

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEC
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

Comparação de metodologias para a genotipagem das espécies *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) e *Echinococcus ortleppi* (G5)

Filipe Santos Pereira Dutra

Pelotas, 2014

Filipe Santos Pereira Dutra

Comparação de metodologias para a genotipagem das espécies *Echinococcus granulosus sensu stricto (G1)* e *Echinococcus ortleppi (G5)*

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Dr. Fabricio Rochedo Conceição

Orientador de Estágio: Dr. Arnaldo Zaha

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

D978c

Dutra, Filipe Santos Pereira

Comparação de metodologias para a genotipagem das espécies *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) e *Echinococcus ortleppi* (G5) / Filipe Santos Pereira Dutra. – 44f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2013. – Orientador Fabrício Rochedo Conceição ; co-orientador Arnaldo Zaha.

1.Biotecnologia. 2.Endonuclease. 3.*Echinococcus granulosus*. 4.*Echinococcus ortleppi*. 5.Rio Grande do Sul. 6.HRM. 7.Hidatidose. 8.Cisto hidático. 9.Bovinos. I.Conceição, Fabrício Rochedo. II.Zaha, Arnaldo. III.Título.

CDD: 591.7857

Filipe Santos Pereira Dutra

Comparação de metodologias para a genotipagem das espécies *Echinococcus granulosus sensu stricto (G1)* e *Echinococcus ortleppi (G5)*

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 6 de janeiro de 2014

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabrício Rochedo Conceição (Orientador Acadêmico)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Profa. Dra. Sibeles Borsuk
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

MSc Guilherme Brzoskowski dos Santos
Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedicatória:

“Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha família e aos meus amigos. Sem eles, não teria chegado até aqui.”

Agradecimentos

Primeiramente à minha mãe e a minha avó, pelo apoio e incentivo durante esses quatros de graduação, sempre me apoiando para que eu pudesse alcançar meus sonhos.

À minha família, pelo incentivo, em especial aos meus tios, Milton e Cléia, pelo apoio durante o período que estive em Porto Alegre.

Ao meu orientador acadêmico Dr. Fabrício Conceição pela confiança a mim investida e contribuição para o aperfeiçoamento do trabalho.

Ao meu orientador de estágio Dr. Arnaldo Zaha, pela oportunidade de estágio em seu laboratório, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

Ao supervisor e amigo Guilherme Brzoskowski dos Santos pelos ensinamentos, paciência e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas dos laboratórios 204/206, em especial aos amigos Guilherme Barros, Edileuza, João, Tatiana, Martin, Karina, William, Aline, Fernanda, Bruna e Cibele.

Aos colegas de graduação pela convivência, amizade e artigos ao longo desses três anos e meio, em especial ao Frederico, Cintia, Fabrício, Francine Ribeiro, Francine Maagh, Vinicius, Lívia, Gabriella Borba, Luiza, Emily, Tatiana, Delva e Helene.

Aproveito para agradecer a todos os professores pelos ensinamentos ao longo da graduação.

Agradeço as professoras Dra. Francieli Stefanello e Dra. Sibebe Borsuk pelos ensinamentos ao longo da minha iniciação científica, e a professora Dra. Luciana Dode, pelo apoio e incentivo.

Agradeço a FAPERGS pelo apoio financeiro durante os dois anos que fui bolsista de iniciação científica.

Muito obrigado!

“A simplicidade é o último grau de sofisticação.”

Leonardo da Vinci

Resumo

DUTRA, Filipe Santos Pereira. **Comparação de metodologias para a genotipagem das espécies *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) e *Echinococcus ortleppi* (G5)**. 2013. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A equinococose ou hidatidose é uma grave doença parasitária causada por platelmintos do gênero *Echinococcus*. Essa enfermidade causa morbidade grave, acometendo cerca de 3 milhões de pessoas no mundo. O impacto econômico com o parasito no mundo é estimado em 3 bilhões de dólares por ano. A análise molecular desses parasitos do gênero *Echinococcus* revelou ser um processo complexo, que resultou na revisão da filogenia do gênero. Devido a isso, atualmente para a diferenciação das atuais espécies presentes no gênero é realizado pelo uso de métodos moleculares. O método atualmente mais utilizado é o sequenciamento de alguns genes, como o gene mitocondrial *cox-1*, apesar disso, essa metodologia é onerosa, laboriosa e demorada. Nesse contexto, este trabalho propõe duas metodologias alternativas, a análise do padrão de clivagem pela enzima de restrição *AluI* e a análise por HRM. A análise do padrão de clivagem permitiu a diferenciação das duas espécies/haplótipos do gênero *Echinococcus* presentes no estado do Rio Grande do Sul. Essa diferenciação é através da presença ou da ausência do único sítio de clivagem para a endonuclease *AluI* no gene *cox-1*, presente em *E. granulosus* (G1) e ausente em *E. ortleppi* (G5). A técnica de HRM é uma metodologia nova, baseada em uma das propriedades intrínsecas do DNA, a desnaturação. Essa metodologia permite a correlação entre a temperatura de desnaturação com a composição do fragmento de DNA, possibilitando a diferenciação entre genótipos/espécies. Para comparar a eficácia dessas metodologias foram utilizadas 49 amostras, cinco de cistos inférteis e 44 cistos férteis e como controle, foram utilizados duas amostras já caracterizadas, uma de G1 e outra de G5. Os cinco inférteis analisados foram determinados como genótipo G1, dos férteis, 24 cistos eram de G5 e 20 cistos eram de G1. Houve uma correlação de todos os resultados entre as duas metodologias. O sequenciamento foi possível para 31 amostras, e nessas houve a confirmação dos resultados apresentados nas demais metodologias. Mesmo sem os dados do sequenciamento para 18 amostras, essas foram genotipadas por clivagem enzimática e por HRM. Devido a características intrínsecas, a análise por HRM é a mais indicada em substituição ao sequenciamento, pois apresenta menos limitações e maior potencial quando comparada a clivagem com a endonuclease *AluI*.

Palavras-chave: Endonuclease, HRM, hidatidose, cisto hidático, sequenciamento, bovinos, Rio Grande do Sul.

Abstract

DUTRA, Filipe Santos Pereira. **Comparison of methods for *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) and *Echinococcus ortleppi* (G5) genotyping.** 2013. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The Echinococcosis or hydatid disease is a serious disease caused by parasitic flatworms of the genus *Echinococcus*. This illness causes severe morbidity, affecting approximately 3 million people in the world. The economic impact of the parasite in the world is estimated at 3 billion of dollars per year. Molecular analysis of the genus *Echinococcus* proved to be a complex process that resulted in a revision of the phylogeny of genus. Because of it, the differentiation of the current species of the genus is realized by the use of molecular methods. The currently most widely used is the sequencing method of some genes, such as *cox-1*, a mitochondrial gene. Nevertheless, the sequencing is a costly, laborious and time-consuming technique. In this context, this work evaluated two alternative methodologies, the analysis of the pattern of cleavage by restriction enzyme *AluI* and the HRM. The analysis of the cleavage pattern allows the differentiation of the two local species/haplotypes of genus *Echinococcus*, present in the state of Rio Grande do Sul. This differentiation is possible by the presence or absence of the a single cleavage site for the restriction endonuclease *AluI* in the *cox-1* gene, present in *E. granulosus* (G1) and absent in *E. ortleppi* (G5). The technique of HRM is a new methodology based on one of the intrinsic properties of DNA, the denaturation. This method allows the correlation between the denaturation temperature with the determination of the composition of the sequence, allowing the differentiation between different genotypes/species. To compare the efficacy of these methods was utilized 49 samples, 5 from infertile cysts and 44 from fertile cysts, and like control, two sample already characterized, one each of G5 and G1 genotype. The 5 infertile cysts analyzed were determined as genotype G1 and the cysts fertile, 24 cysts were G5 and 20 cysts were G1. There was a correlation of all results between both two methodologies. Sequencing was possible for 31 samples, and these were able to confirm the results presented in other methodologies. Even without the data about the sequencing for 18 samples, these were genotyped by enzymatic cleavage and HRM. Due to the intrinsic characteristics, the HRM analysis is more appropriate to replace sequencing, as it has fewer limitations and greater potential compared to cleavage with endonuclease *AluI*.

Keywords: Endonuclease, HRM, hydatid cysts, sequencing, bovines, Rio Grande do Sul.

Lista de Figuras

Figura 1	Incidência Mundial da Equinococose Cística	20
Figura 2	Ciclo de vida do <i>Echinococcus granulosus</i>	21
Figura 3	Estrutura Interna do Metacestóide	22
Figura 4	Árvores filogenéticas de <i>Echinococcus</i> spp.	24
Figura 5	Gel de Agarose 1,2 % do produto de PCR do gene <i>cox-1</i>	31
Figura 6	Sítios de clivagem para <i>AluI</i> no fragmento do gene <i>cox-1</i> de G1 e G5.....	31
Figura 7	Gel de agarose 1,2 % mostrando as análise dos padrões de clivagem dos fragmentos amplificado pela enzima de restrição <i>AluI</i>	31
Figura 8	Gráfico gerado pelo software do RotorGene-Q.	32
Figura 9	Alinhamento das sequências da subunidade I do gene <i>cox-1</i> (444 pb) de G1 e G5, através do software GeneDoc 2.6.002	33

Lista de Tabelas

Tabela 1	Identificação, viabilidade, procedência, localidade, órgão onde o parasito se localizava e o resultado da genotipagem de todas as amostras utilizadas em cada metodologia	334
----------	---	-----

Lista de Abreviaturas e Siglas

AT	Adenina (A) e Timina (T)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CG	Citosina (C) e Guanina (G)
CLG	Camada laminar e germinativa
Cox-1	Subunidade I do citocromo c oxidase
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	dexorribonucleotídeos
g	força centrífuga relativa
G1	linhagem cão-ovelha, atual <i>E. granulosus</i> sensu stricto
G2	linhagem cão-ovelha Tasmânia, atual <i>E. granulosus</i> sensu stricto
G3	linhagem cão-búfalo, atual <i>E. granulosus</i> sensu stricto
G4	linhagem cão-equino, atual <i>E. equinus</i>
G5	linhagem cão-bovino, atual <i>E. ortleppi</i> .
G6	linhagem cão-camelo, atual <i>E. canadensis</i>
G7	linhagem cão-suíno, atual <i>E. canadensis</i>
G8	linhagem cão-cervídeos, atual <i>E. canadensis</i>
G10	linhagem cão-cervídeos, atual <i>E. canadensis</i>
h	horas
HEPES	ácido N-(2-hidróxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico
HRM	<i>high resolution melting</i>
KCl	cloreto de potássio
M	molar
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
MgCl ₂	cloreto de magnésio
NaOH	hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

RNA	ácido ribonucleico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	potencial hidrogeniônico
s	segundos
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
T _m	<i>melting temperature</i>
Tris-HCl	tampão
U	unidade
µg	micrograma
µL	microlitro
UV	ultravioleta

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1. Gênero <i>Echinococcus</i>	18
3.3. <i>Echinococcus granulosus</i> sensu stricto.....	19
3.3.1. Ciclo de Vida do <i>E. granulosus</i> e controle.....	20
3.4. <i>Echinococcus ortleppi</i>	23
3.5. Genotipagem e diferenciação das linhagens/espécies de <i>Echinococcus</i> spp.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Amostras Biológicas	26
4.2. Extração de DNA	26
4.2.1. Cistos Fértéis (Extração Bruta de DNA).....	26
4.2.2. Cistos Inférteis	27
4.3. Amplificação por PCR.....	27
4.3.1. Clivagem Enzimática	28
4.3.2. Análise por HRM.....	29
4.3.3. Sequenciamento.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Amostras Biológicas	30
5.2. Extração de DNA e Amplificação	30
5.1. Clivagem Enzimática	31
5.3. Curvas de HRM	32
5.4. Sequenciamento.....	32
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÃO	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1. INTRODUÇÃO GERAL

A equinococose ou hidatidose é uma grave doença parasitária que causa morbidade grave e se não tratada pode levar morte, por isso é classificada entre as dezessete doenças negligenciadas priorizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013). A doença é causada pelos platelmintos do gênero *Echinococcus* da Classe Cestoda. Essa zoonose possui grande impacto médico, veterinário e econômico em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil. Estimativas atuais da OMS indicam perdas anuais em torno de 3 bilhões de dólares. Estima-se que cerca de 3 milhões de pessoas ao redor do mundo possam estar infectadas com o parasito (CRAIG *et al.*, 2007; CARDONA *et al.*, 2013).

Nos últimos anos houve inúmeros avanços no conhecimento molecular e ecológico do parasito, o que ocasionou um complexo processo de revisão da filogenia e taxonomia do gênero *Echinococcus* (NAKAO *et al.*, 2013). Como resultado desse processo apenas as características morfológicas, principalmente nas fases larvais e pré-adultas, não são suficientes para a identificação precisa das espécies de *Echinococcus* spp.

Devido a esse processo de revisão do gênero *Echinococcus*, a forma mais indicada para a identificação e a caracterização das espécies/haplótipos é através do uso de ferramentas moleculares (SHARMA *et al.*, 2013). Entre esses métodos, os mais citados pela literatura, são os sequenciamentos tanto de genes mitocondriais como de nucleares, a exemplo da subunidade I do gene mitocondrial citocromo c oxidase (cox-1), descrito por Bowles em 1992 (BOWLES *et al.*, 1992).

O sequenciamento de fragmentos específicos de DNA é considerado como a técnica "padrão-ouro" para a genotipagem, devido a sua capacidade de discriminação de polimorfismos conhecidos, além de permitir a descoberta de novos polimorfismos. Apesar dos avanços recentes, o sequenciamento continua sendo uma metodologia onerosa, laboriosa e demorada. Nesse contexto, diversas metodologias alternativas foram desenvolvidas para simplificar a detecção de polimorfismos, e diminuir os custos do processo. As alternativas mais citadas são as análises dos padrões eletroforéticos gerados por enzimas de restrição, as amplificações alelo específicas, o uso de sondas

marcadas (NORAMBUENA *et al.*, 2009) e, mais recentemente, a técnica de High Resolution Melting (HRM) (SANTOS *et al.*, 2013).

Nesse trabalho foram propostas duas técnicas, a análise dos padrões eletroforéticos gerados pela enzima de restrição *AluI*, apesar de não ser uma metodologia nova, desperta interesse, sobretudo devido a sua simplicidade. Já a análise por HRM, a segunda proposta, por outro lado, é uma tecnologia nova, baseada em uma das propriedades intrínsecas do DNA, a desnaturação, sendo que na literatura é apresentada como uma ferramenta simples para a discriminação de diferentes genótipos, e com grande potencial clínico (ERALI & WITTEWER, 2010; SANTOS *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Testar, padronizar e comparar metodologias alternativas ao sequenciamento para a diferenciação e genotipagem das espécies *Echinococcus granulosus* stricto sensu (G1) e *Echinococcus ortleppi* (G5).

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair o DNA das amostras da fase larval de *Echinococcus* spp. obtidas no período de setembro a novembro de 2013 de um abatedouro da região metropolitana de Porto Alegre;
- Realizar amplificação e o sequenciamento da subunidade I do gene citocromo c oxidase (cox-1), um gene mitocondrial, altamente conservado e já bem estabelecido para a diferenciação de espécies de *Echinococcus* spp.
- Analisar os perfis do fragmento do gene cox-1 após clivagem enzimática por *AluI*;
- Analisar as diferenças das curvas de HRM-cox-1 entre G1 e G5.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Gênero *Echinococcus*

A equinococose ou hidatidose é uma severa doença parasitária causada por platelmintos do gênero *Echinococcus* (Rudolphi, 1801), da Classe Cestoda, Ordem Cyclophyllidea, Família Taeniidae.

As espécies do gênero *Echinococcus* apresentam desenvolvimento indireto, ou seja, para completar seu ciclo de vida necessitam obrigatoriamente de dois hospedeiros. As formas adultas se desenvolvem somente no intestino de canídeos e de alguns felídeos (ECKERT & DEPLAZES, 2004). Enquanto que as formas larvais, denominadas de metacestódeos, se desenvolvem nos órgãos internos de várias espécies de mamíferos, principalmente roedores e herbívoros. Ocasionalmente as formas larvais podem acometer o ser humano, um hospedeiro acidental (DINKEL *et al.*, 2004).

A classificação do gênero *Echinococcus* é controversa, pois algumas espécies não possuem fenótipos claros, e há pouca evidência de segregação geográfica ou ecológica entre as espécies (MCMANUS, 2013). O uso de ferramentas moleculares levou a um complexo processo de revisão da filogenia e taxonomia do gênero *Echinococcus*, que ainda não está completo (NAKAO *et al.*, 2013).

De acordo com as filogenias mais recentes, o gênero *Echinococcus* é composto por nove espécies (MCMANUS, 2013): *E. granulosus* sensu stricto, *E. felidis*, *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, *E. equinus*, *E. oligarthra*, *E. vogeli*, *E. orteppi* e *E. canadensis* (NAKAO *et al.*, 2013)

O potencial infectivo de algumas espécies ainda é desconhecido, conseqüentemente, a fase larval de praticamente todas as espécies do gênero *Echinococcus* pode acometer os seres humanos, com exceção do *E. equinus* (MCMANUS, 2013). Apesar disso, as espécies com mais casos clínicos relatados são *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthra* e *E. vogeli* (GUARNERA *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2013). No contexto local, da região sul do Brasil, as duas espécies de maior impacto econômico e sanitário são o *E. granulosus* sensu stricto e o *E. orteppi* (BALBINOTTI *et al.*, 2012), que por isso receberam ênfase neste trabalho.

3.3. *Echinococcus granulosus sensu stricto*

Equinococose cística é uma zoonose de grande impacto médico, veterinário e econômico em muitos países, inclusive no Brasil. O agente etiológico dessa enfermidade é o *E. granulosus*, tanto em humanos como em vários outros mamíferos (MORO & SCHANTZ, 2009). Estimativas atuais da OMS indicam perdas anuais em torno de 3 bilhões de dólares, com o tratamento de casos da doença somado as perdas da indústria pecuária. Além disso, mais de 3 milhões de pessoas podem estar infectadas com o parasito no mundo (CRAIG *et al.*, 2007; CARDONA *et al.*, 2013).

A equinococose cística é inicialmente assintomática, pois os cistos podem levar vários anos para se desenvolver. Os sintomas vão depender da localização do cisto, nos casos em humanos, os cistos se desenvolvem principalmente no fígado e nos pulmões, podendo também desenvolver-se no baço, rins, coração, ossos, olhos e sistema nervoso central, inclusive o cérebro. A ruptura do cisto, devido a trauma ou durante procedimentos cirúrgicos, devido a liberação o líquido cístico, pode causar graves reações anafiláticas no paciente, podendo levar ao óbito (CDC, 2013).

Os tratamentos mais indicados atualmente para a equinococose cística são a quimioterapia, a punção do cisto ou a por aspiração percutânea, em substituição ao procedimento cirúrgico. No entanto, a cirurgia continua sendo o tratamento mais eficaz para a remoção dos cistos e para a cura (CDC, 2013).

E. granulosus possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os continentes, com exceção da Antártida (Figura 1), principalmente em algumas localidades da Eurásia, África, Austrália e América do Sul (OMS, 2013).

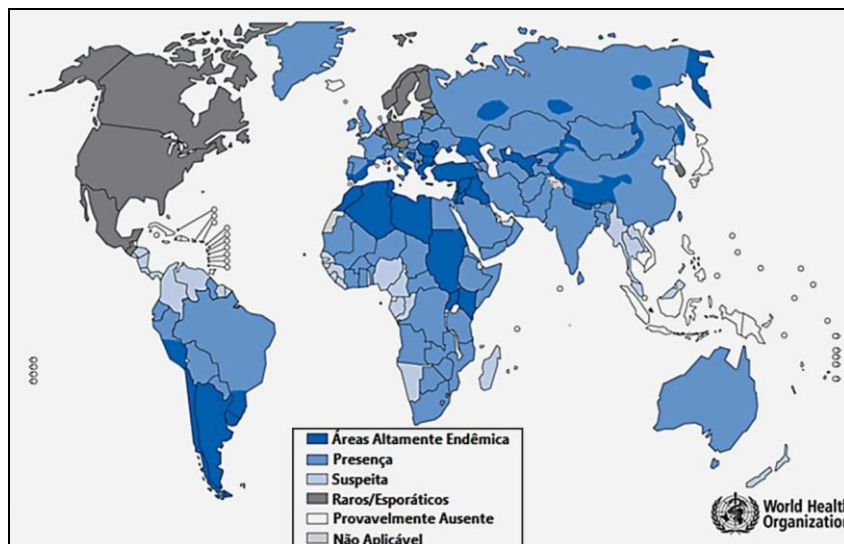


Figura 1: Incidência Mundial da Equinococose Cística (Imagem adaptada)

(Original disponível em: http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_echinococcosis_2009.png)

Na América do Sul, o parasito ocorre em vários países, principalmente no Conesul, com alta prevalência em regiões da Argentina, Bolívia, sul do Brasil, Chile, Peru e Uruguai, representando um problema de saúde pública (MORO & SCHANTZ, 2009).

A alta prevalência de cistos hidáticos nos animais abatidos em abatedouros da América Latina é devido à prática da pecuária em áreas hiperendêmicas. Isso traz, como reflexo, perdas econômicas, principalmente devido à queda da produção e do rendimento do gado, através da condenação do fígado, redução no peso de carcaça e conseqüente redução do valor agregado, redução da produção leiteira, e inclusive, da fertilidade dos animais infectados (CARDONA & CARMENA, 2013).

3.3.1. Ciclo de Vida do *E. granulosus* e controle

O *E. granulosus* é um pequeno platelminto, medindo de 3 a 6 mm, que se mantém principalmente, em áreas endêmicas, no ciclo de cão-ovelha-cão (Figura 2) em grandes regiões pastoris ao redor do mundo (ACHA & SZYFRES, 2003). Além do cachorro, a forma adulta pode se desenvolver em raposas, dingos, lobos, chacais, hienas e gatos (THOMPSON & MCMANUS, 2002a), enquanto as formas larvais podem acometer caprinos, bovinos, suínos, iaques, entre outros ungulados. (ECKERT & DEPLAZES, 2004);

As formas adultas do parasito, no intestino delgado do hospedeiro definitivo, se reproduzem de forma sexuada. Assim como as tênias, o *Echinococcus* spp. é hermafrodita e capaz de se autofecundar, sendo que a fecundação cruzada pode ter um papel importante na reprodução do parasito, e ser mais frequente do que se imaginava (HAAG *et al.*, 1999). A fecundação ocorre somente no último segmento do corpo do parasito, a proglote madura, que após a fecundação, abriga os ovos do parasito em seu interior, passando a ser denominada de proglote grávida (ECKERT & DEPLAZES, 2004).

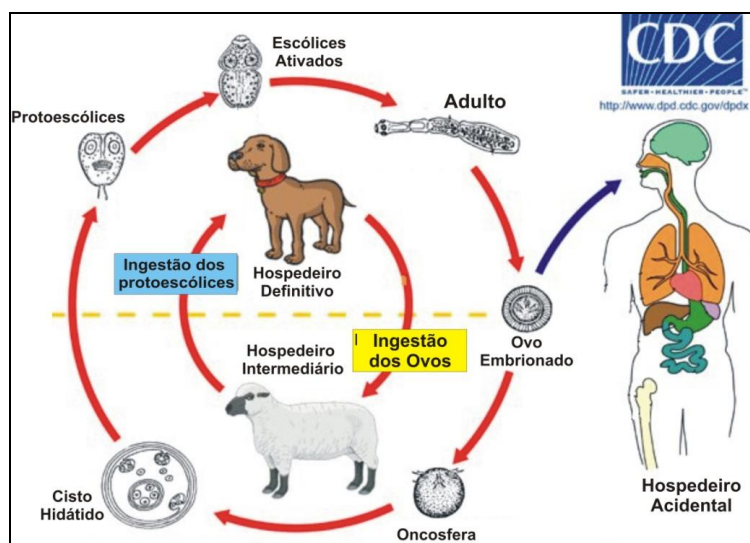


Figura 2: Ciclo de vida do *Echinococcus granulosus* (Imagem Adaptada).

Original disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>

A proglote grávida se desprende do restante do corpo e é eliminada com as fezes do hospedeiro e desintegra-se no meio ambiente, liberando os ovos. No ambiente os ovos são maturados e acabam contaminando o solo, a água e os alimentos (ECKERT & DEPLAZES, 2004). Para continuar o seu desenvolvimento, os ovos precisam ser ingeridos por um hospedeiro intermediário adequado. O homem, como hospedeiro acidental, adquire o parasito da mesma forma (THOMPSON & MCMANUS, 2002a).

Cada ovo contém um embrião hexacanto de seis ganchos, a oncosfera, que é liberado no intestino delgado dos hospedeiros intermediários. A oncosfera atravessa a parede intestinal e via corrente sanguínea ou circulação linfática, migra por vários órgãos (THOMPSON & MCMANUS, 2002a), alojando-se geralmente no fígado ou no pulmão, onde se diferencia, originando o metacéstóide (ACHA & SZYFRES, 2003).

O metacestóide ou cisto hidático (Figura 3) é formado por três camadas, a adventícia, a laminar e a germinativa. A camada adventícia é mais externa, originada através da reação granulosa do hospedeiro frente ao parasito, e é formada por fibroblastos oriundos do tecido conjuntivo do hospedeiro (ECKERT & DEPLAZES, 2004). A camada intermediária é laminar, que diferente das demais é acelular e elástica, e por fim, a camada germinativa que é mais interna e delgada, formada por um sincício, com células indiferenciadas do parasito. O cisto é preenchido pelo líquido hidático (ACHA & SZYFRES, 2003).

A camada germinativa de forma assexuada por brotamento dá origem a cápsulas filhas, e no interior destas originam-se os protoescólices, a forma pré-adulta do parasito, sendo que em alguns casos a camada germinativa pode originar diretamente os protoescólices, sem a necessidade das cápsulas (ACHA & SZYFRES, 2003). Cada cisto pode conter até milhares de protoescólices, porém nem todos os cistos os produzem. Os cistos que apresentam os protoescólices são classificados como férteis, enquanto que os que não os formam, são denominados inférteis ou não-férteis (THOMPSON & MCMANUS, 2002a).

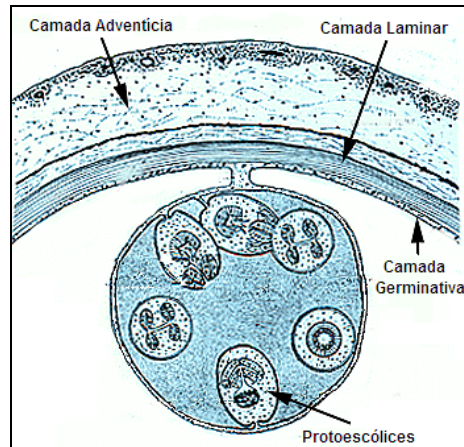


Figura 3: Estrutura Interna do Metacestóide (Imagem Adaptada).

Original disponível em: http://cal.vet.upenn.edu/projects/dxendopar/images/parasiteimages/cestodes/hydatid_cyst1.gif

Se os protoescólices, presentes nos órgãos contaminados, forem ingeridos pelo hospedeiro definitivo apropriado, podem continuar o seu desenvolvimento. No duodeno, os protoescólices evaginam, fixam-se entre as criptas do intestino, e completam seu desenvolvimento, atingindo a fase adulta, o que permitirá o reinício do ciclo (ACHA & SZYFRES, 2003).

O cão doméstico tem papel importante na manutenção do ciclo do *E. granulosus*, ao menos no ciclo doméstico, como hospedeiro definitivo e agente dispersor do parasito (DE LA RUE, 2008). Para quebrar o ciclo de vida do parasito, programas de controle envolvem ações periódicas de desverminação dos cães com praziquantel, juntamente com o estabelecimento de programas educativos e de conscientização da população (ZHANG *et al.*, 2009). No entanto, este tipo de ação representa custo financeiro significativo, principalmente para os países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. O desenvolvimento de uma vacina veterinária para cães, contra a parasitose, pode representar uma alternativa mais viável (ZHANG *et al.*, 2006).

3.4. *Echinococcus ortleppi*

Assim como outras espécies do gênero, o *E. ortleppi* era classificado como um dos haplótipos divergentes dentro do táxon *E. granulosus* (NAKAO *et al.*, 2013), sendo citado como genótipo G5 ou linhagem cão-ovino. O *E. ortleppi* foi reconduzido de status de espécie tendo como base as características ecológicas, morfológicas e moleculares altamente divergentes quando comparadas com as outras linhagens (THOMPSON & MCMANUS, 2002b).

O *E. ortleppi* é uma das espécies de *Echinococcus* spp. encontrada no estado do Rio Grande do Sul (BALBINOTTI *et al.*, 2012) e em algumas localidades da Europa, África, sul da Ásia e das Américas (DINKEL, *et al.*, 2004). Ainda que sejam poucos os casos reportados, o *E. ortleppi* é capaz de causar equinococose cística em humanos, merecendo atenção epidemiológica (DE LA RUE *et al.*, 2011, GUARNERA *et al.*, 2004, SHARMA *et al.*, 2013).

O *E. ortleppi* (G5) mantém-se principalmente no ciclo cão-ovino ou cão-bubalino, mas já foi relatado a presença de cistos férteis em suínos e em cervos manchados (NAKAO *et al.*, 2013). As fases larvais apresentam um tropismo pelos pulmões de bovinos, e os seus cistos nesse órgão apresentam uma maior fertilidade, quando comparado aos casos de G1 em bovinos. Isso colabora com a tese que o melhor desenvolvimento do parasito é devido a sua maior adaptação a esse hospedeiro intermediário (BALBINOTTI *et al.*, 2012).

3.5. Genotipagem e diferenciação das linhagens/espécies de *Echinococcus* spp.

A análise molecular, principalmente através de sequenciamento, usando DNA mitocondrial (mtDNA), levou a caracterização de 10 haplótipos/linhagens, que apresentavam elevada heterogeneidade genética, denominadas de G1 a G10, o que transformou o *E. granulosus* em um táxon complexo. (BOWLES *et al.*, 1992; NAKAO *et al.*, 2007; THOMPSON & MCMANUS, 2002b).

Das 10 linhagens iniciais (Figura 4), apenas três genótipos, G1 (linhagem cão-ovelha), G2 (linhagem cão-ovelha Tasmânia) e G3 (linhagem cão-búfalo) compõem a atual espécie *E. granulosus* *sensu stricto* (NAKAO *et al.*, 2007). Enquanto que outras linhagens passaram à categoria de espécies, como no caso da linhagem cão-bovino (G5), que hoje corresponde ao atual *E. ortleppi*, e a linhagem cão-equino (G4), o *E. equinus*. Outros quatro genótipos, G6, G7, G8 e G10, foram agrupados dentro da espécie *E. canadensis* (NAKAO *et al.*, 2013; MCMANUS, 2013). O *status* de G9 ainda é incerto, pois a sua validade como genótipo precisa ainda ser confirmada (MACMANUS, 2006).

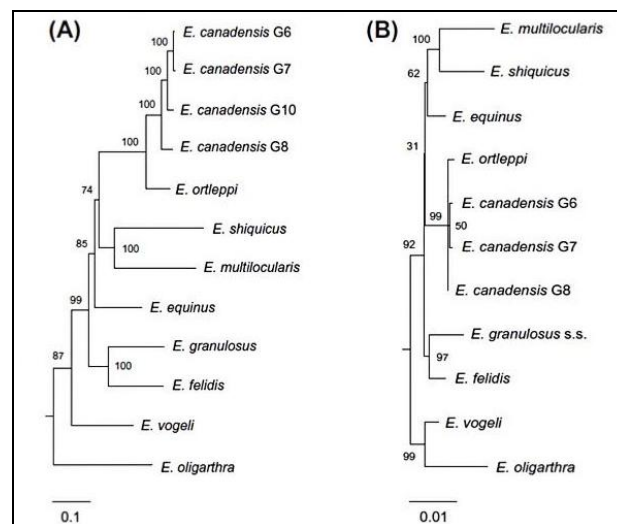


Figura 4: Árvores filogenéticas de *Echinococcus* spp. (A) Baseada na análise a partir de seqüências de genes mitocondriais e (B) a partir de genes nucleares

Fonte: NAKAO *et al.*, 2013.

A reorganização das espécies presentes no gênero levou a melhor compreensão dos fatores envolvidos no ciclo de transmissão do parasito, como as taxas de desenvolvimento, a dinâmica de transmissão, o padrão do ciclo de

vida, a patogenicidade, os quais podem ter grande impacto nas estratégias de controle do parasito (THOMPSON *et al.*, 1995).

Apenas as características morfológicas, principalmente nas fases larvais e pré-adultas, não são suficientes para a identificação precisa das espécies de *Echinococcus* spp. Devido a isso, as análises moleculares são as ferramentas mais indicadas que possibilitariam a identificação e a caracterização das espécies/haplótipos de *Echinococcus* spp. de forma clara e sem equívocos (SHARMA *et al.*, 2013). Entre esse métodos o mais citado pela literatura, é o do sequenciamento da subunidade I do gene citocromo c oxidase (cox-1), descrito por Bowles em 1992.

Nesse contexto o a técnica de High Resolution Melting (HRM) desperta grande interesse devido ao seu grande potencial clínico, sendo uma opção atrativa para laboratórios com restrição de tempo e de recursos (ERALI & WITTWER, 2010). Descrita pela primeira vez por Carl Wittwer, o HRM possibilita a análise de variações de uma sequência de nucleotídeos diretamente a partir da desnaturação do DNA, sem a necessidade da utilização de sondas marcadas e de sequenciamento, apresentando (TONG & GIFFARD, 2012).

O HRM é composto por um conjunto técnicas fundamentadas na análise da diferença de termodinâmica entre dois fragmentos de DNA, ou seja, na análise de fragmentos de DNA a partir da relação entre a temperatura e extensão da desnaturação. As diferenças da temperatura de desnaturação entre os fragmentos de DNA se deve a diferença entre os conteúdos de CG e de AT, o que permite a discriminação de vários genótipos diferentes (ERALI & WITTWER, 2010; ERALI *et al.*, 2008).

Recentemente, além da possibilidade da aplicação clínica do HRM para a análise da variabilidade microbiológica, explorada na revisão de Tong & Giffard (2012), o trabalho de Santos *et al.* (2013), demonstra claramente a aplicação dessa técnica também na parasitologia molecular, sendo altamente confiável e eficaz para diferenciação de algumas espécies de platelmintos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras Biológicas

Neste trabalho foram utilizadas amostras da fase larval do parasito *Echinococcus* spp., os cistos hidáticos coletados de órgãos de bovinos, de animais nativos de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, os quais foram fornecidos semanalmente por um frigorífero da região metropolitana de Porto Alegre. Foram utilizados 49 amostras, sendo 5 de cistos inférteis e 44 de cistos férteis, como padronização do trabalho, cada cisto foi considerado como sendo um indivíduo. Para a genotipagem foram coletados dos cistos férteis, os protoescólices, e dos cistos inférteis as camadas laminar e a germinativa (CLG).

Os protoescólices foram lavados em tampão PBS pH 7,4 para a remoção de restos celulares e outras impurezas, assim como as camadas laminar e a germinativa, que antes da lavagem foram dissecadas.

4.2. Extração de DNA

4.2.1. Cistos Férteis (Extração Bruta de DNA)

Os protoescólices armazenados em PBS foram lavados com água esterilizada. Em uma simplificação da técnica de extração de DNA, 140 µL de aquosa, contendo entre 20 e 50 protoescólices, foram incubados com 10 µL de proteinase K a 10 mg/mL. A solução foi incubada duas horas e meia a 55 °C e após por vinte minutos a 95 °C para a inativação da enzima, não havendo uma etapa de precipitação. As extrações brutas de DNA foram analisadas no Danodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) para a análise da qualidade e quantificação do DNA presente nas amostras.

4.2.2. Cistos Inférteis

Devido à natureza da CGL, na extração de DNA do parasito foi realizada com o reagente Trizol. Um mililitro (1 mL) de Trizol foi adicionado a um pequeno fragmento de CLG, deixado *overnight* a 4 °C para a completa lise do tecido. Após os restos celulares foram removidos por centrifugação a 12000 g por 10min a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Para a separação das fases foram acrescentados 200 µL de clorofórmio, incubado a temperatura ambiente por 3min e centrifugado a 12000 g por 5 min a 4 °C. Formaram-se três fases, a aquosa, a interfase e a orgânica, a primeira foi descartada, para a remoção do RNA. Para a precipitação do DNA, foram acrescentados 300 µL de etanol absoluto as outras duas fases, incubando por 3min a temperatura ambiente, após as amostras foram centrifugadas a 2000 g por 5min a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado, e iniciou-se às etapas de lavagem do DNA. O *pellet* foi lavado, três vezes, com 1 mL citrato de sódio 0,1 M em etanol 10%, com incubação de 30min a temperatura ambiente, seguido por centrifugação a 2000 g por 5min a 4 °C, com remoção do sobrenadante. Após, o *pellet* foi ressuspendido em 300 µL de NaOH a 8 mM, e incubado a 56 °C por 5min, após centrifugados a 12.000 g por 10min, e o sobrenadante foi removido para um novo tubo. O pH foi ajustado para 8,4 adicionando-se 16 µL de HEPES a 0,1 M.

4.3. Amplificação por PCR

Para a genotipagem de *E. granulosus* (G1) e de *E. ortleppi* (G5) foi utilizado parte da subunidade I do gene citocromo c oxidase (cox-1). Para isso foi necessário realizar a amplificação deste fragmento, utilizando o par de *primers* descrito por Bowles *et al.* (1992), o *forward* (F) 5'-TTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3', e o *reverse* (R) 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3', originando um segmento de 444 pb.

Em cada reação de amplificação (PCR) havia de 3 a 10 ng de DNA, 0,16 mM de dNTPs, 0,4 pM de cada um do par de *primers*, 1 mM de MgCl₂ (Ludwig Biotec®), 1 U da taq DNA-polimerase (Ludwig Biotec®), 2,5 µl de Tampão taq

polimerase 10 x (Ludwig Biotec®) (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), em um volume final de 25 µL.

As ampliações foram realizadas no termociclador 7500 (*Applied Biosystems*), hibridizadas por “*touchdown*” através do programa DT55-45. Este programa possui uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 90s, e a etapa seguinte, a de anelamento, a 55 °C, que é reduzida progressivamente em um grau a cada dois ciclos. Nos 10 ciclos finais, o anelamento ocorre a 45 °C. Todos os passos tiveram duração de 30s com exceção do último passo de extensão, com 5min. Os produtos das ampliações foram analisados em gel de agarose a 1,2 %, para a confirmação dos tamanhos adequados dos fragmentos.

A identificação das espécies foi realizada através de três metodologias: o sequenciamento, como controle, e duas metodologias alternativas propostas pelo trabalho, a análise dos padrões eletroforéticos resultantes da clivagem com a enzima *AluI* e por HRM.

4.3.1. Clivagem Enzimática

As sequências da subunidade I do gene *cox-1* de G1 e de G5 com 444 pb, obtidas do banco de dados do NCBI, foram alinhadas no software GeneDoc v.2.6.002, e foi confirmada a presença de vários SNPs na subunidade I do gene *cox-1* entre G1 e G5. Analisando o padrão de clivagem dessas sequências por diferentes endonucleases no software Vector NTI 10.3.0, foi encontrada a presença de um único sítio de clivagem para a enzima de restrição *AluI* no perfil do *E. granulosus* (G1), mas a ausência desse sítio em *E. ortleppi* (G5).

Para confirmação dos resultados da análise *in silico*, 5 µL ampliações foram incubadas com 1 µL do *Buffer Tango com BSA 10 x* (*Thermo Scientific*), 1 U de Enzima de Restrição *AluI* (*Thermo Scientific*), no volume final de 10 µL, por 3h30min a 37 °C, seguida por 20min de incubação a 65 °C para a inativação da enzima. O padrão das clivagens foi analisado após eletroforese em gel de agarose 1,2 %, usando como marcador molecular o plasmídeo PUC-18 clivado com *DdeI*. A clivagem do fragmento corresponderia a G1, enquanto a ausência da clivagem, a G5.

4.3.2. Análise por HRM

A análise por *High Resolution Melting* (HRM) é baseado na capacidade desta técnica de discriminar diferentes padrões de desnaturação de pequenos fragmentos do DNA. Para a identificação precisa de G1 e G5 foi utilizada a análise de HRM-cox-1 obtido após PCR.

Para essa análise foi utilizado o fluoróforo SYTO 13 (Life Technologies), como o corante fluorescente intercalante de dupla fita de DNA, na concentração final de 2,5 mM, num volume final de 20 μ L de PCR, utilizando em médio 4 ng de DNA/ μ L. Como controle foi utilizado curvas de HRM de uma amostra já conhecida de *E. granulosus* e outra de *E. ortleppi*. A técnica de HRM foi realizada no Rotor-Q gene 2plex System (Roche®), a desnaturação foi realizada aumentando a temperatura de 60 °C até 95 °C, elevada em 0,1°C/s, com normalização entre 79,0-80,2 °C e 83-85,0 °C.

4.3.3. Sequenciamento

Como controle e validação das metodologias alternativas, tentou-se realizar o sequenciamento de todas as amostras, a metodologia para genotipagem mais presente na literatura para este fim. Para isso todos os produtos de amplificação foram purificados com Kit (GE Healthcare Life Sciences). O equipamento utilizado foi o sequenciador *MegaBACE* (GE Healthcare Life Sciences), utilizando o mesmo par de *primers* descritos por Bowles *et al* (1992). Os dados das sequências foram acessados pelo software Seqman 7.0.0. A confirmação de G1 ou G5 foi realizada por homologia das sequências obtidas com as disponibilizadas em banco de dados, usando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponibilizada pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2013).

5. RESULTADOS

5.1. Amostras Biológicas

Para a realização e avaliação das diferentes metodologias para a genotipagem, duas amostras foram utilizadas como controle, uma amostra correspondente a G1 e outra a G5, previamente caracterizadas e sequenciadas. Das 49 amostras analisadas, apenas 5 de CLG, pois em muitos casos a maior parte das amostras desse tipo encontrava-se completa ou parcialmente degradada, impossibilitando a extração de DNA das amostras dos cistos inférteis/não férteis, que acabaram não sendo contabilizados.

5.2. Extração de DNA e Amplificação

A avaliação da quantidade de DNA através do Nanodrop 2000 (Termo Scientific) revelou que as amostras de cistos inférteis apresentaram concentração média de 40 ng/ μ L de DNA, enquanto que a extração das amostras com proteinase K apresentaram concentração média de 15 ng / μ L de DNA.

Apesar de não ser significativa devido a grande variação entre as amostras, pode-se observar que as amostras extraídas utilizando o reagente Trizol apresentaram uma maior quantidade de DNA, enquanto que a extração com proteinase K foi mais prática e rápida. Essa aparente contradição entre a dificuldade de extração de DNA e a maior concentração de DNA nas amostras de CLG, se deve a capacidade de extração de DNA pelo reagente Trizol, uma técnica mais eficiente quando comparada à extração bruta com a proteinase K. Porém várias amostras de CLG possuíam o DNA em um estágio avançado de degradação, não impróprias para genotipagem.

Ambos os métodos para a extração de DNA utilizados mostraram-se eficientes e compatíveis com a reação de amplificação (PCR), como pode ser visualizado na figura 5.

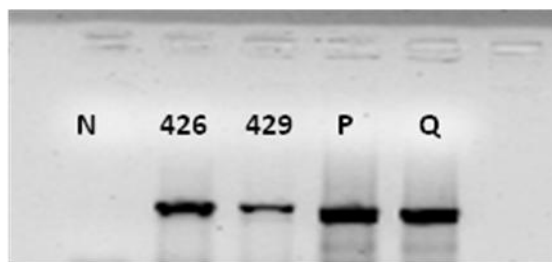


Figura 5: Gel de Agarose 1,2 % do produto de PCR do gene *cox-1*. As amostras 426 e 429 são de protoescólices, e as de CLG representadas por P e Q, sendo N é o controle negativo.

5.1. Clivagem Enzimática

Conforme previsto na análise *in silico* (Figura 6), G1 apresenta a sequência clivada, gerando um fragmento maior de 235 pb (1-235 nt) e o menor com 209 pb (236-444 nt), diferença de 27 pb, enquanto que o mesmo segmento em G5 se apresenta íntegro, com 444 pb.

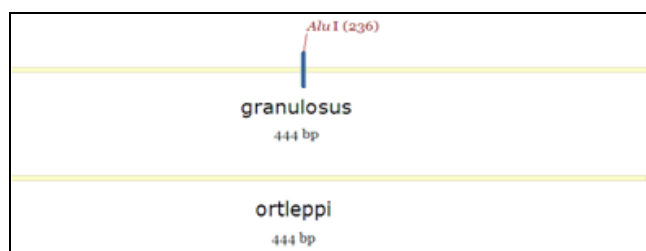


Figura 6: Sítios de clivagem para *AluI* no fragmento do gene *cox-1* de G1 e G5, gerados através da Vector NTI 10.3.0.

A primeira metodologia utilizada para genotipagem das amostras foi através da clivagem enzimática utilizando a endonuclease *AluI*. A análise dos padrões eletroforéticos gerados, após a corrida em gel de agarose, foi possível a clara diferenciação entre G1 e G5. (Figura 7).

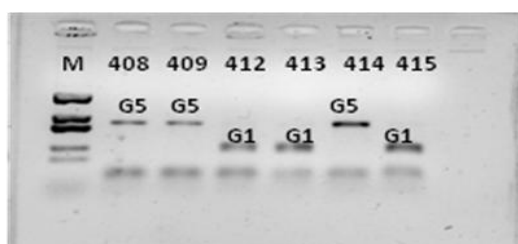


Figura 7: Gel de agarose 1,2 % mostrando as análise dos padrões de clivagem dos fragmentos amplificado pela enzima de restrição *AluI*. M, marcador molecular PUC-18/*Ddel*.

Das 49 amostras analisadas, as 5 amostras inférteis foram determinadas como sendo G1, das férteis, 24 eram de G5 e 20 de G1. Nos resultados apresentados por Balbinotti *et al.* (2012), a maior parte dos cistos inférteis estudados foram identificados como G1, também foi relatado uma mudança dos casos de cistos férteis de G1 para G5, sendo que no último ano foram apresentados mais G5 do que G1. Mesmo que o presente estudo tenha sido realizado em um curto período, os resultados foram similares. Além disso, as amostras e os resultados obtidos foram suficientes para a comparação das técnicas. Todos os resultados são apresentados na Tabela 1.

5.3. Curvas de HRM

O gráfico gerado pelo software do RotorGene-Q, após a normalização da fluorescência durante a desnaturação das duplas fitas de DNA, apresentou a separação de duas curvas entre as temperaturas de 81,4-82,8°C. Devido a maior presença de AT na sequência de G5, essa desnaturou numa temperatura mais baixa que o G1 (Figura 8). A diferença de SNPs possibilitou a separação bem definida dos padrões, evidenciado no gráfico abaixo. Todos os resultados de genotipagem apresentados nessa metodologia foram compatíveis com os gerados pela primeira metodologia, confirmando a equivalência entre as duas.

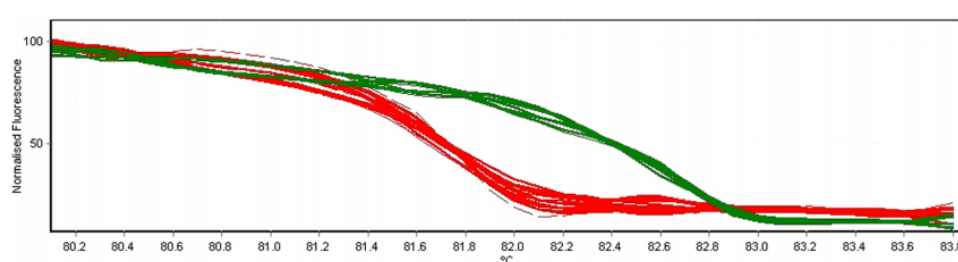


Figura 8: Gráfico gerado pelo software do RotorGene-Q. Linha vermelha representa os amplicons de G5 e as linhas verdes de G1

5.4. Sequenciamento

Para confirmação dos resultados provenientes da clivagem e do HRM foi realizado o sequenciamento. As sequências após edição, apresentam em torno

de 200 pb, menos da metade do fragmento amplificado de 444 pb planejado (Figura 9). Isso se deve a regiões de baixa resolução nas sequências, oriundos desde falhas na manipulação das amostras a erros no processo de sequenciamento. Das 49 amostras iniciais, apenas para 33 amostras foi possível a identificação dos genótipos através do alinhamento dos resultados do sequenciamento com as sequências depositadas no Genbank, por meio da ferramenta BLAST. Porém para 18 amostras não foi possível à identificação das espécies com base nos resultados obtidos no sequenciamento, pois as sequências obtidas foram de muita baixa resolução.

Conforme apresentado na Tabela 1, para as amostras as quais foi possível a realização do sequenciamento, houve a correlação dos resultados das três metodologias para 31 amostras, não havendo discordância. Com base nisso, mesmo não possuindo os resultados do sequenciamento para 18 amostras, mas tendo como base os resultados nas outras metodologias, houve a identificação dos genótipos de todas as amostras.



Figura 9: Alinhamento das sequências da subunidade I do gene cox-1 (444 pb) de G1 e G5, através do software GeneDoc 2.6.002

Tabela 1: Identificação, viabilidade, procedência, localidade, órgão onde o parasito se localizava e o resultado da genotipagem de todas as amostras utilizadas em cada metodologia.

Amostra	Viabilidade	Localidade	Órgão	Sequenciamento	Valor de E	Acesso	Clivagem	HRM
E	Não fértil	Não identificado	Pulmão	G1	1,00E-86	KF612399.1	G1	G1
I	Não fértil	Não identificado	Pulmão	G1	2,00E-53	KF612399.1	G1	G1
N	Não fértil	Não identificado	Pulmão	G1	8,00E-85	KF612394.1	G1	G1
P	Não fértil	Não identificado	Pulmão	G1	1,00E-70	KF612399.1	G1	G1
Q	Não fértil	Não identificado	Pulmão	G1	4,00E-123	KC579447.1	G1	G1
387	Fértil	Bagé	Pulmão				G5	G5
390	Fértil	Itaqui	Pulmão				G5	G5
391	Fértil	Não identificado	Pulmão				G5	G5
393	Fértil	Não identificado	Pulmão				G5	G5
394	Fértil	São Sepé	Pulmão				G5	G5
396	Fértil	Não identificado	Pulmão				G5	G5
397	Fértil	Itaqui	Pulmão				G1	G1
399	Fértil	Itaqui	Pulmão				G5	G5
400	Fértil	São Gabriel	Fígado				G1	G1
401	Fértil	São Gabriel	Fígado				G1	G1
402	Fértil	São Gabriel	Fígado				G1	G1
403	Fértil	Herval	Fígado	G5	2,00E-86	JX912709.1	G5	G5
405	Fértil	Cachoeira do Sul	Fígado	G1	2,00E-124	HF947552.1	G1	G1
406	Fértil	Cachoeira do Sul	Fígado	G1	9,00E-74	KF612394.1	G1	G1
407	Fértil	Cachoeira do Sul	Pulmão				G5	G5
408	Fértil	Cachoeira do Sul	Pulmão				G5	G5
409	Fértil	Cachoeira do Sul	Pulmão				G5	G5
413	Fértil	Rio Pardo	Pulmão	G1	2,00E-39	KF612399.1	G1	G1

414	Fértil	Rio Pardo	Pulmão					G5	G5
415	Fértil	Não identificado	Pulmão	G1	1,00E-71	KF612399.1		G1	G1
416	Fértil	Bagé	Fígado					G5	G5
417	Fértil	Bagé	Pulmão					G5	G5
418	Fértil	Dom Pedrito	Fígado	G1	2,00E-100	KF612393.1		G1	G1
419	Fértil	Alegrete	Pulmão	G5	1,00E-134	JX912709.1		G5	G5
420	Fértil	Alegrete	Pulmão	G1	5,00E-35	KF612399.1		G1	G1
421	Fértil	Alegrete	Pulmão	G5	2,00E-126	JX912709.1		G5	G5
422	Fértil	Não identificado	Pulmão	G5	8,00E-58	JX912709.1		G5	G5
423	Fértil	Não identificado	Fígado	G5	3,00E-90	JX912709.1		G5	G5
424	Fértil	Não identificado	Pulmão	G1	2,00E-68	KF612393.1		G1	G1
425	Fértil	Não identificado	Pulmão	G5	7,00E-65	JX912709.1		G5	G5
426	Fértil	Herval	Pulmão	G1	3,00E-72	KF612394.1		G1	G1
427	Fértil	Livramento	Pulmão	G1	2,00E-91	KF612399.1		G1	G1
428	Fértil	Livramento	Pulmão	G1	1,00E-66	KF443159.1		G1	G1
429	Fértil	Livramento	Fígado	G5	8,00E-90	JX912709.1		G5	G5
430	Fértil	Rio Pardo	Pulmão	G1	4,00E-76	KF612399.1		G1	G1
431	Fértil	Itaqui	Pulmão	G1	5,00E-44	HF947574.1		G1	G1
432	Fértil	Não identificado	Fígado	G5	3,00E-72	JX912709.1		G5	G5
433	Fértil	Não identificado	Pulmão	G1	5,00E-91	KF612396.1		G1	G1
434	Fértil	Não identificado	Pulmão					G5	G5
435	Fértil	Não identificado	Pulmão	G5	8,00E-142	FJ744757.1		G5	G5
436	Fértil	Não identificado	Pulmão	G5	2,00E-45	JX912709.1		G5	G5
437	Fértil	Bagé	Pulmão	G5	6,00E-108	JX912709.1		G5	G5
438	Fértil	Bagé	Pulmão	G5	4,00E-123	JX912709.1		G5	G5
439	Fértil	Bagé	Pulmão	G5	6,00E-80	JX912709.1		G5	G5
Controle G1	Fértil	São Gabriel	Pulmão	G1	5,00E-70	KF612399.1		G1	G1
Controle G5	Fértil	São Gabriel	Pulmão	G5	4,00E-123	JX912709.1		G5	G5

6. DISCUSSÃO

O sequenciamento do DNA é avaliado como a técnica “padrão-ouro” para a genotipagem, entretanto é metodologia onerosa e laboriosa. Simplificar a detecção de polimorfismos e/ou diminuir os custos do processo levou ao desenvolvimento de outras metodologias, como alternativas (NORAMBUENA *et al.*, 2009). Nesse contexto, o presente trabalho propôs e explorou a análises dos padrões eletroforéticos gerados por enzimas de restrição e a análise dos padrões de HRM.

A análise dos padrões eletroforéticos gerados por enzimas de restrição, não é uma metodologia nova e nem a mais eficiente, apesar disso, ainda desperta interesse, sobretudo devido a sua simplicidade. Poucos trabalhos foram realizados envolvendo essa metodologia para a genotipagem de haplótipos de *Echinococcus* spp, um desses poucos trabalhos foi descrito por Cuesta-Bandera *et al.* (1988), que realizaram a caracterização de *E. granulosus* através da análise dos padrões gerados pelas endonucleases *EcoRI* e *BamHI* de fragmentos de DNA hibridizados com pSM889, pEG18, pEG20 e pEG22.

No contexto epidemiológico elaborado por Balbinotti *et al.* (2012), em 10 anos de estudo no estado do Rio Grande do Sul, foi reportada a presença de duas espécies/haplótipos de *Echinococcus* spp, o haplótipo G1 de *E. granulosus* e o G5, atual *E. ortleppi*. Devido a essa característica local, com a simples discriminação de uma das espécies, por eliminação seria possível à identificação da outra. Através dessa característica regional, a presença de um único ponto de clivagem apenas em G1 para a endonuclease *AluI*, permitiria a diferenciação das duas espécies de maneira simples e a baixo custo.

Porém a grande fragilidade dessa técnica é justamente o reconhecimento de G5. Como G1 é o único que apresenta sítio de clivagem para a *AluI*, pressupõem-se que as amostras que não clivaram são de *E. ortleppi*, devido às características epidemiológicas do Rio Grande do Sul, isso é altamente provável. Mas genótipos predominantes variam de uma região para

outra, que não só dificultaria, mas impediria o uso e a transferência dessa técnica para outras regiões.

A clivagem enzimática pela endonuclease *A1ul* poderia ser utilizada em um processo de triagem inicial, pois possibilitaria a identificação dos haplótipos G1. Porém a técnica apresenta diversas limitações, pois eventuais falhas na clivagem, seja devido a presença de SNPs no sítio de clivagem para a enzima de restrição ou devido a inativação das enzimas, levariam a falsos resultados positivos para G5, quando de fato seriam G1.

Para a confirmação de todas as espécies, especialmente das amostras que não clivaram, continuaria sendo necessário o uso do sequenciamento, o que elevaria os custos e reduziria as maiores vantagens dessa técnica, que é a simplicidade e velocidade de processamento das amostras. Uma forma de reduzir os equívocos dessa técnica seria a utilização de controles positivos tanto para G1 e G5, mas continuaria sendo necessário o uso de uma segunda metodologia para a confirmação dos resultados.

A análise por HRM, por outro lado, é uma tecnologia nova, baseada em uma das propriedades intrínsecas do DNA, a desnaturação. Quando submetido ao aquecimento a dupla hélice de DNA se desfaz, devido ao rompimento das pontes de hidrogênio entre as bases complementares, levando à separação das fitas. A análise por HRM é conceitualmente uma ferramenta simples para genotipagem, não necessitando de PCR em tempo real, sondas marcadas, tratamento ou sequenciamento. Porém, a precisão da técnica depende de instrumentação adequada, da saturação dos corantes e de software para análise dos dados gerados (ERALI *et al.*, 2008, NORAMBUENA *et al.*, 2009).

O princípio da técnica de HRM é explicado pela desnaturação que ocorre em pequenos fragmentos de DNA, que não apresentam estados intermediários, o que permite a determinação de uma temperatura média de desnaturação (T_m), a temperatura que corresponde a desnaturação de metade das moléculas de DNA. A T_m dos fragmentos curtos de DNA geralmente pode ser estimada com a precisão de 2°C, levando em consideração a termodinâmica das bases vizinhas. As diferenças de T_m podem permitir a discriminação de diferentes genótipos (ERALI *et al.*, 2008;ERALI; WITTWER, 2010).

Esse processo de separação das fitas do DNA pode ser monitorado pela absorvância de luz UV, para a alta qualidade das curvas de desnaturação sendo necessário alguns microgramas de DNA. O monitoramento também pode ser realizado através de técnicas de fluorescência, mais sensíveis e que requerem menor quantidade de DNA, que podem ser convenientemente fornecida pela amplificação por PCR da amostra (ERALI & WITTWER, 2010; REED *et al.*, 2007).

Os dados de fluorescência gerados durante a desnaturação do DNA e liberação dos fluoróforos podem ser analisados com base na temperatura média de desnaturação (T_m), ou sobre a forma da curva de desnaturação. As T_m são melhores calculadas após a remoção matemática de fundo e normalização da curva, o que garante melhor resolução dos resultados (SCHÜTZ & AHSEN, 2009).

A técnica de HRM vem sendo proposta para a utilização em diversas finalidades, devido a sua capacidade de diferenciar alelos. Um exemplo dessas aplicações é proposta por Lin *et al.* (2008) no uso dessa tecnologia para a diferenciação de variantes do vírus da gripe, e mais recentemente por Santos *et al.* (2013), na determinação das espécies de *Echinococcus* spp. e de *Taenia* spp. As vantagens da tecnologia de HRM são seu baixo custo por amostra, somado a simplicidade e velocidade da técnica, possibilitando a obtenção dos resultados em poucas horas.

A desvantagem dessa metodologia é a necessidade de equipamentos apropriados para a realização da técnica, ainda que seja possível a adaptação da técnica em instrumentos genéricos, como aqueles utilizados para PCR tempo real disponíveis em muitos laboratórios de pesquisa. A técnica de HRM ainda pode representar investimento médio para os laboratórios, sobretudo os da área clínica, dificultando o seu uso.

A análise de uma única amostra de *Echinococcus* spp. por HRM poderia ser de difícil interpretação, sendo necessário o uso de ao menos dois controles, uma de G1 e outra de G5, que poderiam ser facilmente obtidos. Os resultados de outros genótipos, provavelmente, apresentariam padrões diferentes nas curvas de HRM, podendo ser diferenciados, o que possibilitaria a utilização da técnica para outras espécies/haplótipos presentes em outras regiões do mundo (SANTOS *et al.*, 2013).

7. CONCLUSÃO

Metodologias novas de sequenciamento também possibilitam a análise rápida de sequências, sobretudo das de pequeno tamanho, como é o caso da subunidade do *cox-1* utilizada nesse trabalho, porém o investimento para essas tecnologias é alto, o que ao contexto de muitos laboratórios seria inviável. Devido a isso, como foi proposto e apresentado nesse trabalho, ambas as tecnologias testadas, os padrões de clivagem pela enzima de restrição *A/I* e a análise por HRM, podem ser alternativas viáveis, com a mesma eficiência para a genotipagem, porém, com a vantagem de serem mais rápidas e a baixo custo. Apesar das duas metodologias apresentarem a mesma eficiência, a análise por HRM se destaca e é a mais indicada, pois está menos sujeita a equívocos e por apresentar menor número de limitações.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N., SZYFRES, B.; PAHO. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. 3rd ed. Washington, D.C.: PAHO, 2003, 395p. Volume 3: Parasitology (Scientific and Technical Publication).

BALBINOTTI, H.; SANTOS, G. B., BADARACO, J.; AREND, A. C.; GRAICHEN, D. A. S.; HAAG, K. L.; ZAHA, A. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. **Veterinary Parasitology** v.188. p.255–260, 2012.

BOWLES, J.; BLAIR, D.; MCMANUS, D. P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. **Molecular Biochemical Parasitology**. v.54, i.2, p.165-73, 1992.

CARDONA, G. A., CARMENA, D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. **Veterinary Parasitology** v.192 p.10– 32, 2013.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Parasites – Echinococcosis. Disponível em:< <http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/>> Acesso em: 10 de jan. 2014.

CRAIG, P. S.; MCMANUS, D. P.; LIGHTOWLERS, M. W.; CHABALGOITY, J. A.; GARCIA, H. H.; GAVIDIA, C. M.; GILMAN, R. H.; GONZALEZ, A. E.; LORCA, M.; NAQUIRA, C.; NIETO, A.; SCHANTZ, P.M. Prevention and control of cystic echinococcosis. **Lancet Infectious Diseases**. v.7, i.6, p.385-394, 2007.

CUESTA-BANDERA, C., MCMANUS, D. P.; RISHI, A. K. Characterization of *Echinococcus granulosus* of Spanish By DNA Restriction Endonuclease Analysis and Southern Blot Hydridization. **Internatioal Jornal for Parasitology**. v.18, p.137-141, 1988.

DE LA RUE, M. L. CYSTIC ECHINOCOCCOSIS IN SOUTHERN BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.50, i.1, p.53-56, 2008.

DE LA RUE, M. L.; TAKANO, K.; BROCHADO, J. F.; COSTA, C. V.; SOARES, A. G.; YAMANO, K.; YAGI, K.; KATOH, Y.; TAKAHASHI, K. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.177, p.97–103, 2011.

DINKEL, A.; NJOROGE, E. M.; ZIMMERMANN, A.; WÄLZ, M.; ZEYHLE, E.; ELMAHDI, I. E.; MACKENSTEDT, U.; ROMIG, T. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. **Internacional Journal for Parasitology**. v.34, i.5, p.645-653, 2004.

ECKERT, J.; DEPLAZES, P. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. **Clinical Microbiology Reviews**. v.17, n.1, p.107–135, 2004.

ERALI, M.; VOELKERDING, K. V.; WITTWER, C.T. Review High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. **Experimental and Molecular Pathology**. v.85, p.50-58, 2008.

ERALI, M.; WITTWER, C.T. High resolution melting analysis for gene scanning. **Methods**. v. 50, p.250–261, 2010.

GUARNERA, E. A.; ALBERTO PARRA, A.; KAMENETZKY, L.; GARCÍA, G.; GUTIÉRREZ, A. Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. **Acta Tropica**. v.92, p.153–159, 2004.

GROSSO, G.; GRUTTADARIA, S.; BIONDI, A.; MARVENTANO, S.; MISTRETTA, A. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean Area. **World Journal of Gastroenterology**. v.18, i.13, p.1425-1437, 2012.

HAAG, K. L.; ARAÚJO, A. M.; GOTTSTEIN, B.; SILES-LUCAS, M. M.; THOMPSON, R. C. A. ; ZAHA, A. Breeding systems in *Echinococcus granulosus*. **Parasitology**. v.118, p.63-71, 1999.

JENKINS, D. J.; ROMIG, T.; THOMPSON, R. C. A. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.—a global update. **International Journal for Parasitology**. v.35. p.1205–1219, 2005.

KNAPP, J.; CHIRICA, M.; SIMONNET, C.; GRENOUILLET, F.; BART, J.M.; SAKO, Y.; ITOH, S.; NAKAO, M.; ITO, A.; MILLON, L. *Echinococcus vogeli* Infection in a Hunter, French Guiana. ***Emerging Infectious Diseases***. v.15, n.12, 2009.

LIN, J. H.; TSENG, C. P. CHEN, Y. J.; LIN, C. Y.; CHANG, S. S.; WU, H. S.; CHENG, J. C. Rapid Differentiation of Influenza A Virus Subtypes and Genetic Screening for Virus Variants by High-Resolution Melting Analysis. ***Journal of Clinical Microbiology***. v.46, p.1090–1097, 2008.

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

MCMANUS, D. P. Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. ***Parasitology***. v.140, p.1617–1623, 2013.

MCMANUS, D. P. Molecular discrimination of taeniid cestodes. ***Parasitology International***. v.55, p.S31 – S37, 2006.

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

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

NAKAO, M.; LAVIKAINEN, A.; YANAGIDA, T.; ITO, A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). ***International Journal for Parasitology***. v.43, i.12-13, p.1017-1029, 2013.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *NCBI/ BLAST Home*. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 22 de nov. 2013.

NORAMBUENA, P. A.; COPELAND, J. A.; KŘENKOVÁ, P.; ŠTAMBERGOVÁ, A.; MACEK, M. Jr. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. ***Clinical Biochemistry***. v.42, p.1308-1316, 2009.

OBWALLER, A.; SCHNEIDER, R.; WALOCHNIK, J.; GOLLACKNER, B.; DEUTZ, A.; JANITSCHKE, K.; ASPOCK, H.; AUER, H. *Echinococcus*

granulosus strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. **Parasitology**. v.128, p.569–575, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO: *Echinococcosis*.

Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs377/en/>>. Acesso em: 12 de out. 2013.

PETAVY, A. F.; HORMAECHE, C.; LAHMAR, S.; OUHELLI, H.; CHABALGOITY, A.; MARCHAL, T.; AZZOUZ, S.; SCHREIBER, F.; ALVITE, G.; SARCIRON, M. E.; MASKELL, D.; ESTEVES, A.; BOSQUET, G. An Oral Recombinant Vaccine in Dogs against *Echinococcus granulosus*, the Causative Agent of Human Hydatid Disease: A Pilot Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.2, i.1: e:125, 2008.

REED, G. H.; KENT, J. O.; WITTEWER, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostic. **Pharmacogenomics**, v.8, p. 597-608, 2007.

SANTOS, G. B.; ESPÍNOLA, S. M.; FERREIRA, H. B.; MARGIS, R.; ZAHA, A. Rapid detection of *Echinococcus* species by a high-resolution melting (HRM) approach **Parasites & Vectors**, p. 327, 2013.

SHARMA, M., SEHGAL, R.; FOMDA, B. A.; MALHOTRA, A., MALLA, N. Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Cysts in North Indian Patients: Identification of G1, G3, G5 and G6 Genotypes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.7, i.6, e2262, 2013.

SOARES, M. C. P.; RODRIGUES, A. L. S.; MOREIRA, S. C. A.; BRITO, E. M. F.; GOUVÊA, M. S. G.; CORRÊA, I. R. S.; PINHO, J. R. R., MALHEIROSA, A. P.; NUNESA, H. M.; PÓVOA, M. M. Anatomico-clinical and molecular description of liver neotropical echinococcosis caused by *Echinococcus oligarthrus* in human host. **Acta Tropica**. v.125, p.110–114, 2013.

SCHÜTZ, E.; AHSEN, N. V. Influencing factors of dsDNA dye (high-resolution) melting curves and improved genotype call based on thermodynamic considerations. **Analytical Biochemistry**, v.385, p.143-152, 2009.

TONG, S. Y.; GIFFARD, P. M.; Microbiological applications of high-resolution melting analysis. **Journal Clinical Microbiology**, v.50, p.3418-3421, 2012.

THOMPSON, R.C.A. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. **Experimental Parasitology**. v.119. p.439–446, 2008.

THOMPSON, R. C.; LYMBERY, A. J.; CONSTANTINE, C. C. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. **Advances in Parasitology**. v.35, p.145-76, 1995.

THOMPSON, R. C. A.; MCMANUS, D. P. Aetiology: parasites and life-cycles: In: Ed(s) Eckert, J.; GEMMELL, M. A.; MESLIN, F. X.; PAWLOWSKI. **WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern**. Paris, World Organisation for Animal Health and World Health Organization, 2002a, p.1-19.

Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2001/929044522X.pdf>>.

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

ZHANG, W.; ZHANG, Z.; YIMIT, T.; SHI, B.; AILI, H.; TULSON, G.; YOU, H., LI, J.; GRAY, D.J.; MCMANUS, D.P.; WANG, J. A Pilot Study for Control of Hyperendemic Cystic Hydatid Disease in China. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.3, i.10, e.534, 2009.

ZHANG, W.; ZHANG, Z.; SHI, B.; LI, J.; YOU, H.; TULSON, G.;DANG, X.;SONG, Y.; YIMITI, T.; WANG, J.; JONES, M.K.; MCMANUS, D.P. Vaccination of Dogs against *Echinococcus granulosus*, the Cause of Cystic Hydatid Disease in Humans. **The Journal of Infectious Diseases**. v.194, p.966–74, 2006.