

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Averiguação da localização sub-telomérica dos genes do antígeno B de
*Echinococcus***

Ana Cristina Arend

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

Orientadora: Dra. Karen Luisa Haag

Co-orientador: Dr. Hernando del Portillo

Porto Alegre, abril de 2005.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de *Drosophila* - Departamento de Genética - Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório do Dr. Hernando del Portillo - Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), pela Network for Research and Training in Parasitic Disease (RTPD- Network) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

...olhos abertos, o longe é perto o que vale é o sonho....

Agradecimentos

À Dra. Karen Luisa Haag: quero ser assim quando crescer...

Ao Dr. Hernando del Portillo pelo auxílio na realização desse trabalho;

Ao Dr. Bruno Gottstein pelo envio do material de *E. multilocularis*;

À Dra. Vera Gaiiesky por ter permitido a realização desse trabalho no seu laboratório

Ao pessoal do laboratório de parasitologia da USP: Juliana, Márcio, Fernando, Sérgio, Pamela, Daniela, Carmem e Andréa;

Ao pessoal do laboratório de Drosophila em especial: Mônica, Aninha, Maríndia, Fabiano, Rosane e Adriana

Ao pessoal do laboratório: Raquel, Jéferson e especialmente o Dani;

Ao pessoal do café: Ernesto, Nico, Adriano e Ana Moraes;

As amigas: Clarisse, Gecele e Priscila;

Aos colegas de departamento;

Ao Elmo e a Ellen;

Ao PPGBM;

À minha mãe e ao meu irmão: obrigada por tudo!!!

Índice

Lista de Abreviaturas.....	7
Resumo	8
Abstract	9
1. Introdução.....	10
1.1 Os parasitas	10
1.2 O gênero <i>Echinococcus</i>	11
1.2.1 <i>Echinococcus granulosus</i>	15
1.2.1.1 Ciclo Biológico	15
1.2.1.2 Distribuição e transmissão	19
1.2.1.3 Aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento	22
1.2.1.4 Controle e prevenção.....	24
1.2.1 <i>Echinococcus multilocularis</i>	25
1.2.2 Os Cromossomos de <i>Echinococcus</i>	26
1.3 O Antígeno B	27
1.3.1 Os Genes do Antígeno B	28
1.4 Genes de Contingência.....	31
1.5 Telômeros.....	33
2. Objetivos	38
3. Material e Métodos.....	39
3.1 Material biológico	39
3.1.1 Extração de DNA	39
3.1.2 Isolados utilizados	40
3.2 TRF (<i>Telomere Restriction Fragment</i>)	41
3.2.1 <i>Southern blot</i>	42
3.2.1.1 Preparação das sondas.....	43
3.2.1.1.1 Sonda telomérica (sonda tel).....	43
3.2.1.1.2 Sonda <i>AgB</i>	43
3.2.1.1.3 Sonda <i>pAgB</i>	45
3.2.1.2 Marcação das sondas.....	45
3.2.1.3 Pré-hibridização e Hibridização	45
3.2.1.4 Lavagens de hibridização	46
3.2.1.5 Reação de detecção	47
3.2.1.6 Remoção da sonda.....	47
3.3 Digestão com <i>Bal31</i>	48
3.4 PFGE	49
3.4.1 Preparação dos blocos de agarose	49
3.4.1.1 Digestão dos blocos.....	50
3.4.2 Condições de migração	50
3.5 XL-PCR (<i>Extra Long Polymerase Chain Reaction</i>).....	51
3.5.1 Primers	51
4 Resultados	53

4.1	Co-localização do <i>AgB</i> e da seqüência telomérica.....	53
4.2	Identificação do tamanho da região telomérica.....	55
4.3	Separação de grandes fragmentos cromossômicos	56
4.4	Produtos de XL-PCR.....	58
5	Discussão	60
5.1	Conclusões	66
5.2	Considerações finais e perspectivas	66
6	Referências Bibliográficas	68

Lista de Abreviaturas

ATM	Atmosfera
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminatetracético
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FISH	Fluorescent in Situ Hybridization
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
LA-PCR	<i>Long and Accurate Polymerase Chain Reaction</i>
mb	Mega Base
min	Minuto
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanogramas
pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TRF	Telomere Restriction Fragment
U	Unidade
vol	volume
V	Volts
XL-PCR	Extra Long Polymerase Chain Reaction
pmois	Picomóis
³² P	isótopo 32 do fósforo
µg	Micrograma
µl	Microlitros
°C	graus Celsius

Resumo

A forma larval de *Echinococcus granulosus* (metacestóide) é o agente causador da hidatidose cística, zoonose endêmica no Rio Grande do Sul. Essa parasitose caracteriza-se pelo crescimento de uma massa cística preenchida de líquido hidático que causa compressão em órgãos e tecidos vizinhos. O antígeno B (AgB) é um dos maiores componentes do líquido hidático. Apesar da função do AgB ser mal conhecida, alguns indícios sugerem que ele está envolvido na interação parasito/hospedeiro. Sabe-se que os genes de contingência em microparasitas (protozoários e bactérias) são os responsáveis pela evasão da resposta imune do hospedeiro, e estão localizados, freqüentemente, na região sub-telomérica dos cromossomos. A localização sub-telomérica poderia estar relacionada com a alta variabilidade encontrada na família multigênica do AgB, uma vez que tais regiões costumam estar mais sujeitas à mutação.

No presente trabalho procuramos verificar a proximidade dos genes de *AgB* dos telômeros através de experimentos de *Southern blot* utilizando a técnica de TRF (*Telomere Restriction Fragment*) onde o DNA genômico de *E. granulosus* e *E. multilocularis* foi clivado com seis diferentes enzimas de restrição e hibridizado com um inserto que possui o motivo telomérico C₃TA₂ (caracterizado para *E. granulosus*) e re-hibridizado com produtos de PCR dos genes *AgB*, ambos marcados com fluoresceína. Os nossos resultados permitiram a identificação de heterogeneidade no tamanho dos telômeros de *E. granulosus*.

Ainda, utilizamos um PCR extra longo (XL-PCR) com *primers* específicos para os genes de *AgB* e um *primer* contendo o motivo telomérico de *E. granulosus*. Foram obtidos amplicons de aproximadamente 1600 pb para AgB2, AgB3 e AgB4, e de 1300 e 3500 pb para AgB3. Não foram obtidos amplicons para AgB1.

Com base nos dados obtidos neste trabalho, sugerimos que os genes *AgB2*, *AgB3* e *AgB4* estão localizados próximos a um motivo telomérico, mas ainda não podemos definir a precisa localização dos genes nos cromossomos.

Abstract

The larval stage of *Echinococcus granulosus* (metacestode) causes the cystic hydatid disease, an endemic zoonosis from the state of Rio Grande do Sul. The disease is characterized by the growth of a cyst filled with liquid (hydatid fluid), leading to the compression of the neighbouring organs and tissues. Although the biological role of antigen B (AgB) is still uncertain, several clues show that it is involved in the parasite/host interaction. Contingency genes are known to be responsible for the evasion of host immune response in microparasites, and are frequently localized in chromosome sub-telomeric regions. A sub-telomeric localization could be related to the high variability found in the AgB multigene family, since these regions are usually more prone to mutations.

In the present work we tried to verify the proximity of *AgB* genes to the telomeres with *Southern blot* experiments using the TRF (Telomeric Restriction Fragment) technique, where the genomic DNA from 35 *E. granulosus* and 5 *E. multilocularis* isolates were digested with 6 different restriction enzymes and hybridized with an insert containing the *E. granulosus* telomeric motif (C₃TA₂) and re-hybridized with PCR products derived from *AgB* genes, both labeled with fluorescein. Our results show heterogeneity in the *E. granulosus* telomere size.

Furthermore, we used an extra long PCR (XL-PCR) with specific primers for *AgB* genes and a primer containing the *E. granulosus* telomeric motif. We obtained amplicons with about 1600 bp for *AgB2*, *AgB3* and *AgB4*, and with 1300 and 3500 bp for *AgB3*. No amplicons were obtained using *AgB1* specific primers.

Based on these data, we suggest that the *E. granulosus* *AgB2*, *AgB3* and *AgB4* genes are localized in the vicinity of telomeric motifs, but we are still unable to define the precise localization of the genes at chromosomes.

1. Introdução

1.1 Os parasitas

"A história nos mostra que ao invés de existir um processo linear e relativamente simples de transição epidemiológica, no qual as chamadas doenças de pobreza são substituídas pelos males da modernidade, o que se observa é um quadro complexo de alterações, mudanças, adaptações e emergências típicas dos fenômenos vivos. A relação entre as populações de humanos, vetores e agentes etiológicos é bastante complexa e não parece estar no horizonte, para os próximos anos, a miragem de uma vida livre de infecções" (Barata, 2000).

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

Por volta de 1860, os fundamentos da ciência chamada de Parasitologia foram estabelecidos, e os parasitas foram identificados como os responsáveis por importantes doenças do homem e dos seus animais domésticos. Apesar de muitos parasitologistas terem qualificações médicas, a parasitologia estabeleceu-se como um ramo da história natural na metade do século XIX e foi nesse período que se constatou que a hidatidose e a trichinelose tinham parasitas como agentes patogênicos (Foster, 1965).

A partir do final do século XIX, com a publicação da teoria darwiniana da evolução, os estudos em Biologia passaram a seguir um novo paradigma. A Parasitologia, entretanto, sempre abordou questões funcionais e práticas, e somente a partir da metade do século XX começou a ter uma abordagem mais evolutiva e ecológica. Em 1980, a publicação da obra de Price forneceu as bases da Parasitologia evolutiva e, sem dúvida, incentivou inúmeros trabalhos nessa área.

Antigos males ainda persistem nos países em desenvolvimento, devido, em grande parte, ao não-acesso universal à educação e aos serviços básicos de saneamento e de saúde,

às condições socioeconômicas, sanitárias e higiênicas deficientes. Outros fatores como a não-implantação de políticas públicas que promovam o crescimento econômico, a não-distribuição igualitária de renda e contribuem para continuidade das doenças.

1.2 O gênero *Echinococcus*

O tumor líquido é conhecido desde a antiguidade e foi descrito pela primeira vez por Hipócrates e Gales. No entanto, a sua natureza parasitária era desconhecida. Goeze, em 1782, observou alguns protoescólices no líquido, indicando sua similaridade com os vermes, demonstrando que se tratavam de cestódeos. A forma adulta do parasita foi identificada, pela primeira vez, em 1786 por Batsch no intestino de um cão, e recebeu o nome de *granulosus*. Anos mais tarde, em 1805, Rudolphi deu o nome de *Echinococcus* ao gênero.

Em 1972 uma nova espécie, *E. vogeli*, foi identificada por Raush em canídeos selvagens da América do Sul. Tempos depois, na Colômbia, foi diagnosticado um caso de hidatidose humana devido a essa espécie. *E. vogeli* é maior que *E. granulosus* e suas proglótides são mais delgadas. Na América do Sul outra espécie pertencente ao gênero *Echinococcus*, o *E. oligarthus* Diesing, 1863 foi descrita em felinos selvagens e sua fase larval é encontrada em roedores (principalmente em agutis) na forma policística (Bourée, 2001). *E. multilocularis* é a segunda espécie mais amplamente distribuída do gênero, sendo encontrada em praticamente todo o Hemisfério Norte (figura 1A).

O gênero *Echinococcus* pertence à Classe Cestoda, Subclasse Eucestoda, Ordem Cyclophyllidea, Família Taeniidae e é composto de pelo menos quatro espécies reconhecidas: *E. multilocularis*, *E. oligarthrus*, *E. vogeli* e *E. granulosus*. Thompson e McManus (2002), sugerem a existência de uma quinta espécie, o *E. equinus*.

O parasita que utiliza o cavalo como hospedeiro intermediário foi descrito por Williams e Sweatman em 1963, como a subespécie *E. granulosus equinus*. No entanto,

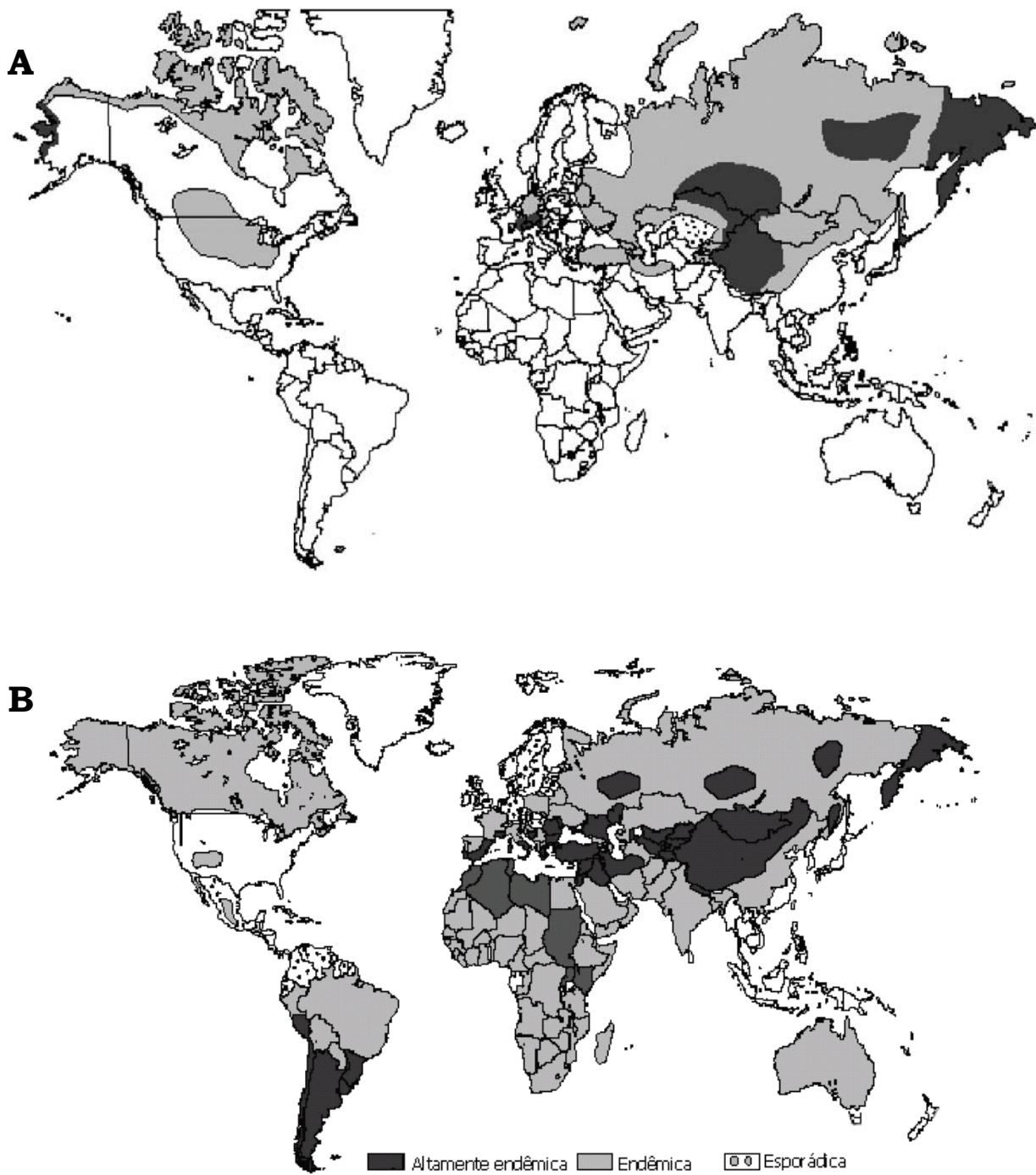


Figura 1: Mapa mostrando a distribuição de *E. multilocularis* em **A** e *E. granulosus* em **B**. (Adaptado de Torgenson e Budke, 2003).

estudos posteriores demonstraram que os padrões epidemiológicos e os hospedeiros variavam, e que o parasita que infecta os cavalos, diferentemente do que infecta ovinos, não é infectivo para os homens (Thompson e Smyth, 1975). Estudos moleculares recentes evidenciam que *E. g. equinus* é tão diferente de *E. granulosus* quanto de *E. multilocularis* o que suporta o status taxonômico da espécie *E. equinus*.

Os seres humanos são susceptíveis a quatro espécies, cujos metacéstodes (fase larval) podem se desenvolver em humanos causando vários tipos de equinococose. Enquanto o *E. granulosus* é o agente causador da equinococose cística, e o *E. multilocularis* causa a equinococose alveolar, o *E. vogeli* e o *E. oligarthrus* são os agentes causadores da equinococose policística que se distribui, principalmente, na América Central e do Sul.

A equinococose cística e a alveolar são as zoonoses mais importantes e as mais amplamente distribuídas (figura 1). Enquanto as parasitoses causadas pelo *E. vogeli* e *E. oligarthrus* ocorrem apenas na América do Sul e Central.

O gênero *Echinococcus* apresenta uma grande variabilidade fenotípica entre os diferentes isolados. Entre as espécies pertencentes a esse gênero a que apresenta maior variabilidade é *E. granulosus*. Essas variantes intraespecíficas foram identificadas através do seqüenciamento de DNA mitocondrial (principalmente, dos genes *cox1*- *Cytochrome C Oxidase 1* (Bowles e cols., 1992) e *Nad1*- *NADH dehydrogenase* (Bowles e McManus, 1993a)), e ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer-1*) de rDNA seguido de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Bowles e McManus, 1993b; Scott e cols., 1996).

Atualmente existem 8 diferentes linhagens (G1, G2, G3, G5, G6, G7, G8 e G9) descritas em *E. granulosus* (Thompson e McManus, 2002) (tabela 1). Elas diferem em caracteres que afetam a taxa de desenvolvimento, a infectividade em humanos, a patogenicidade e a antigenicidade.

Tabela 1: Linhagens de *E. granulosus* mostrando os diferentes hospedeiros intermediários e definitivos, assim com a sua distribuição geográfica (adaptado de Thompson e McManus, 2002).

Linhagem	Hospedeiro Intermediário	Hospedeiro Definitivo	Distribuição Geográfica
G1- ovino	Ovelha, gado, camelo, macropodos e humanos	Cachorro, raposa, dingo, jacal e hiena	Austrália, Europa, EUA, Nova Zelândia, África, China, Oriente Médio, América do Sul e Rússia
G2- ovelha da Tasmânia	Ovelha e humanos	Cachorro e raposa	Tasmânia e Argentina
G3- búfalo	Búfalo e humanos	Cachorro	Ásia
G5- bovino	Gado e humanos	Cachorro	Europa, África do Sul, Índia, Sri Lanka, Rússia e América do Sul
G6- camelo	Camelo, ovelha e humanos	Cachorro	Oriente Médio, China e Argentina
G7- porco	Porco e humanos	Cachorro	Europa, Rússia e América do Sul
G8- cervídeo	Cervídeos e humanos	Cachorro e lobo	Eurásia e América do Norte
G9- leão	Zebra, búfalo, vários antílopes e humanos	Leão	África

1.2.1 *Echinococcus granulosus*

Dentre as espécies que pertencem ao gênero *Echinococcus*, *E. granulosus* é a mais abundante e economicamente a mais importante, pois é o agente causador da hidatidose cística (Arambulo III, 1997). A hidatidose está presente em todos os continentes (figura 1B) atingindo animais de criação e também seres humanos.

O *E. granulosus* adulto é hermafrodita e o processo de fecundação pode ocorrer tanto por autofecundação, como já foi demonstrado *in vivo* (Smyth e Smyth, 1969; Kumaratilake e cols., 1986) como por fecundação cruzada, o que ainda não foi comprovado diretamente (Thompson e cols., 1995). Entretanto, alguns estudos genéticos (Lymbery e Thompson, 1988; Lymbery e cols., 1997; Haag e cols., 1998; Haag e cols., 1999) sugerem que as duas formas de fecundação podem ocorrer em populações de *E. granulosus*, sendo que a autofecundação constitui-se no sistema reprodutivo predominante.

O adulto de *E. granulosus* é um pequeno verme achatado que mede de 2 a 11 mm de comprimento e consiste de escólex (cabeça) e estróbilo (corpo) (figura 2). Vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo, nas criptas de Lieberkühn. O escólex é um órgão de fixação especializado que possui ganchos e músculos sugadores responsáveis pela fixação. Ele é composto por quatro ventosas e um rostelo fixo com um duplo círculo de pequenos ganchos (figura 2B) (Bourée, 2001). O estróbilo é segmentado e constituído por numerosas proglótides reprodutivas. A última proglótide é a maior e contém os ovos maduros.

1.2.1.1 Ciclo Biológico

Assim como os demais membros da família Taeniidae, o gênero *Echinococcus* requer dois hospedeiros mamíferos para completar seu ciclo biológico (figura 3): o hospedeiro definitivo, que é sempre um carnívoro (cão doméstico, raposa, lobo, dingo, hiena, chacal e leão), e o hospedeiro intermediário, que são geralmente herbívoros (principalmente cervídeos, ovinos, bovinos, suínos, caprinos, eqüinos, camelos, marsupiais

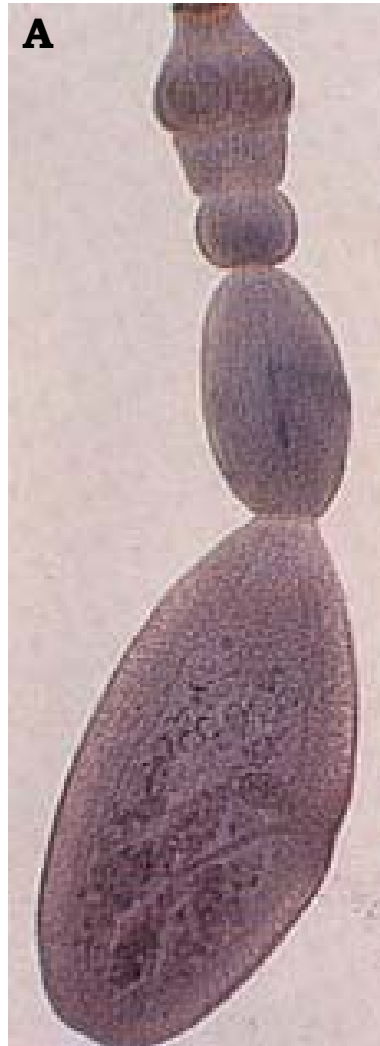


Figura 2: Verme adulto de *E. granulosis*. **A:** verme adulto mostrando o escólex e as proglótides. **B:** detalhe das estruturas em forma de gancho localizadas no escólex (Adaptado de www.viarura.l.com.ar/.../cestodesechinococcus.htm).

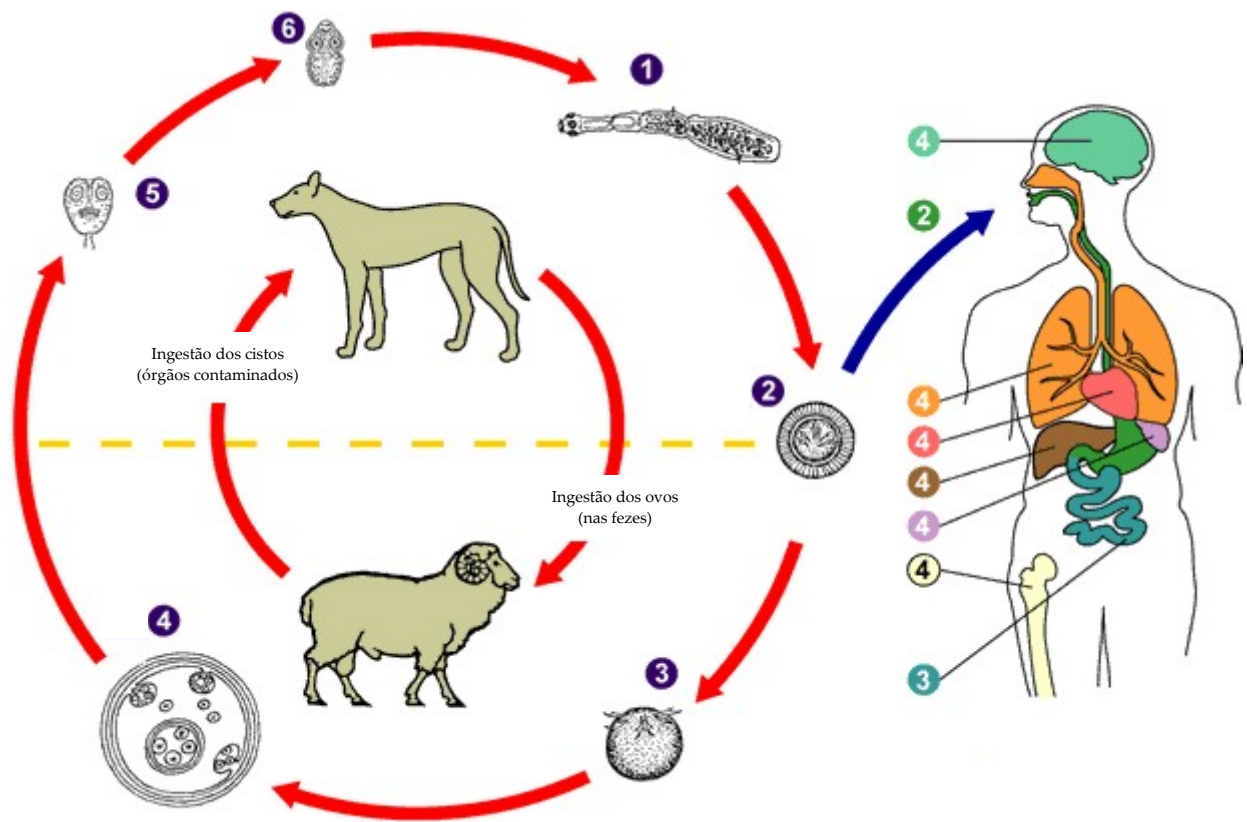


Figura 3: Ciclo de vida de *E. granulosus*. O verme adulto ① vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo (canídeos), produz ovos ② e os libera no ambiente junto com as fezes do hospedeiro. Cada ovo possui um embrião que, quando ingerido pelo hospedeiro intermediário (bovinos, ovinos, suínos e humanos), eclode e ativa uma oncosfera ③ que é capaz de invadir as paredes do intestino e migrar até o órgão onde se estabelecerá e formará o cisto hidático ou metacestódeo ④. O cisto hidático produz clonalmente os protoescolécexes ⑤. O hospedeiro definitivo se infecta pela ingestão das vísceras contaminadas. Ao passar pelo sistema digestivo do hospedeiro definitivo, os protoescolécexes evaginam ⑥, expondo as ventosas e ganchos e se fixam na parede do intestino onde se desenvolverá no verme adulto. Fonte: Division of Parasitic Diseases-CDC (<http://www.cdc.gov/page.do>).

e roedores) e, ocasionalmente, o homem (McManus e Smyth, 1986; Thompson e McManus, 2001).

A contaminação do ambiente e do hospedeiro intermediário é feita pela liberação dos ovos através das fezes do hospedeiro definitivo. Após a reprodução, a última proglótide está repleta de ovos que, quando liberados podem permanecer por até um ano no ambiente (Schantz e cols., 1995). Estima-se que um cão infectado por um único verme de *E. granulosus* libere cerca de 400 ovos a cada semana, sendo que um cão pode conter vários milhares de vermes adultos em seu intestino.

Os ovos do verme adulto são liberados junto com as fezes do hospedeiro infectado. Em aproximadamente 3 horas os ovos podem ser dispersos pelo vento, água e insetos em uma área de 30.000 ha (Bourée, 2001). O hospedeiro intermediário infecta-se com os ovos, que, ao serem ingeridos, dão origem à fase larval (metacestóide ou cisto hidático). Os ovos eclodem no estômago e/ou intestino delgado, liberando e ativando a oncosfera. Os ovos podem sobreviver 21 dias em água a 30°C, mais de 200 dias a 6°C, 10 minutos a 60°C, 6 minutos a 70°C, 1 minuto a 100°C e 24 horas a -70°C (Lawson e Gemmel, 1983).

A oncosfera penetra na mucosa intestinal atingindo a corrente sangüínea e linfática, posteriormente, migra para os órgãos, principalmente pulmões e fígado, podendo atingir outros órgãos como rins, coração e ossos (Thompson, 1995; Von Sinner, 1997) onde ocorre o desenvolvimento do metacestóide em alguns meses ou anos. O cisto pode variar muito de forma e tamanho, e um único órgão pode apresentar inúmeros cistos. A sua localização e morfologia não dependem apenas do hospedeiro, mas também da linhagem ou da espécie de *Echinococcus* envolvida (Torgenson e Budke, 2003).

O cisto hidático, formado pela infecção com a fase larval de *E. granulosus*, é constituído na sua face interna pela camada germinativa, que se apresenta envolta pela camada laminar acelular. A porção mais externa do cisto é constituída pela camada adventícia fibrosa que é produzida pelo hospedeiro. Em *E. multilocularis* ocorre a formação de pequenas vesículas sem a formação da camada adventícia.

A infecção com a fase larval de *E. granulosus*, que pode ser transmitida naturalmente entre humanos e outros animais, é endêmica no sul da América do Sul (figura 1B) (Eckert e cols., 2000). O homem infecta-se acidentalmente através do contato com cães infectados. Os ovos do parasita ficam presos nos pêlos ao redor do ânus dos cães e também podem ser encontrados no focinho e nas patas (Schantz, 1989). Entre os povos nômades de Turkana (Quênia) é comum que os cães, que fazem parte da comunidade, lambam mamadeiras e utensílios de cozinha (Bourée, 2001), facilitando, assim a transmissão da hidatidose.

A hidatidose pode ser uma doença hiperendêmica em zonas rurais como no norte e leste da África, América do Sul ou ser uma doença esporádica, como na Austrália (Bourée, 2001).

1.2.1.2 Distribuição e transmissão

Embora programas de controle da hidatidose tenham obtido sucesso em meados do século XIX e XX (Eckert e cols., 2000), recentes levantamentos indicam que a hidatidose ainda possui distribuição cosmopolita. A parasitose está presente em todos os continentes e em muitos países. Os mais altos índices de prevalência da doença são encontrados na Eurásia (principalmente nos países do Mediterrâneo), norte e leste da África, Austrália e América do Sul (figura 1B).

Há claras evidências que a hidatidose é uma doença emergente ou re-emergente em vários países da Ásia Central, leste da Europa, Israel e, principalmente, na China, onde em pelo menos 21 das suas 31 províncias (87% do território) a hidatidose é endêmica (Eckert e cols., 2000).

Na China, 94% dos bovinos e 88% de ovinos estão infectados e cerca de 84% dos abates ocorrem em casa. O contato homem-cão-ovelha é alto, com 82% das famílias tendo pelo menos um cachorro e 78% uma ovelha em casa. Aproximadamente 71% das famílias alimentam seus cães com vísceras contaminadas (Chi e cols., 1990).

Em Israel a incidência varia de 0,7 a 9 em 100.000 habitantes (El-On e cols., 1997). A hidatidose foi endêmica na região e a sua ocorrência foi esporádica nos últimos 40 anos, embora ela esteja ressurgindo desde 1960 com a importação de ovinos provenientes de regiões endêmicas. O ressurgimento da doença está associado ao fato do abate ser realizado em casa, e os órgãos contaminados dos animais abatidos servirem de alimento aos cães (Goldsmith e cols., 1991).

No Líbano, estima-se que todo rebanho de dromedários esteja infectado. Eles são vendidos para os açougues, ou morrem naturalmente e acabam sendo abandonados, servindo, então, de alimento para cães e chacais (Bourée, 2001). Na população cristã do Líbano os cachorros são considerados da família dos seus donos (essas áreas apresentam altos níveis de hidatidose), enquanto em áreas muçulmanas os cães não podem entrar nas casas. Nesse caso, a religião protege a população da doença (Bourée, 2001).

O homem pode se contaminar pelo contato direto com cães infectados e/ou alimentando-se de vegetais crus. Na Líbia, a principal fonte de infecção é a ingestão de vegetais crus infectados com as fezes de animais contaminados. Na Índia e no Sri Lanka, a infecção humana deve-se à ingestão de vegetais e água contaminados (Irshadullah e cols., 1989). No entanto, os humanos são hospedeiros intermediários acidentais e poucos contribuem para a transmissão da doença.

Em Turkana, no Quênia, as taxas de prevalência da doença são altas, variando entre 5 e 10% (Cooney e cols., 2004), pois há muitos cães infectados nessa área (Macpherson e cols., 1985). Além disso, as fezes dos cachorros são usadas no tratamento de feridas (Nelson, 1986), e o intestino dos chacais é um alimento muito apreciado. Os cadáveres de humanos não são enterrados, mas deixados no campo para serem “removidos pelos Deuses”. Esses cadáveres são devorados por hienas e outros animais que se alimentam de carniça. Com base nesses dados um programa piloto de controle da hidatidose foi iniciado nessa área com uma intensiva campanha educacional e tratamento dos cães (Macpherson e Macpherson, 1986). Apesar dos esforços, a menor soroprevalência (3%) ocorre na região litorânea, onde os cachorros alimentam-se principalmente de peixes (Kenny e MacCabe, 1993). Cooney e cols. em 2004 fizeram uma revisão dos dados cirúrgicos do hospital Kakuma Mission de julho de 1981 até maio de 2002. Eles identificaram 710 casos

cirúrgicos de hidatidose, sendo a idade média dos pacientes de 27 anos (as idades variaram entre 3 e 65 anos). Foram identificados cistos hepáticos, abdominais, intra-abdominais, retroperitoniais, no baço e na parede abdominal, sendo que um dos cistos apresentava um volume de sete litros.

No oeste da África a hidatidose humana é rara apesar da infestação de ovelhas e dromedários (Klungsoyr e cols., 1993). *E. granulosus* é endêmico na Somália, exceto nas áreas onde vivem as populações muçulmanas, que não têm contato direto com cães. No Marrocos, 80% dos dromedários estão infectados.

A região do Mediterrâneo é endêmica para hidatidose. A Argélia possui 69,8% dos ovinos e entre 42 e 56,5% do rebanho de bovinos infectados. A Itália entre 1990 e 1999 apresentava 86,9% do seu rebanho de ovinos contaminado. A hidatidose em humanos na região do Mediterrâneo apresenta os índices mais altos na Turquia, Marrocos, Itália e Egito com valores de 4,0; 7,1; 8,0 e 9,1 contaminados para cada 100.000 habitantes, respectivamente (Seimenis, 2003). Estudos realizados na região norte da Grécia demonstram que 31,3% dos ovinos, 10,3% dos bovinos e 0,6% dos suínos estão infectados (Sotiraki e cols., 2003).

Na Sardenha, onde 80% dos ovinos estão infectados, as perdas anuais com a diminuição no crescimento, queda na produção e qualidade da lã e aumento na mortalidade, principalmente durante o inverno são estimadas em mais de 20 milhões de liras (Attanasio e cols., 1985).

Na Argentina a hidatidose é endêmica em muitas províncias, aproximadamente 7% do rebanho bovino, 12,5% do ovino, 9,8% do suíno e 6% do caprino está infectado (dados fornecidos por SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agropecuaria, 1987–1996). A prevalência em humanos é de 1,9 por 100.000 habitantes. Em reservas indígenas e áreas rurais como as províncias de Neuquén, Chubut e Rio Negro, na região da Patagônia, a prevalência pode chegar a 14,9 por 100.000 habitantes (Kamenetzky e cols., 2002). A hidatidose humana na Argentina é o maior problema de saúde na região dos Andes, onde a ocorrência da doença é de 9,1%, sendo 3,4% no fígado, 2% nos pulmões e 3,7% em ambos os órgãos (Moro e cols., 1997). No Uruguai, calcula-se que

aproximadamente 19 milhões de animais (ovinos e bovinos) estejam infectados (Bonifacino e cols., 1991).

O Rio Grande do Sul é zona endêmica dessa parasitose, principalmente nas cidades que fazem fronteira com o Uruguai ou com a Argentina (Eckert e cols., 2000). Estima-se que cerca de 3% do rebanho gaúcho de ovinos esteja infectado com *E. granulosus*, para bovinos os números chegam a 25%, e foram registrados oficialmente 716 casos de infecção de humanos entre 1981 e 1999 (Farias e cols., 2004). Somando-se a isso a expectativa que os dados oficiais reflitam apenas uma parcela da realidade, tem-se caracterizado o estado do Rio Grande do Sul como uma área endêmica para esta parasitose.

O efeito mais importante da hidatidose em rebanhos domésticos é o impacto econômico. Entre as perdas podemos destacar a diminuição na produção de leite, perda de peso, diminuição nas taxas de reprodução e diminuição no valor da lã e do couro dos animais infectados (Torgerson e Budke, 2003). Em bovinos a hidatidose provoca grandes perdas econômicas em decorrência das condenações em frigoríficos, só no Rio Grande do Sul 500.000 fígados de bovinos são condenados anualmente (de La Rue e Santos, 1997).

1.2.1.3 Aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento

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

Devido à proliferação do metacéstóide em forma de tumor, a infecção com o *E. multilocularis* é a mais severa. O metacéstóide desenvolve-se rapidamente e a morte do hospedeiro pode ocorrer em até 5 meses após a infecção. Roedores infectados experimentalmente apresentaram aumento do abdômen e do peso corporal devido à proliferação do metacéstóide, fraqueza, apatia e anorexia (Torgerson e Budke, 2003).

A infecção com a fase larval de *Echinococcus* é caracterizada por um longo tempo de crescimento do metacéstóide no hospedeiro intermediário. Os casos mais extremos

registrados constam de um cavalo que portou um cisto de *E. granulosus* por 16 anos (Roneus e cols., 1982), e um homem com um cisto de *E. granulosus* durante 53 anos (Spruance, 1974). A habilidade do parasita sobreviver durante um tempo tão longo no hospedeiro implica na existência de estratégias para enganar ou evitar uma resposta imune protetiva do hospedeiro (Zhang e cols., 2003a).

O diagnóstico da hidatidose cística está baseado em achados clínicos, anamnese, dados epidemiológicos, características reveladas em técnicas por imagem (ultra-som, raios-X, tomografia computadorizada, ressonância magnética por imagem) e testes imunológicos (Thompson e cols., 1995).

As proteínas do parasita que possuem o maior valor diagnóstico em detectar *E. granulosus* são o antígeno 5 (Ag5) e o antígeno B (AgB).

O Ag5 em condições redutoras apresenta subunidades de 24 e 38 kDa, em condições não redutoras se apresenta como heterodímero ligado por pontes dissulfeto com aproximadamente 67 kDa (Lightowers e cols., 1989). Poucos estudos são realizados com o objetivo de avaliar o valor clínico dos testes baseados no Ag5 recombinante, provavelmente devido à sua baixa especificidade (Ortona e cols., 2003).

Os recombinantes de AgB têm sido os mais estudados. Embora evidências imunológicas sugiram que ele tenha alto valor diagnóstico, sua importância no monitoramento e eficiência do tratamento farmacológico é desconhecida (Ortona e cols., 2000).

O AgB é altamente imunogênico em infecções humanas e o seu valor diagnóstico é reconhecido quando se analisa os diferentes componentes do líquido hidático. Diversos estudos estão sendo realizados com o objetivo de isolar e caracterizar os genes que codificam antígenos de *E. granulosus*, e expressá-los em *Escherichia coli*, podendo assim, melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes de imunodiagnóstico (Ferreira e Zaha, 1994; Rott e cols., 2000; Virginio e cols., 2003).

Rott e cols. (2000) testaram o AgB nativo e duas formas recombinantes (rAgB1 e rAgB2) em um teste de ELISA anti Ig-G que demonstrou que o rAgB2 possui maior

especificidade (83,87%) e sensibilidade (98,28%) quando comparado com o AgB nativo (81,9% e 77,41%, respectivamente) e com o rAgB1 (80,17% e 54,84%). Estudos recentes (Virginio e cols., 2003) utilizando seis antígenos recombinantes demonstraram que o rAgB2 apresentou maior sensibilidade (93,1%) e especificidade (99,5%) sugerindo que este antígeno pode ser utilizado em testes para o imunodiagnóstico da hidatidose humana.

González-Sapienza e cols. (2000) analisaram a antigenicidade do AgB utilizando sete peptídeos sintéticos que se sobrepõem parcialmente às duas subunidades do AgB. Os resultados desse estudo indicam que os epítomos dominantes para humanos estão localizados na extremidade N-terminal do AgB1.

A hidatidose apresenta dois tipos de tratamento: quimioterápico e cirúrgico. O tratamento cirúrgico pode causar acidentes anafiláticos e alergias, além da possibilidade de formação de cistos secundários se, acidentalmente, ocorrer a ruptura do cisto. Apesar dos riscos a cirurgia é a mais recomendada. Sempre que a cirurgia não for disponível, recorre-se ao tratamento quimioterápico com albendazol e mebendazol (Rey, 2001).

1.2.1.4 Controle e prevenção

Um programa efetivo de combate à hidatidose deve evitar a transmissão do *E. granulosus* numa grande área geográfica e impedir o seu retorno. A dinâmica da transmissão da doença está baseada nos hospedeiros definitivos e intermediários, que variam de acordo com a região que está sendo estudada. Além disso, inúmeros fatores podem interferir na viabilidade dos cistos e dos ovos e, conseqüentemente, na transmissão da doença. Um programa de controle dessa parasitose (incluindo campanhas educacionais e tratamento dos cachorros) deve levar esses fatos em consideração para obter sucesso.

Na Austrália, com uma intensa profilaxia, ou seja, eliminando cães de rua e tratando os domésticos, os níveis de endemia têm caído, uma vez que sem o contato homem-cão os riscos de infecção são baixos. Entretanto, na região oeste da Austrália, um ciclo artificial de transmissão estabeleceu-se com os cães de caçadores ilegais que os alimentam com as vísceras dos animais caçados (porcos e cangurus) (Thompson e cols.,

1993). A ocorrência do ciclo sinantrópico da doença no qual animais selvagens servem como importantes reservatórios para sua transmissão é, também, um importante fator limitante para eliminação total dessa parasitose.

A província de Rio Negro, na Argentina em 1983 apresentava índices de infecção com *E. granulosus* de 5,6% nas crianças com idades entre 7 e 13 anos. Um programa baseado principalmente na desvermifugação dos cães foi implantado entre 1980 e 2000. Os índices de infecção diminuíram significativamente: de 5,6% para 1,1% em 1998 (Larrieu e cols., 2002). Nesse trabalho também foram analisados os principais fatores de risco, sendo os principais: ter um membro da família com a doença, entrar em contato com um grande número de cães nos primeiros anos de vida e ter pais que trabalham abatendo ovinos.

Farias e cols., em 2004 relataram a tentativa de implantação de um programa de controle da hidatidose cística na cidade de Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. O controle estava baseado na utilização de drogas anti-parasitárias em cães. Apesar de mostrar uma diminuição no número de cães infectados o projeto falhou em conscientizar a população rural em relação à profilaxia da doença, bem como em estabelecer um programa permanente de controle desta parasitose no município.

1.2.1 *Echinococcus multilocularis*

E. multilocularis é a segunda espécie mais amplamente distribuída do gênero, sendo encontrada principalmente na região paleo e neo-Ártica (figura 1A). Seu ciclo de vida é muito parecido com o de *E. granulosus*, embora os hospedeiros sejam diferentes. O hospedeiro definitivo mais comum é a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) que mantém o ciclo selvagem do parasita através da predação de pequenos roedores da família Arvicolidae, que são os principais hospedeiros intermediários desta espécie.

Além do ciclo selvagem, *E. multilocularis* pode apresentar ciclos sinantrópicos, onde o hospedeiro definitivo pode ser o cão ou o gato doméstico e o hospedeiro intermediário o homem (Thompson, 1995; Petavy e cols., 2000; Craig e cols., 2000).

A infecção com a larva de *E. multilocularis* provoca a hidatidose alveolar, uma forma menos comum, porém muito mais grave da doença hidática. Diferentemente da hidatidose cística, esta doença caracteriza-se pela formação de uma estrutura multivesicular complexa, capaz de infiltrar tecidos e geralmente com capacidade de induzir a formação de metástase, através de pequenas vesículas que, após se desprenderem da massa original, migram através do corpo pela corrente sanguínea ou linfática. A massa larval geralmente contém uma matriz semi-sólida ao invés de líquido.

A infecção com o metacestóide ocorre devido ao contato com animais infectados (raposas, cães ou gatos) ou diretamente com o ambiente contaminado com ovos. Geralmente as regiões agrícolas ou as periferias são as mais contaminadas com *E. multilocularis*, devido ao ciclo selvagem mantido pelas raposas. Entretanto, nas últimas décadas o número de raposas vivendo nas cidades européias tem aumentado enormemente, e existe uma preocupação crescente, pois estas raposas podem ser portadoras do verme adulto e poderiam representar um grande perigo para a saúde pública (Deplazes e cols., 2004).

1.2.2 Os Cromossomos de *Echinococcus*

O número cromossômico de *E. granulosus* foi determinado por Smyth em 1962 e apresenta número diplóide de 18. São cromossomos pequenos sendo o maior deles com tamanho de 1 μ m.

A dificuldade de cultivo das células em laboratório, assim como de obtenção de células frescas em mitose (menos de uma célula por protoescólices) (Smyth, 1962) limitam a realização de outros trabalhos em citologia com esses organismos.

Utilizando células provenientes de tecidos do estróbilo e da fase larval, foi realizada análise do cariótipo de *E. multilocularis*. O número diplóide de cromossomos encontrados em 95% das células analisadas, assim como em *E. granulosus*, foi de 18 (Rausch e Rausch, 1981).

1.3 O Antígeno B

Durante a fase de metacéstóide, o parasita cresce em tamanho devido à secreção de líquido no interior da massa larval. Este líquido chamado de líquido hidático, é uma complexa mistura de moléculas tanto de origem do parasita quanto do hospedeiro. Dentre os vários componentes desta mistura, encontramos sais inorgânicos, ácidos nucleicos e muitas proteínas (McManus e Bryant, 1995). Entre as proteínas mais abundantes destaca-se o AgB, que compõe cerca de 10% da massa de proteínas do fluído (Oriol e cols., 1971) Esse alto conteúdo pode estar relacionado a uma importante função do antígeno, que é uma molécula imunorregulatória.

O AgB já foi localizado na camada laminar, na camada germinativa, na parede das cápsulas prolíferas (Rickard e cols., 1977), no tegumento de protoescólices e no interior de cápsulas prolíferas (Yarzabal e cols., 1977). O AgB também foi localizado por Sanchez e cols. (1991) nas células do parênquima de protoescólices.

Ele é uma lipoproteína termoestável e polimérica com peso molecular que varia de 120 a 160 kDa (Oriol e cols., 1971; Oriol e Oriol, 1975). A análise do antígeno nativo revelou que quando em gel desnaturante, apresenta padrão do tipo escada com bandas de 8, 16, 24 e 32 kDa, sugerindo que ele seja composto por polímeros de 8 kDa (Lightowers e cols., 1989).

Gonzalez e cols. (1996) analisaram a composição das subunidades do AgB nativo e demonstraram que duas isoformas do AgB, AgB1 (Shepherd e cols., 1991; Frosch e cols., 1994; Rott e cols., 2000) e AgB2 (Fernandez e cols., 1996) estavam presentes nas bandas de 8, 16 e 24 kDa. Esses dados sugerem que os diferentes peptídeos sejam subunidades utilizadas para construir blocos maiores.

O AgB é homólogo a um grupo de proteínas hidrofóbicas que são ricas em α -hélices, e parecem ser específicas de helmintos. Tais proteínas, assim como o AgB, são oligoméricas e compostas por pequenas subunidades que variam entre 7-11 kDa e são boas candidatas à serem utilizadas no imunodiagnóstico (Saghir e cols., 2000; Chemale e cols., 2001).

Esse antígeno tem sido muito estudado, principalmente pela sua importância no diagnóstico da hidatidose. Trata-se de uma proteína com atividade proteolítica, que induz apoptose em células polimorfonucleadas de pacientes que apresentam hidatidose (Rigano e cols., 2002). O AgB explora a ativação de células T, alterando resposta Th1/ Th2, (Rigano e cols., 2001) promovendo uma resposta Th2 não protetora. Além disso, atua na evasão da resposta imune inicial, inibindo elastases e a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* (Shepherd e cols., 1991).

Experimentos de *Western blot* utilizando antígenos provenientes do cisto hidático de uma ovelha e soro de camundongos infectados com oncosferas ativadas revelaram que um antígeno de aproximadamente 8 kDa é o primeiro a ser reconhecido pelo sistema imune após 5 semanas de infecção. Uma banda de 16 kDa foi identificada após 7 semanas e outra de 24 kDa após 10 semanas. Esse padrão parece coincidir como o modelo de AgB, sugerindo que ele é o primeiro antígeno a ser reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro (Zhang e cols., 2003b).

1.3.1 Os Genes do Antígeno B

Os genes que codificam o AgB são representados em várias cópias no genoma, constituindo uma família gênica (Chemale e cols., 2001). Experimentos de *Southern blot* sugerem que pelo menos sete cópias dos genes que codificam o AgB estejam presentes no genoma de *E. granulosus* (Haag e cols., 2004), dos quais, até o momento, foram caracterizados cinco genes: *AgB1* (Frosch e cols., 1994), *AgB2* (Rott e cols., 2000), *AgB3* (Chemale e cols., 2001), *AgB4* (Arend e cols., 2004) e *AgB5* (Haag e cols., 2004). A transcrição dos genes *AgB1*, *AgB2*, *AgB3* e *AgB4* foi confirmada pelo isolamento de seus respectivos cDNA, entretanto mais evidências experimentais são necessárias para confirmar se estas distintas isoformas realmente codificam subunidades particulares do AgB.

Em 1991 foi isolada a primeira seqüência relacionada ao AgB, a qual se tratava de uma seqüência de cDNA parcial da porção carboxi-terminal da menor subunidade do AgB, e apresentava 275 pb (Shepherd e cols., 1991). Frosch e cols. (1994) isolaram uma

seqüência de cDNA completa (331 pb) com uma fase aberta de leitura (243 pb) que codifica a subunidade menor do AgB (8 kDa).

A seqüência deduzida da proteína final apresenta 14 aminoácidos hidrofóbicos na porção N-terminal codificada pelo segundo éxon, seguidos por dois sítios de clivagem da peptidase eucariótica, que sugerem que o AgB seja uma proteína secretória. No mesmo estudo, Frosch e cols. (1994) identificaram diferentes seqüências de aminoácidos e nucleotídeos quando analisaram diferentes isolados de diversas áreas geográficas, sugerindo a existência de polimorfismo.

Um fragmento de cDNA parcial de *E. multilocularis* que apresentava 93,9% de identidade nucleotídica com a seqüência de AgB1 de *E. granulosus* foi isolado em 1994 por Frosch e cols. Posteriormente, Mamuti e cols. (2004) isolaram a seqüência nucleotídica completa do AgB de *E. multilocularis*, que possui uma fase aberta de leitura de 255 pb e codifica uma cadeia polipeptídica de 85 aminoácidos. A comparação das seqüências deduzidas de aminoácidos de AgB1 de *E. granulosus* e *E. multilocularis* mostrou uma identidade de 92,6% (Mamuti e cols., 2004).

Com o objetivo de obter mais informações sobre os genes que codificam o AgB, Rott e cols. (2000) isolaram e sequenciaram uma seqüência genômica de 351 pb que correspondia ao fragmento genômico da seqüência de cDNA descrita anteriormente para AgB1. Essa seqüência apresenta um íntron de 92 pb e dois éxons.

Uma segunda seqüência de cDNA completa relacionada o AgB foi isolada por Fernández e cols. (1996). Essa seqüência apresenta um íntron de 68 pb e dois éxons. A seqüência completa possui 40% de identidade nucleotídica com a seqüência isolada anteriormente, além de apresentar os mesmos possíveis sítios de digestão das peptidases eucarióticas, sugerindo que esse clone também codifique uma subunidade secretória do AgB. A análise de *Southern blot* genômico e das seqüências nucleotídicas indicava tratar-se de outro gene (chamado de *AgB2*).

A análise comparativa entre os dois genes até então descritos (*AgB1* e *AgB2*) indicou que: a) as seqüências nucleotídicas de *AgB1* e *AgB2* mostram uma identidade de 53,3% nos éxons e 50% no íntron, b) a diversidade nucleotídica no segundo éxon é maior

do que no primeiro e até maior do que no íntron (Arend e cols., 2004; Rott e cols., 2000) e c) a diversidade dos aminoácidos é maior que a dos nucleotídeos (Rott e cols., 2000).

Chemale e cols. (2001) e Arend e cols (2004) utilizando *primers* específicos para *AgB1* e *AgB2* isolaram um terceiro e quarto gene que codificam o AgB de *E. granulosus*, respectivamente. Os autores também demonstraram que esses genes são transcritos, sugerindo a possibilidade da existência de mais genes codificadores do AgB.

Frosch e cols. (1994) identificaram variação de nucleotídeos em posições conservadas de cDNAs que codificam o *AgB1*, provenientes de diferentes isolados. Posteriormente, Haag e cols. (1998) estudando o *AgB1* demonstraram um excesso de substituições não-sinônimas em relação às sinônimas na região codificadora de seqüências derivadas de linhagens distintas do parasita, sugerindo a ocorrência de seleção positiva.

Arend e cols. (2004) encontraram um alto grau de polimorfismo em seqüências genômicas de *AgB2* e *AgB4* e nas de cDNA correspondentes isoladas de um único cisto. O mesmo estudo identificou uma seqüência genômica com características de mRNA. Essa seqüência não apresenta a região correspondente ao íntron além de uma deleção de 45 pb no éxon 2 que apresenta sinais conservados de *splicing*.

Estudos posteriores (Haag e cols., 2004) identificaram o mesmo polimorfismo para as seqüências genômicas de *AgB1*, *AgB2*, *AgB3* e *AgB4* isoladas a partir de protoescólices individuais, sugerindo que os genes estejam representados em múltiplas cópias no genoma de *E. granulosus*.

Os parasitas possuem uma imensa gama de mecanismos pra evadir a resposta imune do hospedeiro. Em protozoários a variabilidade dos antígenos de superfície deve-se ao fato da duplicação dos genes que os codificam e do seu arranjo em tandem (Borst, 2002).

Haag e cols. (2004) analisando as relações filogenéticas entre as diferentes seqüências de *AgB* sugerem a ocorrência de hipermutação somática para explicar a variabilidade encontrada entre as seqüências de *AgB* derivadas de um único protoescólice. Além disso, a duplicação do mesmo gene de *AgB* dentro do genoma, assim como a

variação clonal entre os alelos de diferentes protoescólices podem ser os responsáveis pela diversidade das seqüências encontradas no estudo.

Também é importante destacar que alguns genes responsáveis pela variação antigênica em microparasitas (protozoários e bactérias) possuem localização subtelomérica, onde estão sujeitos a altas taxas de mutação, recombinação e silenciamento. Se os genes do *AgB* são subteloméricos, esse fato poderia explicar a alta variação encontrada e porque algumas tentativas de isolá-lo a partir de bibliotecas genômicas não obtiveram sucesso.

1.4 Genes de Contingência

Em geral, espera-se que os genes cujos produtos interagem com um ambiente (hospedeiro) imprevisível apresentem taxas de substituições altas. Por outro lado, os genes *house keeping* cujos produtos interagem com ambientes mais previsíveis possuem taxas de substituição mais baixas.

O processo de evolução molecular que está por trás da variabilidade dos antígenos do parasita é contingente, ou seja, alguns genes são expressos e outros não, em cada parasita. É interessante notar que há meio século atrás Haldane (1949) sugeriu que: "... é vantajoso para a espécie (parasita) ser bioquimicamente diversa, e até mesmo mutante no que se refere aos genes cujos produtos oferecem resistência à doenças...", pois o grupo de genes responsável por superar a resposta imune do hospedeiro está sujeito a taxas de mutação espontânea bem maiores que as taxas médias aplicadas para outros genes do genoma, resultando na diversidade do patógeno no hospedeiro (Moxon et al., 1994).

O grupo de genes responsável por superar os desafios impostos pelo ambiente possui taxas de mutação acima das taxas observadas em outros genes do genoma, resultando na diversidade do patógeno. Esses genes são chamados de genes de contingência.

Uma característica comum entre os diferentes microorganismos é que um membro da família gênica é expresso enquanto o outro serve como um reservatório de variação.

Alterando a expressão na superfície de um membro para outro, o patógeno pode evadir o sistema imune ou alterar a sua interação com os tecidos do hospedeiro (Halme e cols., 2004).

Os genes de contingência, geralmente estão representados por grandes famílias multigênicas que contêm motivos repetidos que facilitam a recombinação. A variação antigênica é uma estratégia de sobrevivência utilizada com sucesso por eubactérias e patógenos eucarióticos. Ela utiliza um grande repertório de genes de contingência que são expressos diferencialmente promovendo a evasão da resposta imune do hospedeiro. Muitos genes de contingência estão localizados na região sub-telomérica dos cromossomos em eucariotos.

Um exemplo clássico de genes de contingência são os VSGs de *Trypanosoma brucei*. Esse protozoário está sempre “um passo a frente” do sistema imune por estar continuamente alterando a expressão de uma glicoproteína de superfície (VSG- *Variant Surface Glicoprotein*) para outra VSG imunologicamente distinta, em um fenômeno chamado de variação antigênica. VSG possui a função de servir como uma barreira contra o ataque do sistema imune. Os VSGs expressos e que foram estudados até o momento estão localizados próximo aos telômeros.

Os mecanismos de *switching* melhor estudados em tripanosoma são: 1) a conversão gênica, ou transposição duplicativa, na qual o VSG em um B-Es (*Blodstream Expression Site*) ativo é trocado por um VSG doador que não era expresso; 2) a troca de todo telômero mais o VSG adjacente para outro cromossomo em um processo chamado de conversão telomérica (Donelson, 2003).

Várias famílias gênicas expressas em fungos codificam glicoproteínas de superfície que conferem aderência e propriedades imunogênicas diferentes para a parede celular do fungo. Em patógenos como *Candida albicans* (ALS genes) e *Candida glabrata* (EPA genes) as proteínas codificadas por essas famílias gênicas são responsáveis pela aderência nos tecidos de mamíferos (Cormarck e cols., 1999; de Las Penas e cols., 2003 e Hoyer, 2001). Em *Pneumocystis carinii* os genes MSG codificam antígenos de superfície reconhecidos pelo sistema imune (Stringer e Keely, 2001). Nesses exemplos, as proteínas

codificadas pelas famílias gênicas são capazes de gerar diferentes propriedades e servir como fonte de variação na superfície celular.

A variação antigênica e a citoaderência em eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* são moduladas por uma família de proteínas variantes de superfície codificada pela família multigênica *var*. Hernandez-Rivas e Scherf (1997) descreveram a ocorrência dos genes *var* em associação com elementos repetitivos que se localizam próximo aos telômeros de *P. falciparum*. Os genes *var* sofrem recombinação ectópica em taxas muito mais altas do que as esperadas para recombinação homóloga. O alinhamento dos telômeros de cromossomos heterólogos permite que seqüências homólogas que estão presentes em diferentes cromossomos sofram recombinação (Scherf e cols., 2001).

P. vivax apresenta em sua extremidade telomérica uma família multigênica chamada *vir*, que é específica para *P. vivax*. Esses genes codificam proteínas que são imunovariantes em infecções naturais, indicando que elas devem ter uma importante função no estabelecimento da infecção crônica através da variação antigênica (del Portillo e cols., 2001).

Arend e cols. (2004) identificaram um alto grau de polimorfismo em seqüências genômicas de *AgB2* e *AgB4* e nas de cDNA correspondentes isoladas em um único cisto. Haag e cols., 2004 identificaram o mesmo polimorfismo para as seqüências de *AgB1*, *AgB2*, *AgB3* e *AgB4* isoladas a partir de apenas três protoescolícos de um único cisto, sugerindo que os genes estejam representados em múltiplas cópias no genoma de *E. granulosus*. Haag e cols (2004) sugerem que a família gênica que codifica o AgB represente o primeiro grupo de genes de contingência identificado em helmintos.

1.5 Telômeros

Os organismos eucarióticos possuem cromossomos lineares, que em suas extremidades possuem estruturas complexas chamadas telômeros, essenciais para manutenção da integridade do genoma. A primeira seqüência de DNA telomérico foi identificada em 1978 no protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila* e consiste de

repetições do hexâmero TTGGGG (Blackburn e Gall, 1978). Outras seqüências repetitivas, ricas em G, vem sendo identificadas nas extremidades dos cromossomos de organismos eucarióticos desde então.

Na maioria dos organismos, o DNA telomérico é composto por repetições *in tandem* de pequenas seqüências de DNA, ricas em G. A quantidade de DNA telomérico nas extremidades dos cromossomos varia entre espécies e dentro das espécies. O cromossomo de camundongo, por exemplo, possui 150 kb de DNA telomérico por telômero (Starlinge e cols., 1990) enquanto *Oxytricha* apresenta apenas 20 pb (Klobutcher e cols., 1981). O DNA telomérico humano varia entre 2 e 10 kb (Cech, 2000; Blackburn, 2001).

Figueiredo e cols. (2002) demonstraram variação intra e intercromossômica no tamanho das repetições dos telômeros estudando *P. falciparum*. A heterogeneidade e as alterações espontâneas no tamanho dos telômeros refletem, provavelmente, um complexo balanço entre o processo que leva à degradação e aquele que alonga o telômero (Zakian, 1995). Variações acima de 25% no tamanho de telômeros de cromossomos homólogos já foram relatadas em *P. falciparum*, sendo que a maioria dessas variações parece ser devido a deleções naturais nas extremidades terminais dos cromossomos.

P. falciparum apresenta uma grande diversidade genética entre os diferentes isolados do parasita tanto nos genes que codificam antígenos quanto nos cromossomos de parasitas individuais. O polimorfismo cromossômico pode ter sua origem durante a mitose ou através da recombinação meiótica (de Bruim e cols., 1994).

O DNA telomérico, durante a maior parte do ciclo celular, apresenta-se em forma de loop, que protege as extremidades vulneráveis dos cromossomos. Os telômeros possuem a função de evitar a fusão das extremidades dos cromossomos, proteger as extremidades do DNA da degradação e auxiliar no reconhecimento entre cromossomos intactos e quebrados (Zakian, 1995). Os telômeros estão associados com a matriz nuclear, envolvidos na organização dos cromossomos no núcleo interfásico (Dernburg e cols., 1995) além de serem essenciais para a correta separação dos cromossomos durante a anáfase (Kirk e cols., 1997).

Devido às propriedades da DNA polimerase, a cada novo ciclo celular uma porção terminal dos cromossomos é perdida, pois ela não é capaz de replicar totalmente a extremidade 3' da seqüência de DNA sem a fita molde (esse fenômeno é conhecido como o efeito do fim da replicação). A extremidade 3', conseqüentemente, sofre um encurtamento a cada ciclo, se não houver um mecanismo de compensação (Neidle e Parkinson, 2003).

Os telômeros evitam essa perda servindo como substrato para telomerase que atua no seu alongamento, e é essencial para manutenção estável dos cromossomos eucarióticos. Em muitas linhagens celulares uma alta atividade da telomerase e uma estabilização no tamanho dos telômeros foi detectada. A telomerase também é expressa em células da linhagem germinativa e em 90% das células de tumores malignos (Kim e cols., 1994).

A *Drosophila*, ao contrário dos demais organismos eucarióticos, não possui seqüências repetidas e conservadas nas suas extremidades, ao contrário, possui elementos retrotransponíveis. Sendo assim, a função de proteção, que é realizada pelas seqüências teloméricas nos demais eucariotos, em *Drosophila* é realizada por uma proteína. Elementos de retrotransposição da família LINES (*Long Interspersed Elements*) estão presentes nas extremidades dos cromossomos. Estudos indicam que esses elementos possuem uma importante função na manutenção do comprimento dos telômeros em *Drosophila* (Mason e Biessmann, 1995).

A transição da região telomérica para a região de DNA específico do cromossomo não é abrupta. Seqüências repetidas próximas aos telômeros formam a região de transição, ou seja, a região sub-telomérica. A região sub-telomérica é altamente polimórfica não havendo relação óbvia entre as seqüências teloméricas nas diferentes espécies (Pryde e cols., 1997).

A plasticidade genotípica é a marca de diversos parasitas protozoários incluindo *Plasmodium* spp, *Trypanosoma* ssp, *Giardia lamblia* e *Leishmania* ssp. Estudos de mapeamento indicam que o genoma de *P. falciparum* possui domínios centrais conservados, onde estão localizados os genes *house keeping* e domínios polimórficos nas extremidades sub-teloméricas que contêm seqüências de DNA repetitivo e, normalmente, genes que codificam antígenos imunodominantes (Gardner e cols., 1998). Essa

compartimentalização dos genes variáveis e das famílias que os codificam é, provavelmente, o resultado da evolução adaptativa (Scherf, 1996).

Observações citogenéticas, utilizando FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), em *P. falciparum* indicam que os telômeros formam agrupamentos na periferia nuclear, sugerindo que eles estão relacionados com a arquitetura nuclear. Esses domínios subnucleares parecem ter uma importante função na regulação epigenética, na recombinação do DNA e no silenciamento telomérico. Ainda não se sabe ao certo qual a extensão do alinhamento dos telômeros, mas algumas evidências demonstram que ela pode ser de 30- 40 kb além dos telômeros, o que incluiria a região sub-telomérica.

A posição periférica no núcleo adotada pelos telômeros em *S. cerevisiae* proporciona reversibilidade no silenciamento transcricional do gene, que é conhecido como efeito de posição do telômero (Manolis e cols., 2001). Em *P. falciparum* existem TAS (*Telomere Associated Sequence*) que são seqüências de DNA não codificante responsáveis por separar as extremidades do telômero dos genes que codificam antígenos. Uma possível função da TAS é a de ser um espaçador e assim, proteger os genes que codificam antígenos dos efeitos do silenciamento telomérico (Scherf, 1996).

A recombinação ectópica envolve seqüências homólogas de cromossomos heterólogos. A região sub-telomérica possui duas características que favorecem a recombinação: a formação de *clusters* na periferia nuclear e o alinhamento de seqüências homólogas em cromossomos diferentes (Barry e cols., 2003).

As regiões sub-teloméricas de muitos organismos são altamente dinâmicas com freqüentes alterações das seqüências. A recombinação nessa região resulta na geração de variabilidade e expressão de antígenos de superfície em parasitas e patógenos onde ter esse tipo de plasticidade é claramente adaptativo. Até mesmo na bactéria *Borrelia*, a região subterminal é usada na geração de diversidade (Rich e cols., 2001). Então a dinâmica das regiões sub-teloméricas permite a amplificação de genes e geração de variação entre eles.

Uma das maiores famílias gênicas conhecidas em mamíferos é a dos receptores olfativos (OR) e está localizada na região sub-telomérica dos cromossomos humanos (Sharon e cols., 1999). A diversidade dos genes OR pode ser gerada por rearranjo das

regiões sub-teloméricas e estudos sugerem que polimorfismos na região sub-telomérica podem levar à variação indivíduo-indivíduo na expressão do repertório de genes OR (Linardopoulo e cols., 2001).

Os altos níveis de recombinação observados nessas regiões não estão presentes no genoma como um todo. Embora existam regiões específicas em determinados genomas que claramente sofrem uma rápida diversificação evolutiva, como o MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de vertebrados, a maioria das seqüências nos genomas é relativamente estável com apenas algumas pequenas mutações acumuladas com o tempo. Se a recombinação ectópica fosse freqüente, em todo genoma haveria muitos efeitos deletérios como resultado de translocações, inversões e deleções.

A análise das regiões teloméricas indica que genes ali localizados são beneficiados por uma maior capacidade de diversificação gênica que, utiliza mecanismos como a recombinação. Os prováveis benefícios da localização sub-telomérica dos genes de contingência são: a reversibilidade do silenciamento gênico, que contribui para o *switching* dos genes; e a recombinação ectópica, que pode levar a família gênica a um alto grau de polimorfismo.

A contínua geração de diversidade dos antígenos de superfície é particularmente importante para *P. falciparum* e outros parasitas de hospedeiros vertebrados que necessitam de variação gênica para sua sobrevivência. Os genes que codificam antígenos de superfície costumam estar associados à evasão do sistema imune e aos telômeros.

Sendo assim, é tentador imaginar que a flexibilidade genética das extremidades dos cromossomos é uma ferramenta utilizada na estratégia de evasão do sistema imune pelo parasita. Na maioria das vezes, genes que estão relacionados com as interações moleculares entre parasitas e hospedeiros estão nos compartimentos sub-teloméricos dos cromossomos.

2. Objetivos

Geral

O antígeno B de *E. granulosus* é um dos maiores componentes imunorregulatórios do hospedeiro. Apesar de ser codificado por uma família gênica e diversas seqüências genômicas já terem sido isoladas, muito pouco se conhece sobre a distribuição desses genes nos cromossomos de *E. granulosus* e sua regulação. Além disso, seqüências teloméricas de helmintos nunca foram descritas. Sendo assim, o objetivo geral dessa dissertação é contribuir para os estudos dos fenômenos biológicos do AgB e dos telômeros de *Echinococcus*.

Específicos

- ✓ Testar a hipótese de co-localização dos genes do AgB e das seqüências teloméricas de *Echinococcus*;
- ✓ Avaliar a possibilidade dos genes de AgB estarem localizados próximos aos telômeros;
- ✓ Verificar a ocorrência de polimorfismo nas regiões teloméricas entre diferentes linhagens e espécies do gênero *Echinococcus*;

3. Material e Métodos

Os meios de cultura e soluções foram preparados com água destilada, com exceção dos casos em que está especificado. O material, quando necessário, foi autoclavado durante 20 min a 120° C e 1 ATM. As soluções e meios de cultura foram preparadas seguindo os protocolos de Sambrook e Russel, 2001.

3.1 Material biológico

Os diferentes isolados de *E. granulosus* utilizados nesse trabalho pertencem ao Banco de DNA de Cestódeos que está sendo construído em nosso laboratório através de coletas semanais realizadas em abatedouros da região Metropolitana de Porto Alegre.

As amostras de *E. multilocularis* foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bruno Gottstein (Instituto de Parasitologia- Universidade de Berna- Suíça).

3.1.1 Extração de DNA

Os órgãos contendo a fase larval do parasita (metacestóide) foram conduzidos ao laboratório para dissecação. O líquido hidático foi puncionado assepticamente com auxílio de seringa e deixado em repouso para ocorrer a sedimentação dos protoescólices. A fertilidade dos metacestóides foi confirmada por exame microscópico. Os protoescólices de cistos individuais foram lavados com PBS 1X (KCl 27 mM; KH₂PO₄ 20mM; NaCl 1,37 mM e NaHPO₄(7H₂O) 100mM) por, no mínimo, três vezes. Após o PBS ser completamente retirado os protoescólices foram estocados à -20° C até o momento da extração do DNA.

O DNA genômico de *E. granulosus* foi extraído seguindo o protocolo descrito por McManus e cols., (1985) e armazenado à -20° C. Os protoescólices foram lisados em solução contendo: 100mM Tris-HCl; 250mM NaCl; 0,5% SDS; 100mM EDTA e

100µg/ml proteinase K previamente aquecida a 65°C. A solução de lise foi incubada durante 2 horas a 65°C.

Após a lise, procedeu-se uma extração com 1 vol de fenol-clorofórmio seguida de duas extrações com 1 vol de clorofórmio. Em seguida, o DNA foi precipitado durante 16 horas com 2,5 vol de etanol absoluto e 1/100 vol de NaCl 5M. O precipitado foi lavado com etanol 70% por 2X, e após ser deixado sobre a bancada para secar, o DNA foi ressuspendido em H₂O, tratado com RNase A e uma alíquota de 1 µl foi observada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. A concentração de DNA foi determinada com o uso de espectrofotômetro.

3.1.2 Isolados utilizados

A tabela 2 apresenta uma lista dos isolados de *E. granulosus* que foram utilizados neste trabalho, assim como os seus respectivos haplótipos para o gene mitocondrial codificador da subunidade I da citocromo oxidase (COI) (Jéferon Badaraco - comunicação pessoal) determinado para alguns deles. Foram analisados cistos individuais (isolados) para permitir a correta identificação de polimorfismos.

Tabela 2: Tabela com os diferentes haplótipos correspondentes à seqüência parcial do gene mitocondrial COI dos isolados de *E. granulosus* utilizados nesse trabalho.

Isolado	Haplótipo	Isolado	Haplótipo
110	G1- ovino	408	Não definido
173	G1a- ovelha da Tasmânia	417	Não definido
352	G1- ovino	419	Não definido
367	G5- bovino	422	Não definido
374	G1- ovino	476	Não definido
375	G1- ovino	507	Não definido

376	Não definido	517	Não definido
377	G1- ovino	522	Não definido
381	G1- ovino	523	Não definido
388	G1a- ovelha da Tasmânia	526	Não definido
389	G1a- ovelha da Tasmânia	527	Não definido
391	G1a- ovelha da Tasmânia	531	Não definido
393	G1- ovino	533	Não definido
395	G1- ovino	541	Não definido
397	G5-bovino	566	Não definido
398	Não definido	572	Não definido
400	G1- ovino	0208-1	Não definido
402	G1- ovino	0208-2	Não definido
405	Não definido	3008-1	Não definido
406	G1- ovino	3008-2	Não definido

3.2 TRF (*Telomere Restriction Fragment*)

A técnica de “fragmento de restrição de telômeros” (de Lange e cols., 1990) está baseada na clivagem do DNA genômico com várias enzimas de restrição que freqüentemente clivam o “corpo” do cromossomo deixando os telômeros intactos. Isso só é possível devido à falta de sítios de restrição nas extremidades dos telômeros que são ricas em G. As frações resultantes da digestão que possuem maior peso molecular devem estar enriquecidas com telômeros.

Uma das desvantagens da utilização dessa técnica é que o tamanho dos telômeros pode variar entre as células e entre os cromossomos, devido à diferença de idade entre as células. Também pode ocorrer a variação na localização dos sítios de restrição de um telômero para outro. Conseqüentemente, as auto-radiografias produzidas pelos TRFs apresentam um arraste (Nakagawa e cols., 2004).

Aproximadamente 10 µg de DNA genômico foram clivados com as enzimas de restrição: Alu I, Rsa I, Dde I, EcoR V, Xmn I e Hinc II. O DNA foi clivado com AluI durante 16 horas à 37°C, após foi precipitado com 2,5 vol de etanol absoluto e deixado à -20°C por 16 horas. Após a etapa de precipitação ele foi ressuspenso com 20 µl de água milliqui, 1µl foi checado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Esse processo foi repetido para as demais enzimas utilizadas. Os produtos das digestões assim como 800 ηg de 200 *base pair DNA Step ladder* (Promega) foram separados em gel de agarose 0,8 % durante 16 horas com potência de 15 V e submetidos à análise por *Southern blot*.

Os controles positivos utilizados foram 50 ng do fragmento que continha a seqüência consenso de telômero e é, também utilizada, depois de marcada, como a sonda tel; 50 ng de produto de PCR referente aos genes *AgB2* e *AgB4* que posteriormente foram marcados e utilizados como sonda, e 50 ng de plasmídeos contendo os insertos dos genes *AgB* em *E. multilocularis* que foram gentilmente cedidos por Daniel Graichen, que também foram, após serem marcados, utilizados como sonda.

3.2.1 *Southern blot*

O gel contendo os fragmentos de DNA foi depurinado em solução de 250mM HCl durante 30 min. Seguiu-se uma etapa de desnaturação por 30 min em solução de 1.5M NaCl e 0.5M NaOH; e de neutralização em solução de 1.5M NaCl e 0.5M Tris-HCl pH 7.5 durante 30 min. Entre as diferentes soluções o gel foi lavado 3X com água destilada autoclavada. Em seguida, os fragmentos de DNA foram transferidos para uma membrana de náilon (HybondTM N⁺, Amersham Biosciences) por meio de capilaridade com SSC 20X (NaCl 3M e Citrato de Sódio 0,3M-pH7,0). A fixação do DNA foi realizada através da incubação da membrana, durante 2 horas a 80°C.

3.2.1.1

Preparação das sondas

3.2.1.1.1 Sonda telomérica (sonda tel)

Karen L. Haag (comunicação pessoal) utilizando a técnica de LA-PCR para isolar a região 5' flanqueadora dos genes que codificam o AgB de *E. granulosus* identificou um plasmídeo (ptel) que possuía uma seqüência consenso de telômero e apresentava 50 repetições do tipo CCCTAA. Essa mesma seqüência telomérica é descrita para *Homo sapiens*.

A sonda telomérica (tel) foi obtida através da transformação por eletroporação de 1 µl de plasmídeo contendo o fragmento de interesse e 20 µl de células eletrocompetentes da linhagem DH10B de *Escherichia coli* que foram preparadas segundo Sambrook e Russel, 2001. O produto resultante da transformação foi plaqueado em meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina. Após a transformação, seguiu-se a extração plasmidial conforme Sambrook e Russel, 2001. Para obtenção do fragmento de interesse, o plasmídeo foi clivado com a enzima *EcoRI*, o inserto de aproximadamente 750 pb liberado e posteriormente purificado com "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Amersham Biosciences) seguindo o protocolo do fabricante. Aproximadamente 50 ng do inserto foram clivados como sonda.

3.2.1.1.2 Sonda AgB

O DNA utilizado como sonda na hibridização foi obtido através de PCR, usando como molde o DNA genômico de *E. granulosus*. Dois pares de oligonucleotídeos foram utilizados. O par de *primers* B1F (5' TCGTTCTGGCTCTCGTCTCA 3') e B1R (5' GTAGATGGTTTATTGAGCAA 3') amplifica os genes correspondentes à AgB1 e à AgB3 enquanto outro par de oligonucleotídeos B2F (5' TTGCTCTCGTGGCTTTCGTGG 3') e à B2R (5' GTGTCCCGACGCATGACTTA 3'), amplifica os genes correspondentes à AgB2 e AgB4.

As reações foram realizadas num vol de 50 µl nas seguintes condições: 200 µM de dNTPs; 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl₂; 20 pmol de cada *primer*; 50 ng de DNA molde e 1X tampão de reação da enzima. As amplificações foram realizadas no programa TD55/45 (tabela 3). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0 % e purificados com "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Amersham Biosciences) seguindo o protocolo do fabricante. Após a purificação, os fragmentos foram visualizados novamente em gel e quantificados visualmente. Foram utilizados como sonda cerca de 50 ng de cada uma das reações de PCR.

Tabela 3: Lista dos programas de PCR utilizados.

Programas	TD 55/45		XL-PCR 5'		XL-PCR 15'	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Passo 1	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min
Passo 2	55°C – 1°C ciclo	1 min	94°C	30 seg	94°C	30 seg
Passo 3	72°C	1 min	48°C	2 min	48°C	2 min
Passo 4	94°C	1 min	68°C	5 min	68°C	15 min
Passo 5	55°C – 1°C ciclo	1 min	Volta 30X para o passo 2	-	Volta 30X para o passo 2	-
Passo 6	72°C	1 min	68°C	5 min	68°C	15 min
Passo 7	94°C	1 min	4°C	∞	4°C	∞
Passo 8	Volta 10X para o passo 2	-				
Passo 9	45°C	1 min				
Passo 10	72°C	1 min				
Passo 11	94°C	1 min				
Passo 12	Volta 20X para o passo 9	-				
Passo 13	45°C	1 min				

Passo 14	72°C	10 min				
Passo 15	4°C	∞				

3.2.1.1.3 Sonda pAgB

Também foram utilizados como sonda 1µg de plasmídeos contendo insertos correspondentes aos quatro genes de AgB de *E. multilocularis*, gentilmente cedidos por Daniel Graichen.

3.2.1.2 Marcação das sondas

As sondas foram marcadas com o método de *random prime* com fluoresceína-11-dUTP utilizando o kit *Gene Images Random Prime Labelling Module* (Amersham Biosciences). Esse método está baseado no fato de nanômetros de seqüências aleatórias serem utilizados para iniciar a síntese de DNA em uma reação catalisada pela DNA polimerase I de *E. coli* (Klenow). A fluoresceína-11-dUTP (Fl-dUTP) substitui parcialmente o dTTP na reação permitindo a formação de uma sonda marcada com fluoresceína.

3.2.1.3 Pré-hibridização e Hibridização

Após a fixação do DNA, a membrana foi pré-hibridizada em 25 ml de solução pré-aquecida a 60 °C contendo: 2,5% SDS; SSC 5X; 1,25g de Sulfato de Dextran e 1,25 ml de líquido bloqueador (Amersham Biosciences), por no mínimo 2 horas à 60 °C no forno com leve rotação. Em seguida foi adicionada a sonda marcada e a etapa de hibridização ocorreu durante 16 horas a 60 °C, com rotação.

3.2.1.4 Lavagens de hibridização

As membranas que foram hibridizadas com as sondas tel, AgB e pAgB foram lavadas conforme a tabela 4.

Tabela 4: Seqüência de lavagens das membranas hibridizadas com as sondas AgB, tel e pAgB.

Lavagem	Solução	Tempo	Temperatura
1°	1 X SSC SDS 0,1%	15 min	60° C
2°	0,1 X SSC SDS 0,1%	15 min	60° C

As membranas que foram hibridizadas com sondas de AgB foram lavadas nas mesmas condições descritas acima, e alternativamente utilizamos o método descrito por Alves-Júnior (2003- tabela 5) que utilizou sondas marcadas com ³²P.

Tabela 5: Seqüência de lavagens da membrana hibridizada com a sonda AgB.

Lavagem	Solução	Tempo	Temperatura
1°	5 X SSC SDS 0,1%	5 min	42° C
2°	5 X SSC SDS 0,1%	5 min	42° C
3°	2 X SSC SDS 0,1%	10 min	42° C
4°	2 X SSC SDS 0,1%	10 min	42° C

5°	1 X SSC SDS 0,1%	10 min	42° C
6°	1 X SSC SDS 0,1%	10 min	42° C
7°	0,5 X SSC SDS 0,1%	10 min	Ambiente
8°	0,5 X SSC SDS 0,1%	10 min	Ambiente
9°	0,2 X SSC SDS 0,1%	10 min	Ambiente
10°	0,2 X SSC SDS 0,1%	10 min	Ambiente

3.2.1.5 Reação de detecção

A reação de detecção foi realizada utilizando-se o *kit Gene Images CDP-Star detection module* (Amersham Biosciences). Após a hibridização, a detecção da região hibridizada acontece com a incubação da membrana com fosfatase alcalina anti-fluoresceína (AP). Após o excesso de conjugado ser retirado, a ligação da sonda com a AP serve como catalisador da produção de luz por decomposição enzimática. Os procedimentos seguiram o protocolo indicado pelo fabricante.

Após a detecção a membrana foi exposta a um filme de raio -X (Kodak, Omat), durante 20 min e então o filme foi revelado.

3.2.1.6 Remoção da sonda

Para membrana ser reutilizada é necessário que a sonda antiga seja removida. Para que isso ocorra, deve-se evitar que ela seque depois da última hibridização, guardando-a em um saco plástico selado. Antes de ser reutilizada, a membrana foi lavada por 2 min em

solução de SSC 5X. Em seguida foi adicionado SDS 0,1% à 100°C, que ficou 15 min em leve agitação no forno à 80 °C. Esse processo foi repetido por 3X.

3.3 Digestão com Bal31

A nuclease Bal31 catalisa a degradação de DNA fita simples. Experimentos utilizando essa enzima permitem saber o tamanho das seqüências de repetição telomérica, uma vez que essa enzima inicia a sua atividade de degradação em DNA fita simples. Produtos de digestão de alto peso molecular podem ser identificados como repetições teloméricas do cromossomo, por hibridização com a sonda telomérica.

Uma unidade de enzima remove 600 pb de cada extremidade do plasmídeo pBR322 linearizado em 10 min a 30° C em 20 ul de reação.

Para identificação do tamanho das seqüências teloméricas foram utilizados 6 µg de DNA genômico do isolado 388 de *E. granulosus* e 4U de Bal31 para cada tempo de clivagem analisado. As amostras foram incubadas à 30°C nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 90 minutos. A reação foi parada adicionando-se 0,05M de EGTA e colocando-a no nitrogênio líquido.

Após a clivagem do DNA com Bal 31 as amostras foram precipitadas com etanol absoluto e ressuspendidos com água MilliQ. As amostras foram clivadas com Rsa I, o produto é resolvido em gel de agarose, transferido para membrana e hibridizado com a sonda tel.

Para a marcação da sonda com α -³²P-dATP (Amersham Biosciences), foi utilizado *Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-cCTP)* (Amersham Biosciences), no qual o DNA utilizado como sonda foi primeiramente desnaturado e então misturado com oligodeoxiribonucleotídeos de seqüências aleatórias que servem de *primers* para síntese pela DNA polimerase. Como nucleotídeos marcados estão presentes durante a reação de síntese, DNA marcado radioativamente foi gerado. A reação foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, utilizando-se 50 µCi de α -³²P-dATP.

3.4 PFGE

Moléculas de DNA maiores que 40 kb não podem, facilmente, ser separadas quando um campo elétrico constante é aplicado no gel de agarose. A eletroforese em campo pulsado (Carle e Olson, 1984) gera campos elétricos em duas direções diferentes, alternadamente. A migração diferencial dos fragmentos ocorre porque o tempo que as moléculas de DNA levam para trocar de direção em resposta ao estímulo do campo elétrico é proporcional ao seu tamanho. Moléculas menores alteram a sua direção com maior eficácia que moléculas maiores e conseqüentemente migram mais rápido.

Grandes moléculas de DNA são tão frágeis que quebram por forças mecânicas durante o seu isolamento. Para evitar esse problema protoescólices intactos foram colocadas em agarose para serem lisados e deproteinizados *in situ*. A matriz de agarose protege o DNA e facilita a sua manipulação.

3.4.1 Preparação dos blocos de agarose

A análise da viabilidade dos protoescólices foi realizada através de exame microscópico. Para confecção dos blocos foi adicionado 1vol de protoescólices diluídos em PBS 1X (KCl 27 mM; KH₂PO₄ 20mM; NaCl 1,37 mM e NaHPO₄(7H₂O) 100mM) a 1 vol de *InCert®Agarose* (1.2%) (LabTrade). Após serem resfriados, os blocos foram retiradas do molde e incubados por 2 vezes à 50°C durante 24 horas em solução: 1% N-lauroil-Sarcosina (Sigma); 0.5M EDTA pH 8.0 e 2mg/ml proteinase K (Invitrogen) que foi adicionada no momento da incubação. Seguiram-se 2 lavagens em solução de hTE (50mM EDTA pH 8.0 e 10mM Tris HCl pH7.5~8.0) por 10 min. No fim das lavagens os blocos foram conservados a 4°C em solução de hTE.

Para sabermos quantos protoescólices eram necessários para obtermos a quantidade de DNA suficiente para realização da técnica, foram realizados testes com 6 diferentes quantidades de protoescólices (5, 10, 50, 100, 500 e 1000) por bloco.

As coletas permitiram a obtenção de 6 blocos de 5 diferentes isolados. São eles: 507, 0208-1, 0208-2, 3008-1, 3008-2 (tabela 2).

3.4.1.1 Digestão dos blocos

As digestões foram realizadas com leve agitação e em temperatura ambiente por 45 min em solução: 0.05M EDTA pH8.0; 0.01M Tris-HCl pH7.5 e 1mM PMSF; 30 min em solução: 0.05M EDTA pH8.0; 0.01M Tris-HCl pH7.5 e 1mM PMSF; 3X durante 45 min em solução contendo 0.05M EDTA pH8.0 e 0.01M Tris-HCl pH7.5; 3X durante 30 min em 0.001M EDTA pH8.0 e 0.01M Tris-HCl pH7.5; após essas lavagens cada bloco foi transferido para um tubo de microcentrífuga; seguida por 2 lavagens de 30 min no tampão de restrição da enzima; finalmente as amostras foram incubadas por 4 horas em solução de vol final de 400µl contendo: 25 U da enzima. Os isolados 507, 0208-1, 0208-2, 3008-1, 3008-2 foram clivados com a enzima *EcoRI*. Adicionalmente, blocos contendo o isolado 3008-01 foram clivados com as enzimas *AluI*, *DdeI*, *HincII* e *RsaI* individualmente, ou seja, cada bloco foi clivado com apenas uma enzima. Após as clivagens os blocos foram armazenados em solução de hTE (0.495M EDTA pH8.0 e 0.01M Tris-HCl pH7.5) a 4° C.

3.4.2 Condições de migração

Os blocos contendo os 6 diferentes isolados de *E. granulosus* foram digeridos com *EcoRI* e posteriormente realizou-se uma corrida de 72 horas nas seguintes condições: 24 horas: 5,5 V/cm com 90-300 *switch ramp* e ângulo de inclinação de 120°; 24 horas: 4 V/cm com 300- 700 *switch ramp* e ângulo de inclinação de 120°; 24 horas: 2,5 V/cm com 700- 1200 *switch ramp* e ângulo de inclinação de 120°. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta.

Uma nova clivagem com *EcoRI* foi realizada seguida por uma eletroforese nas seguintes condições: 20 horas: 5 V/cm com 2,5-12 *switch ramp* e ângulo de inclinação de 120°; 24 horas: 5,5 V/cm com 5- 25 *switch ramp* e ângulo de inclinação de 120°.

Para obtermos fragmentos com tamanhos menores testamos as enzimas: *AluI*, *DdeI*, *HincII* e *RsaI* utilizando apenas o isolado 3008-1.

3.5 XL-PCR (*Extra Long Polymerase Chain Reaction*)

Para verificar se os genes do AgB estão localizados próximos à região telomérica, foi realizada uma PCR utilizando *primers* específicos para AgB e contendo o motivo telomérico (veja a seguir). O XL-PCR é uma PCR que utiliza uma mistura de DNAs polimerases capazes de amplificar fragmentos de até 30 kb.

O DNA genômico do isolado 541 de *E. granulosus* foi utilizado como molde na reação de XL-PCR nas seguintes condições: 100ng de DNA genômico; 10 mM de cada dNTPs; 0,75 mM MgSO₄; 30mM Tris-SO₄ (pH 9,1); 9 mM (NH₄)₂SO₄; 10 μmóis de cada *primer*; 1,0 μl da Elongase® Enzyme Mix (Invitrogen) para um vol final de 25μl de reação.

Foram utilizadas duas condições de amplificação diferentes que variaram apenas no tempo de extensão (tabela 3). O manual da Elongase® Enzyme Mix (Invitrogen) sugere a extensão de 1 min para cada 1 kb que se deseja amplificar. Os tempos utilizados nos testes foram de 5 min (XL-PCR 5') e 15 min (XL-PCR 15') de extensão.

3.5.1 Primers

Para realização do experimento foram utilizados os seguintes *primers* que amplificam produtos específicos para os genes *AgB1*, *AgB2*, *AgB3* e *AgB4* de *E. granulosus*:

B1F4: 5' AAATGTTTGGCGAAGTGAAGT 3'

B2F3: 5' AAAGCACACATGGGGCAAGTG 3'

B3F3: 5' GAAGGGTGTGATGAAGGCCAT 3'

B4F3: 5' CGAGAGATGCAAGTGCCTCAT 3'

B1F4_{inv}: 5' ACTTCACTTCGCCAAACATTT 3'

B2F3_{inv}: 5' CACTTGCCCCATGTGTGCTTT 3'

B3F3_{inv}: 5' ATGGCCTTCATCACACCCTTC 3'

B4F3_{inv}: 5' ATGAGGCACTTGCATCTCTCG 3'

Os *primers* contendo a terminação *inv* correspondem à seqüência senso invertida, com a finalidade de contemplar as duas formas de orientação do gene em relação ao telômero do seu respectivo cromossomo.

Os oligonucleotídeos específicos para AgB foram combinados ao *primer* contendo a seqüência telomérica de *E. granulosus*:

TelEchino: 5' TAACCCTAACCCCTAACCCCTAACCC 3'

As reações de PCR foram realizadas com as seguintes combinações de *primers*: 1) B1F4_{inv} + TelEchino; 2) B2F3_{inv} + TelEchino; 3) B3F3_{inv} + TelEchino; 4) B4F3_{inv} + TelEchino; 5) B1F4 + TelEchino; 6) B2F3 + TelEchino; 7) B3F3 + TelEchino; 8) B4F3 + TelEchino.

A seqüência telomérica utilizada para construção do *primer* TelEchino é, também, a seqüência de muitos outros organismos, inclusive o homem. Com o objetivo de descartar a possibilidade de amplificação devido à similaridade entre essas seqüências, juntamente com todos os XL-PCR foram feitas reações de controle que continham DNA humano. Em nenhuma das reações houve amplificação desses fragmentos, o que indica os produtos obtidos eram específicos.

Após a XL-PCR os amplicons foram verificados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador. Os amplicons correspondentes às três bandas obtidas com os *primers* específicos de AgB3 e TelEchino foram purificados e clonados.

4 Resultados

4.1 Co-localização do AgB e da sequência telomérica

Para análise utilizando TRF, foram testados 5 diferentes isolados de *E. multilocularis*. Após as amostras serem transferidas, a membrana foi hibridizada inicialmente com a sonda tel, desibridizada, e em seguida, re-hibridizada com a sonda AgB. A análise da auto-radiografia indicou que as amostras poderiam estar degradadas, embora um isolado apresentasse clivagem parcial. Uma nova digestão foi realizada e a nova membrana, ao contrário da anterior, foi hibridizada inicialmente com a sonda AgB e posteriormente com a sonda tel.

O exame da auto-radiografia (figura 5) demonstrou que as amostras estavam degradadas, ou apresentavam clivagem parcial. O isolado Em 77 evidenciou clivagem parcial, enquanto o isolado Em 57 estava totalmente degradado e os isolados Em 6a, Em 7 e Em 11 demonstraram sinais de degradação.

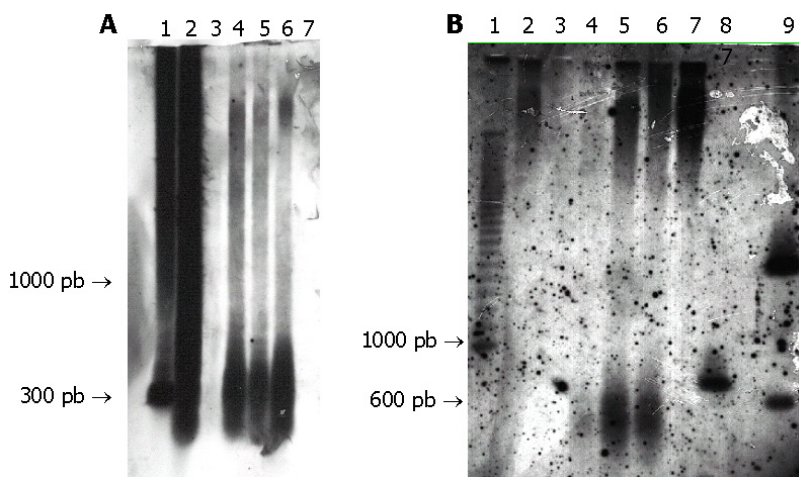


Figura 5: Southern blot com 5 diferentes isolados de *E. multilocularis* hibridizados. Em **A** a membrana foi hibridizada inicialmente com a sonda AgB. Em **B** a membrana foi hibridizada inicialmente com a sonda tel. A figura **A** mostra: **1:** 50 ng do amplicon do AgB2 **2:** Em 77. **3:** Em 57 **4:** Em 11 **5:** Em 7 **6:** Em 6a **7:** 200 pb DNA Step ladder. A figura **B** apresenta: **1:** 200 pb DNA Step ladder **2:** Em 77 **3:** Em 57 **4:** Em 11 **5:** Em 7 **6:** Em 6a **7:** Em 7 sem clivagem **8:** inserto telomérico que posteriormente foi marcado e utilizado como sonda **9:** ladder 100 pb. O isolado Em77 apresenta clivagem parcial, enquanto o isolado Em57 está totalmente degradado e os isolados Em6a, Em7 e Em11 apresentam sinais de degradação.

Para *E. granulosus* foram testados 35 diferentes isolados dos quais 27 apresentaram clivagem parcial ou degradação (figura 6). Todas amostras foram testadas, no mínimo, 3 vezes com o objetivo de comprovar os resultados obtidos. Os isolados 395 e 402 claramente apresentaram variação no tamanho do telômero quando digeridos com 5 enzimas de restrição (*AluI*, *EcoRV*, *DdeI*, *HincII* e *XmnI*). Para avaliar a possibilidade de uso de uma única enzima de restrição na análise do polimorfismo no tamanho dos telômeros, as amostras 395 e 402 que tiveram padrões de TRF distintos, foram digeridas com enzimas individuais e submetidas à análise por *Southern blot*. As diferentes digestões apresentaram o mesmo padrão quando hibridizadas com a sonda tel, evidenciando a impossibilidade de emprego de uma única enzima.

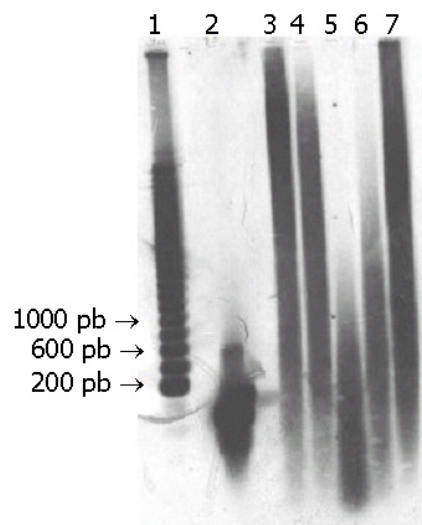


Figura 6: *Southern blot* com diferentes isolados de *E. granulosus* hibridizados com a sonda tel 1: 200 pb DNA Step ladder; 2: fragmento de aproximadamente 700 pb contendo a seqüência consenso de telômero C3TA2; 3: *E. granulosus* isolado 110 4: *E. granulosus* isolado 393 5: *E. granulosus* isolado 395 6: *E. granulosus* isolado 402 7: *E. granulosus* isolado 406.

Das 35 amostras analisadas apenas 8 não apresentaram clivagem parcial e/ou degradação e exibiram variação quando hibridizadas com a sonda tel. No entanto, quando re-hibridizadas com a sonda *AgB* proveniente de PCR ou a sonda p*AgB* (plasmídeo contendo o inserto referente ao *AgB*), as amostras não apresentaram sinais de hibridização em nenhum dos testes realizados.

Esses experimentos tinham como objetivo testar a hipótese de co-localização dos genes de *AgB* e da seqüência consenso de telômero isolada anteriormente (ver material e métodos) no genoma de *Echinococcus*. Para tanto seria conveniente re-hibridizar a mesma membrana com ambas as sondas, mas nossos resultados com experimentos de re-hibridização foram negativos e em alguns casos não foi possível desibridizar a primeira sonda nas condições descritas.

4.2 Identificação do tamanho da região telomérica

A enzima Bal31 é amplamente utilizada para identificação do tamanho da região telomérica, pois degrada DNA a partir da sua extremidade fita simples.

O DNA genômico do isolado 388 foi clivado com Bal31 nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 90 min (figura 7). A análise do *Southern blot* demonstrou que os tempos utilizados não foram suficientes para digestão total da região telomérica. No entanto, sabendo-se que 1 U de enzima degrada 600 pb em 10 min, podemos concluir que a região telomérica do isolado 388 apresenta tamanho superior à 2700 pb.

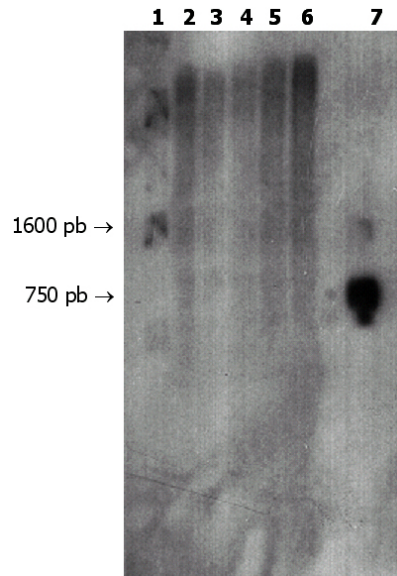


Figura 7: Clivagem do DNA genômico do isolado 388 de *E. granulosus* com a nuclease Bal 31. **1:** Marcador de peso molecular. Clivagem do DNA nos seguintes tempos: **2:** 0 min **3:** 10 min **4:** 20min **5:** 30min **6:** 45 min **7:** sonda tel.

Um exame mais detalhado na auto-radiografia permitiu a identificação de uma banda de aproximadamente 800 pb em todos os tempos testados, indicando a presença de repetições consenso de telômero na região intracromossômica.

4.3 Separação de grandes fragmentos cromossômicos

Diferentes quantidades de protoescólices foram testadas (5, 10, 50, 100, 500 e 1000 por bloco) com o objetivo de identificar quantos protoescólices seriam suficientes para atingirmos a quantidade de DNA necessária para realização do PFGE. Após uma série de testes concluímos que o número ideal estava entre 500 e 1000 protoescólices por bloco. Foram construídos 6 blocos a partir de 5 diferentes isolados contendo 1000 protoescólices em cada bloco.

Após os testes os blocos de agarose contendo os protoescólices de cinco isolados de *E. granulosus* digeridos com EcoRI foram submetidos à eletroforese por 72 horas. Com o objetivo de evitar a contaminação do aparelho, o gel foi corado com brometo de etídio

somente após a corrida e posteriormente visualizado no transluminador. A análise do gel demonstrou que as amostras haviam migrado durante muito tempo.

Foi realizada uma nova eletroforese durante 20 horas, na qual pudemos observar que os cromossomos de *E. granulosus* de diferentes isolados clivados com *EcoRI* apresentam tamanho superior a 2 Mb (figura 8). Por esta razão foram realizados testes com outras enzimas para obtenção de fragmentos menores. Os blocos do isolado 3008-2 foram então, clivados com outras 4 enzimas de restrição: *AluI*, *EcoRV*, *DdeI* e *RsaI* (figura 9). Os resultados indicam que a enzima *RsaI* foi a que apresentou os menores fragmentos.

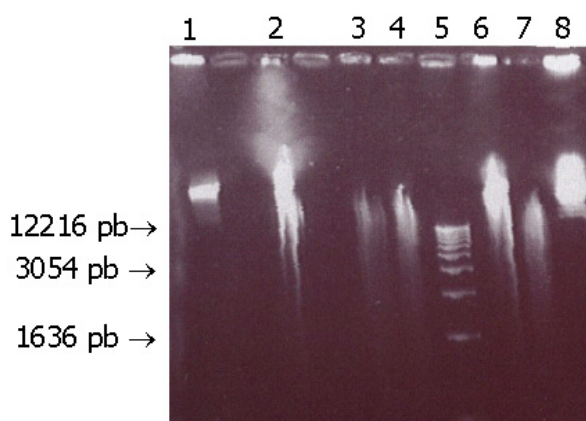


Figura 8: PFGE de diferentes isolados de *E. granulosus* digeridas com *EcoRI*. **1:** DNA Size Standard *S. cerevisiae* **2** 507 **3:** 0208-1 **4:** 0208-2 **5:** Marcador de peso molecular **6:** 3008-1 **7:** 3008-2 **8:** DNA de λ .

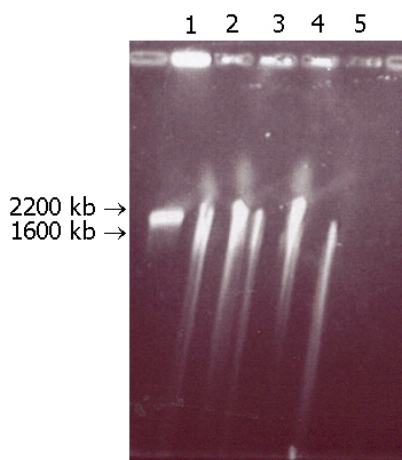


Figura 9: PFGE do isolado 3008-2 de *E. granulosus* clivado com as enzimas *AluI*, *DdeI*, *EcoRV* e *RsaI*. **1:** DNA Size Standard *S. cerevisiae* **2:** *AluI* **3:** *DdeI* **4:** *EcoRV* **5:** *RsaI*.

4.4 Produtos de XL-PCR

A localização sub-telomérica dos genes que codificam AgB foi testada através da técnica de XL-PCR. Para isso foram utilizados os *primers* de AgB específicos para os quatro genes já descritos em duas orientações e da região telomérica (Telechino) e uma polimerase capaz de amplificar fragmentos de 30 kb.

Embora o protocolo do fabricante sugira que se deve utilizar 1 min de extensão para cada 1 kb que se deseja amplificar, a utilização dos tempos de 5 min e 15 min não gerou amplicons de tamanhos diferentes. A reação que utilizou os *primers* B3F3 e TelEchino produziu três amplicons, sendo que o menor possui tamanho aproximado de 1300 pb, o maior possui aproximadamente 3500 pb e o outro fragmento possui tamanho aproximado de 1600 pb. A combinação dos *primers* específicos para AgB1 (B1F4 e B1F4inv) com o *primers* contendo o motivo telomérico (TelEchino) não foi capaz de gerar um amplicon. Todas as demais reações apresentaram um único fragmento com tamanho aproximado de 3500 pb (figura 10).

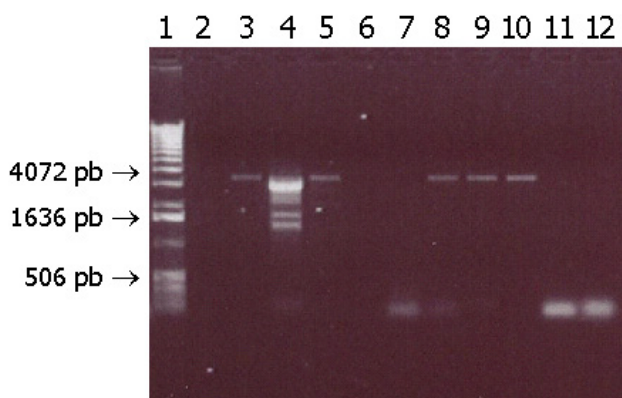


Figura 10: XL-PCR do isolado 541 de *E. granulosus*.: **1:** marcador de peso molecular. Foram utilizados os seguintes pares de primers em cada reação **2:** B1F4 + TelEchino; **3:** B2F3 + TelEchino; **4:** B3F3 + TelEchino; **5:** B4F3 + TelEchino; **6:** Controle Negativo; **7:** B1F4Inv + TelEchino; **8:** B2F3Inv + TelEchino; **9:** B3F3Inv + TelEchino; **10:** B4F3Inv + TelEchino; **11:** Controle Negativo sem DNA; **12:** Controle negativo utilizando o DNA de pacientes com malária

Os três produtos de PCR referentes ao gene *AgB3* foram purificados com sílica segundo Boyle, 1995, seguidos de clonagem utilizando-se o Kit TOPO TA *Cloning® Kit*

for Sequencing (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Após a clonagem seguiu-se a extração do DNA plasmidial segundo Sambrook, 2001. Os plasmídeos recombinantes foram enviados para seqüenciamento.

5 Discussão

O AgB é um dos principais componentes antigênicos do líquido hidático. Ele é codificado por uma família multigênica da qual foram descritos cinco genes até o momento. Trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa têm demonstrado uma alta variabilidade intragênica nos genes desta família. Embora a função do AgB ainda seja desconhecida para nós, algumas evidências demonstram que ela deva estar relacionada com a evasão da resposta imune do hospedeiro.

As regiões teloméricas e sub-teloméricas de diversos organismos possuem genes que são beneficiados por uma maior capacidade de diversificação gênica. Entre os genes que estão, normalmente, localizados na região sub-telomérica estão os genes de contingência que são responsáveis por superar a resposta imune do hospedeiro e apresentam taxas de mutação espontânea mais altas que as outras regiões do genoma. Os prováveis benefícios da localização sub-telomérica dos genes de contingência são: a reversibilidade do silenciamento gênico, que contribui para o *switching* dos genes; e a recombinação ectópica, que pode levar a família gênica a um alto grau de polimorfismo.

A localização sub-telomérica dos genes AgB poderia explicar a alta variabilidade observada nessa família, assim como a dificuldade de isolar esses genes a partir de bibliotecas genômicas.

Sendo assim, com o objetivo de testar a hipótese de co-localização cromossômica dos genes de AgB e da seqüência telomérica foram realizados estudos utilizando a técnica de TRF onde foram analisados 40 diferentes isolados de *E. granulosus*. No entanto, apenas 8 isolados *E. granulosus* não apresentaram clivagem parcial ou degradação, permitindo a sua análise. É importante destacar que as clivagens, e hibridizações foram realizadas em pelo menos três experimentos diferentes para confirmar os resultados obtidos. A reprodutibilidade dos experimentos tem como objetivo evitar que os dados gerados sejam derivados de erros de manipulação, falhas durante a realização dos experimentos, ou falsos positivos/ negativos.

O baixo número de isolados cuja preparação de DNA genômico tinha boa qualidade para permitir sua utilização em estudos de TRF indica a presença de impurezas ou resíduos das soluções utilizadas durante a extração, ou falha na eliminação da fração protéica do lisado do parasita.

Quando hibridizadas com sonda de AgB, provenientes de PCR, e com a sonda pAgB as amostras de *E. granulosus* não apresentaram sinal de hibridização. Em todos os experimentos foram utilizados controles positivos apropriados, ou seja, o fragmento que posteriormente foi marcado e utilizado como sonda foi aplicada no gel. No entanto não foi possível detectarmos sinal de hibridização em nenhuma das diferentes estringências de lavagens utilizadas. Esses dados nos levam a sugerir que as condições empregadas para hibridização e lavagem das membranas não foram as ideais. Não podemos, no entanto, descartar a hipótese de não marcação da sonda, uma vez que não foram realizados os testes de *Dot blot* recomendados pelo fabricante para verificar a eficiência da marcação. A utilização de uma técnica mais sensível como a radioativa pode ser uma alternativa para futuras análises com *E. granulosus*.

A membrana com os isolados de *E. multilocularis* foi inicialmente hibridizada com a sonda AgB, lavada e re-hibridizada com a sonda tel. Contudo, quando analisamos a autoradiografia, podemos perceber uma banda na região correspondente ao amplicon de AgB mesmo quando a membrana foi re-hibridizada com sonda tel. Esses dados sugerem que as lavagens realizadas com o objetivo de retirar a sonda que havia sido utilizada anteriormente, não foram eficazes. A existência dessa hibridização nos leva a sugerir que a membrana sempre deve ser checada antes de ser re-hibridizada como objetivo de evitar resultados falsos positivos.

A heterogeneidade observada entre os 8 diferentes isolados de *E. granulosus* (isolados: 377, 388, 389, 393, 395, 402, 405 e 422) pode ser resultado de uma variação real no número de repetições dos telômeros individuais dos cromossomos dos parasitas (polimorfismo). Contudo, o tamanho dos telômeros também pode variar entre as células e entre os cromossomos devido à diferença de idade entre as células pois, a cada novo ciclo celular, pode ocorrer um encurtamento no tamanho da extremidade telomérica. Já que a TRF utiliza-se da digestão do DNA genômico, a ocorrência de variação na distância dos

sítios de restrição de um telômero para outro acarretará variação no tamanho dos fragmentos, sem, no entanto haver uma variação real no tamanho das extremidades teloméricas (Zijlmans e cols., 1997).

Alguns organismos apresentam repetições do motivo telomérico na região intracromossômica. A técnica de TRF baseia-se na ausência de sítios de restrição de seqüências ricas em CG, após o DNA ser clivado com diversas enzimas a região que apresentar maior peso molecular será a região rica em CG. Uma vez que o genoma apresente repetições teloméricas intracromossômicas, uma parcela das TRFs observadas pode ser devido a essas repetições e não a repetições teloméricas localizadas na extremidade dos cromossomos.

Um achado interessante nos estudos com Bal 31 foi a identificação de uma banda com aproximadamente 800 pb em todas as reações de clivagem testadas. A ocorrência dessa banda sugere a existência de repetições teloméricas intersticiais (ITRs). ITRs já foram descritas para uma grande variedade de espécies como humanos (Weber e cols., 1990, Ijdo e cols., 1991), lêmures (Go e cols., 2000), porcos (de la Seña e cols., 1995), camundongos (Yen e cols., 1997), girafas (Vermeesch e cols., 1996) e galinhas (Nanda e Schmid, 1994).

Entretanto, a origem dessas repetições ainda não foi elucidada. Alguns sugerem uma origem devido à mutação (Wiley e cols., 1992; Vermeesch e cols., 1996 e Sharma e Sharma 1998). Outros estudos sugerem que elas teriam se originado de vestígios de telômeros resultantes de arranjos cromossômicos como inversões, fusões cêntricas ou *em tandem*, que ocorreram durante a evolução do cariótipo (Lee e cols., 1993; Fagundes e cols., 1997; Pellegrino e cols., 1999; Tek e Jiang, 2004).

A ocorrência mais comum das repetições intracromossômicas é na região pericêntrica, o que poderia explicar o fato dessas seqüências serem componentes de DNA satélite de algumas espécies de mamíferos (Garagna e cols., 1997). Agudo e cols. (1999) sugeriram que as repetições teloméricas estejam envolvidas em funções centroméricas, pois as repetições teloméricas nas extremidades dos cromossomos de *Caenorhabditis elegans* e *Schizosaccharomyces pombe* são responsáveis pela fixação do fuso durante prófase da meiose.

A existência dessas repetições intersticiais em *E. granulosus* pode estar associada à imensa heterogeneidade encontrada na análise das TRFs, uma vez que elas apresentam as mesmas características das seqüências teloméricas. As ITRs podem ser responsáveis por parte da heterogeneidade encontrada na análise do tamanho dos telômeros.

As análises das hibridizações obtidas nos experimentos utilizando a nuclease Bal 31 sugerem que o tamanho do telômero do isolado de *E. granulosus* analisado seja superior à 2700 pb. É importante destacar a ocorrência de uma grande heterogeneidade entre os diferentes isolados, o que indica que o tamanho superior a 2700 pb observado nesse experimento refira-se apenas ao isolado 388. Esses dados corroboram os resultados obtidos com TRFs que mostram uma grande variação no tamanho dos telômeros.

A utilização da técnica de TRF mostrou-se onerosa, além de necessitar de uma grande quantidade de DNA de ótima qualidade. Não obstante, a identificação, nesse trabalho, de repetições teloméricas intersticiais nos leva a sugerir que os sinais de hibridização observados podem ser, em parte repetições teloméricas intracromossômicas e não só devido a seqüências teloméricas existentes na extremidade do cromossomo. A ocorrência dessas repetições intracromossômicas dificulta a análise da heterogeneidade observada pois o sinal de hibridização detectado é, na verdade, uma mistura de repetições teloméricas intracromossômicas e repetições que ocorrem na extremidade do cromossomo.

O tamanho exato do genoma de *E. granulosus* não é conhecido. Porém, acredita-se que ele esteja entre 10^5 e 10^6 kb, levando-nos a crer que o DNA genômico íntegro de *E. granulosus* é grande demais para apresentar uma boa resolução na eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Sendo assim, os blocos contendo os diferentes isolados foram submetidos à clivagem com diferentes enzimas antes de serem aplicados no gel.

A condição utilizada para os primeiros testes foi a mesma empregada por del Portillo, (2001) para separar os cromossomos de *Plasmodium vivax*. No entanto, as 72 horas de corrida foram excessivas e os fragmentos cromossômicos digeridos com *EcoRI* migraram muito no gel. Durante essa eletroforese o tempo de pulso foi aumentado a cada 24 horas, para que as moléculas menores fossem inicialmente separadas e posteriormente, com o aumento do tempo de pulso, as moléculas grandes foram separadas.

Outras condições de migração também foram testadas, mas a separação observada ainda não foi a ideal, pois as amostras também não apresentaram a resolução desejada. Optou-se por testar outras enzimas de restrição com o objetivo de verificar se elas seriam capazes de gerar fragmentos menores. Os menores fragmentos obtidos foram gerados a partir da clivagem com RsaI.

Os cromossomos de *E. granulosus* são pequenos e as mitoses são raras, o que dificulta os estudos de citologia com esse organismo. Portanto, a padronização da técnica de PFGE pode ser muito útil no estudo de seus cromossomos. Em tese, o *Pulse Field* é capaz de separar cromossomos, permitindo, assim, a hibridização de sondas específicas em cromossomos individuais. Outros testes utilizando diferentes condições de migração e outras enzimas deverão ser realizadas com o intuito de obter uma melhor resolução na separação cromossômica das amostras de *E. granulosus* por PFGE.

Com o objetivo de testar a hipótese de localização sub-telomérica dos genes que codificam o AgB foram realizadas reações de XL-PCR utilizando *primers* específicos para os genes já descritos de AgB e um *primer* contendo a seqüência consenso de telômero TelEchino. Essa reação difere das demais reações de PCR por utilizar uma enzima capaz de amplificar fragmentos de alto peso molecular.

A utilização dos *primers* específicos para o gene *AgB1* (*primers* B1F4 e B1F4inv) em conjunto com o *primer* da seqüência consenso de telômero (*primer* TelEchino) não amplificaram nenhum fragmento (figura 9) em nenhuma das reações testadas. Esses dados indicam que o gene que codifica *AgB1* deve estar a mais de 15 kb de distância da seqüência consenso de telômero, uma vez que o maior tempo de extensão utilizado permitia a amplificação de produtos de PCR com tamanho molecular de aproximadamente 15 kb.

A combinação dos demais *primers* específicos para cada um dos outros três genes de AgB (B2F3, B3F3, B4F3, B2F3inv, B3F3inv e B4F3inv) em combinação com o *primer* consenso de seqüência telomérica (TelEchino) amplificaram produtos de aproximadamente 3500 pb de tamanho. Esses amplicons podem indicar que esses genes devem estar localizados na mesma região, em cromossomos diferentes, uma vez que os *primers* utilizados geram fragmentos específicos para cada um dos genes. Um fato

interessante foi a amplificação de fragmentos de mesmo tamanho molecular quando utilizados os *primers* no sentido senso e no sentido senso invertido, levando-nos a sugerir que os genes devem estar em diferentes orientações em cromossomos diferentes.

É importante destacar que esse trabalho identificou seqüências teloméricas intersticiais, ou seja, seqüências que possuem o motivo telomérico C₃TA₂ repetido na região intracromossômica. Os produtos obtidos nessas reações podem ser derivados do anelamento do *primer* TelEchino nas repetições teloméricas internas e não do anelamento nas extremidades dos cromossomos. Estudos de hibridização *in situ* com cromossomos metafásicos de *E. granulosus* poderiam identificar mais precisamente em que região cromossômica os genes estão localizados.

A reação que utilizou o *primer* de *AgB3* (B3F3) em conjunto com o *primer* TelEchino gerou três fragmentos de tamanhos distintos. Além do fragmento comum às demais reações com tamanho aproximado de 4 kb, um fragmento de aproximadamente 1200 pb e outro de aproximadamente 1600 pb também foram observados. Esses resultados sugerem que o gene *AgB3* seja repetitivo. A ocorrência desses eventos poderia explicar a existência de redundância no gene *AgB3*. Esses dados corroboram estudos anteriores (Haag e cols., 2004) que sugerem que os genes de *AgB* estão representados em múltiplas cópias no genoma de *E. granulosus*.

A análise preliminar do seqüenciamento indicou que a seqüência analisada apresentou o mesmo valor de E para três dos genes *AgB3* descritos anteriormente e depositados no GenBank com os números de acesso AY 871010, AY871012 e AY871015 na banda de tamanho aproximado de 1600 pb. O valor de E indica o quão aleatório foi o alinhamento. Quanto menor esse valor, menor a probabilidade desse alinhamento ter ocorrido ao acaso. O completo seqüenciamento deste clone pode fornecer mais informação sobre a distribuição desses genes nos cromossomos.

Os amplicons resultantes das reações que utilizaram os *primers* específicos para *AgB2*, *AgB3* e *AgB4* juntamente com o *primer* que continha seqüência consenso de telômero evidencia que esses genes estão próximos de uma repetição telomérica. A ocorrência de repetições intersticiais do motivo telomérico sugere que o genoma de *E. granulosus* sofreu rearranjos cromossômicos durante a sua evolução. Esses rearranjos

podem ter originado novas cópias dos genes que codificam AgB em regiões intracromossômicas.

5.1 Conclusões

Tendo em vista os dados gerados durante a realização dessa dissertação podemos concluir que:

- 1) A análise das auto-radiografias dos TRFs revelou a ocorrência de heterogeneidade no tamanho da região telomérica em *E. granulosus*;
- 2) Os amplicons obtidos nas reações de XL-PCR indicam que repetições de seqüências teloméricas estão a aproximadamente 4 kb de distância dos genes que codificam o AgB2, AgB3 e AgB4;
- 3) Os três produtos de amplificação obtidos para *AgB3* sugerem que esses genes são redundantes e apresentam uma distribuição diferente dos demais genes no genoma de *E. granulosus*;
- 4) *AgB1* deve estar afastado a mais de 15kb das repetições teloméricas;
- 5) Os estudos realizados com a nuclease Bal31 demonstram que a região telomérica de *E. granulosus* pode apresentar um tamanho superior à 2700 pb;
- 6) O genoma de *E. granulosus* deve conter repetições teloméricas intracromossômicas de aproximadamente 800 pb;

5.2 Considerações finais e perspectivas

Uma abordagem que seria de grande interesse para esse e outros estudos envolvendo *E. granulosus* seria a construção de uma biblioteca de DNA genômico de *E. granulosus* em BACs, uma vez que a biblioteca permite a realização de *screening* dos genes de interesse, permitindo que possamos isolar grandes fragmentos que possuam o inserto que queremos estudar. A utilização dessa técnica permitiria identificarmos através de uma sonda contendo a seqüência telomérica, que está flanqueando essa região, facilitando a análise dos recombinantes. Esse experimento já foi iniciado no laboratório. O plasmídeo pBeloBac11 (gentilmente cedido pelo professor Gabriel Padilla Maldonado

(Departamento de Microbiologia- USP)), foi linearizado com a enzima *SacI*, que gera fragmentos com extremidades cegas e possui sítio único de clivagem, e desfosforilado com a enzima SAP (*Shrimp Alkalina Phosphatase* (Invitrogen)). Após a desfosforilação do plasmídeo foi realizada uma série de testes para comprovar a eficiência da desfosforilação. Também já possuímos as células de *E. coli* da linhagem DH10B que são as recomendadas na literatura para serem utilizadas com o pBeloBac11.

Outra abordagem que poderia ser utilizada é a de hibridização *in situ*. Essa técnica permite visualizar a região do cromossomo em que a sonda hibridiza. Assim poderíamos confirmar se uma sonda contendo o motivo telomérico C₃TA₂ hibridiza também na região intracromossômica. Uma posterior hibridização com uma sonda contendo os genes do *AgB* permitiria testar a hipótese de co-localização de ambos os genes. Entretanto, dada a dificuldade de obtenção de cromossomos deste organismo, as perspectivas de utilização de hibridização *in situ* para esta finalidade são poucas.

6 Referências Bibliográficas

- Agudo M, Losada A, Abad JP, Pimpinelli S, Ripoll Porco e Villasante A (1999) Centromeres from telomeres? The centromeric region of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* contains a tandem array of telomeric HeT-A- and TART-related sequences. *Nucleic Acids Res* 27: 3318-3324.
- Alves-Júnior L (2003) Caracterização de membros da família gênica do antígeno B nas espécies do gênero *Echinococcus*. Dissertação de mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Arambulo III P (1997) Public health importance of cystic echinococcosis in Latin America. *Acta Trop* 67: 113-124.
- Arend AC, Haag KL e Ayala FJ (2004) Variability among nucleotide sequences encoding EgAgB, an immunodiagnostic antigen of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol* 108: 76-80.
- Attanasio E, Ferretti G e Palmas C (1985) Hydatidosis in Sardinia: review and recommendations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 154-158.
- Barata RB (2000) Cem anos de endemias e epidemias. *Ciência e Saúde Coletiva* 5(2): 333-345.
- Barry JD, Ginger ML, Burton P e McCulloch R (2003) Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? *Int J Parasitol* 33: 29-45.
- Blackburn EH (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106: 661-673.
- Blackburn EH e Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120: 33-53.

- Bonifacino R, Malgor R, Barbeito R, Balleste R, Rodriguez MJ, Botto C e Klug F (1991) Seroprevalence of *Echinococcus granulosus* infection in a Uruguayan rural human population. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 769-772.
- Borst P (2002) Antigenic variation and allelic exclusion. *Cell* 109: 5-8.
- Bourée P (2001) Hydatidosis: dynamics of transmission. *World J Surg* 25: 4-9.
- Bowles J, Blair D e McManus DP (1992a) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54: 165-174.
- Bowles J e Mcmanus DP (1993a). NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *International Journal for Parasitology* 23: 969-972.
- Bowles J. e McManus DP (1993c). Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a PCR-based method. *Molecular and Biochemical Parasitology* 57: 231-239.
- Boyle JS e Lew AM (1995) An inexpensive alternative to glass milk for DNA purification. *Trends Genet* 11(1): 8.
- Bush AO, Fernández JC, Esch GW e Seed JR (2001) Parasitism – The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press, Cambridge, 566 pp.
- Carle GF e Olson MV (1984) Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 12(14): 5647-5664.
- Cech TR (2000) Life at the end of the chromosome: telomeres and telomerase. *Angew Chem Int Ed Engl* 39: 34-43.
- Chemale G, Haag K, Ferreira H e Zaha A (2001) *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol* 116: 233-237.

- Chi P, Zhang W, Zhang Z, Hasyet M, Liu F, Ding Z, Andersen FL, Tolley HD e Schantz PM (1990) Cystic echinococcosis in the Xinjiang/Uygur autonomous region, people's Republic of China. I. Demographic and epidemiologic data. *Trop Med Parasitol* 41(2): 157-162.
- Cooney RM, Flanagan KP e Zehyle e (2004) Review of surgical management of cystic hydatid disease in a resource limited setting: Turkana, Kenya. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16(11): 1233-1236.
- Cormack BP, Ghori N e Falkow S (1999) An adhesin of the *Candida glabrata* mediating adherence to human. *Science* 285: 578-582.
- de Bruim D, Lanzer M, Ravetch JV (1994) The polymorphic subtelomeric regions of *Plasmodium falciparum* chromosomes contains arrays of repetitive elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 619-623.
- de La Rue ML e Santos AP (1997) Echinococcus/hidatidosis in Rio Grande do Sul, State, Brazil. In: International congress of Hidatidology Lisbon-Portugal, 18. Portugal Proceedings. p. 231-34.
- de la Seña C, Chowdhary BP e Gustavsson I (1995) Localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequences in chromosomes of some domestic animals by fluorescence in situ hybridization. *Hereditas* 123: 269-274.
- de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM e Varmus HE (1990) Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10(2): 518-527.
- de Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R e Cormack BP (2003) Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* 17: 2245-2258.
- del Portillo HA, Fernandez-Becerra C, Bowman S, Oliver K, Preuss M, Sanchez CP, Scheneider NK, Villalobos JM, Rajandream M, Harris D, da Silva LHP, Barrel B e

- Lanzer M (2001) A Superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* 410: 839-842.
- Deplazes P, Hegglin D, Gloor S e Romig T (2004) Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends Parasitol* (2) 20: 77-84.
- Dernburg AF, Sedat JW, Cande WZ e Bass HW (1995) Cytology of telomeres. In: Blackburn EH e Greider CW (eds) *Telomeres* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 295-338.
- Donelson JE (2003) Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop* 85: 391-404.
- Eckert J, Conraths FJ e Tackmann K (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int J Parasitol* 30: 1283-1294.
- El-On J, Khaleel E, Malsha Y, Nahmias J, Schantz P, Sneir R, Ben-Ismael R, Furth M e Hoida G (1997) *Echinococcus granulosus*: a seroepidemiological survey in northern Israel using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 529-532.
- Fagundes V, Scalzi-Martin JM, Sims K, Hozier J e Yonenaga-Yassuda Y (1997) ZOO-FISH of microdissection DNA library and G-banding patterns reveal the homeology between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *A. montensis*. *Cytogenet Cell Genet* 78: 224-228.
- Farias LN, Malgor R, Cassaravilla C, Bragança C e De La Rue ML (2004) Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 46(3): 153-156.
- Fernandez V, Ferreira H, Fernandez C e Zaha A (1996) Molecular characterization of a novel 8-KDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Mol Biochem Parasitol* 77: 247-250.

- Ferreira HB e Zaha A (1994) Expression and analysis of the diagnostic value of an *Echinococcus granulosus* antigen gene clone. *Int J Parasitol* 10: 863-870.
- Figueiredo LM, Freitas-Junior LH, Bottius E, Olivo-Marin J e Scherf A (2002) A central role for *Plasmodium falciparum* subtelomeric regions in spatial positioning and telomere length regulation. *EMBO Journal* 21(4): 815-824.
- Foster WD (1965) A history of parasitology. E & S Livington Ltda, Edimburgo-Londres.
- Frosch P, Hartmann M, Muhlschlegel F e Frosch M (1994) Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Mol Biochem Parasitol* 64: 171-175.
- Garagna S, Ronchetti E, Mascheretti S, Crovella S, Formenti D, Rumpler Y e Romanini MGM (1997) Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus *Eulemur*. *Chromosome Res* 5: 487-491.
- Gardner MJ, Tettelin H, Carucci DJ, Cummings LM, Aravind L, Koonin EV, Shallom S, Mason T, Yu K, Fujii C, Pederson J, Shen K, Jing J, Aston C, Lai Z, Schwartz DC, Pertea M, Salzberg S, Zhou L, Sutton GG, Clayton R, White O, Smith HO, Fraser CM, Adams MD, Venter JC e Hoffman SJ (1998) Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 282: 1126-1132.
- Go Y, Rakotoarisoa G, Kawamoto Y, Randrianjafy A, Koyama N e Hirai H (2000) PRINS analysis of the telomeric sequence in seven lemurs. *Chromosome Res* 8(1): 57-65.
- Goldsmith R, Nahmias J, Schantz P, Peleg H, Shtamler B e El-On J (1991) Resurgence of hydatid disease (echinococcosis) in communities in northern Israel. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 98-100.
- Gonzalez G, Nieto A, Fernandez C, Orn A, Wernstedt C e Hellman U (1996) Two different 8 KDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol* 18: 587-596.
- González-Sapienza G, Lorenzo C e Nieto A (2000) Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of

- its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. J Clin Microbiol 38: 3979–3983.
- Craig PS, Giraudoux P, Shi D, Bartholomot B, Barnish G, Delattre P, Quere JP, Harraga S, Bao G, Wang Y, Lu F, Ito A e Vuitton DA (2000) An epidemiological and ecological study of human alveolar echinococcosis transmission in south Gansu, China. Acta Trop 77: 167–177.
- Haag KL, Araújo A, Gottstein B e Zaha A (1998) Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequence. Mem Inst Oswaldo Cruz 93(5): 695- 702.
- Haag KL, Araújo AM, Gottstein B, Siles-Lucas M, Thompson RCA e Zaha A (1999) Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or out crossing? Parasitology 118: 63-71.
- Haag KL, Alves-Junior L, Zaha A e Ayala FJ (2004) Contingent, non-neutral evolution in multi-cellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. Gene 333: 157–167.
- Haldane JBS (1949) Disease and evolution. La Ricerca Scientifica19: 3-11.
- Halme SA, Bumgarner S, Styles C e Fink G (2004) Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast antigen recognized by the host immune system. Cell 116: 405-415.
- Hernandez-Rivas R e Scherf A (1997) Separation and mapping of chromosomes of parasitic protozoa. Mem Inst Oswaldo Cruz 92(6): 815-819.
- Hoyer LL (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiol 9: 176-180.
- Ijdo JW, Baldini A, Ward DC, Reeders ST e Wells RA (1991) Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion. Proc Natl Acad Sci USA 88(20): 9051-9055.

- Irshadullah M, Nizami WA e MacPherson CNL (1989) Observations on the suitability and importance of the domestic intermediate hosts of *Echinococcus granulosus* in Uttar Pradesh, India. *J Helminthol* 63: 39-45.
- Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, García GE e Rosenzvit MC (2002) Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol* 2: 129-136.
- Kenny JV e MacCabe RJ (1993) Sero-epidemiology of hydatid disease in the non-intervention area of northeast Turkana. *Ann Trop Med Parasitol* 87:451-457.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL e Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2911-2915.
- Kipling D, Salido EC, Shapiro LJ e Cooke HJ (1996) High frequency de novo alterations in the long-range genomic structure of the mouse pseudoautosomal region. *Nat Genet* 13: 78-82.
- Kirk KE, Harmon BP, Reichard IK, Sedat JW e Blackburn EH (1997) Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science* 275: 1478-1481.
- Klobutcher LA, Swanton MT, Donini P e Prescott DM (1981) All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3015-3019.
- Klungsoyr P, Courtright P e Hendrikson TH (1993) Hydatid disease in the Hamar of Ethiopia: a public health problem for women. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87:254-255.
- Kumaratilake LM, Thompson RCA, Eckert J e D'alessandro A (1986) Sperm transfer in *Echinococcus*. *Z Parasitenkd* 72: 265-269.

- Larrieu EJ, Costa MT, del Carpio M, Moguillansky S, Bianchi G e Yandon ZE (2002) A case-control study of the risk factors for cystic echinococcosis among the children of Rio Negro province, Argentina. *Ann Trop Med Parasitol* 96(1): 43-52 .
- Lawson JR e Gemmel MA (1983) Hydatidosis and cysticercosis: the dynamics of transmission. *Adv Parasitol* 22: 261-308.
- Lee C, Sasi R e Lin CC (1993) Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. *Cytogenet Cell Genet* 63: 156-159.
- Lightowlers M, Dongyou L e Haralambous A (1989) Subunit composition and specificity of major cyst antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 37: 171-182.
- Linardopoulo E, Mefford HC, Nguyen O, Friedman C, va der Engh G, Farwell DG, Coltrera M e Trask B (2001) Transcriptional activity of multiple copies of a subtelomerically located olfactory receptor that is polymorphic in number and localization. *Hum Mol Genet* 10(21): 2373-2383.
- Lymbery AJ e Thompson RCA (1988) Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. *Int J Parasitol* 18: 803-811.
- Lymbery AJ, Constantine CC e Thompson CA (1997) Self-fertilization without genomic or population structuring in a parasitic tapeworm. *Evolution* 51(1): 289-294.
- Macpherson CNL e Macpherson C (1986) Hydatid disease: research and control in Turkana. IV. The pilot control programme. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 196.
- Macpherson CNL, French CM, Stevenson P, Karstad L e Arundel JH (1985) Hydatid disease in the Turkana district of Kenya. IV. The prevalence of *Echinococcus granulosus* infections in dogs, and observations on the role of the dog in the lifestyle of the Turkana. *Ann Trop Med Parasitol* 79:51- 61.

- Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Sato N, Vuitton DA, Piarroux R, Lightowers MW, Craig PS e Ito A (2004) Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. *J Clin Microbiol* 42(3): 1082-1088.
- Manolis KG, Nimmo ER, Hartsuiker E, Carr AM, Jeggo PA e Allshire RC (2001) Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO Journal* 20: 210-221.
- Mason JM e Biessmann H (1995) The unusual telomeres of *Drosophila*. *Trends Genet* 11(2): 58-62.
- McManus D, Knight M e Simpson JG (1985) Isolation and characterization of nucleic acids from the hydatidic organisms, *Echinococcus* spp. (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 16: 251-266.
- McManus DP e Symyth JD (1986) Hidatidosis: changing concepts in epidemiology and speciation. *Parasitol Today* 2: 163-167.
- McManus DP, Ding X e Bowles J (1994). A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Acta Tropica* 56: 7-14.
- McManus DP e Bryant C (1995) Biochemistry, physiology and molecular biology of *Echinococcus*. In: Thompson RCA e Lymbery AJ (eds) *Echinococcus* and hydatid disease, CAB International, Wallingford, pp 135-182.
- Moro PL, McDonald J, Gilman RH, Silva B, Verastegui M, Malqui V, Lescano G, Falcon N, Montes G e Bazalar H (1997) Epidemiology of *Echinococcus granulosus* infection in the central Peruvian Andes. *Bull W.H.O.* 75:553.
- Moxon ER, Rainey PB, Novak MA e Lenski RE (1994) Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol* 4: 24-33.

- Nakagawa S, Gemmell NJ e Burke T (2004) Measuring vertebrate telomeres: applications and limitations. *Mol Ecol* 13(9): 2523-2533.
- Nanda I e Schmid M (1994) Localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in chicken (*Gallus domesticus*) chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 65: 190-193.
- Neidle S e Parkinson GN (2003) The structure of telomeric DNA. *Curr Opin Struct Biol* 13(3): 275-83.
- Nelson GS (1986) Hydatid disease: research and control in Turkana, Kenya. Epidemiological observation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 177-182.
- Oriol R, Willian M, Esandi P e Oriol C (1971) Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am J Trop Med Hyg* 20(4): 569-574.
- Oriol R e Oriol C (1975) Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg* 24: 96-100.
- Ortona E, Riganò R, Margutti P, Notargiacomo S, Ioppolo S, Vaccari S, Barca S, Buttari B, Profumo E, Teggi A e Siracusano A (2000) Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasite Immunol* 22(11): 553-559.
- Ortona E, Riganò R, Buttari B, Delanuardo F, Ioppolo S, Margutti P, Profuno E, Teggi A, Vaccari S e Siracusano A (2003) An update on immunodiagnostic of cystic Echinococcosis. *Acta Trop* 85: 165-171.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT e Yonenaga-Yassuda Y (1999) Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas* 131: 15-21.
- Petavy AF, Tenora F, Deblock S e Sergent V (2000). *Echinococcus multilocularis* in domestic cats in France: A potential risk factor for alveolar hydatid disease contamination in humans. *Vet Parasitol* 87: 151-156.

- Price PW (1980) Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 237 pp.
- Pryde FE, Gorham HC e Louis EJ (1997) Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev* 7: 829-828.
- Rausch VR e Rausch RL (1981) The Karyotype of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda:Taeniidae). *Can J Genet Cytol* 23: 151-154.
- Rey L (1991) Parasitologia. 2º edição. Editora Guanabara Koogan.
- Rich SM, Sawyer SA e Barbour AG (2001) Antigenic polymorphism in *Borrelia hermsii*, a clonal pathogenic bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15038-15043.
- Rickard MD, Davies C, Bout DT e Smyth JD (1977) Immunohistological localization of two hydatid antigens (antigen 5 and antigen B) in the cyst wall, brood capsules and protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (ovine and equine) and *E. multilocularis*, using immunoperoxidase methods. *J Helminthol* 51: 359-364.
- Riganò R, Profuno E, Bruschi F, Carulli G, Azarrà A, Ioppolo S, Buttari B, Ortona E, Margutti P, Teggi A e Siracusano A (2001) Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect Immun* 69: 288-296.
- Riganò R, Buttari B, Profuno E, Ortona E, Margutti P, Teggi A e Siracusano A (2002) Apoptosis modulation in PMBC from patients with cystic echinococcosis 51st Annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygiene. p. 277.
- Roneus O, Christensson D e Nilsson NG (1982) The longevity of hydatid cysts in horses. *Vet. Parasitol* 11: 149-154.
- Rott M, Fernandez V, Farias S, Ceni J, Ferreira HB, Haag KL e Zaha A (2000) Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Trop* 75: 331-340.

- Saghir N, Conde PJ, Brophy PM e Barret J (2000) A new diagnostic for neurocysticercosis is a member of cestode specific hydrophobic ligand binding protein family. *FEBS Letters* 487: 181-184.
- Sambrook J, Fritsch EF e Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor, 3 V.
- Sambrook J e Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor, 3 V.
- Sanchez F, March F, Mercader M, Coll P, Muñoz G e Prats G (1991) Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoescolices and cysts of *Echinococcus granulosus* from human origin. *Parasite Immunol* 13: 583-592.
- Schantz PM (1989) Echinococcosis/Hidatidosis (Hydatid disease). In: Goldsmyth R and Heyneman D. *Tropical Medicine and Parasitology*. East Norwall, Appleton and Lange. pp. 503-511.
- Schantz PM, Chai J, Craig PS, Eckert J, Jenkins DJ, Macpherson CNL e Thakur A (1995) Epidemiology and control of hydatid disease. In: Thompson RCA e Lymbery AJ (eds) *Echinococcus and hydatid disease*. CAB International, Wallingford, pp 233-332.
- Scherf A (1996) *Plasmodium* telomeres and telomere proximal gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 7: 49-57.
- Scherf A, Figueiredo LM e Freitas-Junior LH (2001) *Plasmodium* telomeres: a pathogen's perspective. *Curr Opin Microbiol* 4: 409-411.
- Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski e McManus DP (1997) Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 114: 37-43.
- Seimenis A (2003) Overview of the epidemiological situation on echinococcosis in the Mediterranean region. *Acta Trop* 85: 191-195.

- Sharma GG e Sharma T (1998) Unusual chromosomal organization of telomeric sequences and expeditious karyotypic differentiation in the recently evolved *Mus terricolor* complex. *Cytogenet Cell Genet* 80: 204-208.
- Sharon D, Glusman G, Pilpel Y, Khen M, Gruetzner F, Haaf T e Lancet D (1999) Primate evolution of an olfactory receptor cluster: diversification by gene conversion and recent emergence of pseudogenes. *Genomics* 61: 24-36.
- Shepherd J, Aitken A e McManus D (1991) A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol Biochem Parasitol* 44: 81-90.
- Smyth JD (1962) The chromosome number of *Echinococcus granulosus*. *J Parasitol* 48: 544.
- Smyth JD e Smyth MM (1969) Self-insemination in *Echinococcus granulosus in vivo*. *J Helminthol* 43: 383-388.
- Sotiraki S, Himonas C e Korkoliakou (2003) Hydatidosis: echinococcosis in Greece. *Acta Trop* 85: 197-201.
- Spruance SL (1974) Latent period of 53 years in a case of hydatid cyst disease. *Arch Intern Med* 134: 741-742.
- Starling JA, Maule J, Hatie ND e Allshire RC (1990) Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res* 18: 6881-6888.
- Stringer JR e Keely SP (2001) Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 69: 627-639.
- Tek AL e Jiang J (2004) The centromeric regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence. *Chromosoma* 113: 77-83.
- Thompson RCA e Smyth JD (1975) Equine hydatidosis: a review of the current status in Great Britain and the results of an epidemiological survey. *Vet Parasitol* 1: 107-127.

- Thompson RCA, Robertson ID, Gasser RB e Constantine CC (1993) Hydatid disease in western Australia: a novel approach to education and surveillance. *Parasitol Today* 9: 431- 433.
- Thompson RCA (1995) Biology and systematic of *Echinococcus*. In: Thompson RCA *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford. cap. 1
- Thompson RCA, Lymbery AJ e Constantine CC (1995) Variation in *Echinococcus* - Towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* 35: 145-176.
- Thompson RCA e McManus DP (2001) Aetiology: parasites and life cycles. In: WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. OIE/WHO. Paris, cap.1.
- Thompson RCA e McManus DP (2002) Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18: 452-457.
- Torgerson PR e Budke CM (2003) Echinococcosis – an international public health challenge. *Res Vet Sci* 74: 191-202
- Vermeesch JR, de Meurichy W, van Den Berghe H, Marynen P e Petit P (1996) Differences in the distribution and nature of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in the chromosomes of Girafidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob (4;26) fusion site. *Cytogenet Cell Genet* 72: 310-315.
- Virginio V, Hernandez A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, Zaha A e Ferreira HB (2003) A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol* 132: 309–315.
- Von Sinner W (1997) Imaging of cystic echinococcosis. *Acta Trop* 67: 67-89.

- Weber B, Collins C, Robbins C, Magenis RE, Delaney AD, Gray JW e Hayden MR (1990) Characterization and organization of DNA sequences adjacent to the human telomere associated repeat (TTAGGG)_n. *Nucleic Acids Res* 18: 3353-3361.
- Wiley JE, Meyne J, Little ML e Stout JC (1992) Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence on the chromosomes of some North American hyloid frogs. *Cytogenet Cell Genet* 61: 55-57.
- Yarzabal LA, Dupas H, Bout D, Naquira F e Capron A (1977) *Echinococcus granulosus*: the distribution of Hydatid fluid antigens in the tissue of the larval stage. II. Localization of the thermostable lipoprotein of parasitic origin (Antigen B). *Exp Parasitol* 42: 115-120.
- Yen CH, Pazik J, Zhang Y e Elliott RW (1997) An interstitial telomere array proximal to the distal telomere of mouse chromosome 13. *Mamm Genome* 8: 411-417.
- Zakian VA (1995) Telomeres: beginning to understand the End. *Science* 270: 1601-1607.
- Zhang W, Li J e McManus DP (2003a) Concepts in immunology and diagnosis of hydatid Disease. *Clin Microbiol Rev* 16(1): 18-36.
- Zhang W, You H, Li J, Zhang Z, Turson G, Aili H, Wang J e McManus DP (2003b) Immunoglobulin profiles in a murine intermediate host model of resistance for *Echinococcus granulosus* infection. *Parasite Immunol* 25: 161-168.
- Zijlmans JMJM, Martens UM, Poon SSS, Raap AK, Tanke HJ, Wards RK e Landsdorp PM (1997) Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7423-7428.