

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Genética
Programa Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

Caracterização do polimorfismo de *Echinococcus granulosus* em dois genes nucleares e um mitocondrial: evidências de introgressão

Jeferson L. Badaraco

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

Orientadora: Dra. Karen L. Haag

Porto Alegre, Abril de 2007.

Índice

Resumo	4
Abstract	6
Capítulo 1. Introdução	8
1.1. Seleção natural:	8
1.2. Gênero <i>Echinococcus</i>	9
1.3. O <i>Echinococcus granulosus</i>	11
1.4. Variação intraespecífica.....	14
1.5. O antígeno B.....	17
1.6. Variação antigênica	19
1.7. Populações de parasitas	23
1.8. Marcadores moleculares em <i>Echinococcus</i>	24
1.9. Objetivos.....	25
Capítulo 2. Manuscrito: Utilizando marcadores mitocondrial e nuclear para testar o isolamento reprodutivo entre linhagens de <i>Echinococcus granulosus</i>.....	28
<i>Resumo</i>	29
2.1. Introdução	30
2.2. Materiais e métodos	31
2.3. Resultados.....	34
2.4. Discussão.....	36
2.5. Agradecimentos	42

2.6.	<i>Referências</i>	43
2.7.	<i>Tabelas e Figuras</i>	47
Capítulo 3.	Resultados parciais sobre a diversidade do AgB4	53
3.1.	<i>Metodologia</i>	53
3.2.	<i>Resultados</i>	56
3.3.	<i>Perspectivas</i>	62
Capítulo 4.	Considerações Finais	64
	Referência Bibliográficas	66

Resumo

Nos parasitos do gênero *Echinococcus* observam-se grandes diferenças genéticas entre as espécies. Mais ainda, a espécie *E. granulosus* apresenta uma grande variação intraespecífica. Diversas variantes com características biológicas e epidemiológicas particulares, e adaptadas a hospedeiros intermediários diferentes, foram classificadas como linhagens. De fato, estas linhagens são muitas vezes tão divergentes geneticamente quanto as demais espécies do gênero. Isto tem gerado diversas discussões quanto seu *status* taxonômico. Os genes do antígeno B (AgB) de *Echinococcus* compõem uma família multigênica. A proteína secretada, um oligômero formado a partir de subunidades de 8 kDa, tem um papel importante no estabelecimento da infecção, modulando a resposta imune do hospedeiro. Estudos demonstraram que alguns genes desta família devem estar sob seleção positiva ou diversificadora. Inclusive, a quantidade de variantes encontradas é alta em um único parasito. Este trabalho analisa amostras de *E. granulosus* coletadas no Rio Grande do Sul e as compara a amostras de outras populações geográficas (Argentina, Argélia e Romênia) usando um marcador mitocondrial (*coxI*-391 pb) e duas seqüências nucleares. Uma delas corresponde a um fragmento que inclui majoritariamente o segundo íntron do gene de cópia única codificador da malato desidrogenase citosólica (*mdh* - 214 pb) e a outra trata-se da seqüência parcial do gene que codifica a subunidade 4 do AgB (AgB4 - 329-355 pb), incluindo aproximadamente 80 pb da região promotora do gene até em torno de 60 pb à montante do códon de parada da tradução. A análise do fragmento de *mdh* utilizou a técnica de PCR-SSCP, seguida de seqüenciamento, para discriminar os alelos das amostras de cada população, totalizando 259 indivíduos (isolados). Os achados confirmam a homogeneidade das populações geográficas de *E. granulosus* e a divergência dos parasitos das linhagens ovina e bovina (freqüentemente denominada *E.*

ortleppi). Apesar da divergência entre as linhagens, são encontrados em baixa frequência alelos característicos da linhagem bovina (haplótipo G5) em parasitos com haplótipo mitocondrial ovino (G1) e vice-versa. Tal situação poderia ser consequência do cruzamento entre parasitos destas linhagens quando em simpatria. A abordagem adotada na análise do gene AgB4 foi a amplificação por PCR seguida do seqüenciamento direto de 151 isolados. Os dados indicam a presença de mais de duas cópias do AgB4 no genoma, e que, dada a conservação na região codificante, seria provável que estes genes estejam evoluindo em concerto. Também encontramos alta divergência entre as seqüências dos isolados com haplótipos mitocondriais G1 (AgB4 tipo 1) e G5 (AgB4 tipo 2). A divergência é tão grande que acreditamos que na linhagem bovina o gene AgB4 tenha recombinado com AgB2. Uma seqüência idêntica a nossa depositada no GeneBank foi previamente sugerida como sendo uma variante não-funcional do AgB2. Assim como no caso do *mdh* alguns parasitos com haplótipos mitocondriais G5 (linhagem bovina) apresentaram em baixa frequência seqüências de AgB4 do tipo 1 características da linhagem ovina. Este achado reforça a hipótese de fluxo gênico entre as linhagens de *E. granulosus*.

Abstract

In the parasites belonging to the genus *Echinococcus* large differences between species are observed. Furthermore, the *E. granulosus* species shows a high intraspecific variability. Different variants with particular biologic and epidemiologic features, adapted to distinct intermediate hosts, were classified as strains. Indeed, the strains are frequently as genetically divergent as the other species within the genus. This has generated several discussions about their taxonomic status. The *Echinococcus* antigen B (AgB) genes belong to a multigene family. The secreted protein, an oligomer built by subunits of 8kDa, has an important role in the infection establishment, modulating the host immune response. Studies have demonstrated that some genes in this family might be under positive or diversifying selection. Moreover, the quantity of variants found is high, even in a single parasite. This study analyzes samples of *E. granulosus* collected in Rio Grande do Sul, and compares them to samples from other geographic regions (Argentina, Algeria and Romania) using a mitochondrial marker (*cox1* – 391bp) and two nuclear sequences. One corresponds to a fragment including mostly the second intron of the cytosolic malate dehydrogenase single copy gene (*mdh* – 214bp) and the other is a partial gene sequence encoding the fourth subunit of AgB (AgB4 – 329-355bp), which includes approximately 80bp of the promoter region until around 60bp upstream to the stop codon. The analysis of the *mdh* fragment was based on the PCR-SSCP technique, followed by sequencing, to discriminate among alleles within samples of each population, totalizing 259 individuals (isolates). Our findings confirm the homogeneity within *E. granulosus* geographic populations and a high divergence between parasites from the ovine and bovine (frequently named *E. ortleppi*) strains. Despite the divergence between strains, bovine strain (haplotype G5) characteristic alleles are found in low frequency in parasites with the ovine mitochondrial haplotype

(G1) and vice-versa. This situation could be a consequence of interbreeding between parasites from the different strains, when in sympatry. The approach used for the AgB4 gene analysis was the PCR amplification followed by direct sequencing of 151 isolates. The data indicate the presence of more than two AgB4 gene copies inside the genome; and that, considering the conservation of the coding region, it would be probable that these genes are evolving in concert. We also found a high divergence in AgB4 sequences between isolates with haplotypes G1 (AgB4 type 1) and G5 (AgB4 type 2). The divergence is so large, that we believe that in the bovine strain the AgB4 gene might have recombined with AgB2. As well as for the *mdh* gene, some parasites with the G5 mitochondrial haplotype (bovine strain) showed in low frequencies AgB4 type 1 sequences, characteristic of the ovine strain. This finding reinforces the hypothesis of gene flow between strains of *E. granulosus*.

Capítulo 1. Introdução

1.1. Seleção natural:

A teoria selecionista considera que as mutações são constantemente removidas pela força purificadora da seleção direcional, e certa parte, pela deriva genética. A teoria balanceadora sugere que a própria seleção natural pode manter ou aumentar a variabilidade nas populações (seleção diversificadora ou positiva). Baseado nas primeiras seqüências de aminoácidos, e para explicar a diversidade dos padrões eletroforéticos de isoenzimas nas populações naturais, surgiu a teoria neutralista de evolução. Esta considera que a evolução se daria basicamente pela deriva genética. Porém, a teoria não deixa de reconhecer a existência de seleção purificadora e raros casos de seleção diversificadora (Lewontin, 1974).

Com as informações das seqüências de DNA, o neutralismo se fortaleceu. Verificou-se que o número de substituições sinônimas é muito maior que as não-sinônimas para a maioria dos genes. Ainda, permitiu a identificação de um “relógio molecular” onde as seqüências possuem taxas de substituição constantes ao longo do tempo (Kimura, 1991). Com o acúmulo de dados provenientes do seqüenciamento de DNA, foi proposta a teoria quase neutra. Neste caso, as mutações selecionadas fracamente se “comportariam” diferentemente, sendo influenciadas em populações pequenas pela deriva genética, e em populações grandes pela seleção natural, o que se confunde muito com a visão selecionista. Ainda, de acordo com a teoria quase neutra, a seleção “darwiniana” positiva seria necessária para que os genes adquirissem novas funções (Ohta, 1996).

1.2. O Gênero *Echinococcus*

O gênero *Echinococcus*, descrito por Rudolphi em 1801, pertence ao Filo Platyhelminthes, Classe Cestoda, subclasse Eucestoda, Família Taeniidae. Como os demais membros do Filo, são animais triploblásticos, acelomados, achatados dorsoventralmente, com simetria bilateral e sem sistema digestivo desenvolvido. A família reúne endoparasitos obrigatórios, com ciclo de vida indireto. Na fase adulta infectam o intestino de vertebrados (Thompson, 1995).

Existem, no mínimo, cinco espécies descritas para o gênero *Echinococcus*: *E. oligarthrus*, *E. vogeli*, *E. multilocularis*, *E. granulosus* e o recentemente encontrado *E. shiquicus* (Xiao *et al.*, 2006). As espécies *E. oligarthrus* e *E. vogeli* são encontradas exclusivamente na América do Sul; a primeira utiliza um grande número de felinos como hospedeiros definitivos e a segunda é restrita a um canídeo selvagem, popularmente conhecido como cachorro do mato. O ancestral destas espécies teria chegado ao continente sul-americano junto com a migração dos hospedeiros após a formação do estreito do Panamá no Pleistoceno recente. Duas hipóteses filogeográficas são propostas para a especiação no gênero *Echinococcus*. Atualmente, a maioria das espécies de *Echinococcus* usa canídeos como hospedeiros definitivos. Se esta é a característica ancestral, a provável origem da espécie deve ser a América do Norte, onde surgiu o hospedeiro. Por outro lado, se o hospedeiro ancestral foi um felino, o qual surgiu na Ásia, o ancestral do *Echinococcus* deve ter migrado para a América, Europa e África junto com seus hospedeiros (Nakao *et al.*, 2006).

A taxonomia de *Echinococcus* ainda é muito controversa. Quando seu ciclo biológico foi evidenciado em 1852 por von Siebold, acreditava-se existir duas formas da espécie *E. veterinorum*, uma de humanos (*altricipariens*) e outra de animais

(*scolicipariens*) (Gemmell, 1990). Novos ciclos, envolvendo outros hospedeiros, começaram a ser descritos e, conseqüentemente, o número de novas espécies aumentou. Na segunda metade do século passado uma revisão taxonômica agrupou as espécies do gênero em apenas quatro, *E. oligarthrus*, *E. vogeli*, *E. multilocularis* e *E. granulosus*. As características principais de cada espécie, segundo Schantz *et al.* (1995) são:

- *E. oligarthrus*: na fase adulta parasita um felídeo selvagem e na fase larval, roedores selvagens. Está distribuída na América Central e América do Sul.
- *E. vogeli*: na fase adulta parasita um canídeo selvagem e na fase larval, roedores selvagens. Está distribuída na América Central e América do Sul.
- *E. multilocularis*: no ciclo de vida selvagem, o principal hospedeiro carnívoro é a raposa vermelha, e infecta pequenos roedores na fase larval. Distribui-se por todo o hemisfério Norte.
- *E. granulosus*: seu ciclo principal envolve o cão doméstico e ovelhas, porém, pode parasitar uma série de espécies de animais domésticos (porco, cavalo, camelo, cabras e bovinos) e selvagens (cervídeos), além de humanos. É cosmopolita e muito ligado às práticas de produção animal.

A dificuldade maior na taxonomia do gênero está em tentar definir as espécies segundo o conceito tradicional de espécies biológicas, baseado no potencial de intercruzamento. Este problema se repete em diversos parasitas capazes de realizar autofecundação. Um método alternativo para a definição de espécies nestes casos seria a utilização de um critério cladístico, o da monofilia recíproca, para determinar populações historicamente coesas, e a diferenciação genética na designação das espécies (Lymbery, 1992).

1.3. O *Echinococcus granulosus*

As espécies do gênero *Echinococcus* são morfologicamente semelhantes na fase adulta, e infectam o intestino de carnívoros. No ciclo do *E. granulosus* (Figura 1), o cão doméstico é parasitado pelo verme adulto, uma pequena tênia com cerca de 2-4mm (Figura 2), que raramente causa morbidade. Os ovos são disseminados no ambiente pelas fezes, e ingeridos por herbívoros domésticos (ovinos e bovinos) ou selvagens (diversos macrópodos).

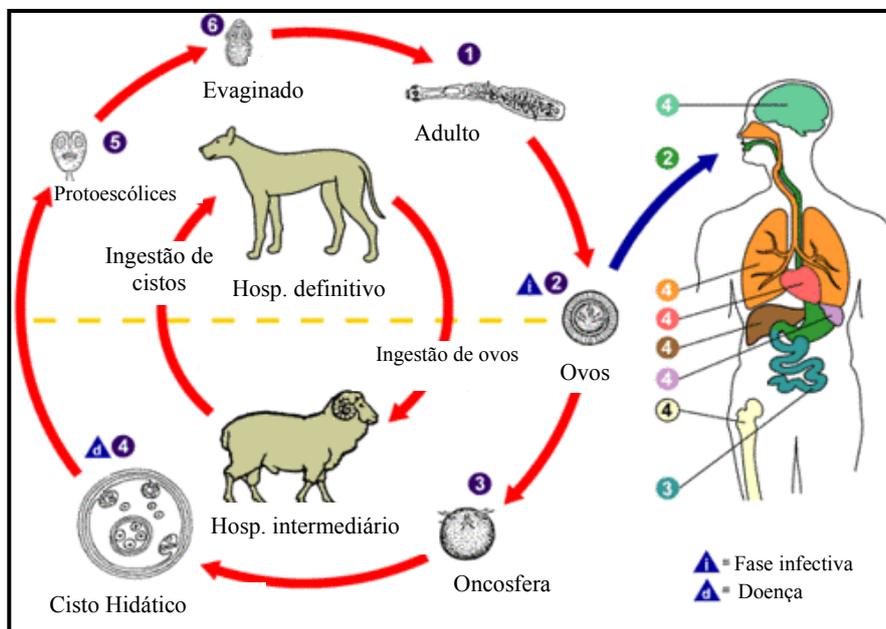


Figura 1: Ciclo de vida do *Echinococcus granulosus*: 1) o verme adulto no intestino de carnívoros; 2) os ovos são liberados no ambiente; 3) os ovos ingeridos liberam as oncosferas que atingem o fígado; 4) desenvolvimento da metacestóide, formação do cisto hidático, proliferação clonal do parasito, formação dos protoescolices; 5) ingestão dos cistos hidático com protoescolices, pelo carnívoro; 6) evaginação no trato digestivo do carnívoro, início da estrobilação e fixação no intestino delgado (modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Echinococcosis.asp>)

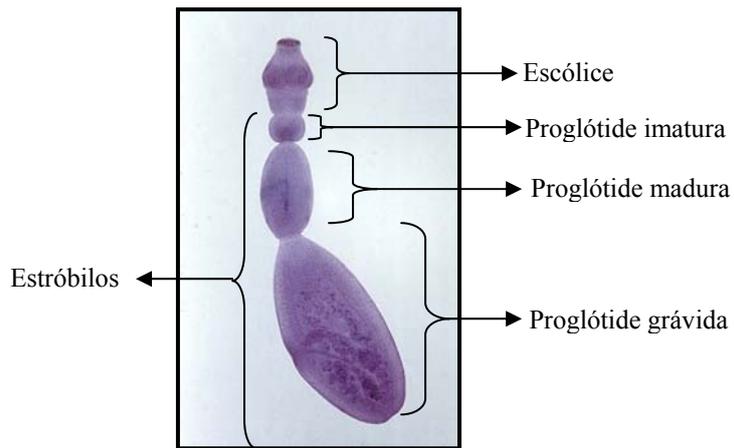


Figura 2: Verme adulto de *Echinococcus*, evidenciando o escólice e os estróbilos com suas proglótides em diferentes estágios de desenvolvimento (modificado de <http://www.k-state.edu/parasitology/625tutorials/Tapeworm03.html>).

Nestes hospedeiros a larva oncosfera chega a órgãos como o fígado e os pulmões desenvolvendo o cisto hidático. Os cistos hidáticos são compostos por uma camada acelular e elástica (camada laminar), que envolve a camada germinativa. Esta é um sincício celular, com composição semelhante ao tegumento do adulto, e suas células indiferenciadas são responsáveis pela proliferação assexual do parasito, dando origem aos protoescólices. Cada protoescólice tem a capacidade de desenvolver um novo adulto. O líquido hidático preenche o lúmen do cisto, e é uma mistura de proteínas do parasito além de sais e proteínas do hospedeiro que mantêm os protoescólices. A camada adventícia envolve mais externamente o cisto, e é composta por fibroblastos e tecido conjuntivo do hospedeiro (Figura 3).

A manifestação clínica da fase larval de *Echinococcus granulosus* é chamada de hidatidose cística, e causa muitos danos aos hospedeiros intermediários, tendo impacto direto em rebanhos de animais domésticos. Por se tratar de uma zoonose, isto é, o homem pode ser infectado e desenvolver a doença, é de importância para a saúde pública (Schantz *et al.*, 1995; Torgerson e Heath, 2003). É interessante notar que no

meio doméstico o ciclo é mantido pela prática de alimentar os cães com as vísceras infectadas de animais abatidos nas propriedades rurais.

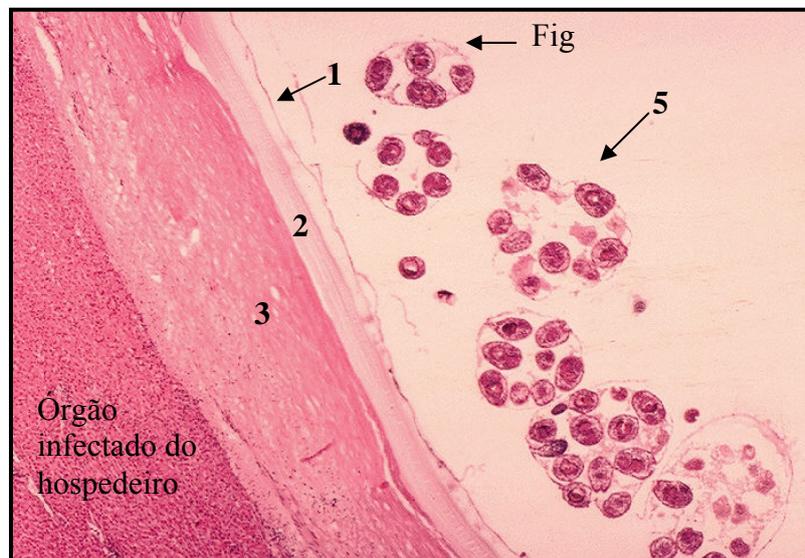


Figura 3: Corte histológico de um cisto hidático de *E. granulosus*: 1) camada germinativa; 2) camada laminar (acelular); 3) camada adventícia (tecido conjuntivo e fibroblastos); 4) cápsulas prolíferas originando os protoescólices a partir das células indiferenciadas da camada germinativa; 5) protoescólice (modificado de http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/03051999/00016/09G0016_lores.jpg).

E. granulosus é cosmopolita, e tem alta prevalência em regiões da África, Ásia, Europa, e América do Sul (Budke, 2006). No Rio Grande do Sul se tem registro de que a pecuária iniciou ainda no século XVI e, provavelmente, com ela chegou o parasito. Kloetzel e Pereira (1992) calcularam a prevalência de hidatidose cística em humanos em 24 municípios da região da campanha do Rio Grande do Sul é de 55 casos por 10.000 habitantes. Dados de 2003 da Secretaria da Agricultura do Estado estimam que a hidatidose contribua com cerca de 40% das principais zoonoses controladas nos rebanhos de bovinos (tuberculose, cisticercose, facioloze e hidatidose).

Medidas sanitárias objetivando o controle da hidatidose cística são menos efetivas em locais onde existe o ciclo selvagem (Gemmell, 1990). O desenvolvimento

de vacinas para os hospedeiros intermediários tem sido alvo de diversas pesquisas. Gauci *et al.* (2005) utilizaram uma proteína recombinante expressa na oncosfera (EG95) para conseguir níveis de proteção satisfatórios em rebanhos de ovinos e caprinos. Contudo, os altos custos de produção impedem a aplicação em larga escala deste recurso. Um controle efetivo só será possível se associado a programas de vacinação com medidas sanitárias adequadas (Torgerson, 2006).

1.4. Variação intraespecífica

E. granulosus apresenta uma maior variação intra-específica quando comparado as demais espécies do gênero (McManus e Thompson, 2003). O termo linhagem foi usado para diferenciar grupos da mesma espécie que diferem em características biológicas de relevância epidemiológica tais como: tempo de desenvolvimento, especificidade ao hospedeiro intermediário, endemismo. As técnicas de análise de polimorfismo de DNA principalmente PCR-RFLP da região do DNA ribossomal ITS1 (Bowles e McManus, 1993b) se mostraram sensíveis na identificação destas variantes. A utilização do seqüenciamento de regiões do DNA mitocondrial que codificam a NADH desidrogenase 1 (ND1- 470 pb) e a subunidade 1 da citocromo oxidase (*cox1*- 391 pb), identificou os haplótipos (G1-G10) relacionados à estas linhagens (Tabela 1; Bowles *et al.*, 1992; Bowles e McManus, 1993a).

A variante de *E. granulosus* menos específica ao hospedeiro intermediário ou quanto ao órgão alvo é a de ovinos (haplótipo G1). A introdução desta linhagem na Austrália permitiu que o parasito infectasse o dingo, um canídeo selvagem, e o ciclo passou a ocorrer entre os animais nativos (Gemmell, 1990; Thompson, 1995). Existem também diversas microvariantes mitocondriais, isto é, haplótipos contendo poucas mutações em relação aos haplótipos mais comuns. Uma destas microvariantes, que foi

caracterizada como uma outra linhagem é o haplótipo G2. Foi identificada em ovinos da Tasmânia, e está presente na Argentina pela introdução de animais provenientes daquela ilha (Thompson e McManus, 2002).

Tabela 1: Principais linhagens de *Echinococcus granulosus*, e os haplótipos mitocondriais correspondentes. Os hospedeiros utilizados e distribuição geográfica também estão indicados (modificado de Thompson e McManus, 2002).

Linhagens (haplótipo)	Hosp. Intermediário	Hosp. Definitivo	Distribuição geográfica
Ovino (G1)	ovinos, bovinos, cabras macropodes diversos e humanos	cão, raposa, chacal, dingo, hiena	Austrália, Europa, Estados Unidos, Nova Zelândia, China, África, Oriente Médio, América do Sul, Rússia
Ovino da tasmânia (G2)	ovinos e bovinos e humanos	cão e raposa	Tasmânia e Argentina
Búfalo (G3)	búfalos, bovinos?	cão	Ásia
Eqüino (G4)	eqüinos	cão	Europa, Oriente Médio, África do Sul
Bovino (G5)	bovinos e humanos	cão	Europa, Índia, Sri-Lanka, América do Sul, Rússia, África do Sul
Camêlo (G6)	camelídeos e cabras e humanos	cão	África, China, Oriente Médio, Argentina
Suíno (G7)	suínos, humanos?	cão	Europa, Rússia, América do Sul
Cervídeo (G8)	cervídeos e humanos	cão e lobos	América do Norte, Eurásia e África

O haplótipo G4 de eqüinos tem sido recentemente considerado como outra espécie, denominada *E. equinus*, pois só ocorre em cavalos, e as seqüências nucleotídicas de marcadores mitocondriais e nucleares são muito divergentes (Williams e Sweatman, 1963; Bowles *et al.*, 1995). A posição taxonômica de outras linhagens também está sendo revisada, como é o caso do haplótipo de bovinos (G5), e um grupo filogeneticamente relacionado que reúne as linhagens de cervídeo, suíno e camelo (G8, G7 e G6). G5 já tem sido chamada de *E. ortleppi*, e suas características mais marcantes são: a alta especificidade do metacestóide de se desenvolver nos pulmões de bovinos,

um período pré-patente mais curto e grande diferenciação genética (Thompson e McManus, 2002). Quanto às outras três linhagens, têm se sugerido que devam compor uma espécie separada (*E. canadensis*), pois são tão divergentes geneticamente da linhagem ovina (G1) quanto G5, e compartilham um ancestral comum mais recente com G5 em filogenias de marcadores mitocondriais (Figura 4; Nakao *et al.*, 2006).

No Rio Grande do Sul, a principal linhagem que parasita o rebanho de bovinos e ovinos é a G1. Os focos da doença estão concentrados na metade sul do estado onde ocorre a criação extensiva destes animais. A linhagem G5 ocorre em simpatria, porém apenas em bovinos. Ambas podem infectar acidentalmente humanos, e não é conhecido ciclo selvagem da doença.

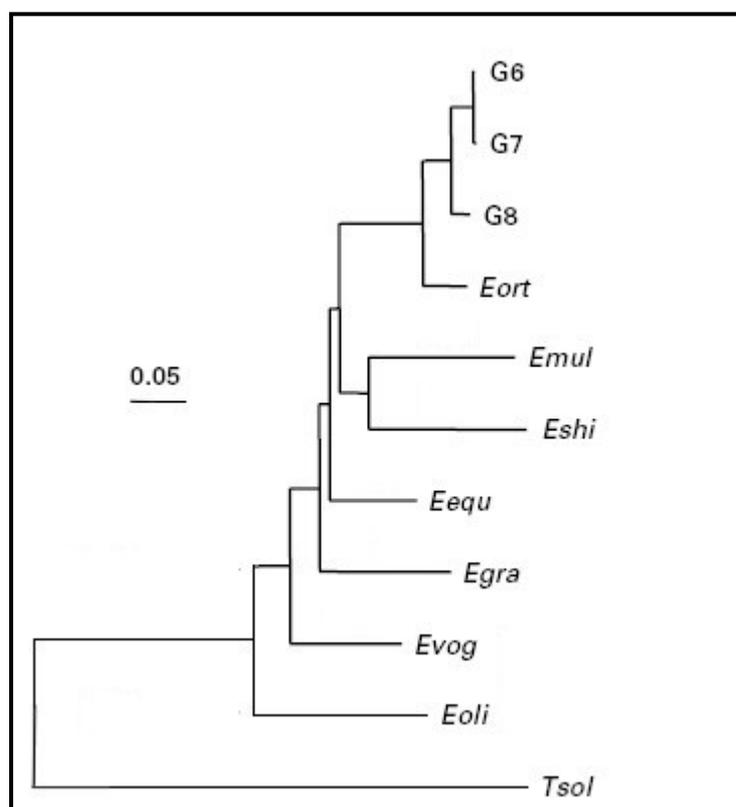


Figura 4: Filogenia do gênero *Echinococcus* baseado no genoma mitocondrial completo obtida por máxima verossimilhança. Eort-*E. ortleppi*; Emul-*E. multilocularis*; Eshi-*E. shiui*; Eequ-*E. equinus*; Egra-*E. granulosus*; Evog-*E. vogeli*; Eoli-*E. oligarthrus*; Tsol-*Taenia solium*. G6, G7, G8 são os haplótipos mitocondriais já referidos (ver texto, modificado de Nakao *et al.*, 2006).

1.5. O antígeno B

A proteína de *Echinococcus* mais abundante no líquido hidático (cerca de 10% da proteína bruta) é uma lipoproteína termo estável (Oriol *et al.*, 1971; Musiani *et al.*, 1978). Esta proteína, o antígeno B (AgB), é altamente imunogênica em humanos (Maddison *et al.*, 1989), sendo amplamente utilizada em imunodiagnóstico (Lightowers e Gottstein, 1995).

O AgB é produzido pelo parasito durante o desenvolvimento do metacéstóide. Ele parece ser secretado pela membrana germinativa e pelos protoescolices (Rickard *et al.*, 1977; Yarzabal *et al.*, 1977; Sanchez *et al.*, 1991). A grande quantidade desta proteína sugere um papel importante na sobrevivência do parasito, porém sua função biológica ainda não está bem determinada.

O AgB é rico em α -hélices (Monteiro *et al.*, 2007), e é considerado homólogo às proteínas de helmintos que se ligam à lipídeos (HLBPs; Gonzalez-Sapienza e Cachau, 2003). Porém, sua função não parece estar relacionada com a captação e o metabolismo de lipídeos, mas a processos de detoxificação de xenobiontes (Chemale *et al.*, 2001; Chemale *et al.*, 2005). O envolvimento do AgB na evasão da resposta imune do hospedeiro intermediário foi sugerido em experimentos *in vitro* que registraram a inibição do recrutamento de células polimorfonucleares e de proteases (Shepherd *et al.*, 1991). Rigano *et al.* (2007) testaram a ação do AgB sobre os monócitos e células dendríticas (CD). Verificaram que ele não só inibe a diferenciação dos monócitos em CD, como modula as CD sentinelas polarizando a resposta para o tipo Th2, considerada não protetora para a infecção. Para determinar o envolvimento da resposta imune celular do hospedeiro com a variação encontrada nos genes do AgB de *Echinococcus multilocularis*, Graichen *et al.* (2007) infectaram camundongos da linhagem Balb/c e

nude (desprovidos de células T). Os camundongos nude, incapazes de ativar a resposta do tipo T celular, apresentaram uma quantidade de transcritos de AgB menor em comparação aos camundongos Balb/c no primeiro mês de infecção. Os resultados podem estar sugerindo que a expressão do AgB de *Echinococcus* é mediada por fatores envolvidos com a resposta imune celular do hospedeiro.

Quando descrito por Oriol *et al.* (1971), o AgB foi caracterizado como uma lipoproteína de 120-160kDa. O padrão de migração do AgB nativo em gel de SDS-PAGE é composto por bandas de 8, 16, 24 e 32kDa. A quantidade relativa de proteína aumenta à medida que o peso molecular diminui, sugerindo que a estrutura quaternária desta proteína se forma pela ligação de peptídeos de 8kDa (Lightowlers *et al.*, 1989).

O isolamento de genes que codificam peptídeos do antígeno B começou com Shepherd *et al.* (1991), que obteve uma seqüência parcial do cDNA. A seqüência completa foi obtida por Frosch *et al.* (1994b). Uma outra seqüência relacionada com a primeira seqüência descrita foi identificada em um banco de cDNA por Fernandez *et al.* (1996). Esta nova seqüência apresentava uma similaridade nucleotídica de 40% com a primeira. Por isso, a primeira isoforma passou a ser chamada de EgAgB8/1 e a segunda EgAgB8/2. Para simplificar, os genes do antígeno B serão referidos aqui apenas por AgB seguido do número correspondente à isoforma identificada (AgB1, AgB2, AgB3 e AgB4).

Outras seqüências foram descritas com similaridades nucleotídicas diferentes: o AgB3 (Chemale *et al.*, 2001) é 63% similar ao AgB1 e 42,5% ao AgB2; o AgB4(Arend *et al.*, 2004) é 71% similar ao AgB2 e 38% e 43,8% similar ao AgB1 e AgB3, respectivamente (Mamuti *et al.*, 2006). Estruturalmente, os genes do antígeno B já caracterizados possuem uma região codificadora de aproximadamente 300 pb

interrompidas por um íntron rico em repetições CCT. O primeiro éxon codifica um peptídeo sinal, enquanto o segundo éxon codifica a proteína secretada. Acredita-se que a região do íntron rica em CCT facilite eventos de recombinação entre os genes da família.

Experimentos de “Southern blot” genômico demonstram que esta proteína deve ser codificada por uma família gênica com no mínimo sete genes. Uma quinta seqüência genômica similar ao AgB3 foi descrita recentemente como outro gene o AgB5 (Haag *et al.*, 2004). A evolução dos genes provavelmente ocorreu por eventos de duplicação anterior a especiação, pois estes genes estão presentes em todas as espécies do gênero. Os genes formam dois clados: um composto por AgB1, AgB3 e AgB5 e outro por AgB2 e AgB4 (Figura 5; Haag *et al.*, 2006b).

1.6. Variação antigênica

A variabilidade de antígenos dos parasitos pode lhes garantir a sobrevivência frente à resposta imunológica do hospedeiro. O fenômeno denominado variação antigênica pode ser mantido em nível populacional, de modo que diferentes linhagens de parasitos têm vantagens em diferentes hospedeiros. Isto é observado freqüentemente em antígenos codificados por um único loco no genoma. Outra forma de variação antigênica ocorre em nível individual, onde os antígenos seriam expressos por diferentes locos em momentos diferentes do desenvolvimento (Machado *et al.*, 2006).

No caso da variação ser mantida em nível populacional, poderíamos citar dois exemplos. Em bactérias como *Streptococcus pneumoniae*, existem mais de 90 linhagens que diferem nos antígenos de superfície da cápsula polissacarídea. Cada uma é capaz de produzir uma resposta imune específica. Deste modo, outras linhagens têm a chance de infectar os hospedeiros (Henrichsen, 1995). No vírus influenza verifica-se altas taxas

mutacionais em genes que codificam antígenos específicos. A resposta imune contra estes antígenos é capaz de eliminar o vírus, porém a cada ciclo as mutações acumuladas nesta proteína impedem o reconhecimento pela memória imunológica da população hospedeira gerada na primeira epidemia do vírus, o que garante que os sorotipos mais recentes possam infectar hospedeiros que já tiveram contato com a linhagem anterior (Fitch *et al.*, 1997).

Já num sistema de parasitos eucariotos, podemos citar a expressão diferencial de antígenos de superfície do protozoário *Trypanosoma brucei* (VSG – Variant-Surface Glycoprotein). Frequentemente o alelo da VSG expresso é substituído por translocação ou recombinação, dirigidas por seqüências homólogas nas regiões flangeadoras de 1000 cópias do gene *vsg* distribuídas pelos cromossomos. Desta forma, os tripanossomos expressam diferencialmente suas proteínas de superfície, dificultando a eliminação do parasito (Cross *et al.*, 1998).

Estudos preliminares com o gene *AgB1* indicaram que existe heterogeneidade de seqüências entre linhagens de *E. granulosus* (Frosch *et al.*, 1994a). Esta heterogeneidade de seqüência foi observada também em protoescólices de um mesmo cisto (ver abaixo). Um excesso de substituições não-sinônimas em relação às sinônimas entre parasitos de diferentes linhagens foi encontrado neste mesmo gene, principalmente na região do segundo éxon, indicando a ocorrência de seleção positiva ou balanceadora (Haag *et al.*, 1998). Além disto, variações no nível nucleotídico são encontradas mesmo para um único protoescólice (Haag *et al.*, 2004). Neste caso, a variação alélica encontrada poderia estar ligada a eventos de hipermutação somática ou recombinação durante a fase larval.

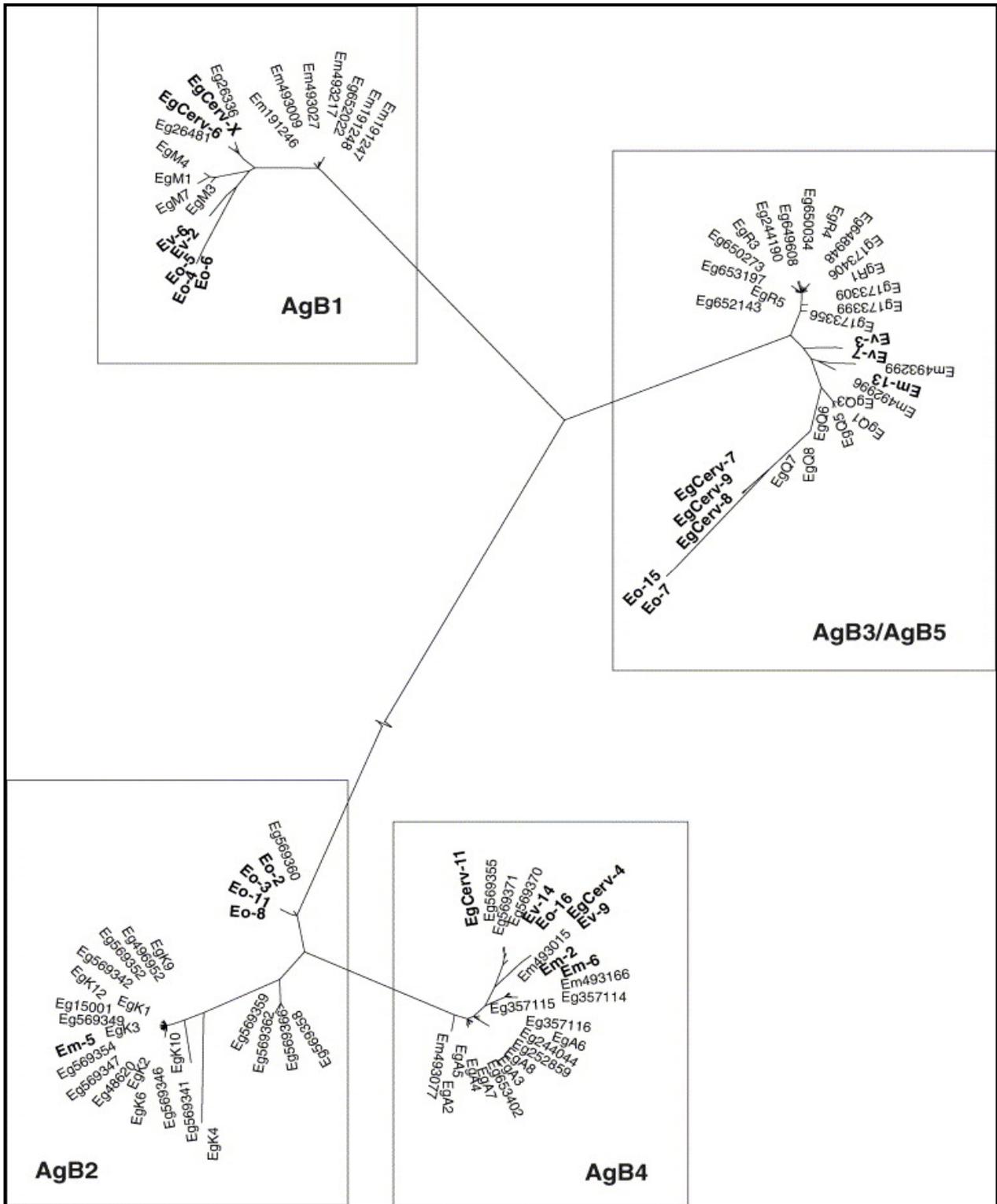


Figura 5: Filogenia inferida por máxima verossimilhança dos genes da família do antígeno B de *Echinococcus*. A separação entre os clados AgB1-AgB3-AgB5 e AgB2-AgB4 está indicada pelo ramo interno mais longo. Eg-*E. granulosus*, Eo-*E. oligarthrus*, Em-*E. multilocularis*, Ev-*E. vogeli*). Extraído de Haag *et al.* (2006b).

Outra explicação para a existência desta variação nucleotídica seria que os genes do AgB seriam redundantes no genoma, e estariam dispostos em tandem, o que tem sido suportado por experimentos de PCR em tempo real (Haag *et al.*, 2006a). Um exemplo disto é observado em genes que codificam RNA ribossomal. Pequenas mutações que ocorrem nas diferentes cópias seriam responsáveis pela variação encontrada nas seqüências amplificadas.

Haag *et al.* (2006b) encontraram evidências de seleção positiva em códons específicos de genes para três isoformas (AgB1-códon 18, AgB3-códon 3 e AgB4-códon 71). A evolução dos genes AgB parece não desviar da neutralidade. É interessante notar que o códon selecionado positivamente em AgB1 está situado em uma região imunorreativa mapeada por Gonzalez-Sapienza e Cachau (2003).

O antígeno B, portanto, é codificado por uma família gênica que poderia estar sendo expressa de modo diferencial durante o desenvolvimento do parasito, e evoluindo de maneira contingente (Haag *et al.*, 2004). Evidências indicam que ele tem um papel fundamental na permanência da infecção frente ao sistema imunológico do hospedeiro. A pressão de seleção causada sobre certas regiões desta proteína (aquelas expostas às moléculas do sistema imune do hospedeiro) explicaria em parte a variação apresentada em termos de alelos. Porém, outro mecanismo gerador de variabilidade é necessário para explicar as variações encontradas durante a propagação clonal, podendo ser elevadas taxas de mutação ou recombinação entre os genes da família, facilitadas por uma possível localização próxima dos telômeros, e motivos repetitivos constantes nas regiões não codificadoras dos genes, a exemplo das proteínas VSG de *Trypanosoma* (Borst, 2002).

1.7. Populações de parasitas

Uma população pode ser definida como um grupo de organismos da mesma espécie ocupando um dado espaço e tempo, compartilhando um mesmo “pool” genético. Este conceito não pode ser aplicado na íntegra para parasitas. Por exemplo, todos os indivíduos de uma única espécie em um único hospedeiro constituiriam uma população? Ou todos os indivíduos de todos os hospedeiros de um ecossistema representariam esta população? Outro problema é o fato de que muitos helmintos parasitas na fase adulta aumentam em número somente por migrações em seus hospedeiros definitivos (Esch e Fernandez, 1993).

Assim, os conceitos de infrapopulação, metapopulação e suprapopulação foram introduzidos por Esch *et al.* (1975) para hierarquizar a estrutura populacional de parasitos. A infrapopulação consistiria nos parasitos de uma única espécie em um hospedeiro individual. A metapopulação seria a composição de infrapopulações em uma determinada espécie hospedeira de um ecossistema. Já a suprapopulação, o nível hierárquico mais alto, reúne todos os parasitos de uma determinada espécie em todas as fases de seu desenvolvimento em todas as espécies hospedeiras em um determinado ecossistema. Esch e Fernandez (1993) consideram que fatores como a amplitude de distribuição do parasito, seu ciclo de vida, e sua especificidade quanto aos hospedeiros são fatores que contribuem para o grau de diferenciação entre as metapopulações.

A identificação da espécie com a qual se trabalha é o ponto de partida para estudos populacionais. Os marcadores moleculares são muito utilizados na caracterização de espécies já descritas, e também são ferramentas na prospecção de espécies crípticas (Criscione *et al.*, 2005). A estruturação populacional de parasitos depende do fluxo gênico e da diversidade genética contida na população. O tipo de

ciclo, de reprodução e o sistema de cruzamento influenciam diretamente o fluxo gênico e a diversidade genética. Price (1980) considera que populações de parasitas devam ser homozigotas e ter baixa diversidade genética. Embora esta idéia não se aplique a todas as espécies de parasitas, é o que parece ocorrer em organismos onde a transmissão entre hospedeiros ocorre pela infecção por grupos de parasitos irmãos, e o principal sistema de acasalamento é a autofecundação (Criscione *et al.*, 2005).

1.8. Marcadores moleculares em *Echinococcus*

A variação genética em *Echinococcus* já foi acessada por marcadores nucleares e mitocondriais. O DNA mitocondrial é amplamente empregado na discriminação de organismos relacionados, principalmente por possuir uma taxa evolutiva mais rápida, ser haplóide, de herança materna e não recombinar.

Os primeiros estudos moleculares em *Echinococcus* utilizaram a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) genômico ou PCR-RFLP da região ITS1 do rDNA nuclear (McManus e Simpson, 1985; Bowles e McManus, 1993b). Os resultados identificaram diversas linhagens em *E. granulosus*, e os padrões observados são constantes dentro de cada linhagem. A análise direta das seqüências de DNA se mostrou muito mais sensível na detecção de variações. Regiões codificantes dos genes mitocondriais da subunidade 1 da citocromo oxidase (*cox1*) e NADH desidrogenase 1 (ND1) foram usadas na determinação de haplótipos relacionados com as características de cada linhagem (Bowles *et al.*, 1992; Bowles e McManus, 1993a).

A técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), permitiu a análise de muitos isolados e a identificação de heterozigotos de alelos que se diferenciam por poucos nucleotídeos. A técnica foi utilizada na caracterização dos haplótipos mitocondriais já descritos (Gasser *et al.*, 1998), e aplicada na identificação da

variabilidade do DNA mitocondrial em populações da China e Argentina (Zhang *et al.*, 1999). Porém, o mais interessante para estudos populacionais é a capacidade de discriminar alelos em heterozigose e homozigose. Haag *et al.* (1999), se valeram disso para determinar a variabilidade genética em locos nucleares (codificantes e não-codificantes), e inferir que a autofecundação é o sistema de cruzamento prevalente em populações de *E. granulosus*.

A análise de variabilidade de microssatélites é uma das ferramentas mais utilizadas em teste de paternidade e estudos forenses pela capacidade de identificar virtualmente os indivíduos. Esta característica faz dos microssatélites a principal escolha para estudos das relações evolutivas entre espécies e populações (Barker, 2002). Em *Echinococcus* foi identificado um microssatélite multi-locus com motivos de repetição CA e GA denominado EmsB. O polimorfismo de tamanho destes microssatélites mostrou-se sensível para discriminar isolados de *E. multilocularis* de uma mesma localidade (Bart *et al.*, 2006).

1.9. Objetivos

Haag *et al.* (2006a), estudaram a região flanqueadora dos genes que codificam as subunidade do AgB, e buscaram estimar o número de cópias de cada subunidade no genoma das espécies *E. granulosus*, *E. ortleppi* e *E. multilocularis*. Os resultados da PCR em tempo real sugeriram que o gene do AgB2 apresenta um menor número de cópias nas três espécies. O AgB4 apresentou poucas cópias em *E. granulosus* da linhagem G1.

Dos quatro genes principais, AgB1 e AgB4 apresentam um maior número de sítios sofrendo seleção positiva (Haag *et al.*, 2006b). O AgB1 parece estar sob seleção positiva ou diversificadora entre as linhagens de *E. granulosus* (Haag *et al.*, 1998). O

AgB4 ainda não foi utilizado em estudos populacionais. Além disso, a maioria dos trabalhos que buscaram caracterizar os genes do AgB analisaram apenas o segundo éxon (Chemale *et al.*, 2001; Arend *et al.*, 2004; Haag *et al.*, 2006b), ou os *primers* utilizados não foram específicos na amplificação dos genes, e ignoravam a região promotora (Haag *et al.*, 2004; Kamenetzky *et al.*, 2005).

Tendo em vista o acima exposto, este trabalho buscou analisar o polimorfismo da região promotora, o primeiro éxon, o íntron e a seqüência parcial do segundo éxon do gene do AgB4 em amostras de *Echinococcus* de quatro países: Argentina, Argélia, Brasil e Romênia. Os parasitos foram separados, primeiramente, pelo haplótipo mitocondrial, utilizando a seqüência parcial do gene mitocondrial *cox1*. Além disso, foi usada a seqüência parcial de um segundo gene nuclear, que codifica a malato desidrogenase citosólica (*mdh*) com o objetivo de refinar as análises populacionais.

Os objetivos específicos foram:

- Determinar o haplótipo mitocondrial usando o marcador *cox1* segundo Bowles *et al.* (1992) dos isolados que não possuíamos esta informação;
- Amplificar o fragmento do gene *mdh* e caracterizar os alelos que ocorrem nas linhagens, identificando heterozigotos e homozigotos nas amostras pelo polimorfismo da conformação da fita simples de DNA:
 - Calcular a diversidade nucleotídicas das amostras.
 - Estimar a freqüência alélica nas amostras das diferentes populações e verificar se estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.
 - Analisar a estruturação populacional das linhagens.

- Amplificar e seqüenciar o gene do AgB4 das amostras para as diferentes linhagens, caracterizar os alelos e definir os polimorfismos nas amostras de cada população objetivando:
 - Identificar se os amplificados correspondem a ortólogos.
 - Utilizá-lo para caracterizar a estrutura genética das populações.
 - Identificar sítios de seleção entre as diferentes populações ou linhagens.

Capítulo 2. Manuscrito: Utilizando marcadores mitocondrial e nuclear para testar o isolamento reprodutivo entre linhagens de *Echinococcus granulosus*.

Autores

Badaraco, J.¹, Ayala, F.J.² e Haag, K. L.¹✧

Afiliação

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Department of Ecology and Evolutionary biology, University of California at Irvine, CA, USA.

Autor para correspondência

✧Departamento de Genética, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, Caixa Postal 15053, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brasil.

Tel.: +55-51-3316-9826; Fax: +55-51-33167311

e-mail: karen.haag@ufrgs.br

Palavras-chave: hidatidose, *Echinococcus granulosus*, epidemiologia, genética populacional.

Resumo

Diversos trabalhos utilizando marcadores morfológicos e moleculares concordam que algumas linhagens de *Echinococcus granulosus*, usualmente definidas por haplótipos mitocondriais, deveriam ser considerados espécies distintas. Porém, utilizar apenas marcadores mitocondriais não nos permite testar o efeito de trocas de genes entre as populações parcialmente isoladas. A partir do DNA total de 259 parasitos de amostras do Brasil, Argentina, Argélia e Romênia, determinou-se os haplótipos mitocondriais e amplificou-se um fragmento de 214pb do gene nuclear que codifica a malato desidrogenase citosólica (*mdh*). Dos dez haplótipos mitocondriais já descritos para *Echinococcus*, cinco estão incluídos no presente estudo (G1, G2, G5, G6 e G7). Um fato interessante é a presença de um parasito do haplótipo G7, linhagem suína, infectando um bovino na amostra do Brasil. Pelo padrão de migração da fita simples (SSCP) do gene *mdh* foram identificados 3 alelos distintos (Md1-Md3), formando homozigotos e heterozigotos, confirmados por seqüenciamento. Não foram encontrados alelos exclusivos nas linhagens. Mesmo assim, nas linhagens do agrupamento G1-G2 os alelos Md1 e Md2 estão em alta freqüência independentemente da amostra, enquanto Md3 é o alelo mais freqüente para o agrupamento G5-G6-G7. Estes achados podem ser conseqüências de: a) um polimorfismo ancestral ou b) introgressão de genes. Os valores de *Fst* indicam uma alta diferenciação entre as linhagens dos agrupamentos G1-G2 e G5-G6-G7. Este achado confirma-se pela AMOVA, que mostra que 79% da variância está entre as linhagens. Dados de outros marcadores nucleares estão sendo acessados para estes isolados, que serão esclarecedores para esta questão. Em nossa opinião, parece mais provável que um processo de introgressão esteja ocorrendo. Mesmo sendo lento, este processo pode trazer conseqüências biológicas e epidemiológicas importantes.

2.1. Introdução

O gênero *Echinococcus* Rudolphi, 1801 (Cestoda; Taeniidae) inclui no mínimo quatro espécies: *E. vogeli*, *E. oligarthrus*, *E. multilocularis* e *E. granulosus*, as quais necessitam de dois hospedeiros: um carnívoro na fase adulta, e um herbívoro, onde se desenvolve a larva ou metacestóide (Thompson, 1995). Nesta última fase ocorre reprodução assexuada, a proliferação clonal dos protoescólices, cada um deles com o potencial de gerar um verme adulto. Conseqüentemente, ao serem ingeridos pelo hospedeiro definitivo, os protoescólices originarão uma população geneticamente idêntica de vermes no trato digestivo de um hospedeiro individual.

Os parasitos adultos são hermafroditas, e se reproduzem principalmente por autofertilização, muito embora existam algumas evidências de fertilização cruzada (Thompson e Lymbery, 1996; Lymbery *et al.*, 1997; Haag *et al.*, 1999). Entretanto, dada a população de origem clonal no hospedeiro definitivo, espera-se que a fecundação cruzada ocorra entre genótipos idênticos mais freqüentemente (geitonogamia), o que em termos populacionais, equivale a autofecundação (Criscione e Blouin, 2006).

Uma característica marcante dos parasitas da espécie *E. granulosus* é a grande variação intra-específica (McManus e Thompson, 2003). Variantes genéticas que diferem em caracteres de relevância epidemiológica são classificadas como linhagens distintas (Bowles *et al.*, 1992; Wachira *et al.*, 1993; Bowles *et al.*, 1995; Thompson e McManus, 2002). Tais linhagens são comumente identificadas pelo seqüenciamento parcial de genes mitocondriais, e seus haplótipos foram designados G1 - G10. Dentre os haplótipos (linhagens) mais comuns destacam-se: G1 (linhagem ovina), a qual apresenta uma grande plasticidade fenotípica; e G5 (linhagem bovina), ambas encontradas no sul do Brasil e capazes de infectar bovinos. Algumas linhagens são particularmente

diferenciadas, razão pela qual tem-se proposto que sejam categorizadas como espécies. Por exemplo, a linhagem G5, por ser altamente adaptada a bovinos, ter o desenvolvimento preferencial nos pulmões, uma morfologia característica dos estróbilos e rápido período pré-patente, foi proposta como uma nova espécie, denominada *E. ortepi* (Thompson e McManus, 2002).

Este trabalho identificou as linhagens mitocondriais circulantes em amostras de bovinos do estado do Rio Grande do Sul (Brasil). Foi avaliada a diversidade genética dentro de cada linhagem usando um fragmento de 214 pb do gene nuclear codificador da malato desidrogenase citosólica (*mdh*). A diversidade nestas amostras foi comparada com amostras de outras populações (Argentina, Argélia e Romênia). Buscou-se avaliar se as diferenças quanto a biologia das distintas linhagens são suficientes para restringir o fluxo gênico.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Características das amostras

Os metacestóides (isolados) foram coletados de bovinos em um frigorífico da região metropolitana de Porto Alegre, o qual recebe animais principalmente da região sul do estado. Lamentavelmente não é possível precisar a origem exata dos animais devido a grande mobilidade de reses antes do abate. Cada isolado foi considerado como um indivíduo diferente, mas a forma de coleta impediu a determinação de parasitas de um mesmo hospedeiro.

O DNA total de 171 metacestóides foi obtido através de extração convencional com fenol-clorofórmio. Foram também analisadas amostras de outros hospedeiros e regiões geográficas (Tabela 1), as quais foram gentilmente cedidas pela Dra. Mara C. Rozsensvit (material da Argentina) e pelo Dr. Jean-Mathieu Bart (material da Argélia e

Romênia). Os haplótipos mitocondriais destas amostras foram previamente estabelecidos.

2.2.2. Determinação do haplótipo mitocondrial

Para a determinação dos haplótipos mitocondriais que caracterizam as diferentes linhagens, utilizou-se a seqüência parcial da subunidade 1 da citocromo oxidase (*cox1*). Os fragmentos foram obtidos com os primers desenvolvidos por Bowles *et al.*, 1992. Cada reação continha aproximadamente 30ng de DNA total, 1 unidade de Taq DNA polimerase (INVITROGEN®), 1,5mM de MgCl₂, 10mM de dNTPs e 20pmois de cada *primer* em um volume total de 50µl. A amplificação foi feita por “*touchdown*” com a temperatura de anelamento inicial de 55°C reduzindo um grau a cada dois ciclos nos 20 primeiros ciclos e mais 20 ciclos a 45°C. Com exceção do primeiro passo de desnaturação de 4 minutos e o último passo de extensão 7 minutos, os demais tinham a duração de 1 minuto. Estes amplicons foram seqüenciados automaticamente (ABI 3730XL) usando apenas o *primer* direto, o que foi suficiente para diferenciar os haplótipos já descritos.

2.2.3. Genotipagem do locus *mdh*

Foi amplificado um fragmento de 214pb do gene codificador da malato desidrogenase citosólica, que compreende parte do segundo éxon, o segundo íntron e parte do terceiro éxon. As reações foram feitas nas mesmas condições descritas para *cox1*, mas os primers utilizados foram: 5'CGC TCC TTC CAT TTC CGA AAG3' direto e 5'TTG GTG ACA ACG GCG TGA GAC3' reverso. O programa de amplificação incluiu 40 ciclos com temperatura de anelamento de 50°C. Os fragmentos foram desnaturados e migrados em gel de poliacrilamida (12%) para a separação pela conformação da fita simples (SSCP – *single strand conformation polymorphism*)

utilizando o sistema GenePhor (*GE Healthcare*). A migração foi feita em “buffer A” (pH 9.0 *GE Healthcare*) à temperatura de 12°C e à voltagem constante de 200V por 1h e 30 min. Posteriormente os géis foram corados com nitrato de prata 1% utilizando protocolos convencionais. Os alelos identificados por SSCP foram confirmados por seqüenciamento automático. Foram seqüenciadas no mínimo 6 amostras independentes representativas de cada padrão encontrado na análise de SSCP.

2.2.4. *Análise dos dados de seqüência*

Para todas as análises, as amostras de cada país foram separadas por linhagem, de acordo com os haplótipos mitocondriais (G1, G2, G5, G6 e G7). A diversidade no locus *mdh* para cada linhagem de *E. granulosus* foi estimada através dos parâmetros: número de sítios segregantes (S), diversidade nucleotídica (π) e Theta (θ) (Nei e Li, 1979; Nei, 1987), usando o programa DNAsp 4.0 (Rozas et al., 2003).

A deficiência ou não de heterozigotos (equilíbrio de Hardy-Weinberg) e a estruturação genética das populações baseado no índice F_{st} (Reynolds et al., 1983), e na AMOVA (Excoffier et al., 1992) foram testados utilizando o programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005). A análise da estrutura populacional foi feita seguindo um padrão hierárquico. Primeiramente, foram agrupadas as amostras de acordo com sua localização geográfica, e dentro de cada grupo os isolados foram separados em populações de acordo com a linhagem identificada pelo haplótipo mitocondrial.

2.3. Resultados

2.3.1. Identificação de linhagens

Apenas os haplótipos mitocondriais G1 e G5 foram encontrados nas amostras de bovinos do Brasil, com exceção de um único parasito com o haplótipo G7, característico da linhagem de porco, isolado do fígado de um bovino. Do total de 171 isolados provenientes do Brasil, 115 pertenciam à linhagem G1 e 55 à G5 (Tabela 1).

2.3.2. Alelos do gene *mdh*

Três alelos, Md1, Md2 e Md3, foram identificados pelos padrões de SSCP (Figura 1) e confirmados por seqüenciamento. Na Tabela 2 estão dispostas as freqüências genóticas e alélicas por linhagem para cada amostra.

Não existem alelos restritos a linhagens específicas, porém o alelo Md3 aparece em maior freqüência (no mínimo 0,88) nas linhagens bovina, de camelo e suína (G5, G6 e G7). Os alelos Md1 e Md2, por outro lado, estão presentes em baixa freqüência nestas linhagens. Na Romênia foi encontrado um isolado heterozigoto Md2/Md3 pertencente à linhagem G7.

Md1 e Md2 são mais freqüentes nos isolados das linhagens G1 e G2, sendo Md2 o alelo mais representado em todas as amostras deste grupo. Ainda assim, Md3 aparece, em baixa freqüência, nos isolados de G1 das amostras da Argentina, Brasil e Argélia. Apenas um parasito com o haplótipo mitocondrial G1 do Brasil é heterozigoto entre Md2 e Md3 e outros dois apresentaram o alelo Md3 em homozigose.

As freqüências genóticas foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3). Foram encontradas deficiências no número de heterozigotos para a linhagem G1 nas amostras da Argentina, Brasil e Argélia e nos isolados da linhagem G5 do Brasil

($p < 0,001$). Na Tabela 3 também estão os índices de diversidade de seqüências entre as linhagens de cada amostra: número de sítios segregantes (S) e diversidade nucleotídica (π). Os valores de π mostram que as amostras de G1 são mais diversas com exceção da amostra da Argentina. Contudo, a diversidade nucleotídica é baixa de um modo geral. Nas amostras G2 da Argentina, e G1 e G7 da Romênia, os valores de S foram 3, 3 e 8 respectivamente, as demais apresentaram 10 sítios segregantes, exceto G6 da Argélia, por ser monomórfico para Md3. Três sítios segregantes estão localizados no final do éxon 2 do gene, outros três no segundo íntron e mais quatro no terceiro éxon.

2.3.3. *Diferenciação e estruturação populacional*

A Tabela 4 mostra o grau de diferenciação entre as populações geográficas de cada linhagem, calculado pelo índice F_{st} (diagonal inferior). Dos valores com suporte estatístico destacam-se as grandes diferenças entre as linhagens G1 e G5 na amostra do Brasil (0,82). Esta diferença se repete entre as demais populações de G1 e a de G5. As linhagens, G6 e G7, não apresentam diferenças significativas em relação a G5. Os valores de F_{st} entre populações da linhagem G1 da Argentina e Argélia, Argentina e Brasil, e Argélia e Brasil são de 0,1 e 0,13 ($p < 0,001$) e -0,01.

Na diagonal superior da Tabela 4 está a estimativa do número de migrantes por geração calculada com base no F_{st} para cada par de populações (Slatkin 1991). Em negrito aparecem apenas os valores com F_{st} estatisticamente significativos ($p < 0,05$), e que fazem sentido em termos populacionais. Apesar do grande grau de diferenciação entre as amostras das linhagens G1 e G5 no Brasil e G1 e G6 na Argélia e G1 e G7 na Romênia existe um certo fluxo gênico de 0,11, 0,13 e 0,08 migrantes por geração respectivamente.

O teste AMOVA foi estruturado nos seguintes níveis hierárquicos: 1) populações amostras de cada localidade separadas pela linhagem 2) grupos compostos pelas populações da mesma linhagem. Os resultados mostram que a maior parte da variação encontra-se entre as linhagens (haplótipos mitocondriais) de *E. granulosus* (79%); já as populações geográficas da mesma linhagem apresentam pouca variação (1%), mas existe uma certa variação dentro das populações (20%).

2.4. Discussão

Nesta amostra de cistos hidáticos de hospedeiros bovinos do Rio Grande do Sul encontrou-se uma maior prevalência da linhagem G1 (67%), sendo que G5 ocorre em menor frequência (32%). A linhagem de porco (haplótipo G7) já foi encontrada em bovinos da república Eslováquia (Turcekova et al., 2003), e neste trabalho descrevemos pela primeira vez em bovinos do sul do Brasil. Do ponto de vista biológico este dado é importante, pois, demonstra a plasticidade destes parasitas. Do ponto de vista epidemiológico este também tem relevância, já que uma terceira linhagem infectiva aos humanos ocorre nos bovinos criados extensivamente nesta região do país.

O gene *mdh* de *Echinococcus* possui um íntron após o primeiro códon. Haag et al. (1999) estudaram o padrão de SSCP da região promotora somada ao primeiro íntron de 110 isolados de *E. granulosus* de várias haplótipos mitocondriais e de diferentes hospedeiros. Foram identificados 6 alelos diferentes, e alguns alelos privados em alguns haplótipos. Numa outra região do mesmo gene estudada no presente trabalho, identificamos apenas 3 alelos, e nenhum que ocorresse exclusivamente em um haplótipo.

Nakao et al. (2006), publicaram uma hipótese filogeográfica para a divergência das espécies de *Echinococcus*. A divergência das espécies neotropicais *E. oligarthrus* e

E. vogelli, provavelmente ocorreu após a formação do istmo do Panamá durante o Pleistoceno. O local-berço das espécies não é claro, mas se o hospedeiro definitivo inicial fosse um felino, a origem mais provável seria a Ásia. Se fosse um canídeo, o berço das espécies de *Echinococcus* seria a América do Norte. Os autores também sugeriram que a resposta para esta pergunta deveria vir das espécies do gênero menos ligadas aos processos migratórios humanos, que teve papel fundamental principalmente na dispersão da espécie *E. granulosus* e suas linhagens.

Possivelmente a criação de diferentes espécies de hospedeiros intermediários em um mesmo local (bovinos e ovinos, por exemplo) permitiu o contato entre parasitos que realizavam ciclos até então isolados. A simpatria pode ter acarretado na troca de genes entre as diferentes populações, previamente isoladas. Isto traz a tona alguns problemas.

1) Qual sistema de cruzamento predominante? 2) A taxa de fluxo gênico é suficiente para a homogeneização destas populações? 3) Qual o conceito de espécie mais adequado para estes parasitos?

2.4.1. Sistema de cruzamento

A capacidade do adulto hermafrodita de realizar autofecundação pode ser vantajosa em infecções com baixa densidade de vermes, porém a frequência com que isto ocorre na natureza é pouco conhecida (Thompson, 1995). Duas considerações quanto ao estabelecimento da infecção no hospedeiro definitivo devem ser observadas: os cistos, que possuem milhares de protoescólices, são ingeridos inteiros pelos cães; no intestino muitos protoescólices (clones) se agregam, possivelmente por atração entre os vermes, o que poderia estar relacionado com diferenças no microambiente nutricional, mas que em contrapartida aumentaria as chances de fecundação cruzada (Lymbery et al., 1989). Por estas características, poderíamos supor que o cruzamento entre clones

seria tão provável quanto a autofecundação. De qualquer forma, a consequência do cruzamento entre clones é equivalente a autofecundação (Criscione e Blouin, 2006).

Em *Echinococcus* o tipo de fecundação foi estudado a partir de marcadores moleculares. Lymbery e Thompson (1988) usaram eletroforese de isoenzimas e verificaram que a variação observada nos parasitos entre as regiões da Austrália e a ausência de desequilíbrio de ligação sugeria a fecundação cruzada. Por outro lado, a deficiência de heterozigotos era um indício de autofecundação. Lymbery et al. (1997) concluíram, que estes dados refletiriam a ocorrência de fecundação cruzada entre clones (geitonogamia). A análise do polimorfismo de seqüência por SSCP de 6 locus do genoma feita por Haag et al. (1999), concluiu que os dois tipos de fecundação correm em *Echinococcus*, e encontraram evidências de cruzamento entre linhagens mitocondriais diferentes, apesar destas linhagens serem bastante homogêneas em termos genéticos.

Os dados aqui apresentados confirmam a deficiência de heterozigotos nas populações de todas as linhagens mitocondriais estudadas. Isto nos permite apenas concluir que a autofecundação ou um sistema equivalente deve estar atuando nas populações. Além disso, as frequências haplotípicas sugerem que: ou está ocorrendo cruzamento entre as linhagens, ou as linhagens apresentam um polimorfismo ancestral. Os possíveis híbridos são encontrados entre as os haplótipos G1 e G5 na amostras do Brasil, G1 e G6 na Argentina, e G1 e G7 na Romênia. Pelo menos para as amostras do Brasil podemos afirmar que os ciclos das linhagens ovina e bovina compartilham o mesmo hospedeiro definitivo. O mesmo é sugerido para outras amostras da Argentina (Haag et al., 2004), no Sul da Argélia entre as linhagens ovina e camelina (Bardonnet et

al., 2003; Bart et al., 2004) e na Romênia entre os haplótipos mitocondriais G1, G2 e G7 (Bart et al., 2006).

2.4.2. *Populações em simpatria*

Apesar das evidências que sugerem o cruzamento entre indivíduos de linhagens diferentes (Thompson e Lymbery, 1996; Lymbery *et al.*, 1997; Haag *et al.*, 1999), as populações mesmo em simpatria permanecem bem diferenciadas. Tanto os valores de F_{st} e a AMOVA suportam que as populações da linhagem ovina (haplótipos G1 e G2) estão bastante diferenciadas das linhagens de bovinos de porco e de camelo (haplótipos G5, G6, G7). As estimativas de números de migrantes, baseados nos valores de F_{st} , sugerem que o fluxo gênico não é suficiente para que ocorra a homogeneização destas populações em simpatria (Futuyma, 1986).

De fato, a posição taxonômica destas linhagens está em discussão. A linhagem de bovino (haplótipo G5) já é tratada como a espécie *E. ortleppi* (Thompson and McManus, 2002). Os haplótipos G1, G2 e G3 formariam a espécie *E. granulosis*, e os haplótipos G6, G7 e G8 comporiam a espécie *E. canadensis* (Nakao *et al.*, 2006).

2.4.3. *Espécies de Echinococcus*

Como definir espécies de parasitos? O conceito biológico de espécies não é aplicável para a maioria dos parasitos, principalmente aqueles que realizam autofecundação. Lymbery (1992) buscou tratar deste problema de modo objetivo, pois não seria adequado refutar o conceito de espécies biológicas naqueles organismos em que o sistema de cruzamento predominante é a autofecundação. O autor sugere utilizar a cladística para identificar grupos monofiléticos e discriminar as espécies por um método de distância genética. Concordamos com a classificação da linhagem bovina como uma nova espécie, e apesar de não conseguirmos distinguir, com o gene nuclear, as linhagens de porco e camelo da linhagem de bovino, os dados mitocondriais suportam esta separação (Thompson e McManus, 2002; Nakao *et al.*, 2006)

Não podemos ignorar o fato que estas populações quando em simpatria são capazes de inter cruzar. A consequência deste fluxo gênico é a evolução. Novos conjuntos de genes estão sendo “testados” em cada ambiente. Thompson e Lymbery (1988) consideram a linhagem de camelo (haplótipo G6) pouco infectiva à humanos. Na Argentina esta linhagem foi encontrada em 4 de 9 pacientes com hidatidose (Rosenzvit et al., 1999). McManus e Thompson (2003) especularam que alguma mutação pode ter surgido nos parasitos da linhagem G6 deste país, o que teria permitido a infecção de humanos. Da mesma forma, porém com a possibilidade do cruzamento das linhagens de ovino e de camelo, sugerimos que a introgressão gênica possa ser a responsável por ampliar o número de espécies hospedeiras em parasitos com o haplótipo G6.

No sul do Brasil, o contato entre as linhagens de bovinos e ovinos possivelmente aumentou nas últimas décadas. A especificidade ao hospedeiro da linhagem de bovino deve ter colaborado para a restrição do contato com a linhagem ovina. Porém, o acesso à energia elétrica para o congelamento da carne, permitiu que o abate de bovinos ficasse freqüente nas fazendas, unido à retração da ovinocultura, os cães passaram a ser alimentados mais freqüentemente com cistos da linhagem bovina do que no passado.

No sul do Brasil, não é conhecido um ciclo selvagem do parasito. Na Austrália, o parasito da linhagem ovina se adaptou ao ambiente silvestre usando o dingo como hospedeiro definitivo, e macrópodos, como cangurus, para desenvolver suas larvas. (Thompson, 1995). Na Terra do Fogo dados de campo indicaram o potencial de infecção da raposa cinza (*Pseudalpes griséus*) por *Echinococcus granulosus* (Zanini et al., 2006). O a introgressão gênica poderia favorecer o surgimento de parasitos com capacidade de infectar com sucesso animais selvagens. A infecção por *Echinococcus* nos canídeos leva a uma imunidade populacional, isto é, os animais mais novos são

intensamente infectados enquanto os animais mais velhos a infecção é controlada, liberando poucos ovos (Torgerson, 2006). Sendo assim, novos hospedeiros definitivos poderiam aumentar rapidamente a quantidade de ovos no ambiente. Isto traria conseqüências importantes no controle da doença e um possível aumento de casos em humanos. Considerar apenas a informação do DNA mitocondrial fornece uma visão limitada da história natural dos organismos (Anderson, 2001). Por isso, novos marcadores nucleares analisados em conjuntamente aos mitocondriais serão cruciais na elucidação da dinâmica evolutiva das populações de *Echinococcus*.

2.5. Agradecimentos

Agradecemos à Dra. Mara C. Rozsensvit pelas amostras genotipadas dos parasitos coletados na Argentina. e ao Dr Jean-Mathieu Bart pelas amostras da Argélia e da Romênia. Os órgãos financiadores deste projeto foram CAPES e CNPq.

2.6. Referências

- Anderson T J (2001) The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. *Trends Parasitol* 17 183-8.
- Bardonnet K, Benchikh-Elfegoun M C, Bart J M, Harraga S, Hannache N, Haddad S, Dumon H, Vuitton D A e Piarroux R (2003) Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination. *Vet Parasitol* 116 35-44.
- Bart J M, Bardonnet K, Elfegoun M C, Dumon H, Dia L, Vuitton D A e Piarroux R (2004) *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology* 128 229-34.
- Bart J M, Morariu S, Knapp J, Ilie M S, Pitulescu M, Anghel A, Cosoroaba I e Piarroux R (2006) Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol Res* 98 130-7.
- Bowles J, Blair D e McManus D P (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54 165-73.
- Bowles J, Blair D e McManus D P (1995) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110 (Pt 3) 317-28.
- Criscione C D e Blouin M S (2006) Minimal selfing, few clones, and no among-host genetic structure in a hermaphroditic parasite with asexual larval propagation. *Evolution Int J Org Evolution* 60 553-62.

- Excoffier L, Smouse P E e Quattro J M (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131 479-91.
- Excoffier L, G. Laval e S S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1 47-50.
- Futuyma D J (1986) *Evolutionary biology*, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., xii, 600.
- Haag K L, Araujo A M, Gottstein B, Siles-Lucas M, Thompson R C e Zaha A (1999) Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology* 118 (Pt 1) 63-71.
- Haag K L, Ayala F J, Kamenetzky L, Gutierrez A M e Rosenzvit M (2004) Livestock trade history, geography, and parasite strains: the mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *J Parasitol* 90 234-9.
- Lymbery A J (1992) Interbreeding, monophyly and the genetic yardstick: species concepts in parasites. *Parasitol Today* 8 208-11.
- Lymbery A J e Thompson R C (1988) Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. *Int J Parasitol* 18 803-11.
- Lymbery A J, Hobbs R P e Thompson R C (1989) The dispersion of *Echinococcus granulosus* in the intestine of dogs. *J Parasitol* 75 562-70.

- Lymbery A J, Constantine C C e Thompson R C A: Evolution (1997) Self-fertilization without genomic or population structuring in a parasitic tapeworm. Society for the Study of Evolution, pp. 289(6).
- McManus D P e Thompson R C (2003) Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. Parasitology 127 Suppl S37-51.
- Nakao M, McManus D P, Schantz P M, Craig P S e Ito A (2006) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitology 1-10.
- Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, x, 512.
- Nei M e Li W H (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci U S A 76 5269-73.
- Reynolds J, Weir B S e Cockerham C C (1983) Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. Genetics 105 767-779.
- Rosenzvit M C, Zhang L H, Kamenetzky L, Canova S G, Guarnera E A e McManus D P (1999) Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. Parasitology 118 (Pt 5) 523-30.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio J C, Messeguer X e Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19 2496-7.
- Thompson R C A: (1995) Biology and Systematics of *Echinococcus*. in. In: Lymbery., R C A T a A J (Ed.), *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, pp. 1, 50.

- Thompson R C e Lymbery A J (1988) The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 27 209-58.
- Thompson R C e Lymbery A J (1996) Genetic variability in parasites and host-parasite interactions. *Parasitology* 112 Suppl S7-22.
- Thompson R C e McManus D P (2002) Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18 452-7.
- Torgerson P R (2006) Canid immunity to *Echinococcus* spp.: impact on transmission. *Parasite Immunol* 28 295-303.
- Turcekova L, Snabel V, D'Amelio S, Busi M e Dubinsky P (2003) Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Trop* 85 223-9.
- Wachira T M, Bowles J, Zeyhle E e McManus D P (1993) Molecular examination of the sympatry and distribution of sheep and camel strains of *Echinococcus granulosus* in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 48 473-9.
- Zanini F, Laferrara M, Bitsch M, Perez H e Elissondo M C (2006) Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of the patagonian grey fox (*Pseudalopex griseus*) in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina. *Vet Parasitol* 136 329-34.

2.7. Tabelas e Figuras

Tabela 1: Número de isolados de cada linhagem* por amostra.

Amostra	Hospedeiro	Linhagem	n	total
Argentina	Ovino	G1	7	33
		G1	14	
	Humano	G2	4	
		G6	8	
Brasil	Bovino	G1	115	171
		G5	55	
		G7	1	
Argélia	Ovino	G1	10	28
	Humano	G1	5	
		Bovino	G1	
	Dromedário	G1	3	
G6		3		
Romênia	Ovino	G1	6	27
	Humano	G1	1	
	Bovino	G1	12	
	Suíno	G7	8	
Total				259

* linhagem definida pelos haplótipos de *cox1*

Tabela 2: Frequências genotípicas absolutas (% entre parênteses) e haplotípicas dos alelos de *mdh* para cada linhagem distribuídas por amostra.

Amostras	Linhagens	Frequência genotípica					Total	Frequência haplotípica		
		Md1/Md1	Md1/Md2	Md2/Md2	Md2/Md3	Md3/Md3		Md1	Md2	Md3
Argentina	G1	1 (4,76)	2 (9,52)	17 (80,95)	-	1 (4,76)	21	0,1	0,86	0,04
	G2	-	1 (25)	3 (75)	-	-	4	0,12	0,88	-
	G6	-	1 (12,5)	-	-	7 (87,5)	8	0,06	0,06	0,88
	total	1 (3,03)	4 (12,12)	20 (60,61)	-	8 (24,24)	33	0,09	0,67	0,24
Argélia	G1	5 (20)	9 (36)	10 (40)	-	1 (4)	25	0,38	0,58	0,04
	G6	-	-	-	-	3 (100)	3	-	-	1
	total	5 (17,86)	9 (32,14)	10 (35,71)	-	4 (14,29)	28	0,52	0,34	0,14
Brasil	G1	25 (21,74)	46 (40)	41 (35,65)	1 (0,87)	2 (1,74)	115	0,42	0,56	0,02
	G5	-	3 (5,5)	-	-	52 (94,5)	55	0,03	0,03	0,94
	G7	-	-	-	-	1 (100)	1	-	-	1
	total	25 (14,62)	49 (28,65)	41 (23,98)	1 (0,58)	54 (31,58)	171	0,29	0,39	0,32
Romênia	G1	2 (10,53)	6 (31,58)	11 (57,89)	-	-	19	0,26	0,74	-
	G7	-	-	-	1 (12,5)	7 (87,5)	8	-	0,06	0,94
	total	2 (7,41)	6 (22,22)	11 (40,74)	1 (3,7)	7 (25,93)	27	0,19	0,53	0,28

Tabela 3: Desvio da heterozigosidade esperada e índices de diversidade de seqüência nos alelos de *mdh* para os isolados de cada linhagem nas diferentes amostras.

Amostras		n	Heterozigose		Índices de Diversidade de Seqüência	
Origem	Linhagem		Observada	Esperada	Sítios Polimórficos (S)	Diversidade nucleotídica (π)
Argentina	G1	21	0,09**	0,26	10	0,006
	G2	4	0,25	0,25	3	0,003
	G6	8	0,13	0,24	10	0,01
Brasil	G1	115	0,41**	0,51	10	0,01
	G5	55	0,05**	0,1	10	0,004
Argélia	G1	25	0,36*	0,53	10	0,01
	G6	3	0	-	0	0
Romênia	G1	19	0,32	0,4	3	0,01
	G7	8	0,13	0,13	8	0,005

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,001$

Tabela 4: Valores de Fst na diagonal inferior e número de migrantes por geração na diagonal superior.

Amostras			Diferenciação Populacional Fst e Número de migrantes por geração								
Origem	Linhagem	n	Argentina			Brasil		Argélia		Romênia	
			G1	G2	G6	G1	G5	G1	G6	G1	G7
Argentina	G1	21		∞	0,13	3,30	0,07	4,32	0,08	15,32	0,09
	G2	4	-0,06		0,12	5,04	0,06	8,10	0,02	∞	0,06
	G6	8	0,8**	0,80**		0,16	285,70	0,18	∞	0,11	∞
Brasil	G1	115	0,13**	0,09	0,76*		0,11	∞	0,12	13,46	0,13
	G5	55	0,87**	0,9**	0,00	0,82**		0,09	∞	0,07	∞
Argélia	G1	25	0,10**	0,06	0,73*	-0,01	0,84**		0,13	23,34	0,14
	G6	3	0,87**	0,95*	-0,03	0,81**	-0,06	0,79**		0,06	∞
Romênia	G1	19	0,03	-0,02	0,81*	0,03*	0,88**	0,02	0,89**		0,08
	G7	8	0,85**	0,89**	-0,04	0,79**	-0,03	0,78**	-0,08	0,86**	

* = p<0,05

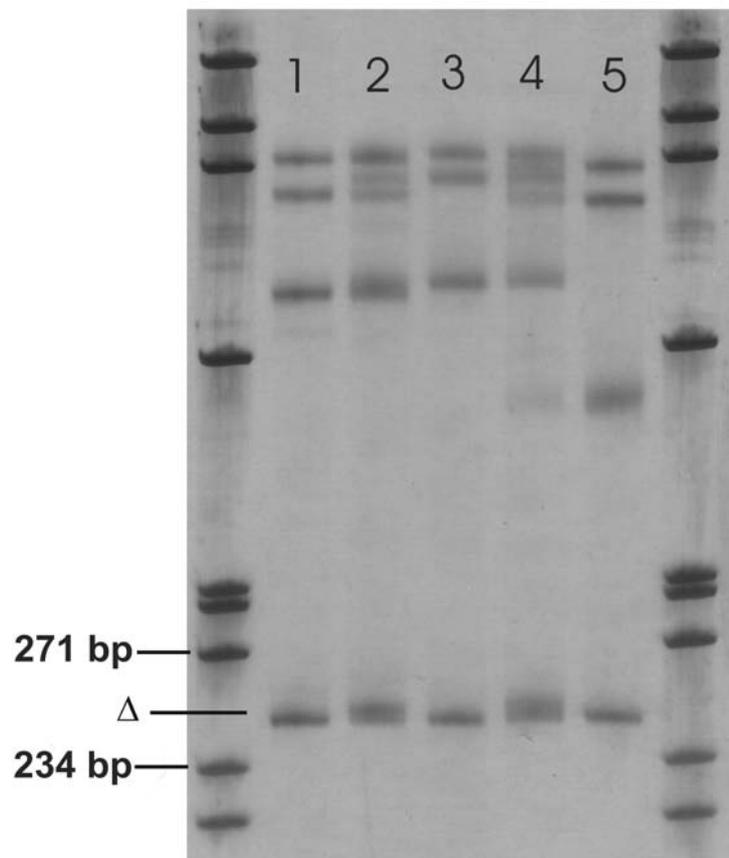
** = p<0,001

em negrito valores de Nm relevantes onde o Fst possui p<0,05.

Tabela 5: AMOVA entre grupos (G1, G2, G5, G6, G7) e entre populações geográficas (Argentina, Argélia, Brasil, Romênia).

Fonte de Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Componente da variância	Porcentagem de Variação
Entre grupos	4	739,3	3,00261 Va	78,97
Entre populações do grupo	5	12,79	0,04299 Vb	1,13
Dentro das populações	508	384,29	0,73144 Vc	19,9
Total	517	1.136,93	3,80	

Figura 1: Padrões de migração das fitas simples (SSCP) dos fragmentos do gene *mdh*. 1) homozigoto para o alelo Md1; 2) Heterozigoto Md1/Md2; 3) Homozigoto para o alelo Md2; 4) Heterozigoto Md2/Md3; 5) Homozigoto para o alelo Md3. Δ fita dupla dos amplicons de *mdh*, notar a presença de heteroduplex nos heterozigotos (2 e 4). Padrão de peso molecular Φ X174/HeaIII.



Capítulo 3. Resultados parciais sobre a diversidade do AgB4

3.1. Metodologia

3.1.1. Amostras

Na Tabela 2 estão dispostos os 151 isolados de cada amostra que tiveram o AgB4 seqüenciado, com seus respectivos haplótipos. Um isolado é definido como um indivíduo, e representa uma fração dos protoescólices geneticamente idênticos de um único cisto hidático.

Tabela 2: número de isolados seqüenciados de cada amostra separados por linhagem.

Amostra	haplótipo	isolados
Argentina	G1	10
	G2	2
	G6	1
Brasil	G1	72
	G5	21
Argélia	G1	24
	G6	2
Romênia	G1	18
	G7	1
Total		151

3.1.2. PCR e seqüenciamento

Um *primer* foi desenhado a partir do clone DQ148522.1 do GeneBank, anelando na região promotora 5' (PB4F_o11 5' GGA TGG AGT ATA AGG AGC AG 3'). A região 5' de anelamento dos *primers* existe certa homologia entre as seqüências de AgB2 e AgB4. Para evitar a amplificação do AgB2 utilizou-se um *primer* reverso específico

para AgB4 utilizado por Haag *et al.* (2006a). Este primer anela dentro do segundo éxon (AgBRev2 5' GAC ATA TTT CTT CAA CAC TTC GTG AAC 3'). O tamanho esperado dos amplicons é de 355 pb (Figura 6).

Com o objetivo de reduzir ainda mais chance de amplificação do AgB2, as PCRs foram realizadas com um programa do tipo *touchdown*. A temperatura de anelamento variava de 60°C a 50°C nos 20 primeiros ciclos e permanecia a 50°C por mais 20 ciclos. Cada ciclo iniciava com uma temperatura de 94°C para desnaturação por 1 min, mais 1 min à 50°C para anelamento dos *primers*, e um último passo de extensão de 1 min à 72°C. As condições das reações foram as seguintes: aproximadamente 30ng de DNA total; 1,5 unidades de enzima (Taq DNA polimerase INVITROGEN®); 1,5mM de MgCl₂; 10mM de dnTPs; 20pmois de cada *primer*, em um volume total de 50µl.

Os amplicons foram seqüenciados automaticamente (ABI 3730XL). O seqüenciamento de toda a região amplificada só foi possível com a utilização de um segundo *primer* direto (AgB8/2F 5' TTG CTC TCG TGG CTT TCG TG 3') que anela após a região repetitiva do promotor (Figura 6), uma vez que o uso do *primer* direto da PCR resultava em muitos picos sobrepostos.

3.1.3. Análise dos dados

3.1.3.1. Obtenção das sequencias

Cada reação de amplificação foi seqüenciada com os primers AgBRev2 e AgB8/2F. Os cromatogramas de cada isolado foram alinhados e obtidos os *contigs* no programa SeqManTM II do pacote Lasergene DNASTar® 6.0. Este programa calcula diretamente a qualidade das seqüências pelos dados do seqüenciador. Foram utilizados picos com escore de qualidade superior a 12 segundo as predeterminações do programa no nível de rigorosidade médio.

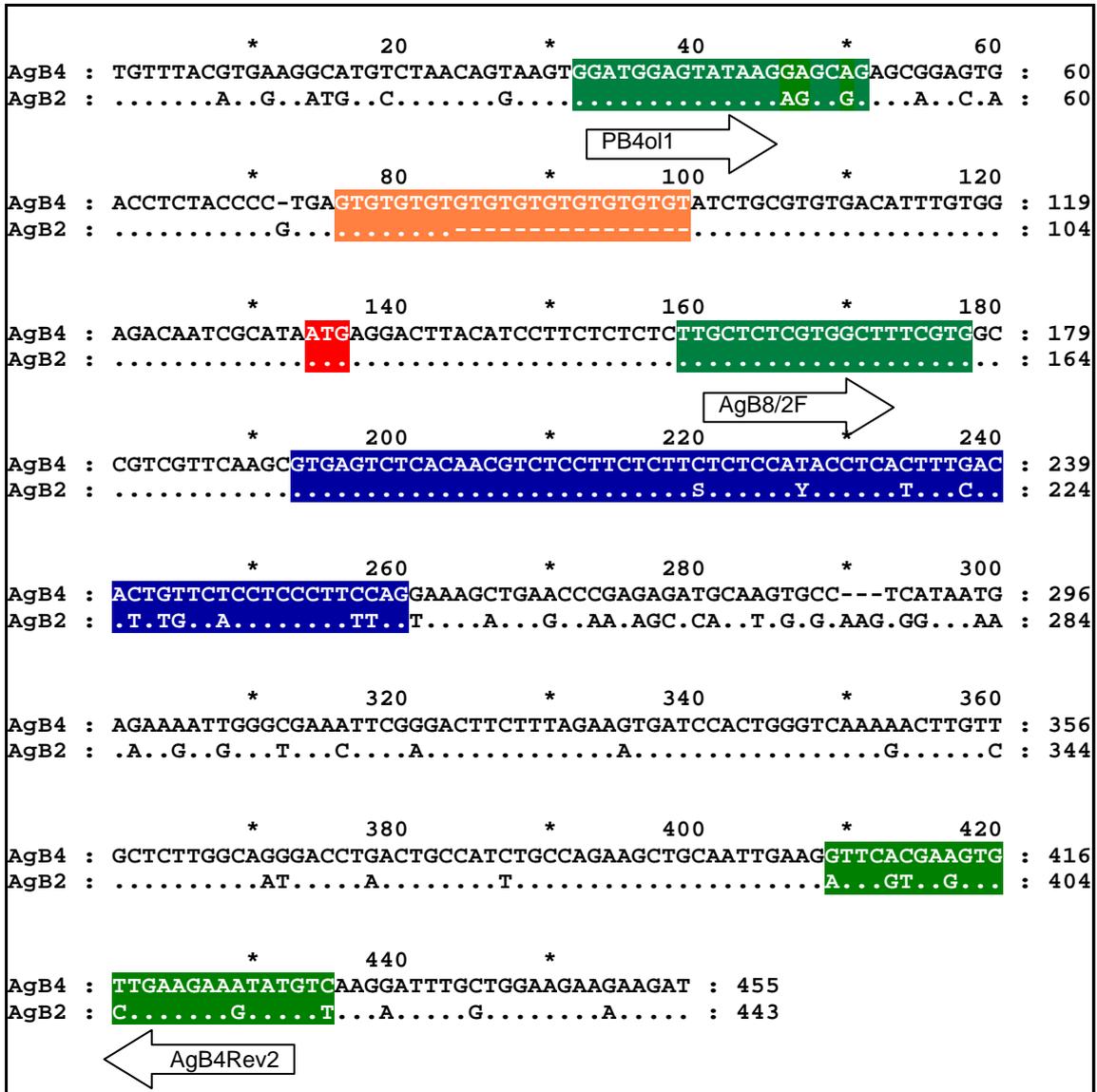


Figura 6: Comparação das regiões amplificadas do gene AgB4 (DQ148522.1 e AY614001.1) e a homologia em AgB2 (DQ148518.1 e AY569356.1). Em verde Localização dos *primers* utilizados (PB4F_o11, AgB8/2F e AgB4Rev2), as setas indicam a direção do primer na seqüência. Em vermelho a posição do primeiro códon. Em azul localização do íntron. Em laranja microssatélite com motivo GT.

Com exceção da região após o microssatélite do promotor, algumas seqüências tiveram ambigüidades no segundo éxon apenas. As ambigüidades foram consideradas como polimorfismos reais quando apareciam nas duas fitas seqüenciadas. Após o microssatélite, em direção ao início do amplicon, a maioria das seqüências apresentou picos múltiplos, esta região foi excluída das análises de diversidade.

3.1.3.2. Alinhamento e diversidade

As seqüências foram alinhadas e separadas em dois grupos (ver abaixo). Os alinhamentos foram feitos no programa ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) e conferidos no programa GeneDoc 2.7 (Nicholas, 1997). As estimativas de diversidade nucleotídicas foram feitas no programa DNASP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003), separadamente para as seqüências de cada tipo, e em conjunto.

3.2. Resultados

Pelos padrões dos cromatogramas, é verificado que os amplicons de AgB4 são compostos por uma população heterogênea de seqüências, que variam em número de repetições GT na região promotora 5' (Figura 7). Temos a certeza de estar amplificando especificamente genes que codificam o AgB4, pela homogeneidade das seqüências na região codificadora. Porém, fica claro que se trata de genes parálogos, ou os protoescólices não são geneticamente idênticos, pois o número de amplicons distintos é nitidamente superior a 2. Acreditamos estar amplificando parálogos de AgB4, porque Haag *et al.* (2006a) já mostraram evidências da redundância deste gene. Devido às dificuldades de leitura na região 5' compreendendo os motivos repetitivos, foram excluídos das análises subseqüentes aproximadamente 60 pb.

Foram identificados dois conjuntos de seqüências claramente distintas. Mais freqüentemente nos isolados com haplótipo mitocondrial G1 foram encontradas as

seqüências que nós chamamos de “tipo 1”. Em G5, as seqüências do “tipo 2” foram mais freqüentes (Tabela 3).

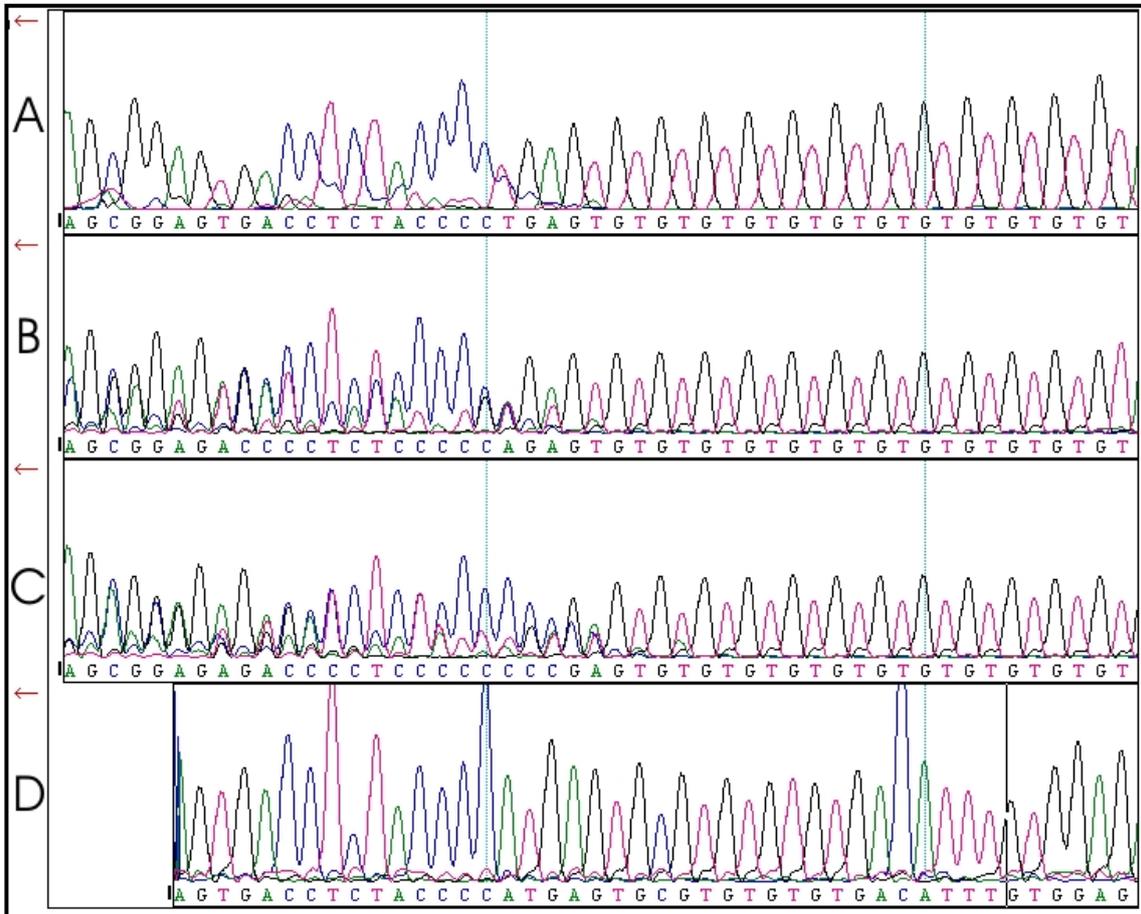


Figura 7: Cromatogramas das seqüências obtidas com o primer AgB4Rev2 (as setas vermelhas indicam o sentido do seqüenciamento). “A” seqüência obtida de um isolado com haplótipo G1 (tipo 1) que não sai de fase após o microsatélite. “B” e “C” seqüências de outros isolados G1 com múltiplos picos nas posições após o microsatélite, “D”, seqüência padrão de um isolado do haplótipo G5 (tipo 2). As seqüências não estão alinhadas para facilitar a visualização da qualidade dos picos. As 3 seqüências apresentam a base subsequente ao *primer* PB4F_ol1.

Tabela 3: Frequências das seqüências do tipo 1 e do tipo 2 para os diferentes haplótipos mitocondriais.

Haplótipos	Seqüências AgB4				total
	Tipo1		Tipo2		
	Absoluto	%	Absoluto	%	
G1	122	0,99	1	0,01	123
G2	2	1,00	0	0	2
G5	4	0,18	18	0,82	22
G6	2	0,67	1	0,33	3
G7	1	1,00	0	0	1
Total	131	0,87	20	0,13	151

3.2.1. Seqüências do tipo 1

Neste grupo foram encontradas seqüências em que o motivo GT está repetido 4, 11, 13 e 14 vezes. O motivo está distante 33 nucleotídeos à montante do primeiro códon. Do início do amplicon até o primeiro códon são aproximadamente 83 nucleotídeos. Este comprimento varia para algumas seqüências devido a *indels* na região repetitiva (Figura 8). Após a região repetitiva as seqüências do tipo 1 são pouco divergentes, apresentando apenas 4 sítios polimórficos. Três deles no éxon 2 e um no éxon 1. Os íntrons de todas estas seqüências são idênticos, e possuem o sinal de remoção conservado. As seis diferentes seqüências encontradas possuem poucos sítios segregantes e uma baixa diversidade nucleotídica (Tabela 4).

Tabela 4: Diversidade das seqüências obtidas do gene AgB4 calculada para cada tipo de seqüência.

	Sítios segregantes	Número de haplótipos	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica
Tipo1	7	6	0,52	0,0023
Tipo2	6	2	0,1	0,0018
Tipo1 e 2	42	6	0,63	0,034

3.2.2. Seqüências do tipo 2

As seqüências do tipo 2 são mais curtas do que o esperado (329 pb), apresentando uma deleção na região promotora de aproximadamente 24 pb, quando comparadas com as seqüências do tipo 1 (Figura 8). Diferentemente das seqüências do tipo 1, os cromatogramas não apresentaram picos sobrepostos na região 5' (Figura 7). Mas as diferenças não se restringem a região 5'. Frente à grande divergência das seqüências do tipo 1 e do tipo 2 (Tabela 4) realizamos uma busca no GeneBank usando a ferramenta BLASTn. As seqüências do tipo 1 foram todas identificadas como AgB4. Entretanto, as do tipo 2 apresentaram similaridade com uma seqüência (AY569358.1), considerada uma cópia não funcional do gene do AgB2 (Kamenetzky *et al.*, 2005), que chamamos de AgB2-like.

Apesar das diferenças, o primeiro éxon é bastante conservado. Nas 151 seqüências, foram encontradas apenas duas diferenças em duas seqüências nesta região. Uma apresentou uma transição (C-T) silenciosa na posição 3 do terceiro códon, outra uma transversão (T-A) que muda o aminoácido a de uma serina para uma tirosina na segunda posição do códon 8. A diversidade nucleotídica das seqüências nesta região foi 0,0005.

As grandes diferenças na região codificadora das seqüências do tipo 1 e do tipo 2 iniciam no sinal de *splicing* na extremidade 3' do íntron. Nas seqüências do tipo 2 este sinal está alterado, e não pode ser utilizado para a edição do mRNA (Figura 8). A partir deste ponto, a seqüência torna-se semelhante à de AgB2. A maioria das diferenças entre as seqüências tipo 1 e tipo 2 encontra-se em uma região que se estende por 60 bases após o sítio *splicing* “original”. Nesta região existe uma inserção de dois nucleotídeos que certamente mudaria a fase de leitura (Figura 9). Após esta região o próximo sinal de

3.3. *Perspectivas*

A possibilidade dos genes do AgB estarem redundantes no genoma de *Echinococcus* foi proposta por Haag *et al.* (2006a) utilizando PCR em tempo real. O presente trabalho reúne dados de 151 isolados, e os padrões dos cromatogramas de quase todos eles sugerem a amplificação de mais de um loco relacionado com o AgB4. Para buscar identificar a diversidade existente, alguns amplicons estão sendo clonados. Pelo menos 40 plasmídeos contendo insertos relacionados a AgB4 serão seqüenciados, para avaliar a diversidade alélica e a variação no número de repetições GT entre as variantes.

A grande homologia na região codificadora e no íntron entre as seqüências de um mesmo grupo poderia sugerir a evolução em concerto, a exemplo do que ocorre nas regiões de rDNA. As variantes podem estar distribuídas no genoma em freqüências desiguais, o que poderia ser sugerido pelas diferentes alturas nos picos sobrepostos dos cromatogramas, e pela variação da estimativa do número de cópias encontradas em experimentos de PCR em tempo real (Haag *et al.*, 2006a).

Kamenetzky *et al.* (2005) utilizaram uma reação de PCR não específica para a amplificação de seqüências dos genes AgB2 e AgB4 em amostras pequenas de parasitos de diferentes haplótipos mitocondriais. Após as clonagens dos amplicons, encontraram uma seqüência no *cluster* dos haplótipos G5 e G6/G7 que eles consideraram como sendo uma cópia não-funcional de AgB2. Dada a especificidade de nossas reações, sugerimos que as seqüências presentes em G5 são consequência de uma variante de AgB4 que aparentemente recombinau com o gene AgB2. O sítio de remoção do íntron está alterado. Contudo, a conservação do íntron, do éxon 1 e final do éxon 2 pode estar sugerindo que este gene ainda é funcional, e poderia estar sendo editado pela remoção

do íntron em um sítio alternativo. Estudos envolvendo a transcrição reversa e seqüenciamento dos cDNAs de AgB4 do tipo 2 serão esclarecedores. Uma vez que as seqüências do tipo 2 ocorrem preferencialmente nos isolados do haplótipo G5, duas explicações são possíveis: a) o tipo 2 é a seqüência típica da linhagem bovina; ou b) o gene AgB4 não truncado desta linhagem está em um local diferente no genoma. De qualquer modo, a presença da seqüência do tipo 1 em isolados com haplótipo G5 seria melhor explicado pela introgressão gênica (ver capítulo 4).

Capítulo 4. Considerações Finais

Tabela 5: Total de isolados caracterizados para os 3 marcadores (*cox1*, *mdh* e AgB4).

Haplótipo	<i>mdh</i>					AgB4		Total
	Md1/Md1	Md1/Md2	Md2/Md2	Md2/Md3	Md3/Md3	Tipo1	Tipo2	
G1	23	39	55	1	2	119	1	120
G2	-	1	1	-	-	2	-	2
G5	-	2	-	-	20	4	18	22
G6	-	1	-	-	2	2	1	3
G7	-	-	-	-	1	1	-	1
Total	23	43	56	1	25	128	20	148

Embora estudos prévios tenham demonstrado uma alta diferenciação genética entre as linhagens de *E. granulosus* (Bowles *et al.*, 1992; Bowles e McManus, 1993a; Bowles e McManus, 1993b; Bowles *et al.*, 1995; Thompson e McManus, 2002; Nakao *et al.*, 2006), nosso estudo com dois marcadores nucleares aponta para um considerável grau de fluxo gênico entre elas. Para os dois genes nucleares pudemos identificar alelos (no caso de *mdh*) e seqüências características (no caso de AgB4) para as linhagens ovina e bovina. Enquanto nos parasitos da linhagem ovina (haplótipos G1 e G2) predominam dos alelos Md1 e Md2 para *mdh* e seqüências do tipo 1 para Agb4, nos isolados da linhagem bovina predominam o alelo Md3 e seqüências do tipo 2 (Tabela 5).

No futuro será interessante adicionar um número maior de marcadores à análise. Combinados aos dados do gene AgB4, nossos resultados indicam que o compartilhamento de alelos de *mdh* (capítulo 4) não se trata de um polimorfismo ancestral, mas é resultado de introgressão gênica. As implicações evolutivas e epidemiológicas desse achado são relevantes para o controle da doença.

Finalmente, nossos resultados sobre o polimorfismo do AgB4 confirmam o alto grau de redundância dos genes do AgB, conforme proposto previamente por estudos do nosso grupo. Comparando a diversidade das seqüências do tipo 1 e do tipo 2 (apenas da região do éxon 1, íntron e éxon 2) observamos que a do tipo 2 é menos variável nos níveis de diversidade nucleotídica e alélica (Tabela 4). Considerando que o número de cópias estimado nos parasitos da linhagem bovina é maior que nos da linhagem ovina (Haag *et al.*, 2006a), nossos dados estariam de acordo com a evolução em concerto dos genes. Os eventos de conversão gênica, que geram a evolução em concerto, são favorecidos quanto maior for o número de cópias e se os genes se encontram agregados em *clusters* (Graur e Li, 2000).

Porém, são necessários estudos mais aprimorados sobre os processos de divergência dos genes parálogos nessa família, que teriam gerado a grande diferenciação entre os genes AgB4 das linhagens ovina (seqüências tipo 1) e bovina (seqüências tipo 2). Uma vez que o AgB tem um importante papel na interação parasito-hospedeiro, conforme constatado por diversos estudos (Shepherd *et al.*, 1991; Rigano *et al.*, 2001; Gonzalez-Sapienza e Cachau, 2003; Rigano *et al.*, 2007; Graichen *et al.*, 2007), este tipo de investigação poderá identificar mais precisamente os mecanismos genéticos responsáveis pela adaptação do *Echinococcus* aos seus hospedeiros intermediários.

Referência Bibliográfica

- Arend A C, Zaha A, Ayala F J e Haag K L (2004) The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp Parasitol* 108 76-80.
- Barker G C (2002) Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 Suppl 1 S21-4.
- Bart J M, Knapp J, Gottstein B, El-Garch F, Giraudoux P, Glowatzki M L, Berthoud H, Maillard S e Piarroux R (2006) EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infect Genet Evol* 6 390-400.
- Borst P (2002) Antigenic variation and allelic exclusion. *Cell* 109 5-8.
- Bowles J e McManus D P (1993a) Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol* 57 231-9.
- Bowles J e McManus D P (1993b) NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol* 23 969-72.
- Bowles J, Blair D e McManus D P (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54 165-73.
- Bowles J, Blair D e McManus D P (1995) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110 (Pt 3) 317-28.
- Budke C M (2006) Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* 12 296-303.

- Chemale G, Haag K L, Ferreira H B e Zaha A (2001) *Echinococcus* granulosus antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol* 116 233-7.
- Chemale G, Ferreira H B, Barrett J, Brophy P M e Zaha A (2005) *Echinococcus* granulosus antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim Biophys Acta* 1747 189-94.
- Criscione C D, Poulin R e Blouin M S (2005) Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol Ecol* 14 2247-57.
- Cross G A, Wirtz L E e Navarro M (1998) Regulation of vsg expression site transcription and switching in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 91 77-91.
- Esch G W e Fernandez J C (1993) *A Functional Biology of Parasitism: ecological and evolutionary implications*. Chapman & Hall., London.
- Esch G W, Gibbons J W e Bourque J E (1975) An analysis of the relationship between stress and parasitism. *American Midland Naturalist* 93 339-353.
- Fernandez V, Ferreira H B, Fernandez C, Zaha A e Nieto A (1996) Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus* granulosus antigen B. *Mol Biochem Parasitol* 77 247-50.
- Fitch W M, Bush R M, Bender C A e Cox N J (1997) Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 7712-8.
- Frosch P, Hartmann M, Muhlschlegel F e Frosch M (1994a) Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Mol Biochem Parasitol* 64 171-5.
- Frosch P M, Muhlschlegel F, Sygulla L, Hartmann M e Frosch M (1994b) Identification of a cDNA clone from the larval stage of *Echinococcus* granulosus with

- homologies to the *E. multilocularis* antigen EM10-expressing cDNA clone. *Parasitol Res* 80 703-5.
- Gasser R B, Zhu X e McManus D P (1998) Display of sequence variation in PCR-amplified mitochondrial DNA regions of *Echinococcus* by single-strand conformation polymorphism. *Acta Trop* 71 107-15.
- Gauci C, Heath D, Chow C e Lightowers M W (2005) Hydatid disease: vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine. *Expert Rev Vaccines* 4 103-12.
- Gemmell M A (1990) Australasian contributions to an understanding of the epidemiology and control of hydatid disease caused by *Echinococcus granulosus*- past, present and future. *Int J Parasitol* 20 431-56.
- Gonzalez-Sapienza G e Cachau R E (2003) Identification of critical residues of an immunodominant region of *Echinococcus granulosus* antigen B. *J Biol Chem* 278 20179-84.
- Graichen D A, Gottstein B, Matsumoto J, Muller N, Zanotto P M, Ayala F J e Haag K L (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.
- Graur D e Li W-H: (2000) Gene Duplication, Exon Shuffling, and Concerted Evolution, *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., pp. xiv, 481.

- Haag K L, Araujo A M, 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 K L, Araujo A M, Gottstein B, Siles-Lucas M, Thompson R C e Zaha A (1999) Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? Parasitology 118 (Pt 1) 63-71.
- Haag K L, Alves-Junior L, Zaha A e Ayala F J (2004) Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. Gene 333 157-67.
- Haag K L, Gottstein B, Muller N, Schnorr A e Ayala F J (2006a) Redundancy and recombination in the *Echinococcus* AgB multigene family: is there any similarity with protozoan contingency genes? Parasitology 133 411-9.
- Haag K L, Zanotto P M, Alves-Junior L, Gasser R B, Zaha A e Ayala F J (2006b) Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. Infect Genet Evol 6 251-61.
- Henrichsen J (1995) Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 33 2759-62.
- Kamenetzky L, Muzulin P M, Gutierrez A M, Angel S O, Zaha A, Guarnera E A e Rosenzvit M C (2005) High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. Parasitology 131 805-15.
- Kimura M (1991) Recent development of the neutral theory viewed from the Wrightian tradition of theoretical population genetics. Proc Natl Acad Sci U S A 88 5969-73.

- Kloetzel K e Pereira J A (1992) Human hydatidosis in Rio Grande do Sul (brazil): an estimate of its significance for the public health of the country. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 34 549-55.
- Lewontin R C (1974) The problem of genetic diversity. *Harvey Lect* 70 Series 1-20.
- Lightowlers M W e Gottstein B: (1995) Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and moleculular diagnosis. In: Thompson, R C e Lymbery, A J (Eds.), *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, pp. 355-410.
- Lightowlers M W, Liu D Y, Haralambous A e Rickard M D (1989) Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 37 171-82.
- Lymbery A J (1992) Interbreeding, monophyly and the genetic yardstick: species concepts in parasites. *Parasitol Today* 8 208-11.
- Machado C R, Augusto-Pinto L, McCulloch R e Teixeira S M (2006) DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat Res* 612 40-57.
- Maddison S E, Slemenda S B, Schantz P M, Fried J A, Wilson M e Tsang V C (1989) A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDA. *Am J Trop Med Hyg* 40 377-83.
- Mamuti W, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Ishikawa Y, Yamasaki H, Lightowlers M W e Ito A (2006) Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitol Int* 55 Suppl S57-62.

- McManus D P e Simpson A J (1985) Identification of the *Echinococcus* (hydatid disease) organisms using cloned DNA markers. *Mol Biochem Parasitol* 17 171-8.
- McManus D P e Thompson R C (2003) Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127 Suppl S37-51.
- Monteiro K M, Scapin S M, Navarro M V, Zanchin N I, Cardoso M B, da Silveira N P, Goncalves P F, Stassen H K, Zaha A e Ferreira H B (2007) Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim Biophys Acta* 1774 278-85.
- Musiani P, Piantelli M, Lauriola L, Arru E e Pozzuoli R (1978) *Echinococcus granulosus*: specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. *J Clin Pathol* 31 475-8.
- Nakao M, McManus D P, Schantz P M, Craig P S e Ito A (2006) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 1-10.
- Nicholas K B e N, H B (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distribuído pelos autores.
- Ohta T (1996) The current significance and standing of neutral and neutral theories. *Bioessays* 18 673-7; discussion 683.
- Oriol R, Williams J F, Perez Esandi M V e Oriol C (1971) Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am J Trop Med Hyg* 20 569-74.

- Price P W (1980) Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, Princeton, N.J., xi, 237 ill.
- Rickard M D, Davies C, Bout D T e Smyth J D (1977) Immunohistological localisation of two hydatid antigens (antigen 5 and antigen b) in the cyst wall, brood capsules and protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (ovine and equine) and *E. multilocularis* using immunoperoxidase methods. J Helminthol 51 359-64.
- Rigano R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzara 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 69 288-96.
- Rigano 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.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio J C, Messeguer X e Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19 2496-7.
- Sanchez F, March F, Mercader M, Coll P, Munoz C e Prats G (1991) Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoscoleces and cysts of *Echinococcus granulosus* from human origin. Parasite Immunol 13 583-92.
- Schantz P M, Chai J M, Craig P S, Eckert J, Jenkins D J, Macpherson C N L e Thakur A: (1995) Epidemiology and control of hydatid disease. In: Thompson, R C e Lymbery, A J (Eds.), *Echinococcus* and hidatid disease. Cab. International, Wallingford, pp. 233-332.

- Shepherd J C, Aitken A e McManus D P (1991) A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol Biochem Parasitol* 44 81-90.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F e Higgins D G (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25 4876-82.
- Thompson R C A: (1995) Biology and Systematics of *Echinococcus*. in: In: Lymbery., R C A T a A J (Ed.), *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, pp. 1, 50.
- Thompson R C e McManus D P (2002) Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18 452-7.
- Torgerson P R (2006) Canid immunity to *Echinococcus* spp.: impact on transmission. *Parasite Immunol* 28 295-303.
- Torgerson P R e Heath D D (2003) Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127 Suppl S143-58.
- Williams R J e Sweatman G K (1963) On the Transmission, Biology and Morphology of *Echinococcus Granulosus Equinus*, a New Subspecies of Hydatid Tapeworm in Horses in Great Britain. *Parasitology* 53 391-407.
- Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz P M, Craig P S e Ito A (2006) *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: discovery and epidemiological implications. *Parasitol Int* 55 Suppl S233-6.

Yarzabal L A, Dupas H, Bout D, Naquira F e Capron A (1977) *Echinococcus* granulosus: the distribution of hydatid fluid antigens in the tissues of the larval stage. II. Localization of the thermostable lipoprotein of parasitic origin (antigen B). *Exp Parasitol* 42 115-20.

Zhang L, Gasser R B, Zhu X e McManus D P (1999) Screening for different genotypes of *Echinococcus* granulosus within China and Argentina by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 329-34.