluating the influence of T-cell immune selection on antigenic variation. *Gene.* 392:98-105.

Graichen DAS, Muller N, Gottstein B e Haag KL. (Submetido) Genomic instability inferred by AgB number of copies.

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, Araujo AM, Gottstein B, Siles-Lucas M, Thompson RCA e Zaha A. (1999) Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitol.* 118: 63–71.

Librado P e Rozas J. (2009) DNAsp v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452

Lightowers 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.

Lymbery AJ, Constantine CC e Thompson RCA. (1997) Self-fertilization without genomic or population structuring in a parasitic tapeworm, *Evolution* 51:289–294.

Mamuti W, Sako Y, Bart JM, Nakao M, Ma X, Wen H e Ito A. (2007) Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of antigen B from *Echinococcus granulosus* genotypes 1 and 6. *Parasitol Int.* 56:313-316.

Mamuti W, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Ishikawa Y, Yamasaki H, Lightowlers MW, Ito A. (2006) Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitol Int.* 55: 57-62

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) Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. *J Clin Microbiol.* 42:1082-1088.

Moore J e Brooks DR. (1987) Asexual Reproduction in Cestodes (Cyclophyllidea: *Taeniidae*): Ecological and Phylogenetic Influences *Evolution* 41: 882-891

Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS e Ito A. (2007) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitol.* 134:713-722.

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

Saarma U, Jõgisalu I, Moks E, Varcasia A, Lavikainen A, Oksanen A, Simsek S, Andresiuk V, Denegri G, González LM, Ferrer E, Gárate T, Rinaldi L, Maravilla P. (2009) A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitol.* 136:317-328

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

Smyth JD e McManus DP (1989) The physiology and biochemistry of cestodes, 1st ed. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., p. 5–9.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, e Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,

Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).

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

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, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.

Torgerson PR, Ziadinov I, Aknazarov D, Nurgaziev R e Deplazes P. (2009) Modelling the age variation of larval protoscoleces of *Echinococcus granulosus* in sheep. *Int J Parasitol.* 39:1031-1035.

Trouvé S, Morand S e Gabrion C. (2003) Asexual multiplication of larval parasitic worms: a predictor of adult life-history traits in Taeniidae? *Parasitol Res.* 89:81-88.

Zhang W, Li J, Jones MK, Zhang Z, Zhao L, Blair D e McManus DP. (2010) The *Echinococcus granulosus* antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e784.

Figura complementar 1: Alinhamento das seqüências obtidas a partir da clonagem dos amplicons de um único verme adulto. A) *AgB1*; B) *AgB2*, C) *AgB3*; D) *AgB4*; E) *AgB5* e F) *MdH*. As seqüências aqui representadas são as mesmas utilizadas para inferir o dendrograma da Figura 1. Traços indicam a presença de gaps e pontos de interrogação indicam a ausência de informação. As regiões destacadas em cinza claro representam os sítios de anelamento dos primers e as em cinza escuro são posições variáveis do alinhamento.

Figura complementar 1 A

```

                *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
EgAgB1_haa : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAT 115
EgAgB1_Zha : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAT 115
EgAgB1      : AAATGATTGGCGAACGGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115
AgB1_1      : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115
AgB1_2      : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115
AgB1_3      : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115
AgB1_4      : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115
AgB1_5      : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115
AgB1_6      : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115
AgB1_7      : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115
AgB1_8      : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115
AgB1_9      : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115
AgB1_10     : AAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAAC TGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCAC 115

                120      *      140      *      160      *      180      *      200      *
EgAgB1_haa : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
EgAgB1_Zha : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC- 146
EgAgB1      : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
AgB1_1      : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
AgB1_2      : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
AgB1_3      : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
AgB1_4      : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
AgB1_5      : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
AgB1_6      : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
AgB1_7      : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
AgB1_8      : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
AgB1_9      : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218
AgB1_10     : GGCAC TCAAGTCCCACCTCAGAGG GTTGATTGCTGAAGGTCAATAGAGGIGCCAATACACTGTCAITGTGACTIAGTCATAGATTTTGCTCAATAAACCATCTIAC 218

```

Figura complementar 1 B

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	
EoAgB2	:	AAAGCGCACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	
EgAgB2_Zha	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GGTAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCCAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AATGACCT	AACGGCATTT	115	
EgAgB2_Haa	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GGTAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCCAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AATGACCT	AACGGCATTT	115	
AgB2_1	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	
AgB2_2	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	
AgB2_3	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	
AgB2_4	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	
AgB2_5	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	
AgB2_6	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	
AgB2_7	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	
AgB2_8	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	
AgB2_9	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	
AgB2_10	:	AAAGCACACATGGGGCAAGT	GATAAAAAAA	GATGGGTGA	ACTTCAAGACTT	CCTTTAGAA	TGATCCACTGGG	CAAAGACTT	GTGCTCTTGGC	AGGACCTG	ACTGCCATCT	114	

		120	*	140	*	160	*	180	*	200	*	220	
EoAgB2	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223
EgAgB2_Zha	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CGTCAGGTGC	TGAAGAAG	TATGTTAAGA	ATTTGGTGGAA	AAAAA-----	GATGATGATT	CAAAG????????????????	198		
EgAgB2_Haa	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CGTCAGGTGC	TGAAGAAG	TATGTTAAGA	ATTTGGTGGAA	AAAAA-----	GATGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	218
AgB2_1	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223
AgB2_2	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223
AgB2_3	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223
AgB2_4	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223
AgB2_5	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223
AgB2_6	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223
AgB2_7	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223
AgB2_8	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223
AgB2_9	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223
AgB2_10	:	GCCAGAAGCTGC	ATTTGAAGATT	CACGAAGTGT	TGAAGAAA	TATGTCAAG	GATTTGTTGGAAGA	AAGAAGA	GAGGATGATT	CAAAGIAAGT	CATGCGTCGGG	GACAC	223

Figura complementar 1 D

```

                *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
EgAgB4_haa : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGAAAATTGGCGCAAATTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAAACCTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
EgAgB4/1_z : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGAAAATTGGCGCAAATTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAAACCTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
EgAgB4/2_z : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAAGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
EgAgB4/3_z : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGAAAATTGGCGCAAATTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAAACCTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
AgB4_1 : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
AgB4_2 : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
AgB4_3 : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
AgB4_4 : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
AgB4_5 : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
AgB4_6 : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
AgB4_7 : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
AgB4_8 : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
AgB4_9 : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116
AgB4_10 : CGAGAGATGCAAGTGCCTCATAATGAGGAAAATTGAGCGAAGTTCGGGACTTCTTTAGAAGTGAATCCACTGGGTCAAAGACTTGTGCTCTTGGCAGGGACCTGACTGCCATCTGCC 116

```

```

                120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
EgAgB4_haa : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGCTGGAAGAAGAAGATGA---GGATGATTTAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 219
EgAgB4/1_z : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGCTGGAAGAAGAAGATGA---GGATGATTTAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 219
EgAgB4/2_z : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGTTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGATGATTCAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 222
EgAgB4/3_z : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATCTGCTGGAAGAAAAGATGA-----TGATTCAAAGTAA???????????????? 199
AgB4_1 : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGTTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGATGATTCAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 222
AgB4_2 : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGTTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGATGATTCAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 222
AgB4_3 : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGTTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGATGATTCAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 222
AgB4_4 : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGTTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGATGATTCAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 222
AgB4_5 : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGTTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGATGATTCAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 222
AgB4_6 : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGTTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGATGATTCAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 222
AgB4_7 : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGTTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGATGATTCAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 222
AgB4_8 : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGTTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGATGATTCAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 222
AgB4_9 : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGCTGGAAGAAGAAGATGA---GGATGATTTAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 219
AgB4_10 : AGAAGCTGCAATTGAAGTTTACGGAAGTGTGAAGAAATATGTCAAGGATTTGTTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGATGATTCAAAGTAAAGTCAATGCGTCTGGGACAC 222

```

Figura complementar 1 E

```

                *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
EgAgB5_mam: GAAGATGACATCGATTTCGAAAGCGAACAAGGGTGTTCATGAAAAGTGTAGCCGAATTAAAAGAATTCCTTGCAAGTIGATCCAATGGGGCAAAAATTGGCTTCTATTTGCAAGGAGC 115
EgAgB5_zha: GAAGATGACATCGATTTCGAAAGCGAACAAGGGTGTTCATGAAAAGTGTAGCCGAATTAAAAGAATTCCTTGCAAGTIGATCCAATGGGGCAAAAATTGGCTTCTATTTGCAAGGAGC 115
AgB5_2 : gaAGATGACATCGATTTCGAAAGCGAACAAGGGTGTTCATGAAAAGTGTAGCCGAATTAAAAGAATTCCTTGCAAGTIGATCCAATGGGGCAAAAATTGGCTTCTATTTGCAAGGAGC 115
AgB5_3 : GAAGATGACATCGATTTCGAAAGCGAACAAGGGTGTTCATGAAAAGTGTAGCCGAATTAAAAGAATTCCTTGCAAGTIGATCCAATGGGGCAAAAATTGGCTTCTATTTGCAAGGAGC 115
AgB5_4 : GAAGATGACATCGATTTCGAAAGCGAACAAGGGTGTTCATGAAAAGTGTAGCCGAATTAAAAGAATTCCTTGCAAGTIGATCCAATGGGGCAAAAATTGGCTTCTATTTGCAAGGAGC 115
AgB5_8 : GAAGATGACATCGATTTCGAAAGCGAACAAGGGTGTTCATGAAAAGTGTAGCCGAATTAAAAGAATTCCTTGCAAGTIGATCCAATGGGGCAAAAATTGGCTTCTATTTGCAAGGAGC 115
AgB5_10 : GAAGATGACATCGATTTCGAAAGCGAACAAGGGTGTTCATGAAAAGTGTAGCCGAATTAAAAGAATTCCTTGCAAGTIGATCCAATGGGGCAAAAATTGGCTTCTATTTGCAAGGAGC 115

                120      *      140      *
EgAgB5_mam: TGAAAGATTTCTTCCTTTTGGCCAGGACAAAAGCTCGATC 155
EgAgB5_zha: TGAAAGATTTCTTCCTTTTGGCCAGGACAAAAGCTCGATC 155
AgB5_2 : TGAAAGATTTCTTCCTTTTGGCCAGGACAAAAGCTCGATC 155
AgB5_3 : TGAAAGATTTCTTCCTTTTGGCCAGGACAAAAGCTCGATC 155
AgB5_4 : TGAAAGATTTCTTCCTTTTGGCCAGGACAAAAGCTCGATC 155
AgB5_8 : TGAAAGATTTCTTCCTTTTGGCCAGGACAAAAGCTCGATC 155
AgB5_10 : TGAAAGATTTCTTCCTTTTGGCCAGGACAAAAGCTCGATC 155

```

Figura complementar 1 F

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      120
MDH3 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129
MdH-1 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129
MdH-2 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129
MdH-3 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129
MdH-4 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129
MdH-5 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129
MdH-6 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129
MdH-7 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129
MdH-8 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129
MdH-9 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129
MdH-10 : CGTTCCTTCCATTTCCGAAAGAACTTTACTGCCCTTACCCGCTTGGACCATAACCGCGCCATCTACCAGGTGAGAAAATTAACCAAGTGGAGGATTAGTTGCCCCCTCCCTCGAGACGCTTAATCGCT 129

*      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *      240      *
MDH3 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254
MdH-1 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254
MdH-2 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254
MdH-3 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254
MdH-4 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254
MdH-5 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254
MdH-6 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254
MdH-7 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254
MdH-8 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254
MdH-9 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254
MdH-10 : CTTGTTTGTGTCCTTCTAGGTCGCTGCCAAGGCTGGAGTTCCTAACACGTGTGTGAAGAACGTATGTATCTGGGGCAACCACAGCAATAAGCAATTCCTGATCTGTCTCACGCCGTTGTCACCAA 254

```

Capítulo 5: Manuscrito 3

Manuscrito em preparação.

Produção de anticorpos policlonais contra subunidades específicas do Antígeno B de Echinococcus granulosus

1. Introdução

O estágio larval do parasito *Echinococcus granulosus* infecta humanos e rebanhos de animais de corte em todas as regiões do mundo. A doença é caracterizada por sua longa persistência acarretando morbidade nos indivíduos afetados, embora raramente leve-os à morte (Budke *et al*, 2006). Para garantir sua persistência no hospedeiro, o parasito dispõe de mecanismos físicos (as membranas que recobrem o cisto) e de mecanismos químicos que interagem com as moléculas dos hospedeiros (Brehm, 2010). O antígeno B (AgB) é uma molécula chave nesta inter-relação entre parasito e hospedeiro, contribuindo para a persistência da infecção (Siracusano *et al*, 2008)

O AgB nativo é uma lipoproteína termoestável com peso molecular de aproximadamente 120 kDa (Oriol e Oriol, 1975; Lightowlers *et al*, 1989) que até o momento, foi localizado no tegumento dos protoescóleces, na camada germinativa, além de ser secretado abundantemente no líquido hidático (Rickard *et al*, 1977; Sanches *et al*, 1991). Análises em gel desnaturante de poli-acrilamida (PAGE-SDS) 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 (Lightowlers *et al*, 1989). Estudos de oligomerização sugerem um papel distinto para as diferentes subunidades na composição da proteína nativa. A subunidade AgB3 possui uma função estrutural, localizando-se na parte central do complexo protéico e as subunidades AgB1 e AgB2 presumivelmente teriam uma função catalítica, por se localizarem na superfície do complexo (Monteiro *et al*, 2007).

Embora a função do AgB possa estar relacionada à detoxificação de produtos lipídicos (Chemale *et al*, 2005), estudos *in vitro* demonstraram que ele inibe elastases e a quimiotaxia de neutrófilos (Shepherd *et al*, 1991), além de induzir apoptose em células imunes de pacientes com doença hidática (Siracusano *et al*, 2008). Em 2001, Riganò *et al* analisaram o perfil de citocinas secretado por células mononucleadas do sangue periférico após ativação com AgB. Eles avaliaram células de 40 pacientes infectados com *E. granulosus* divididos em dois grupos: com doença progressiva e 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 protetora para o hospedeiro) principalmente nos pacientes com a forma progressiva da doença, evidenciando um papel importante do AgB na proteção do parasito. Adicionalmente, em 2007, Riganò *et al.* mostraram que o AgB interfere na diferenciação de células dendríticas do sistema imune do hospedeiro, protegendo o parasito da resposta imunológica protetora e favorecendo sua sobrevivência.

Até o momento já foram caracterizados cinco genes pertencentes à família do AgB em *E. granulosus*, *AgB1* (Frosch *et al* , 1994), *AgB2* (Férrandez *et al* , 1996), *AgB3* (Chemale *et al* , 2001), *AgB4* (Arend *et al* , 2004) e *AgB5* (Mamuti *et al* , 2007). O número exato de genes pertencentes a esta família ainda não está determinado, podendo ser composto por pelo menos 10 loci (Graichen *et al*, em preparação). A similaridade nucleotídica entre os genes é maior entre o par *AgB4/2* chegando a 72%, dependendo do alelo analisado. A similaridade entre os genes *AgB1* e *AgB3* é de cerca de 63% e o gene *AgB5* compartilha similaridades variando de 42% com *AgB2* até 54% com *AgB3*. Esta grande similaridade tem sido um fator de dificuldade na produção de anticorpos policlonais específicos contra as proteínas da família do AgB.

O objetivo deste trabalho foi produzir anticorpos específicos contra cada um destes monômeros para posterior utilização em estudos sobre a localização da proteína em diferentes tecidos do parasito. Duas abordagens foram utilizadas para gerar anticorpos monômero-específicos: i) produção de anticorpos contra a proteína recombinante (recAgB1-5); ii) geração de anticorpos contra oligopeptídeos representativos de cada monômero (oliAgB1-5)

2. Materiais e métodos

2.1 Produção dos antígenos

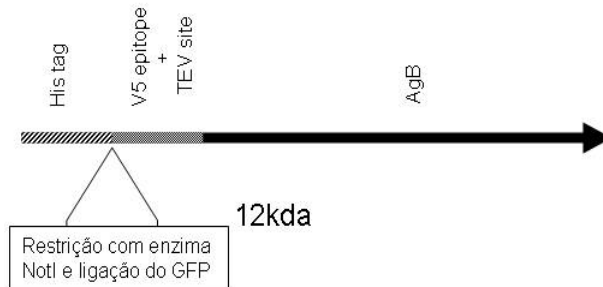
a) Clonagem, expressão e purificação de Antígeno B recombinante (recAgB) em *Escherichia coli*

O segundo éxon de cada um dos cinco genes conhecidos do AgB (AgB1-5) foi amplificado por PCR com enzima “Pfu DNA polimerase” (Promega), A reação foi ajustada conforme os parâmetros recomendados pelo fabricante da enzima e os primers utilizados estão listados na tabela 1. A reação de PCR consistiu de um passo de desnaturação a 95° C seguido por 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, 50° C graus por 45 segundos e 72° C por 30 segundos. A seqüência CACC foi adicionada na extremidade 5' de todos os primers diretos (Tabela 1). A inserção desta seqüência é fundamental para a clonagem a ser realizada posteriormente, pois ela permite que o amplicon seja clonado na direção correta dentro do plasmídeo. O sistema de clonagem utilizado foi a “Champion™ pET151 Directional TOPO® Expression kit” que permite expressar genes em fusão com uma cauda de histidina. Como estratégia para aumentar os níveis de expressão, foi adicionado posteriormente ao vetor de expressão um fragmento funcional do gene GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*), entre a cauda de histidina e o inserto do AgB (Figura 1). Os plasmídeos foram primeiramente transformados em células da linhagem bacteriana Top10 (estas células não possuem os elementos genéticos responsáveis pela expressão dos genes clonados neste vetor de expressão) e cinco clones foram seqüenciados para confirmar a inserção dos fragmentos por seqüenciamento automático (Macrogen Inc, South Korea). Dois clones de cada gene foram selecionados para os testes de expressão da proteína recombinante e transformados em bactérias da linhagem BL21 Star (DE3). A expressão foi induzida com 1 ou 0,1 mM de IPTG (2 isopropil β-D-tiogalactosídeo) em duas temperaturas diferentes (20° C e 37° C) durante até 7 h. Frações de 500 µl foram coletas antes da adição do IPTG e após cada hora durante a fase de indução e foram centrifugadas a 13.000 x g por 1 min. O sedimento formado foi utilizado para verificar a expressão em pequena escala das proteínas recombinantes, através de SDS-PAGE 15% (eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % complementado com SDS). O teste de solubilidade das

proteínas foi realizado utilizando-se 2 ml da amostra induzida e submetendo-a a uma centrifugação de 13.000 x g por 5 minutos. Ao *pellet* adicionou-se 0,5 ml de tampão fosfato salino 1x (PBS) e as células foram lisadas por sonicação. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4° C. Ambas as frações foram processadas e submetidas à SDS-PAGE 15% para identificação e localização das proteínas. Um clone recombinante de cada plasmídeo foi usado para inocular 15 ml de LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e cultivado *overnight* sob agitação (37° C, 250 rpm). Esse cultivo foi utilizado para inocular 500 ml de meio LB líquido (100 µg/ml de ampicilina), nas mesmas condições anteriormente descritas. Após as 3 horas de indução, o cultivo foi submetido à centrifugação a 5.000 x g por 20 min a 4° C, o sobrenadante desprezado e o *pellet* submetido a duas sucessivas lavagens, em 50 ml de PBS e centrifugado nas mesmas condições, para então ser ressuspensionado em 50 ml da solução desnaturante (8 M uréia, 20 mM Na₂HPO₄, 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazole). As células foram então lisadas por sonicação. O lisado foi centrifugado novamente a 5.000 x g por 30 min a 4° C e o sobrenadante contendo a proteína foi coletado e utilizado para purificação. A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando um sistema de cromatografia líquida de baixa pressão em coluna de afinidade carregada com cobalto (TALON Metal Affinity Resin, ClonTech Inc). A pureza das proteínas foi avaliada através por SDS-PAGE 15% e a quantificação pelo kit BCA™ Protein Assay (Pierce) seguindo as instruções do fabricante.

Figura 1

A



B

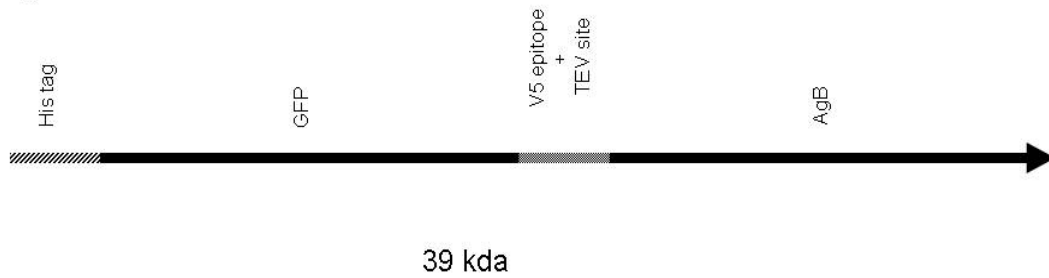


Figura 1. Esquema parcial representativo da porção expressa dos construtos gerados para expressar recAgB em *Escherichia coli*. A) construto originado pela inserção dos genes *AgB1-5* de *E. granulosus* no sítio de clonagem do plasmídeo de expressão pET 151D (Invitrogen). B) Construto derivado do anterior, em que foi acrescentada uma região funcional do gene GFP na parte expressa do vetor, entre a cauda de histidina e os sítios de clivagem da enzima TEV.

Tabela 1 – Primers utilizados para amplificar o segundo exon dos genes AgB1-5. A seqüência adicionada ao primer para a clonagem está destacada em letras minúsculas.

	<i>Primer direto</i>	<i>Primer reverso</i>	<i>Tamanho do amplicon</i>
AgB1	caccGATGATGGCCTCACCTCG	GTATTGGCACCTCTATTCA	213 bp
AgB	caccCAAAGCACACATGGGGCAA	GTGTCCCGACGCATGACTTA	224 bp
AgB3	caccGATGATGAAGTGACAAAGACGA	ATCTCCTCTACTCATCCTCTT	208 bp
AgB4	caccGAGAGATGCAAGTGCCTCAT	GTGTCCCGACGCATGACTTA	221 bp
AgB5	caccGAAGATGACATCGATTGAAAG	CTACTCCCCTTCATCCATCAACCT	204 bp

b) Seleção e síntese de oligopeptídeos representativos de AgB1-5

Selecionaram-se cinco oligopeptídeos representativos de cada subunidade (oliAgB1-5). Os critérios utilizados para a seleção foram: 1) predição dos epítomos imunogênicos da proteína, de acordo o método descrito por Kolaskar e Tongaonkar (1990); 2) probabilidade do peptídeo se localizar na parte exposta da proteína, através de inferências sobre a hidrofiliçidade das diferentes regiões da proteína e da predição de sua exposição na superfície da proteína; e 3) não compartilhar seqüências iguais ou maiores a 4 aminoácidos com seqüência de proteínas de outros AgBs. As simulações e predições foram realizadas com a ajuda do software IEDB Antibody Epitope Prediction, disponível no site <http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/>. É importante ressaltar que muitas vezes, as regiões da proteína que se mostraram adequadas sob um aspecto, imunogenicidade, por exemplo, não puderam ser utilizadas, pois sob outros critérios esta região não era a mais apropriada. Este fato foi verificado na escolha do peptídeo representativo da proteína AgB1. Para esta proteína já havia sido descrito um peptídeo de 8 aminoácido altamente imunogênico (González-Sapienza e Cachau, 2003) localizado entre o 17º e 25º aminoácidos, entretanto nós decidimos sintetizar um peptídeo localizado alguns aminoácidos à região N-terminal do peptídeo descrito anteriormente (Figura 2ª e 2C). Desta maneira, nós aumentaríamos a divergência deste peptídeo em relação às demais proteínas (principalmente em relação à AgB3) e aumentaríamos a especificidade dos anticorpos gerados contra ele, quando testados contra as proteínas originais. Os peptídeos foram sintetizados pelo método de síntese sobre fase sólida (Fmoc solid-phase, Biomatik Corp) e purificados até atingir uma pureza superior a 90%. Para aumentar a imunogenicidade os peptídeos foram fusionados a uma proteína carreadora. A proteína carreadora utilizada foi a hemocianina de *Megathura crenulate* (keyhole limpet hemocyanin, KLH). A figura 2 demonstra a seqüência dos oligopeptídeos, sua localização sobre as seqüências das subunidades do AgB (Figura 2ª), assim como as análises de predição dos peptídeos (Figura 2C) e a ligação dos oligopeptídeos à proteína carreadora (Figura 2B).

Figura 2

A

```
          *      20      *      40      *      60      *
EgAgB2 : --KDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQKIREVLKKYVKNLVEEKD-DDSK : 70
EgAgB4 : --KAEPERCKCLIMRK-LGEIRDFFRSDEPLGQKLAALGRDLTAICQKLQKVHEVLKKYVKDLLEEEDEDDLK : 70
EgAgB1 : ---DDGLTSTSR SVMKMFGEVKYFFERDPLGQKVVDLLKELEEVFQLLRKKLRMALRSHLRGLIAEGE----- : 65
EgAgB3 : DDDDDDVTTKTKKGVMKAISEIKHFFQSDPLGKKLVEVMKDVASVCEMVRKKARMALKEYVRKLVKEDE----- : 68
EgAgB5 : EDDIDS--KAKKGVMSVAELKEFFASDPMGQKLASICKELKDFELLARTKARSALRDYVKRLMDEGE----- : 66
```

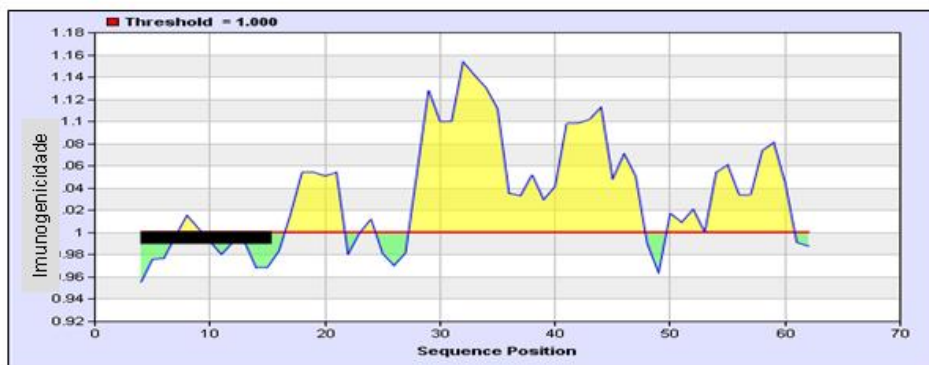
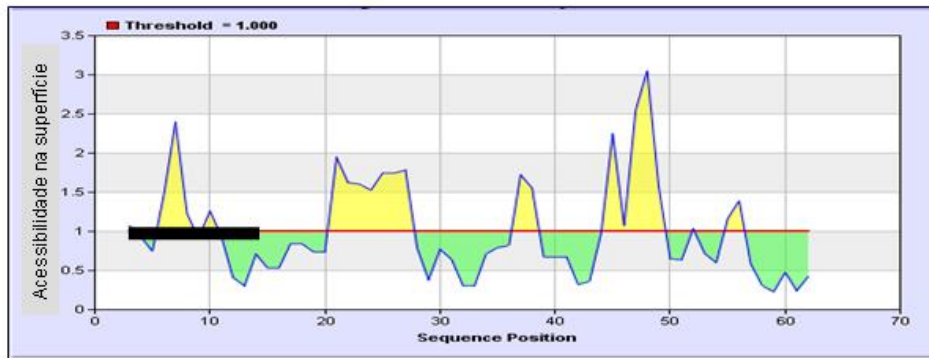
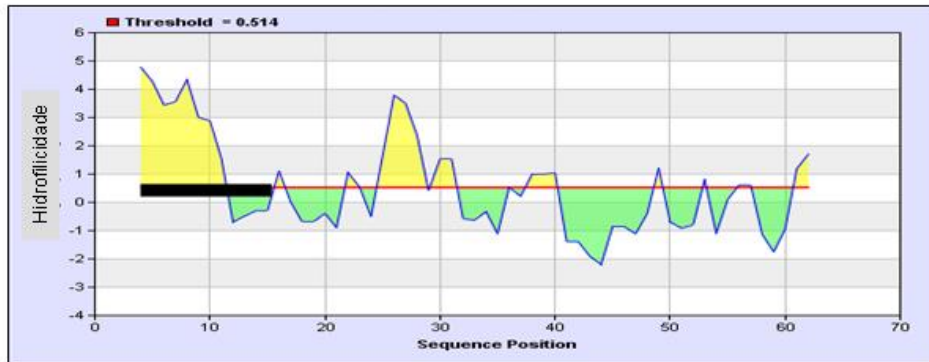
B

```
oliAgB1   DDGLTSTSR SVMC-KIh
oliAgB2   KAHMGQVVKRWGELC-KIh
oliAgB3   KIh-CDVTKTKKGVMKAIS
oliAgB4   KIh-CKSLIMRKLGEIRD
oliAgB5   KIh-CHDFFLLARKARSA
```

Figura 2. Representação dos antígenos utilizados para a imunização dos camundongos. A) Seqüência de aminoácidos das recAgB1-5, representando o segundo éxon de cada proteína (a parte expressa relativa ao vetor não é mostrada). Em verde, sobre o alinhamento de aminoácidos, está destacada a seqüência dos oligopeptídeos selecionados como representativos de cada proteína. B) Seqüências dos oligopeptídeos de oliAgB1-5. Na figura, destaca-se a ligação dos peptídeos à proteína carreadora KLH.

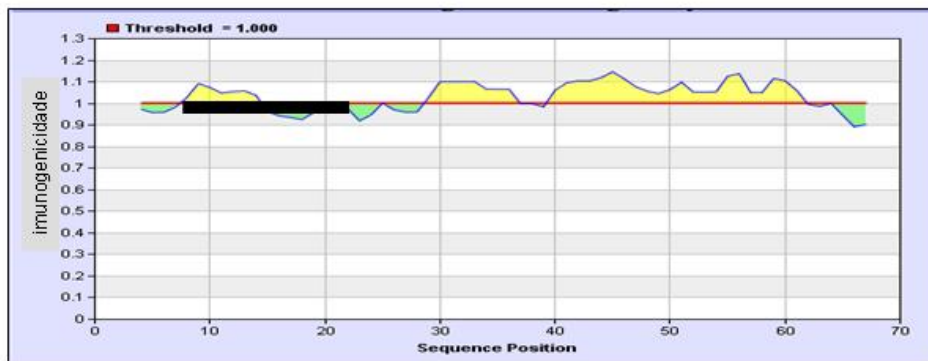
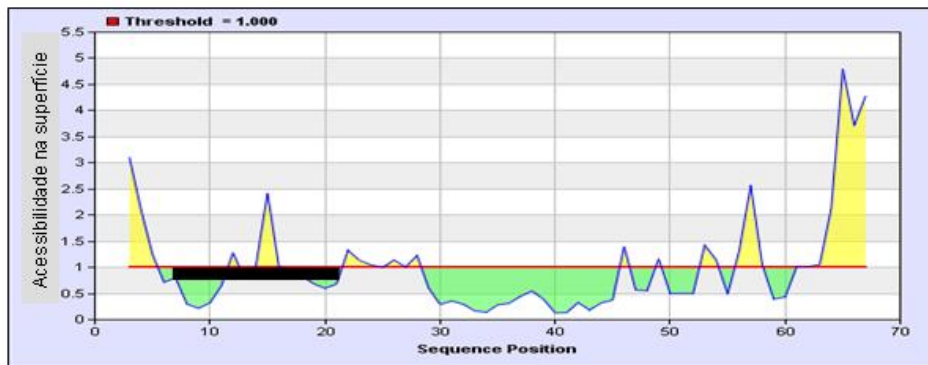
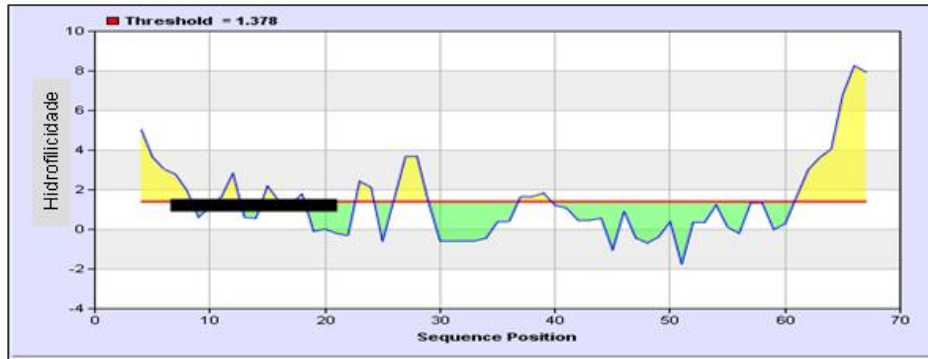
C

AgB1



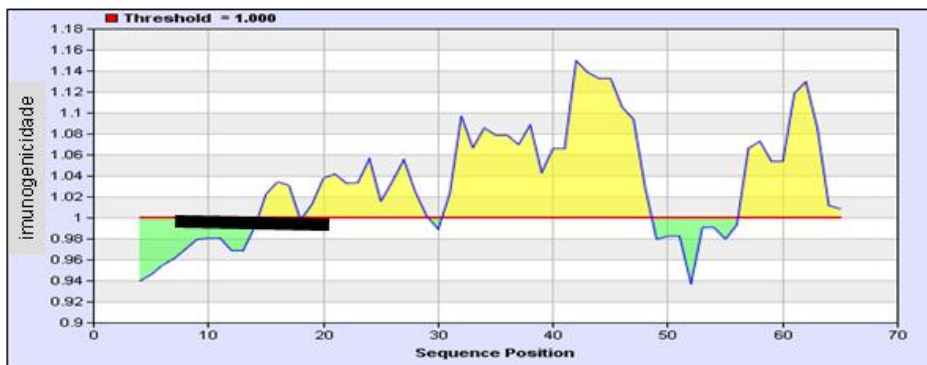
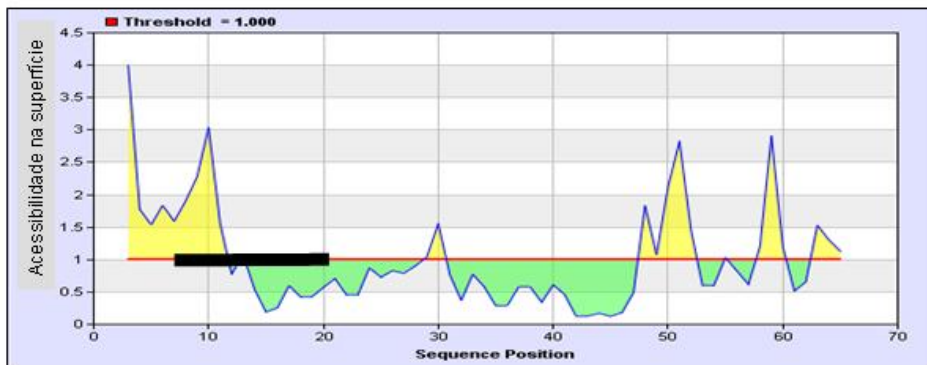
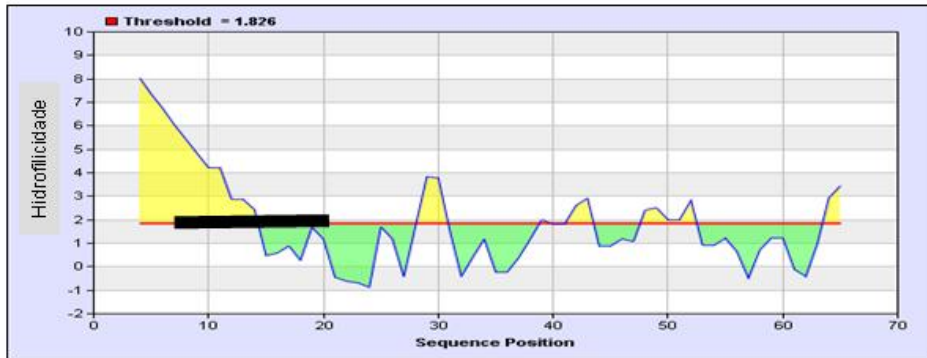
C (cont.)

AgB2



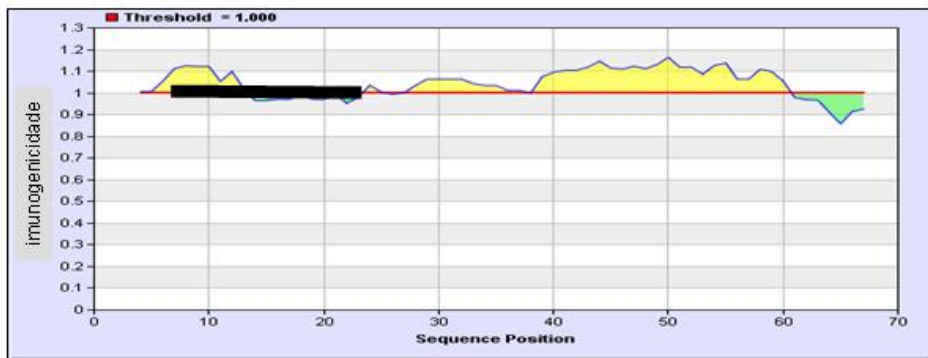
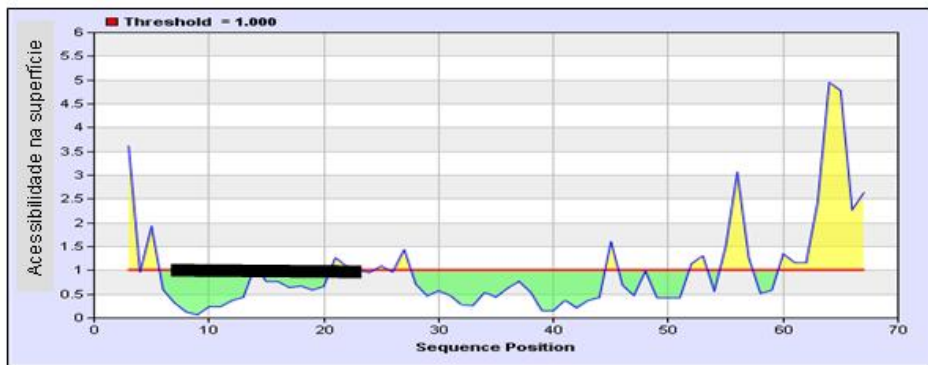
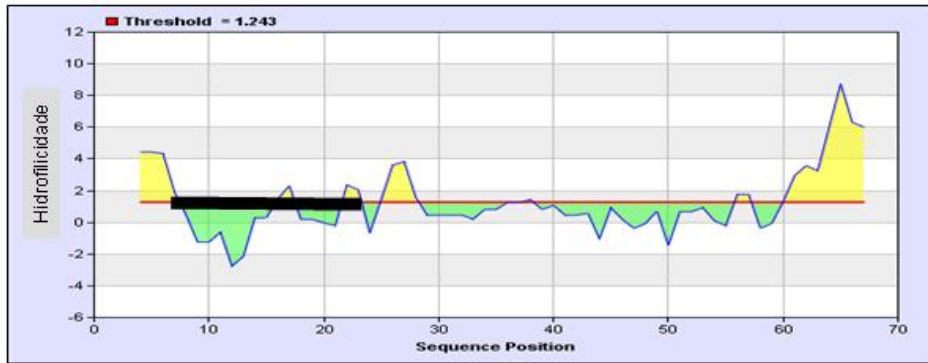
C (cont.)

AgB3



C (cont.)

AgB4



C (cont.)

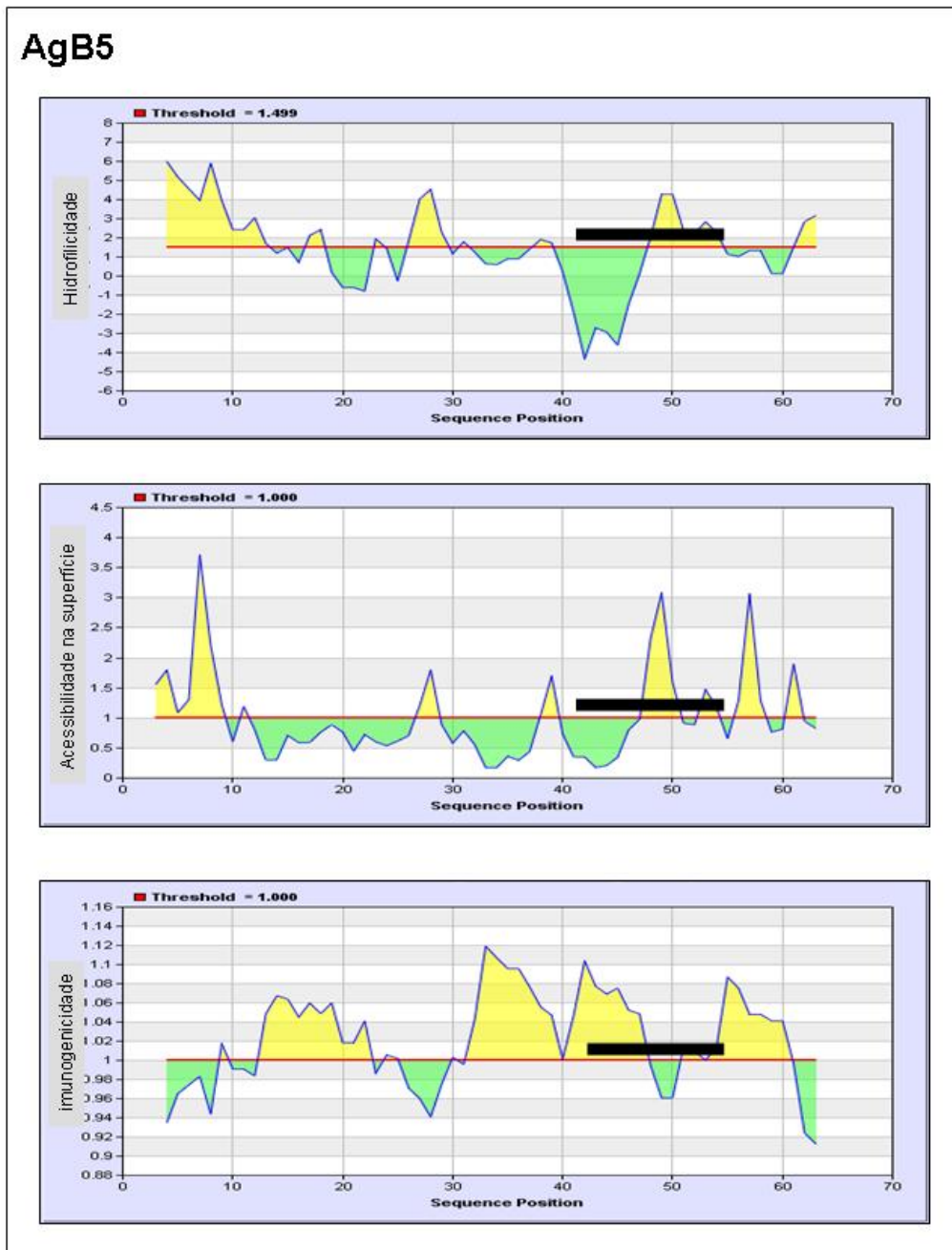


Figura 2. C) Análise computacional para selecionar os oligopeptídeos. Na figura, as propriedades de cada região da proteína foram avaliadas em janelas de 7 aminoácidos, com deslocamentos de passos de 1 aminoácido. O traço em preto representa o oligopeptídeo selecionado.

2.2 Imunização em camundongos, coleta do soro e Western Blot

Os antígenos, tanto as proteínas recombinantes (RecAgB1-5) como os oligopeptídeos sintéticos (oliAgB1-5) foram inoculados em fêmeas de camundongos BALB/c com 4 semanas de idade, adicionados do adjuvante incompleto de Freud (100ul/dose). Utilizaram-se dois animais para cada antígeno. O esquema de inoculação foi composto de 4 inoculações de 100 μ g de proteína ou 50 μ g de oligopeptídeo nos dias 0 (zero), 10, 20 e 25, sendo que a coleta do soro ocorreu no 30° dia, por punção cardíaca nos animais e conseqüente finalização do experimento. Após a coleta do sangue, este repousou por 2 horas a temperatura ambiente para coagular e em seguida foi centrifugado para separar a fração celular do soro.

O soro foi testado diretamente por Western Blot contra um painel contendo 10 ng de recAgB1-5. As amostras de recAgB1-5 purificadas foram aplicadas em SDS-PAGE 15% por 1h a 10 V/cm. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e bloqueadas com tampão BSA (albumina sérica de bovinos) diluída a 1% (Blocker™ BSA, Thermo Scientific) por 2 horas. Posteriormente, a membrana foi incubada por 1 hora com o soro coletado dos animais diluído em uma titulação de 1:1000 em tampão BSA diluído a 0,1%. Após três lavagens com PBS complementado com o detergente Twin (0.1%), a membrana foi novamente incubada com antisoro “Anti-Mouse IgG (whole molecule)–Peroxidase conjugated antibody” (Sigma) diluído 10000X em tampão BSA diluído a 0,1%. A revelação seguiu as recomendações do fabricante.

3. Resultados e discussão

3.1 Os plasmídeos recombinantes não foram eficientes para expressar recAgB.

A expressão de proteínas recombinantes do AgB neste sistema de clonagem (Champion 151D, Invitrogen) foi muito baixa. A análise comparativa dos extratos protéicos de células contendo o plasmídeo após a indução com

IPTG com os de células não submetidas à indução não revelou a presença de uma banda adicional do tamanho esperado para o inserto, 12 KDa (Figura 3^a). Nem uma das quantidades testadas de IPTG foi suficiente para induzir a expressão da proteína recombinante. Da mesma forma, a alteração da temperatura de indução de 37°C para 20°C graus também não produziu efeitos de aumento da expressão (dados não mostrados). Este é um fato surpreendente, pois o AgB de diferentes espécies de *Echinococcus* tem sido expresso heterologamente em bactérias através de muitos sistemas de clonagem e fusionado a uma série de peptídeos (Rott *et al*, 2000; Chen *et al*, 2005; Mamuti *et al*, 2004), sendo inclusive expresso em níveis bastante elevados (Monteiro *et al*, 2008). Embora não existam evidências para justificar a falta de expressão em nossos experimentos, não podemos descartar que estes construtos produziram proteínas tóxicas à linhagem de bactéria utilizada, ou que a proteína foi endereçada para alguma rota de degradação, uma vez que muito pouca proteína foi produzida, mesmo quando diferentes quantidades do indutor ou diferentes temperaturas foram testadas. As proteínas que seriam expressas por estes construtos deveriam ter uma massa molecular de aproximadamente 12 kDa (8 Kda do inserto de AgB e 4 Kda da parte expressa do vetor), adequando-se aos parâmetros recomendados. Na análise das seqüências das recAgB não encontramos sinais moleculares conhecidos que poderiam sinalizar e direcionar estas proteínas para rotas de degradação (Varshavsky, 1996). No entanto, nenhum dos cinco diferentes construtos (recAgB1-5) foi eficiente para expressar esta proteína em bactérias *E. coli* da linhagem BL21 Star (DE3).

3.2 A inserção do gene GFP ao construto aumentou o nível de expressão

Tendo em mente que as características físico-químicas da proteína expressa heterologamente podem ser um fator de limitante na expressão de proteínas em *E. coli*, adicionou-se outro fragmento ao vetor com o intuito de modificar o construto original (figura 1B). A escolha do novo inserto, no caso o GFP, foi motivada por ela ser uma proteína que apresenta altos níveis de

expressão, quando expressa em bactérias *E. coli* (Penna *et al*, 1994). A expressão de todos os plasmídeos recombinantes foi bastante aumentada pela presença desta inserção no plasmídeo já no primeiro teste de expressão (figura 3B). Interessantemente, a proteína resultante foi insolúvel, fato contrário aos achados anteriores, tanto com AgB recombinante (Monteiro *et al*, 2008), quanto com GFP recombinante (Davis e Viestra, 1998). Vale ressaltar que os novos construtos gerados não destruíram o sítio de clivagem da enzima proteolítica TEV, adjacente ao AgB, de modo que o AgB clonado nestes construtos podem ser separados do peptídeo original por clivagem proteolítica. Também é interessante salientar que a proteína recombinante gerada após a inserção do gene GFP expressa uma região funcional deste gene, fato que foi confirmado pela presença de fluorescência nas células bacterianas expressando a proteína heterologicamente (dados não mostrados). A nova proteína recombinante originada após a inserção do GFP possui 39 kDa e foi reconhecida pelos anticorpos policlonais desenvolvidos, tanto contra moléculas totais de *Echinococcus* (anticorpos cedidos por Bruno Gottstein, Unibe) quanto contra as subunidades AgB1 e AgB2 (anticorpos gentilmente cedidos por Arnaldo Zaha, UFRGS) (dados não mostrados).

Figura 3

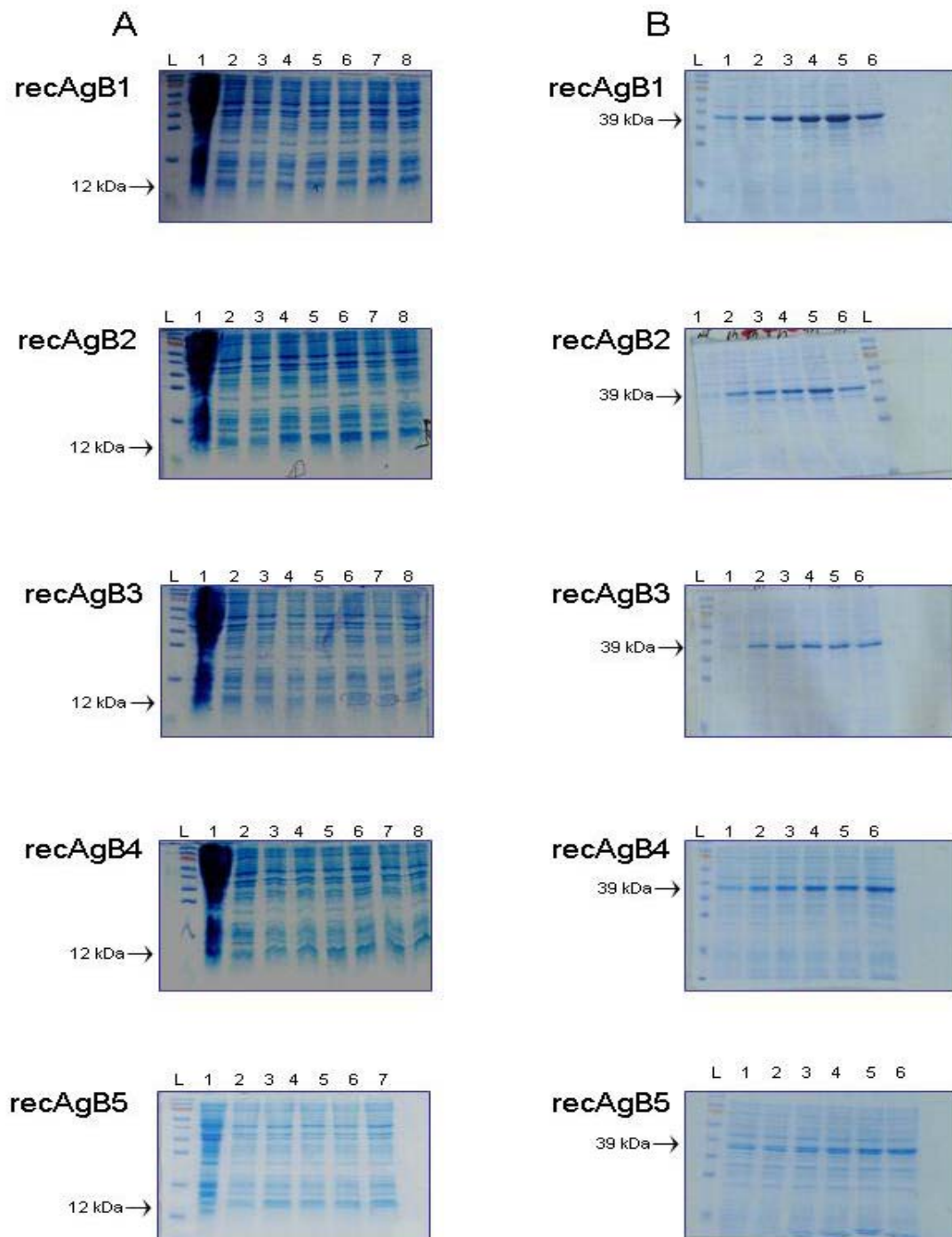


Figura 3. PAGE-SDS dos extratos celulares expressando recAgB1-5. A) Extratos protéicos de células expressando o constructo original. B) Extratos protéicos de células expressando o constructo modificado pela inserção da GFP. L= padrão de peso molecular, 1= célula não induzida, 2) Indução por 1 hora, 3) Indução por 2 horas, 4) Indução por 3 horas 5) Indução por 4 horas, 6) Indução por 5 horas 7) Indução por 6 horas 8) Indução por 7 horas.

3.3 Reposta imune contra o recAgB e oliAgB: reação cruzada é uma marca das moléculas relacionada ao AgB

Os anticorpos obtidos através da inoculação de camundongos com recAgB1-5 e oliAgB1-5 foram testados quanto a sua especificidade por Western blot contra um painel contendo 10ng de recAgB1-5 purificada. Quando os anticorpos foram gerados através da inoculação de proteína recombinante observaram-se muitos casos de reação cruzada (figura 4A), fato que pode ser explicado pela similaridade entre as seqüências protéicas e conseqüente compartilhamento de epítomos. Entretanto, em alguns casos como na inoculação de recAgB3 existe um claro predomínio de resposta contra este peptídeo e a reação cruzada contra outros monômeros é cerca de 10 vezes menos intensa. Interessantemente, os anticorpos gerados contra recAgB4 reconhecem somente este peptídeo e não há reação cruzada contra nenhum outro monômero, nem mesmo com recAgB2. Quando as seqüências de aminoácidos são comparadas, nós encontramos similaridade de 50% entre as proteínas AgB1 e AgB3 e cerca de 70% entre as proteínas AgB2 e AgB4. Esta elevada similaridade certamente se traduz em compartilhamento de epítomos, o que poderia explicar em grande parte a ocorrência de reação cruzada encontrada nos estudos anteriores. O que é surpreendente é a ausência de reatividade cruzada, contra recAgB2, quando os anticorpos gerados pela inoculação de recAgB4 são utilizados (lembrando que o par AgB2/AgB4 apresentam cerca de 70% de similaridade em termos de seqüência de aminoácidos). Uma possível explicação para este fato é que a inoculação de recAgB4 leve à formação de anticorpos preferencialmente contra algum epítomo imunodominante, específico de AgB4 (o qual não estaria presente em AgB2). Entretanto, métodos mais sensíveis aos utilizados por nós poderiam detectar sinais de uma possível reação cruzada. Em casos de famílias gênicas com alta similaridade de seqüência de aminoácidos, a reação cruzada é bastante comum (Singh, 2009, D'Suze *et al*, 2007), sendo que os anticorpos geralmente dependem de purificações adicionais ou diluições a grandes titulações para atingir algum grau de especificidade. Neste sentido, um estudo

anterior desenvolveu anticorpos policlonais específicos contra proteínas recombinantes AgB1-5 de *E. multilocularis*, em que foi possível eliminar a reatividade cruzada entre as subunidades através da purificação baseada em imuno-afinidade (Mamuti *et al*, 2006). Os oligopeptídeos utilizados na tentativa de gerar uma resposta específica contra epítomos exclusivos de cada monômero apresentaram baixa imuno-reatividade. Apenas a inoculação com oliAgB2 apresentou resposta imune detectável, e esta foi específica (Figura 4B). É importante salientar que apenas 1 de 5 oliAgB testados foi imunogênico. A dificuldade em obter uma resposta imunológica contra os peptídeos não surpreende, uma vez que vários fatores afetam a eficiência da resposta imunológica contra oligopeptídeos, como por exemplo, a linhagem dos animais inoculados (Su e Caldwell, 1993) e o adjuvante utilizado (Holland *et al*, 2000). Em um trabalho recente, List *et al* (2010) testaram 45 oligopeptídeos quanto à sensibilidade para detectar anticorpos em soros de pacientes com equinococose (tanto cística quanto alveolar) e encontraram que destes, somente 17 peptídeos foram eficientes para detectar anticorpos. O mesmo estudo também demonstrou que os peptídeos maiores (mais de 30 aminoácidos) foram mais sensíveis que peptídeos menores, fato este justificado pela presença de mais epítomos em peptídeos maiores. Entretanto, quanto maior o peptídeo, maiores as possibilidades de compartilhamento de epítomos e maiores as probabilidades de reatividade cruzada (List *et al*, 2010), fato este que nos levou a optar pela escolha de peptídeos curtos, porém mais específicos. O adjuvante incompleto de Freud, utilizado neste estudo, é caracterizado por estimular uma resposta imune forte induzida por células T principalmente do tipo Th1 e o AgB é descrito como antagonista deste tipo de resposta (Riganò *et al*, 2007), e é possível que a escolha de outro adjuvante poderia favorecer a produção de anticorpos contra epítomos de AgB. O antígeno oliAgB2, é ligeiramente maior do que os demais peptídeos (16 aminoácidos), de forma que poderia representar mais possibilidades de epítomos e aumentar a reatividade do antígeno.

Figura 4

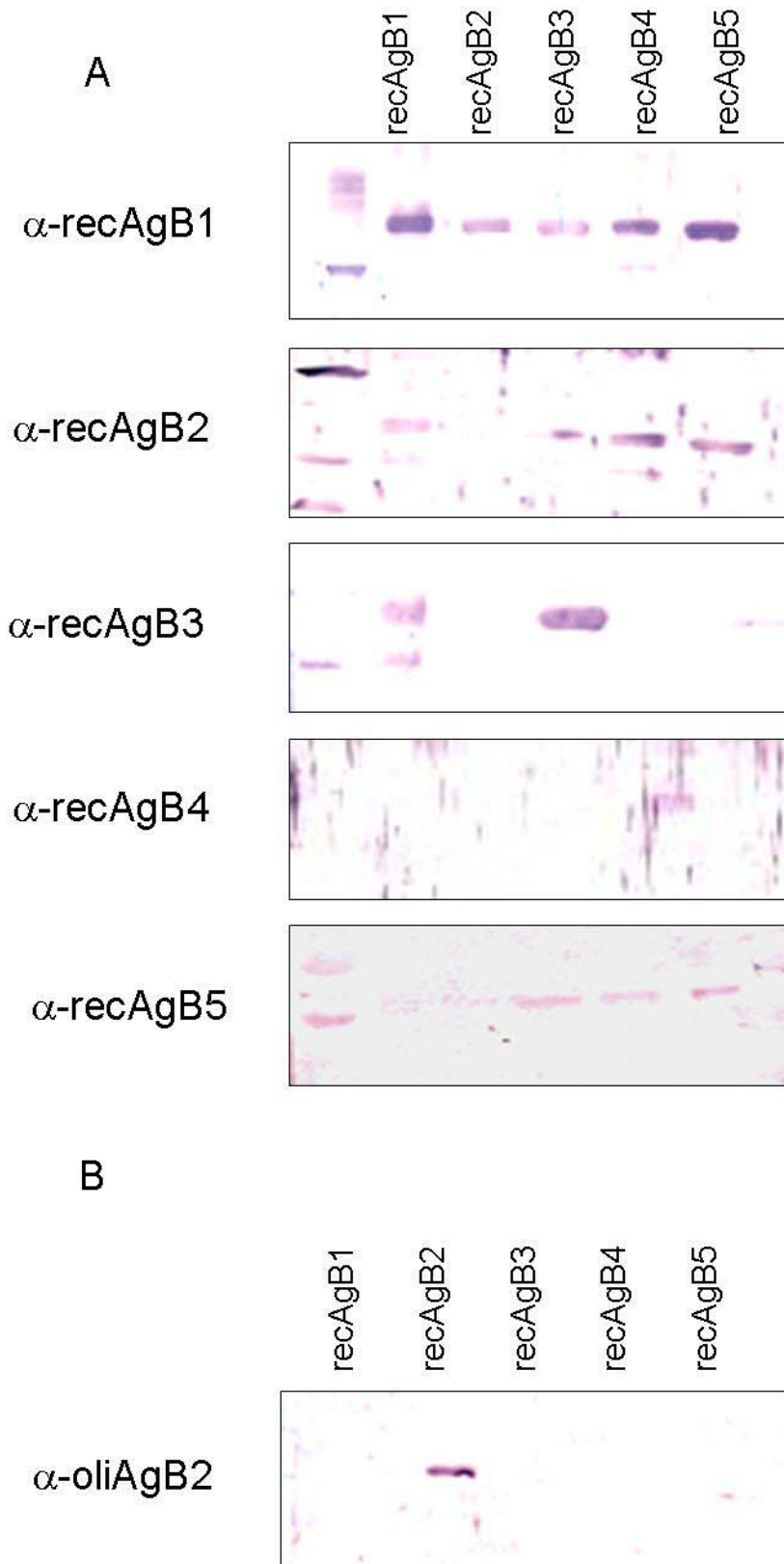


Figura 4. Teste da especificidade da resposta imunológica dos anticorpos gerados pela inoculação de recAgB1-5 e oliAgB1-5. Após PAGE-SDS 15%, 10 ng de recAgB1-5 foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e testadas contra o soro extraído dos camundongos. A) *Western Blot* utilizando anticorpos gerados contra a proteína recombinante; B) *Western Blot* utilizando anticorpos gerados contra o oliAgB2 (por não apresentarem resposta, os *Western Blot* com anticorpos contra os demais oligopeptídeos não são mostrados).

4. Comentários finais

Futuros estudos sobre a estrutura do AgB nativo e da funcionalidade de cada uma das partes constituintes desta proteína necessitarão de anticorpos que sejam claramente específicos contra cada subunidade. Neste sentido, a obtenção de anticorpos específicos, mono ou policlonais, é um ponto chave para o desenvolvimento de novos estudos. Nosso grupo possui os anticorpos não purificados estocados à -20° C e pretende efetuar a purificação com o intuito de utilizá-los para localizar as diferentes subunidades da proteína em diferentes tecidos do parasito.

Uma característica adicional, mas não menos importante, da proteína AgB é que ela é codificada por genes que apresentam diversidade de seqüências dentro de um mesmo indivíduo. Ainda não está determinado se estes alelos alternativos que surgem durante o desenvolvimento do parasito são traduzidos em diferentes proteínas, e se estas proteínas possuem suas propriedades alteradas em relação ao antígeno codificado pelo alelo original do qual se originaram, mas a existência de anticorpos específicos contra subunidades, ou mesmo contra alelos individuais do AgB permitir-nos-ia estudar estes temas.

Embora existam alguns aminoácidos nas proteínas do AgB que sofram seleção diversificadora, provavelmente por ação do sistema imune sobre estes sítios (Haag *et al*, 2006), eles não foram considerados para a seleção dos oligopeptídeos neste estudo. O motivo para esta omissão é que o objetivo deste trabalho foi obter anticorpos que fossem capazes de detectar qualquer alelo de um antígeno em particular. Para isto, escolheram-se apenas as

regiões que fossem imunogênicas e que pudessem estar presentes na superfície da proteína, não se levando em conta sua história evolutiva.

5. Referencias Bibliográficas

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.

Brehm K. (2010) *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitol.* 137:537-555.

Budke CM, Deplazes P e Torgerson PR. (2006) Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis.* 12:296-303.

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.

Chen XH, Wen H, Lu XM, Zhang JH, Lin RY e Zheng SS (2005) Expression, purification and identification of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 23:296-299.

Davis SJ e Vierstra RD (1998) Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol.* 36:521-528.

D'Suze G, Moncada S, Gonzalez C; Sevcik C e Alagn A. (2007) Antigenic cross-reactivity between sixteen venoms from scorpions belonging to six genera. *Clin Toxicol.* 45:158-163.

Fernandez 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.

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

Graichen DAS, Santos GB, Muller N, Gottstein B e Haag KI. (2011). Genomic instability of *Echinococcus granulosus* Antigen B. Submetido.

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.

Haag KL, Zanotto PM, Alves-Junior L, Gasser RB, Zaha A, Ayala FJ. (2006) Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. Infect Genet Evol. 6:251-261.

Holland MJ, Harcus YM, Riches PL e Maizels RM. (2000) Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. Eur J Immunol. 30:1977-1987.

Kolaskar AS e Tongaonkar PC. (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS Lett. 276:172-174.

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.

List C, Qi W, Maag E, Gottstein B, Müller N e Felger I. (2010) Serodiagnosis of *Echinococcus* spp. infection: explorative selection of diagnostic antigens by peptide microarray. PLoS Negl Trop Dis. 4:e771.

Mamuti W, Sako Y, Bart JM, Nakao M, Ma X, Wen H e Ito A. (2007) Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of

antigen B from *Echinococcus granulosus* genotypes 1 and 6. *Parasitol Int.* 56:313-316.

Mamuti W, Sako Y, Xiao N, Nakaya K, Nakao M, Yamasaki H, Lightowers MW, Craig PS, Ito A. (2006) *Echinococcus multilocularis*: developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. *Exp Parasitol.* 113:75-82.

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

Monteiro KM, Scapin SM, Navarro MV, Zanchin NI, Cardoso MB, da Silveira NP, Goncalves PF, Stassen HK, Zaha A e Ferreira HB. (2007) Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim Biophys Acta.* 1774:278-285.

Monteiro KM, Zaha A e Ferreira HB. (2008) Recombinant subunits as tools for the structural and functional characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Exp Parasitol.* 119:490-498.

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

Penna TCV, Ishii M, Souza LC e Cholewa O. (1994) Expression of green fluorescent protein (GFPuv) in *Escherichia coli* DH5- α , under different growth conditions *African J Biotech.* 3:105-111.

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, Delunardo F, Margutti P, Mattei V, Teggi A, Sorice M e Siracusano A (2007) *Echinococcus granulosus* antigen

B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun* 75:1667-1678.

Riganò R, Profuno 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.

Rott MB, Fernández 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.

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

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.

Singh S, Soe S, Weisman S, Barnwell JW, Perignon JL e Druilhe P. (2009) A Conserved Multi-Gene Family Induces Cross-Reactive Antibodies Effective in Defense against *Plasmodium falciparum*. *PLoS one*. 4: e5410.

Siracusano A, Margutti P, Delunardo F, Profumo E, Riganò R, Buttari B, Teggi A e Ortona E. (2008) Molecular cross-talk in host-parasite relationships: the intriguing immunomodulatory role of *Echinococcus* antigen B in cystic echinococcosis. *Int J Parasitol*. 38:1371-1376.

Su H e Caldwell HD. (1993) Immunogenicity of a synthetic oligopeptide corresponding to antigenically common T-helper and B-cell neutralizing epitopes of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Vaccine*. 11:1159-1166.

Varshavsky A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. Proc Natl Acad Sci U S A. 93:12142-12149.

Capítulo 6: Considerações finais

1. Conclusões

Dentre os aspectos mais relevantes da biologia de *Echinococcus* encontra-se sua capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo no interior do hospedeiro intermediário (Roneus *et al*, 1982). Levando-se em conta que o hospedeiro responde à presença do parasito tentando eliminá-lo, alguns fatores da biologia de *Echinococcus* são essenciais para sua sobrevivência. Um mecanismo bastante utilizado por parasitos para sobreviver em seus hospedeiros é a síntese de proteínas que interajam com moléculas dos hospedeiros (Siracusano *et al*, 2008). Durante a fase larval, *Echinococcus* secreta uma proteína oligomérica chamada antígeno B (AgB) que está associada à modulação da resposta imune do hospedeiro intermediário (Riganò *et al*, 2001) e à detoxificação de metabólitos lipídicos (Chemale *et al*, 2005). Atualmente, cinco *loci* dos genes desta família gênica estão bem caracterizados no gênero *Echinococcus*, *AgB1-5*, embora outros *loci* tenham sido descritos (Haag *et al*, 2004, Zhang *et al*, 2010).

A análise detalhada das seqüências gênicas do AgB em cistos hidáticos revelou que estes genes possuíam grande diversidade de seqüências, mesmo quando cistos individuais eram analisados. Analisando as seqüências dos genes *AgB1-4* em um único cisto hidático, Haag *et al* (2004) encontraram sete, dez, cinco e oito diferentes seqüências de cada um dos genes analisados, respectivamente. As diferenças entre as seqüências ocorreram devido a pequenas alterações, sendo que uma seqüência era mais abundante, podendo ser considerada a seqüência original, da qual as demais seriam derivadas. Esta diversidade foi interpretada como proveniente de eventos de hipermutabilidade somática durante o crescimento do cisto, originando seqüências levemente divergentes que poderiam ser importantes para a interação com o hospedeiro (Haag *et al*, 2004). No mesmo trabalho, foi sugerido que duplicações também poderiam estar envolvidas com o surgimento da diversidade interna do cisto.

Posteriormente, foi observado por qPCR que o número de cópias dos genes *AgB1-4* não era constante quando indivíduos da mesma espécie e da mesma localização geográfica eram comparados, sendo o gene *AgB3* aquele que apresentava maior amplitude de variação entre diferentes cistos de *Echinococcus granulosus sensu stricto* (em torno de cinco vezes a diferença entre o cisto que possuía maior número de cópias em relação ao que possuía o menor) e foi sugerido que rearranjos genômicos poderiam ser os mecanismos geradores de tal variabilidade (Haag *et al*, 2006a).

A despeito de o cisto hidático ser originado por um único ovo e ser o produto do crescimento e de transformações do embrião hexacanto, presente no interior deste ovo, ele não é uma entidade homogênea, possuindo compartimentalizações e especializações regionais. Galindo *et al* (2003) encontraram que diferentes regiões dentro de um cisto são ativas ou inativas em determinado momento, em relação à síntese de DNA, RNA e proteínas, sugerindo que o cisto possua diferenças metabólicas internas. Variações ainda mais profundas dentro de um mesmo cisto podem ser inferidas do trabalho de Haag *et al* (2004), pois neste trabalho os autores analisaram protoescoléces individuais de um mesmo cisto, e freqüentemente, as seqüências encontradas em um protoescoléx não estavam presentes em outros, sugerindo que a hipermutabilidade subjacente à variabilidade ocorre independentemente nos protoescoléces, produzindo entidades divergentes quanto ao conteúdo gênico.

Neste contexto, a motivação inicial desta tese foi analisar a dinâmica dos genes do AgB durante várias fases do ciclo de vida do parasito, em relação a sua organização genômica, variabilidade e expressão. Diante da dificuldade de se obter material biológico de muitas das fases propostas nos objetivos (ver tópico seguinte), nos detivemos em analisar a organização do genoma de vários indivíduos, durante a fase larval, de *E. granulosus sensu lato* através de Southern blot em busca de rearranjos que pudessem explicar as diferenças encontradas anteriormente no número de cópias observadas entre cistos hidáticos. Também procuramos abordar a origem da variação do número de cópias do AgB, quando analisamos o número de cópias do AgB em protoescoléces individuais.

Uma vez que a diversidade dos genes do AgB tem sido analisada somente na fase larval (Arend *et al*, 2004, Haag *et al*, 2004, Graichen *et al*, 2007), sendo atribuída à hipermutabilidade durante a fase de metacéstóide e tem sido sugerido que diversidade de seqüências estaria envolvida com a adaptação do parasito ao hospedeiro, nós analisamos se a diversidade das seqüências do AgB também estaria presente durante o estágio adulto.

Por fim, buscando contribuir para a elucidação do papel biológico do AgB, também pretendíamos obter respostas quanto à localização da proteína em diferentes tecidos e fases do parasito. Por motivos que serão discutidos no item subsequente, este objetivo foi apenas parcialmente abordado.

Na busca por repostas para as questões elencadas nos objetivos, a presente tese atingiu as seguintes conclusões:

i) O número de loci gênicos para os genes do AgB é maior do que o pensado anteriormente, sendo de nove e dez para *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi*, respectivamente;

ii) Embora todos os indivíduos de *E. granulosus sensu stricto* tenham apresentado o mesmo padrão de hibridização, cada indivíduo de *E. ortleppi* demonstrou um padrão diferente (pelo menos para o gene *AgB3*), sugerindo que ocorram rearranjos;

III) Existe uma grande variação do número de cópias do AgB entre os protoescoléces de um mesmo cisto, de maneira que cada protoescoléx é diferente do outro, podendo ser considerado uma entidade distinta;

iv) A análise das seqüências genômicas de uma espécie relacionada, *E. multilocularis*, revelou que existem seqüências adicionais relacionadas ao AgB, com similaridade variada, espalhadas pelo genoma. Também demonstrou que pode existir um gene adicional, o qual chamamos de *EmAgB6*. Estas seqüências adicionais poderiam fornecer sítios para recombinação e conversão gênica;

v) O verme adulto contém apenas parte da diversidade encontrada na fase larval; demonstrando que parte da diversidade gerada durante esta fase é perdida no estágio adulto;

vi) A análise qualitativa das seqüências obtidas do verme adulto revelou que podemos estar frente a um caso de hibridização entre duas diferentes espécies de *Echinococcus*, *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi*, uma vez que o verme analisado apresentou tanto seqüências características de *E. granulosus sensu stricto* (*AgB1*, *AgB3-5*, *Cox1*) e seqüências típicas de *E. ortleppi* (*AgB2* e *MDH*);

vii) A expressão heteróloga de AgB recombinante em *E. coli* foi obtida somente após a conjugação deste com uma proteína grande (GFP), possivelmente por este conjugado inibir a toxicidade do AgB produzido pelo construto original;

viii) Imunização com a proteína recombinante recAgB3 ou recAgB4 produziu anticorpos com baixa reatividade cruzada, enquanto inoculações com as demais proteínas recombinantes produziram anticorpos que reconhecem igualmente todos os peptídeos da família AgB testados (grande reatividade cruzada);

ix) Embora os oligopeptídeos sintéticos do AgB testados apresentassem baixa imunogenicidade em camundongos BALB/c (apenas oliAgB2 foi imunogênico), os anticorpos obtidos a partir desta inoculação foram aparentemente específicos.

2. Dificuldades e limitações

2.1 Diferentes estágios de *Echinococcus*.

A coleta de material biológico de *Echinococcus* em nosso laboratório esteve tradicionalmente limitada à fase larval. A coleta de outros estágios, ovos e adultos, por exemplo, demanda a observância de cuidados adicionais em relação à biosegurança, como o uso de roupas descartáveis e manipulação em laboratório com nível de segurança 2 (Ministério da Saúde do Brasil, 2006),

uma vez que a forma infectante para humanos é o embrião hexacanto ou oncosfera, contido no ovo, e que o adulto maduro possui em seu interior milhares de ovos.

A obtenção de vermes adultos, no contexto de execução deste trabalho, apresentou certas dificuldades que tiveram que ser superadas. Primeiramente, os requisitos de biosegurança necessários foram solucionados através da colaboração com o Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Maria, que possui laboratório adequado ao manuseio de fases infectantes de parasitos. A coleta dos vermes adultos também demanda estrutura logística, que também foi sanada pela entidade colaborativa de Santa Maria. Duas abordagens foram empregadas para obter vermes adultos: cães naturalmente infectados foram purgados com bromidrato de arecolina para a eliminação do muco do intestino delgado, o qual foi checado quanto à presença de vermes adultos; e cães foram experimentalmente infectados com protoescólecis e posteriormente purgados para a obtenção dos vermes adultos. Na primeira abordagem, de dez cães analisados três possuíam vermes adultos que foram coletados. Na segunda estratégia, dois cães de um total de seis inoculados apresentaram vermes.

A obtenção das fases de ovo e oncosfera foram abordadas a partir do manuseio dos vermes adultos coletados previamente. O protocolo descrito na literatura consistia em duas etapas: primeiramente a liberação mecânica dos ovos do verme adulto através de maceração (nesta etapa obteríamos o ovo) seguido por uma ativação metabólica mimetizando o hospedeiro intermediário (nesta etapa obteríamos a oncosfera ativada). A técnica já havia sido descrita anteriormente (Zhang *et al*, 2001) e consistia na coleta de vermes adultos de cães naturalmente ou experimentalmente infectados, seguida por uma destruição mecânica das proglotes do verme adulto para a liberação dos ovos que seriam coletados por uma série de peneiras. Após a obtenção dos ovos, estes seriam ativados para a liberação da oncosfera pela simulação de um ambiente igual ao encontrado pelo ovo no hospedeiro intermediário. Esta simulação consistiria em tratar os ovos primeiramente com 1% de pepsina (1:2500) e 1% de HCl (ácido clorídrico) em uma solução com 0.85% de NaCl

(cloreto de sódio), simulando o estômago de um mamífero. Em seguida os ovos seriam inoculados em uma solução contendo 1% de pancreatina, 1% NaHCO₃ (carbonato de sódio) e 5% de bile bovina estéril (coletada de animais). Após este tratamento, as oncosferas estariam livres do tegumento do ovo e ativadas.

A obtenção dos ovos por peneiramento da material macerado do verme adulto mostrou-se ineficiente, pois a presença de muito material biológico inespecífico, derivado dos retos do corpo do parasito, atrapalhava a separação dos ovos, seja entupindo as peneiras utilizadas, seja restando presente no produto final que deveria conter apenas ovos. Desta maneira, pelo excesso de lavagens que tiveram que ser feitas para se obter ovos de *Echinococcus* livres de material contaminante, o produto final obtido não apresentou ovos em concentração suficiente para a análise molecular prevista nos objetivos. Da mesma maneira, as tentativas feitas para a ativação das oncosferas a partir dos ovos obtidos não foram eficientes em ativar o embrião hexacanto, de modo que nenhum embrião ativado pôde ser observado ao microscópio em nossas tentativas.

2.2 Produção de antígenos e anticorpos

Um dos objetivos originais do trabalho era desenvolver anticorpos policlonais específicos contra cada subunidade da proteína AgB para serem utilizados em estudos de localização da proteína em tecidos do parasito. Esta tarefa foi abordada através de dois métodos diferentes: primeiramente, utilizou-se a proteína recombinante diretamente para gerar anticorpos e, alternativamente, tentou-se induzir uma resposta imune contra oligopeptídeos sintéticos representantes de cada uma das subunidades.

Após a escolha do vetor de expressão em *E. coli* (Champion™ pET151 Directional TOPO® Expression kit, Invitrogen), verificou-se que a expressão heteróloga dos genes do AgB utilizando este vetor era extremamente baixa. Embora não tenhamos uma resposta clara para este fenômeno, acreditamos que a proteína deva gerar algum composto que seja tóxico para a bactéria ou

que seja degradado por ela. Em virtude disto, decidiu-se modificar o construto pela inclusão do gene funcional GFP. Interessantemente, a expressão deste novo constructo foi bastante eficiente, o que nos permitiu realizar inoculação dos peptídeos purificados para obter anticorpos. A expressão heteróloga de proteínas recombinantes do AgB já foi realizada em muitos vetores em conjugação com vários outros peptídeos (Rott *et al*, 2000; Chen *et al*, 2005; Mamuti *et al*, 2004) de modo que os baixos níveis de expressão obtidos com nosso sistema de clonagem, em todas as condições testadas, não pôde ser explicada satisfatoriamente (capítulo 4 desta tese).

Uma vez superada a fase de produção dos antígenos recombinantes, a produção de anticorpos contra a proteína recombinante foi realizada em camundongos da linhagem BALB/c. A escolha deste sistema para produzir anticorpos deveu-se à facilidade de manuseio no biotério disponível. O soro coletado dos animais inoculados apresentou alta reatividade contra a proteína recombinante em testes de Western blot, entretanto, apresentaram alta reatividade cruzada. A resposta imune cruzada entre as diferentes subunidades do AgB não foi uma surpresa, pois este fato já havia sido observado inúmeras vezes (Rott *et al*, 2000, Monteiro *et al*, 2008). O que nos deixou bastante entusiasmados foi o fato de algumas subunidades apresentarem algum grau de especificidade, como é o caso do soro contra recAgB3 e recAgB4. A purificação dos anticorpos por coluna de afinidade pode ser utilizada como um passo adicional para purificar os anticorpos de modo a obter-se uma reatividade ainda mais específica (Mamuti *et al*, 2006b).

Como alternativa à purificação por coluna de afinidade, a qual exigiria maiores quantidades de material, decidiu-se sintetizar oligopeptídeos que fossem representativos de cada subunidade da proteína. A escolha dos oligopeptídeos imunogênicos foi conduzida através de simulações de bioinformática, procurando as regiões das proteínas que fossem específicas de cada subunidade e que mesmo assim fossem imunogênicas, além de estarem presumivelmente localizadas na superfície da proteína nativa. A síntese de oligopeptídeos derivados de epítomos de proteínas tem sido utilizada para gerar respostas imunes específicas contra proteínas membros de famílias

multigênicas. Ikeuchi *et al* (1995) obtiveram anticorpos específicos contra a subunidade β de duas gonadotrofinas de salmão, GTH I e GTH II, através da inoculação de coelhos com oligopeptídeos sintéticos de 17 e 12 aminoácidos, respectivamente. Embora a forma nativa de cada uma destas gonadotrofinas seja composta por várias subunidades, os anticorpos desenvolvidos pela inoculação dos peptídeos sintéticos foram específicos contra a subunidade β utilizada para desenhar os oligopeptídeos. Os anticorpos obtidos puderam ser utilizados para evidenciar as diferentes localizações teciduais das gonadotrofinas analisadas (Ikeuchi *et al* 1995). Por outro lado, anticorpos desenvolvidos contra oligopeptídeos sintéticos podem apresentar baixa reatividade contra a proteína íntegra da qual o peptídeo é derivado, pois a conformação atingida pelo oligopeptídeo na interação com as células do sistema imune pode ser diferente daquela apresentada pela oligopeptídeo quando presente na proteína (Regenmortel, 2001) ou a imunoreatividade do oligopeptídeo pode ser muito fraca para elucidar resposta imune detectável.

Em nossas análises, a resposta imune contra a maioria dos oligopeptídeos testados não foi suficientemente forte para detectarmos anticorpos contra a proteína recombinante. Apenas o oligopeptídeo desenhado contra a subunidade AgB2 (oliAgB2) apresentou níveis de anticorpos detectáveis em Western blot. Possivelmente, a linhagem de camundongos utilizada para realizar estas inoculações contribuiu para isto, pois os camundongos da linhagem BALB/c utilizados para as imunizações não são bons modelos para produzir anticorpos contra epítomos lineares (Su e Caldwell, 1993). Além disso, o adjuvante utilizado nos experimentos pode não ter sido adequado para produzir níveis de anticorpos detectáveis (Holland *et al*, 2000). Pelo fato de a linhagem de camundongos utilizada para as inoculações, BALB/c, muitas vezes não reagir adequadamente contra epítomos lineares (Su e Caldwell, 1993), conduzimos inoculações adicionais dos mesmos antígenos em camundongos de outra linhagem, C57 BL/6, a qual apresenta um background genético diferente de BALB/c (Thor e Brian, 1992). Este soro foi coletado para posterior análise.

3. Instabilidade genômica e geração de diversidade

A variabilidade no número de cópias dos genes do AgB entre cistos de *Echinococcus* já havia sido investigada anteriormente e, embora não tenha sido possível inferir diretamente o mecanismo responsável pela heterogeneidade observada, sugeriu-se que rearranjos genômicos poderiam estar envolvidos (Haag *et al*, 2006a). Os nossos resultados de Southern blot mostraram que a organização dos genes do AgB varia não somente entre as espécies *E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi*, mas que existem rearranjos importantes dentro de uma mesma espécie, principalmente em relação aos loci *AgB3* em *E. ortleppi*. A presença de múltiplas bandas nas hibridizações com diferentes sondas permitiu-nos inferir que a espécie *E. granulosus sensu stricto* possui pelo menos nove loci de genes do AgB, enquanto a espécie *E. ortleppi* apresentou pelo menos dez loci. Interessantemente, o loci gênico mais heterogêneo em nossos experimentos de Southern blot foi *AgB3*, o mesmo loci mais variável nas quantificações do número de cópias entre diferentes cistos, variando de 7 a 117 cópias (Haag *et al*, 2006a).

O número de loci gênicos do AgB tem sido analisado em vários estudos, e consistentemente novos loci tem sido adicionados a esta família gênica. Após a descoberta dos dois primeiros genes através da caracterização de seqüências genômicas e de cDNA (Frosch *et al*, 1994, Fernandez *et al*, 1996), estudos utilizando Southern blot indicavam que a família gênica seria composta por mais loci. Chemale *et al* (2001) indicaram a presença de três loci, posteriormente Haag *et al* (2004) inferiram a presença de pelo menos sete loci, e agora encontramos indícios de nove loci em *E. granulosus sensu stricto* e dez em *E. ortleppi*. Entretanto, este número ainda não é definitivo, pois a técnica de Southern blot apresenta algumas limitações, como baixa sensibilidade contra seqüências menos similares e incapacidade de revelar loci arranjados em tandem.

Embora a família gênica do AgB seja composta por um número ainda indefinido de genes, tem sido proposto que as seqüências gênicas descritas em *E. granulosus sensu lato* podem ser agrupadas em cinco grupos distintos, caracterizando cinco subfamílias de acordo com sua similaridade, subfamílias

AgB1-5 (Zhang *et al*, 2010). A presença, em nossos experimentos de Southern blot, de múltiplas bandas para uma única sonda confirma que existem várias seqüências dentro de uma mesma subfamília, por exemplo, utilizando a sonda *AgB3* (que também hibridiza com *AgB1*) encontramos cinco bandas de hibridização e com a sonda *AgB5* encontramos duas. No mesmo sentido, análises do genoma de *E. multilocularis*, revelaram sete cópias de genes da família AgB, que puderam ser agrupados nas cinco categorias descritas em *E. granulosus sensu lato*, sendo que a subfamília *AgB3* apresentou três loci e a subfamília *AgB2* apresentou um pseudogene (Brehm, 2010).

Em uma busca mais detalhada por seqüências relacionadas ao AgB no genoma de *E. multilocularis*, encontramos um gene adicional, *EmAgB6*, o qual encontra-se em uma região duplicada do genoma de aproximadamente 30 Mbp. Embora as bibliotecas de EST (*Expression Sequence Tags*) de vários tecidos de *E. granulosus sensu stricto* não tenham revelado seqüências homólogas a *EmAgB6*, não podemos descartar que esta espécie também possua este gene, e uma análise direta do genoma deste organismo, utilizando primers desenhados para este fim, poderiam responder a esta questão. No genoma de *E. multilocularis* também foram encontradas muitas seqüências degeneradas com similaridades variadas. Tais seqüências são relacionadas aos genes da família AgB. Estas seqüências podem representar vestígios de duplicações gênicas e ainda podem ser uma importante causa de recombinação não específica que poderia estar envolvida na geração de variabilidade, tanto no número de cópias quanto nas seqüências gênicas.

Um resultado surpreendente desta tese é a demonstração de variação entre os protoescóceles de cistos de *E. granulosus sensu stricto* em relação ao número de cópias dos genes do AgB. A ocorrência de especializações teciduais em um organismo (caracterizadas por expressão gênica diferencial, alterações epigenéticas específicas ou mesmo pequenas variações em conteúdo genético) não é nenhuma novidade. Do mesmo modo, foi demonstrado que cistos de *Echinococcus* apresentaram especializações regionais, com ocorrência de regiões ativas e inativas quanto à síntese de proteínas e à proliferação celular (Galindo *et al*, 2003). Nossos resultados

estendem a magnitude das diferenças internas de um cisto hidático, por demonstrarem a grande variação existente entre protoescoléces (superior a 20 vezes) no número de cópias de genes do AgB. Como os protoescoléces originam-se por brotações da parede do cisto e são, em última análise, clones (Thompson, 1995), as diferenças encontradas entre os protoescoléces quanto ao número de cópias dos genes do AgB indicam que cada protoescoléx possui características distintas podendo ser considerado uma entidade singular

Ainda que não tenhamos investigado diretamente os mecanismos responsáveis pela variabilidade observada no número de cópias dos genes do AgB, a extensa variação observada entre os protoescoléces de um mesmo cisto leva-nos a supor que o mecanismo responsável pela amplificação gênica não gera amplificações estáveis, isto é, a amplificação do número de cópias não se mantém com as divisões celulares (Stark, 1984), podendo ser considerada um evento de instabilidade genômica. Isto explicaria por que em um mesmo cisto encontramos protoescoléces com número de cópias dos genes do AgB aumentados em diferentes magnitudes.

Embora muitos estudos considerem cada cisto hidático como um isolado, isto é, um indivíduo (*e.g.* Kamenetzky *et al*, 2002, Badaraco *et al*, 2008, Almeida *et al*, 2006), o fato de existir uma grande variação no número de cópias dos genes do AgB entre diferentes protoescoléces no interior de um cisto (capítulo 3 desta tese), somado às diferenças entre as seqüências genéticas do AgB observada entre protoescoléces (Haag *et al*, 2004), leva-nos a enfatizar que o protoescoléx pode ser considerado um indivíduo *per se*, com uma história evolutiva que começa antes de ser ingerido pelo hospedeiro definitivo, na competição com outros protoescoléces ainda no interior do cisto.

As características apresentadas pela proteína *in vitro* levam-nos a sugerir que ela exerce funções importantes para a vida do parasito, seja por interagir com moléculas do sistema imune do hospedeiro (Riganò *et al*, 2001), seja por adsorver metabólitos lipídicos (Chemale *et al*, 2005). Neste contexto, a variação encontrada no número de cópias dos genes do AgB poderia representar um mecanismo adicional do parasito para controlar a expressão gênica frente a desafios impostos pelo hospedeiro. As tentativas de verificar a

influência do número de cópias dos genes do AgB com o nível de expressão gênica em cistos hidáticos não revelou correlação direta (Haag *et al*, dados não publicados). Devido ao fato de o cisto hidático se mostrar uma entidade extremamente heterogênea em relação aos genes do AgB, a comprovação da influência do número de cópias dos genes do AgB sobre a expressão dos mesmos deveria ser feita em protoescóleces individuais. Além disso, assumindo que a variação observada no número de cópias em nossos resultados seja uma resposta a um desafio imposto pelo hospedeiro, deveríamos supor que parasitos enfrentando hospedeiros intermediários com resposta imune mais ativa apresentem maiores alterações no número de cópia dos genes do AgB do que parasitos enfrentando hospedeiros intermediários debilitados.

4. Diversidade genética do verme adulto e especiação em *Echinococcus*

Embora se tenha imaginado um importante papel para o AgB durante a fase larval de *Echinococcus* (Riganò *et al*, 2001, Chemale *et al*, 2005, Siracusano *et al*, 2008), estudos têm demonstraram que alguns genes do AgB também são expressos durante a fase adulta (Mamuti *et al*, 2007, Zhang *et al*, 2010), devendo ter alguma importância também nesta fase. Desta maneira, tornou-se interessante analisar se a variabilidade genética nas seqüências do AgB, a qual foi encontrada no estágio larval, também estaria presente no estágio adulto.

A análise das seqüências gênicas do AgB obtidas de um indivíduo de verme adulto de *Echinococcus* revelou que a diversidade de seqüências na fase adulta é menor do que na fase larval, embora ela não seja negligenciável. O verme adulto é o resultado do desenvolvimento de um único protoescólex após este ser ingerido pelo hospedeiro definitivo. Como a diversidade de seqüências observada anteriormente dentro de um único metacestóide não está distribuída igualmente entre todos os protoescóleces do cisto. (Haag *et al*, 2004), é razoável pensar que a diversidade de seqüências total observada no

cisto hidático fique diluída entre os vermes adultos. Estes resultados confirmam que as variações de seqüências observadas dentro de cistos hidáticos surgem durante o desenvolvimento do metacestóide, possivelmente por mutações somáticas, e que são reduzidas no estágio adulto.

Quando da escolha do material biológico para a análise, procuramos por um verme representante da espécie *Echinococcus granulosus sensu stricto*, para isto utilizamos como critério de classificação o seqüenciamento parcial do gene mitocondrial *Cox1*. Este critério tem sido utilizado tradicionalmente para determinar a espécie de vermes do gênero *Echinococcus* (Bowles *et al*, 1992, Bowles *et al* 1995, Haag *et al*, 1998, Kamenetzky *et al*, 2002, Badaraco *et al*, 2008), sendo, portanto, um critério taxonômico bem estabelecido (Saarma *et al*, 2009). Entretanto, a análise qualitativa de todas as seqüências obtidas neste estudo apresentou uma incongruência importante: embora as seqüências dos genes *AgB1*, *AgB3,4* e *5* sejam características de *E. granulosus sensu stricto*, as seqüências de *AgB2* e *MDH* são características de *E. ortleppi*. Desta maneira, este indivíduo pode representar o primeiro caso de hibridação envolvendo duas espécies de *Echinococcus* observado no estágio adulto.

O processo de especiação em *E. granulosus sensu lato* tem sido discutido e existem duas teorias aparentemente conflitantes para explicar o grande número de linhagens observado. Devido a deficiências de heterozigotos observada em várias populações de *E. granulosus sensu lato*, Smyth e Smyth (1964) assumem que a autofecundação é a forma preferencial de reprodução em *Echinococcus*, e desta maneira o isolamento reprodutivo leva à formação de linhagens, que diferenciam-se gradativamente e se transformam em entidades cada vez mais distantes, até poderem ser consideradas espécies distintas. No outro extremo, Rausch (1986) afirma que *E. granulosus sensu lato* apresenta níveis consideráveis de reprodução cruzada e que, portanto, a grande radiação evolutiva observada dentro do clado não pode ser explicada apenas pelo isolamento e autofecundação, mas principalmente por adaptações ao hospedeiro intermediário mediadas por seleção natural.

Recentemente, Haag *et al* (2010) analisaram a forma de reprodução de *E. granulosus sensu lato* no sul do Brasil e não encontraram deficiência

significativa de heterozigotos, reforçando a hipótese de que a reprodução cruzada é freqüente neste parasito. A análise do indivíduo adulto em nosso trabalho revelou que o verme analisado possuía seqüências de duas espécies distintas do clado *E. granulosus sensu lato*, e que, portanto, pode representar um caso de hibridação. Evidências de introgressão de seqüências *entre E. granulosus sensu stricto* e *E. ortleppi* já haviam sido reportadas (Badaraco *et al*, 2008), mas esta é a primeira vez no estágio adulto. O fato de um verme adulto, aparentemente híbrido, ser encontrado sugere que o cisto do qual este verme se originou também era híbrido e era capaz de produzir protoescoléces viáveis. O possível evento de hibridação, portanto, deve ter ocorrido pelo menos na geração adulta anterior, formando ovos viáveis que se desenvolveram em cistos férteis os quais, por sua vez, puderam se transformar novamente em um verme adulto.

As hipóteses de Smyth e Smyth (19964) e de Rausch (1986) não são mutuamente excludentes (Haag *et al*, 2010), de modo que as duas formas de reprodução são importantes em *Echinococcus* e desempenham papéis mais ou menos importantes, dependendo das condições da população analisada. Durante a evolução de *E. granulosus sensu lato*, houve a formação de várias linhagens evolutivas que, devido à baixa vagilidade dos seus hospedeiros, se mantiveram relativamente isoladas em seus ciclos. Em tempos modernos, com o comércio intenso de animais, os parasitos foram levados para viver em novas regiões geográficas, onde puderam encontrar outras linhagens das quais estavam se diferenciando (Kamenetzky *et al*, 2002). Como a especiação é um processo contínuo, muitas vezes, a existência de similaridades genéticas entre espécies incipientes pode permitir que elas troquem material genético e, desta maneira, formem híbridos.

5. Perspectivas

Os resultados do presente trabalho abrem novos horizontes para a compreensão da biologia de *Echinococcus*, principalmente sobre a diversidade interna do cisto hidático e o isolamento reprodutivo entre as espécies *E.*

granulosus sensu stricto e *E. ortleppi*. Dentre os possíveis desdobramentos a partir desta tese podemos citar:

i) Confirmar por outros métodos, como hibridização *in situ*, a heterogeneidade nas cópias gênicas do AgB entre protoescoléces de um mesmo cisto hidático;

ii) Verificar a extensão da variabilidade do número de cópias em outros genes dentro do cisto de *Echinococcus*;

iii) Verificar se as variações encontradas no número de cópias do AgB dentro de cistos hidáticos se mantêm em outras fase do parasito, como por exemplo, em adultos provenientes de uma mesma infrapopulação;

iv) Estender a análise do isolamento reprodutivo entre as duas espécies de *Echinococcus* estudadas, com a análise de mais indivíduos de vermes adultos;

v) Realizar experimentos de co-infecção de cães com protoescoléces das duas espécies e verificar se é possível encontrar híbridos na infrapopulação de vermes adultos resultante;

vi) Dar continuidade aos trabalhos de produção e purificação dos anticorpos contra as diferentes subunidades do AgB e localizar a proteína nos tecidos do parasito, especialmente na fase adulta.

Bibliografia Geral

Aguilera A e Gómez-González B. (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet.* 9:204-217.

Almeida FB, Rodrigues-Silva R, Neves RH, Romani EL, Machado-Silva JR. (2006) Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* in livestock from Peru. *Vet Parasitol.* 143:50-58.

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.

Badaraco JL, Ayala FJ, Bart JM, Gottstein B e Haag KL. (2008) Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. *Exp Parasitol.* 119:453-459.

Bayne CJ e Grevelding CG (2003) Cloning of *Schistosoma mansoni* sporocysts in vitro and detection of genetic heterogeneity among individuals within clones. *J Parasitol* 89: 1056-1060.

Bétermier M. (2004) Large-scale genome remodelling by the developmentally programmed elimination of germ line sequences in the ciliate *Paramecium*. *Res Microbiol.* 155:399-408.

Beverley SM (1991) Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 45: 417-444

Bonnivard E e Higuete D (2009) Fluidity of eukaryotic genomes. *C R Biol* 332: 234-240.

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

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.

Brehm K. (2010) *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitol.* 137:537-555.

Brown DD e Dawid IB. (1968). Specific gene amplification in oocytes. Oocyte nuclei contain extrachromosomal replicas of the genes for ribosomal RNA. *Science.* 160:272-280.

Budke CM, Deplazes P e Torgerson PR. (2006) Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis.* 12:296-303.

Cézilly F, Thomas F, Médoc V e Perrot-Minnot MJ. (2010) Host-manipulation by parasites with complex life cycles: adaptive or not? *Trends Parasitol.* 26:311-317.

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.

Chen XH, Wen H, Lu XM, Zhang JH, Lin RY e Zheng SS (2005) Expression, purification and identification of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 23:296-299.

Claycomb JM e Orr-Weaver TL (2005) Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression. *Trends Genet* 21: 149-162.

Cobey S e Koelle K. (2008) Capturing escape in infectious disease dynamics. *Trends Ecol Evol.* 23:572-577.

Correale J e Farez M. (2007) Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 61:97-108.

Cox FEG. (1996) *Modern Parasitology: a textbook of parasitology*. Ed: Blackwell Science. Massachusetts USA.

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.

Davis SJ e Vierstra RD (1998) Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol.* 36:521-528.

Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Wälz M, Zeyhle E, Elmahdic IE, Mackenstedt U e Romig T. (2004). A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int J Parasitol.* 34: 645–653.

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

Dreyer WJ e Bennett JC (1965) The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54: 864-869

D'Suze G, Moncada S, Gonzalez C; Sevcik C e Alagn A. (2007) Antigenic cross-reactivity between sixteen venoms from scorpions belonging to six genera. *Clin Toxicol.* 45:158-163.

Farias LN, Malgor R, Cassaravilla C, Bragança C e de la Rue ML. (2004) Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 46:153-156.

Fernandez 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.

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

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

Galindo M, Paredes R, Marchant C, Miño V e Galanti N. (2003) Regionalization of DNA and protein synthesis in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*. J Cell Biochem. 2003 90:294-303

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 e Hemphill A. (1997) Immunopathology of echinococcosis. Chem Immunol. 66:177-208.

Gottstein B, Dai WJ, Walker M, Stettler M, Müller N e Hemphill A. (2002) An intact laminated layer is important for the establishment of secondary *Echinococcus multilocularis* infection. Parasitol Res. 88:822-828.

Gottstein B, Haag K, Walker M, Matsumoto J, Mejri N e Hemphill A. (2006) Molecular survival strategies of *Echinococcus multilocularis* in the murine host. Parasitol Int. 55 :45-49.

Graichen DAS, Gottstein B, Matsumoto J, Müller N, Zanotto PMA, Ayala FJ e Haag KL. (2007) Expression and diversity of *Echinococcus multilocularis* AgB genes in secondarily infected mice: evaluating the influence of T-cell immune selection on antigenic variation. Gene. 392:98-105.

Graichen DAS, Muller N, Gottstein B e Haag KL. (2011) Genomic instability inferred by AgB number of copies. Submetido.

Grevelding CG (1999) Genomic instability in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 101: 207-216.

Grogan JL, Kremsner PG, Deelder AM e Yazdanbakhsh M. (1998) Antigen-specific proliferation and interferon-gamma and interleukin-5 production are down-regulated during *Schistosoma haematobium* infection. J Infect Dis. 177:1433-1437.

Gullemaud T, Makate N, Raymond M, Hirst B e Callaghan A (1997) Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. Insect Mol Biol 6: 319-327.

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, Araujo 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, Araujo AM, Gottstein B, Siles-Lucas M, Thompson RCA e Zaha A. (1999) Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? Parasitol. 118: 63–71.

Haag KL, Gottstein B e Ayala FJ. (2008) Taeniid history, natural selection and antigenic diversity: evolutionary theory meets helminthology. Trends Parasitol. 24:96-102.

Haag KL, Gottstein B, Muller N, Schnorr A e Ayala FJ (2006a) Redundancy and recombination in the *Echinococcus* AgB multigene family: is there any similarity with protozoan contingency genes? Parasitol. 133:411-419.

Haag KL, Marin PB, Graichen DA, e de la Rue ML.(2010) Reappraising the theme of breeding systems in *Echinococcus*: is outcrossing a rare phenomenon? Parasitol. 138:298-302.

Haag KL, Zanotto PM, Alves-Junior L, Gasser RB, Zaha A, *et al* (2006b) Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. Infect Genet Evol 6: 251-261.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. Nucl Acids 41: 95-98.

Harnett W. (2005) Parasite modulation of the immune response. Parasite Immunol. 27:357-359.

Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N e Ullman B. (1992) Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. Mol Cell Biol 12: 2855-2865.

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

Hewitson JP, Grainger JR e Maizels RM. (2009) Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. Mol Biochem Parasitol. 167:1-11.

Holland MJ, Harcus YM, Riches PL e Maizels RM. (2000) Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. Eur J Immunol. 30:1977-1987.

Hüttner M, Nakao M, Wassermann T, Siefert L, Boomker JD, Dinkel A, Sako Y, Mackenstedt U, Romig T e Ito A. (2008) Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. Int J Parasitol. 38:861-868.

Ikeuchi T, Mochida K, Ura K, Adachi S, Yamauchi K (1995) Specific antibodies against synthetic peptides of salmonid GTH I and II β subunits. *Zoolog Sci.* 12: 317-323.

Jahn CL e Klobutcher LA. (2002) Genome remodeling in ciliated protozoa.. *Annu Rev Microbiol.* 56:489-520.

Joly DO e Messier F. (2004) The distribution of *Echinococcus granulosus* in moose: evidence for parasite-induced vulnerability to predation by wolves? *Oecol.*140:586-590.

Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, García GE e Rosenzvit MC. (2002) Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol.* 2:129–136.

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*. *Parasitol.* 131:805-815.

Kolaskar AS e Tongaonkar PC. (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 276:172–174.

Lavikainen A, Haukisalme V, Lehtinen MJ, Henttonen H, Oksanen A e Meri S. (2008) A phylogeny of members of the family Taeniidae based on the mitochondrial cox1 and nad1 gene data. *Parasitology.* 135:1457-467.

Libersat F, Delago A e Gal R. (2009) Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites. *Annu Rev Entomol.* 54:189-207.

Librado P e Rozas J. (2009) DNAsp v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452

Lightowlers MW e Gottstein B. (1995) Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. In: Thompson RCA e

Limbery AJ. *Echinococcus* and Hydatid Disease. Wallingford, CAB International. 355-410.

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.

List C, Qi W, Maag E, Gottstein B, Müller N e Felger I. (2010) Serodiagnosis of *Echinococcus* spp. infection: explorative selection of diagnostic antigens by peptide microarray. PLoS Negl Trop Dis. 4:e771.

Little MP. (2010) Cancer models, genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. Biol Direct. 20:5-19.

Lymbery AJ, Constantine CC e Thompson RCA. (1997) Self-fertilization without genomic or population structuring in a parasitic tapeworm, Evolution. 51:289–294.

Lymbery AJ, Hobbs RP e Thompson RCA. (1989) The dispersion of *Echinococcus granulosus* in the intestine of dogs. J Parasitol. 75:562-570.

Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, Fried JA, Wilson M e Tsang VCW. (1989) A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 KDa. Am J Trop Med Hyg. 40:377-383.

Maizels RM (2005) Immunoglobulin gene diversification. Annu Rev Genet 39: 23-46.

Maizels RM e Yazdanbakhsh M (2003) Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nat Rev Immunol. 3:733-44.

Mamuti W, Sako Y, Bart JM, Nakao M, Ma X, Wen H e Ito A. (2007) Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of antigen B from *Echinococcus granulosus* genotypes 1 and 6. Parasitol Int. 56:313-316.

Mamuti W, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Ishikawa Y, Yamasaki H, Lightowlers MW e Ito A. (2006a) Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitol Int.* 55:57-62.

Mamuti W, Sako Y, Xiao N, Nakaya K, Nakao M, Yamasaki H, Lightowlers MW, Craig PS e Ito A. (2006b) *Echinococcus multilocularis*: developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. *Exp Parasitol.* 113:75-82.

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) 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 hidatid disease, CAB international, Wallingford, pp 135-182.

Metcalf CJ, Bulazel KV, Ferreri GC, Schroeder-Reiter E, Wanner G, Rens W, Oberfell C, Eldridge MD e O'Neill RJ. (2007) Genomic instability within centromeres of interspecific marsupial hybrids. *Genetics.* 177:2507-2517.

Ministério da Saúde do Brasil. (2006) Biosegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. 3. Ed. Brasília: 290 pp

Monni O, Bärlund M, Mousses S, Kononen , Sauter G, Heiskanen M, Paavola P, Avela K, Chen Y, Bittner ML e Kallioniemi A. (2001) Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5711-5716.

Monteiro KM, Scapin SM, Navarro MV, Zanchin NI, Cardoso MB, da Silveira NP, Goncalves PF, Stassen HK, Zaha A e Ferreira HB. (2007) Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim Biophys Acta.* 1774:278-285.

Monteiro KM, Zaha A e Ferreira HB. (2008) Recombinant subunits as tools for the structural and functional characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Exp Parasitol.* 119:490-498.

Moore J e Brooks DR. (1987) Asexual Reproduction in Cestodes (Cyclophyllidea: *Taeniidae*): Ecological and Phylogenetic Influences *Evolution* 41: 882-891

Moro PL e Schantz PM. (2006) Cystic echinococcosis in the Americas. *Parasitol Int.* 55:181-186.

Moro PL, McDonald J, Gilman RH, Silva B, Verastegui M, Malqui V, Lescano G, Falcon N, Montes G e Bazalar H. (1997) Epidemiology of *Echinococcus granulosus* infection in the central Peruvian Andes. *Bull World Health Organ.* 75:553-561.

Morris DL e Taylor DH (1990) *Echinococcus granulosus*: development of resistance to albendazole in an animal model. *J Helminthol* 64: 171-174.

Morrison LJ, Marcello L e McCulloch R. (2009) Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. *Cell Microbiol.* 11:1724-1734.

Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS e Ito A. (2007) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitol.* 134:713-722.

Nash TE. (2002) Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol.* 45:585-590.

Nicholas KB e Nicholas HBJ (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.

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, Pérez Esandi MV e Oriol C. (1971) Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. Am J Trop Med Hyg. 20:569-574.

Ortlepp RJ. (1937). South African Helminths, Part I. Onderstepoort J Vet Sci 9:11–366.

Paton MG, Karunaratne SH, Giakoumaki E, Roberts N e Hemingway J. (2000) Quantitative analysis of gene amplification in insecticide-resistant *Culex* mosquitoes. Biochem J. 346 17-24.

Penna TCV, Ishii M, Souza LC e Cholewa O. (1994) Expression of green fluorescent protein (GFPuv) in *Escherichia coli* DH5- α , under different growth conditions African J Biotech. 3:105-111.

Pichon G e Treuil JP. (2004) Genetic determinism of parasitic circadian periodicity and subperiodicity in human lymphatic filariasis. C R Biol. 327:1087-1094.

Preechapornkul P, Imwong M, Chotivanich K, Pongtavornpinyo W, Dondorp AM, Day NP, White NJ e Pukrittayakamee S. (2009) *Plasmodium falciparum* pfmdr1 amplification, mefloquine resistance, and parasite fitness. Antimicrob Agents Chemother 53: 41509-41515.

Quack T, Doenhoff M, Kunz W e Grevelding CG (1998) *Schistosoma mansoni*: the varying occurrence of repetitive elements in different strains shows sex-specific polymorphisms. Exp Parasitol 89: 222-227.

Rausch R.L (1986). Life-cycle patterns and distribution of *Echinococcus* species. In: Thompson RCA (ed) The Biology of *Echinococcus* and Hydatid Disease. George Allen & Unwin, London, UK. 44–80.

Regenmortel VMH. (2001) Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. Biologicals. 29:209-213.

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, De Falco E, Profumo E, Ortona E, Margutti P, Scottà C, Teggi A e Siracusano A. (2004) *Echinococcus granulosus*-specific T-cell lines derived from patients at various clinical stages of cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* 26:45-52.

Riganò R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Delunardo F, Margutti P, Mattei V, Teggi A, Sorice M e Siracusano A. (2007) *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun.* 75:1667-1678.

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.

Roneus O, Christenson D e Nilsson NG. (1982) The longevity of hydatid cyst in horses. *Vet parasitol* 11:149-154.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Rosenzvit MC, Canova SG, Kamenetzky L e Guarnera EA. (2001) *Echinococcus granulosus*: intraspecific genetic variation assessed by a DNA repetitive element. *Parasitol.* 123:381-388.

Rott MB, Fernández 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.

Saarma U, Jõgisalu I, Moks E, Varcasia A, Lavikainen A, Oksanen A, Simsek S, Andresiuk V, Denegri G, González LM, Ferrer E, Gárate T, Rinaldi L e Maravilla P. (2009) A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on

nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitol.* 136:317-328.

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..

Sambrook J e Russell DW. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanches F, March F, Mercader M, Coll P, Muñoz Z e Prats G (1991) Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoescólicas 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, 233-332.

Schantz PM. (1989) Echinococcosis/Hidatidosis (Hydatid disease). *In*: Goldsmyth R. e Heyneman D. *Tropical Medicine and Parasitology*. East Norwall, Appleton and Lange. Cap. 23:503-511.

Schimke RT (1984) Gene amplification, drug resistance, and cancer. *Cancer Res* 44: 1735-1742.

Schmid-Hempel P. (2008) Parasite immune evasion: a momentous molecular war. *Trends Ecol Evol.* 2008 23:318-326.

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.

Singh S, Soe S, Weisman S, Barnwell JW, Perignon JL e Druilhe P. (2009) A Conserved Multi-Gene Family Induces Cross-Reactive Antibodies Effective in Defense against *Plasmodium falciparum*. *PLoS one.* 4: e5410.

Siracusano A, Margutti P, Delunardo F, Profumo E, Riganò R, Buttari B, Teggi A e Ortona E. (2008) Molecular cross-talk in host-parasite relationships: the intriguing immunomodulatory role of *Echinococcus* antigen B in cystic echinococcosis. *Int J Parasitol.* 38:1371-1376.

Smyth JD e McManus DP (1989) The physiology and biochemistry of cestodes, 1st ed. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., p. 5–9.

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*. *Parasitol.* 54: 493-514.

Spradling AC. (1981) The organization and amplification of two chromosomal domains containing *Drosophila* chorion genes. *Cell.* 27:193-201.

Stark GR (1944) Gene amplification. *Ann Rev Biochem* 53:447-491.

Su H e Caldwell HD. (1993) Immunogenicity of a synthetic oligopeptide corresponding to antigenically common T-helper and B-cell neutralizing epitopes of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Vaccine.* 11:1159-1166.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, e Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).

Thevenet PS, Jensen O, Drut R, Cerrone GE, Grenovero MS, Alvarez HM, Targovnik HM e Basualdo JA. (2005) Viability and infectiousness of eggs of *Echinococcus granulosus* aged under natural conditions of inferior arid climate. *Vet Parasitol.* 133:71-77.

Thompson J.D., Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F e Higgins DG. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.

Thompson RC e Lymbery AJ. (1988) The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol.* 27:209-258.

Thompson RCA e McManus DP. (2001) Aetiology: parasites and life-cycles. In: WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. OIE/WHO. Paris, cap. 1

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

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.

Thor G. e Brian AA (1992) Glycosylation variants of murine interleukin-4: evidence for different functional properties, *Immunol* 75:143–149

Torgerson PR e Budke CM. (2003) Echinococcosis--an international public health challenge. *Res Vet Sci.* 74:191-202.

Torgerson PR, Ziadinov I, Aknazarov D, Nurgaziev R e Deplazes P. (2009) Modelling the age variation of larval protoscoleces of *Echinococcus granulosus* in sheep. *Int J Parasitol.* 39:1031-1035.

Trouvé S, Morand S e Gabrion C. (2003) Asexual multiplication of larval parasitic worms: a predictor of adult life-history traits in Taeniidae? *Parasitol Res.* 89:81-88.

Ubeda JM, Légaré D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Tremblay MJ, Olivier M, Papadopoulou B e Ouellette M. (2008) Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol* 9: R115.

Varshavsky A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:12142-12149.

Virginio VG, Taroco L, Ramos AL, Ferreira AM, Zaha A, Ferreira HB e Hernández A. (2007) Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitol Res.* 100:935-42.

Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. (2007) Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:6442-6447.

Wilson K, Berens RL, Sifri CD e Ullman B (1994) Amplification of the inosinate dehydrogenase gene in *Trypanosoma brucei gambiense* due to an increase in chromosome copy number. *J Biol Chem* 269: 28979-28987.

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.

Zaccone P, Burton OT e Cooke A. (2008) Interplay of parasite-driven immune responses and autoimmunity. *Trends Parasitol.* 24:35-42.

Zarlenga DS, Rhoads ML e al-Yaman FMA (1994) *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol* 67: 215-223.

Zhang W, Li J, Jones MK, Zhang Z, Zhao L, Blair D e McManus DP. (2010) The *Echinococcus granulosus* antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e784.

Zhang W, You H, Zhang Z, Turson G, Hasyet A e McManus DP. (2001) Further studies on an intermediate host murine model showing that a primary *Echinococcus granulosus* infection is protective against subsequent oncospherical challenge. *Parasitol Int* 50:279-283.

Zhao Y e Epstein RJ (2008) Programmed genetic instability: a tumor-permissive mechanism for maintaining the evolvability of higher species through

methylation-dependent mutation of DNA repair genes in the male germ line. *Mol Biol Evol* 25: 1737-1749.

Zysk G, Bethe G, Nau R, Koch D, Gräfin 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.