



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,

Especialidade de Biologia Molecular

em Medicina Tropical e Internacional

**CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*  
EM PORTUGAL**

SÍLVIA FILIPA ALVES BEATO

2008



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*  
EM PORTUGAL**

SÍLVIA FILIPA ALVES BEATO

*Tese apresentada para a obtenção do  
grau de Mestre em Ciências Biomédicas,  
especialidade de Biologia Molecular em  
Medicina Tropical e Internacional*

**ORIENTADORA:**

PROF<sup>a</sup> DOUTORA MARIA AMÉLIA A. GRÁCIO

**CO-ORIENTADORA:**

PROF.<sup>a</sup> DOUTORA MARIA MANUELA CALADO

2008

**Publicações no âmbito deste trabalho:**

**SÍLVIA BEATO, MARIA MANUELA CALADO, ISABEL CLEMENTE & MARIA AMÉLIA AFONSO GRÁCIO.** 2008. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Portugal. Comunicação Oral apresentada no Xth European Multicolloquim of Parasitology, 24-29 Agosto. Paris. Abstract nr. SY20/0201, page 103.

**SÍLVIA BEATO, MARIA MANUELA CALADO, ISABEL CLEMENTE & MARIA AMÉLIA AFONSO GRÁCIO.** 2008. Caracterização molecular de estirpes de *Echinococcus granulosus* existentes em Portugal. Comunicação Oral apresentada no Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica, Sida e Parasitologia, 8-11 Outubro. Vilamoura. Resumo nº OC03, página 33.

Estes últimos dois anos têm sido muito importantes na minha formação científica e profissional, pois tive o privilégio de me cruzar com pessoas extraordinárias que permitiram que eu pudesse realizar este projecto até ao final. A todas elas o meu sincero agradecimento:

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Amélia Grácio pelo conhecimento partilhado comigo ao longo da realização deste trabalho e pela sua disponibilidade.

À Professora Doutora Maria Manuela Calado pelos ensinamentos no laboratório e ajuda sempre que necessitei.

À Técnica Principal Isabel Clemente incansável nos ensinamentos e na ajuda prestada, estando sempre pacientemente disponível desde o primeiro momento.

À Investigadora Auxiliar Alcione Trinca pelos valiosos conselhos e momentos de alegria partilhados.

A toda a Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas pelo acolhimento que demonstraram fazendo-me sentir em casa.

Aos Mestres Pedro Ferreira e Cátia Ferreira pela paciência que tiveram em me ajudar quando era necessário.

À Patrícia e à Mariana pelas nossas inúmeras horas de trabalho e entreaajuda que foram fundamentais e acima de tudo à amizade que daqui nasceu.

Às colegas de mestrado, e acima de tudo amigas, Jacinta, Ana Carina e Ana Isabel, por terem estado presentes em todos os momentos.

Ao Doutor Barreira Júnior pela disponibilidade em ajudar nos contactos com as autoridades competentes.

Aos serviços veterinários na pessoa da Doutora Ana, Doutora Otília e Doutor Henrique pela disponibilidade para a recolha das amostras necessárias para a realização do estudo.

Ao Professor Preto Ribeiro e a todos os funcionários da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias pela disponibilidade e paciência que demonstraram e pelo apoio que me deram.

À Liliana pela ajuda e apoio que me deu quando era necessário.

A todos os meus amigos e colegas que de alguma forma me ajudaram com conselhos e amizade e muitas vezes tiveram de aturar o meu mau feitio.

Ao casal Helena e Jorge Monteiro pelos conselhos, amizade e disponibilidade para me ouvirem.

Aos meus pais por sempre estarem quando é necessário e pelo que representam para mim.

A todos aqueles que de modo directo ou indirecto me deram apoio e força para continuar a lutar pelos meus sonhos sabendo que o fim das coisas tem sempre um sabor melhor quando temos os amigos verdadeiros ao nosso lado.

E por fim, mas sendo o mais importante, a Deus que sem Ele não seria possível pois se não me guardasse nas muitas viagens que fiz nestes anos e não me desse inteligência e discernimento para levar a bom termo este trabalho fisicamente teria desistido.

A Equinococose/hidatidose – doença causada pela fase larvar (hidátide – vulgarmente conhecida como quisto hidático) do cestode *Echinococcus granulosus* – é uma das zoonoses mais comuns e encontra-se entre as de maior importância médica e veterinária. Tem uma ocorrência em ecossistemas variados e a boa adaptação do parasita a diversos hospedeiros contribui para a biodiversidade, com o aparecimento de variações genéticas intraespecíficas ou “estirpes”. De facto, vários estudos demonstraram a existência de dez diferentes estirpes/genótipos (G1 a G10) vindo, assim, confirmar a diferenciação efectuada por critérios morfológicos, biológicos e bioquímicos. A caracterização molecular tem permitido clarificar a epidemiologia e melhorar o controlo desta zoonose, em diferentes países. A maioria das estirpes conhecidas de *E. granulosus* pode infectar os humanos (principalmente a G1, mas também G2, G5, G6, G7, G8 e G9) com maior ou menor gravidade.

O principal objectivo deste estudo é identificar os genótipos de *E. granulosus* circulantes nos hospedeiros intermediários, em Portugal, dado que não existe ainda nenhum estudo molecular sobre identificação de estirpes deste parasita no país.

As amostras foram isoladas de fígados e pulmões, recolhidos em matadouros, a partir de animais domésticos, como ovinos e bovinos, na região centro de Portugal. Foi feita a extracção de DNA de todas as amostras e, este, foi submetido a técnicas moleculares com base na amplificação da região ITS-1 (ITS1-PCR), Eg9-PCR e Eg16-PCR, às quais foram aplicadas diferentes enzimas tais como a Rsa I, a Cfo I, a Msp I e a Taq I. Para confirmação foi feita, posteriormente, a sequenciação de uma região do genoma mitocondrial que codifica o gene citocromo oxidase c sub-unidade 1 (COI).

Os resultados obtidos mostraram que o genótipo presente nas amostras estudadas (de ovinos e bovinos) é o G1 (estirpe ovina). Devido ao reconhecimento desta estirpe como infecciosa para os humanos, a presença da mesma em Portugal demonstra a importância que a hidatidose pode assumir como problema de saúde pública.

Cystic echinococcosis – caused by the larval stage (hydatid cyst) of the cestode *Echinococcus granulosus* - is one of the most widespread zoonoses of veterinary and medical importance. Numerous studies have shown that *E. granulosus* exists as a complex of strains differing in a wide variety of criteria. Ten distinct genotypes (G1-G10) have been identified with impact on pathology, epidemiology and control of cystic hydatid disease. Our main objective was to identify Portuguese genotypes of *E. granulosus*. In Portugal, no molecular genetic typing study has been carried out to clearly identify the putative strains transmitted.

Parasite samples were isolated from liver and lung, in slaughterhouses, from domestic animals such as sheep and cattle, from many regions of Portugal. The samples were submitted to molecular techniques using ITS1-PCR, Eg9-PCR, Eg16-PCR and Eg9-PCR linked restriction fragment length polymorphism (RFLP). Some samples were submitted to the sequencing using primers for COI gene.

The only strain identified was G1 (Sheep strain). Since this is the most infectious strain for humans we are in front of public health problem.

---

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Índice geral.....	viii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xiv
Abreviaturas .....	xv
<b>Capítulo I - Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 – Distribuição Geográfica.....	2
1.1.1 - No Mundo.....	2
1.1.2 - Em Portugal.....	7
1.2 – O Parasita.....	9
1.2.1 – Sistemática.....	9
1.2.2 - Morfologia.....	10
1.2.3 - Especiação.....	14
1.2.4 – Sub-Especiação.....	15
1.3 – Ciclo de Vida.....	17
1.4 – Patologia.....	21

---

1.5 – Diagnóstico	22
1.5.1 – Clínico	22
1.5.2 – Imagiologia	24
1.5.3 – Diagnóstico Laboratorial Tradicional	25
1.5.4 – Diagnóstico Molecular	26
1.6 – Tratamento	32
<b>Capítulo II – Objectivos</b>	<b>33</b>
2.1 - Objectivos	34
<b>Capítulo III – Material e Métodos</b>	<b>35</b>
3.1 - Obtenção e transporte do material biológico parasitado	36
3.2 - Obtenção dos protoescólices	36
3.3 – Análise molecular das amostras parasitadas	39
3.3.1 – Amplificação dos produtos extraídos	40
3.3.2 – Electroforese em gel de agarose	43
3.3.3 - Enzimas de Restrição	44
3.3.4 – Purificação e sequenciação dos produtos amplificados	46
<b>Capítulo IV – Resultados</b>	<b>47</b>
4.1 – Análise das amostras parasitadas	48
4.2 – Análise molecular das amostras parasitadas	53
4.2.1 – Amplificação da Região ITS-1	53
4.2.2 – Aplicação de enzimas de restrição à região ITS-1	57

---

4.2.3 – Sequenciação das amostras amplificadas	60
<b>Capítulo V - Discussão</b>	<b>66</b>
5.1 – Análise das amostras parasitadas	67
5.2 – Análise molecular das amostras parasitadas	69
5.2.1 – Amplificação da região ITS-1	70
5.2.2 – Aplicação de enzimas de restrição à região ITS-1	74
5.2.3 – Sequenciação das amostras amplificadas	78
<b>Capítulo VI - Conclusões</b>	<b>81</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>83</b>

<b>Figura 1</b> – Distribuição mundial do <i>E.granulosus</i> (Imagem adaptada de Eckert & Deplazes, 2004)	2
.....	
<b>Figura 2</b> – Parasita adulto de <i>E.granulosus</i> (Imagem cedida pela Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas, IHMT)	10
.....	
<b>Figura 3</b> – Ovo de <i>E.granulosus</i> 400x (Imagem cedida pela Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas, IHMT)	11
.....	
<b>Figura 4</b> – Membrana germinativa extraída de quisto hidático de fígado de ovino	13
.....	
<b>Figura 5</b> – Protoescólices de um quisto de ovino, 400x	14
.....	
<b>Figura 6</b> – Ciclo de vida do <i>Echinococcus granulosus</i> : 1 – O cão, hospedeiro definitivo, infecta-se ao comer vísceras dos hospedeiros intermediários com metacéstodes (quistos hidáticos); 2 – Os proglótis grávidos do parasita <i>E.granulosus</i> são libertados no intestino do cão e eliminados com as fezes para o exterior; 3 – Os ovos contaminam o solo, água, ar e o próprio pêlo do cão; 4 – Os embriões hexacantos darão origem, nos hospedeiros intermediários incluindo o homem, à formação de hidátides ou quistos hidáticos (Imagem cedida pela Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas, IHMT)	20
.....	
<b>Figura 7</b> – Fígado de ovino parasitado com <i>E.granulosus</i>	22
.....	
<b>Figura 8</b> – Quisto Hidático calcificado no quadrante superior do abdómen de um homem de 28 anos (Imagem adaptada de Yuksel <i>et al</i> , 2007)	24
.....	
<b>Figura 9</b> – Quisto Hidático no fígado de um homem de 25 anos (Imagem adaptada de Yuksel <i>et al</i> , 2007)	25
.....	
<b>Figura 10</b> – Extracção do Líquido hidático. A) Punção do quisto. B) Extracção do líquido hidático	37
.....	

<b>Figura 11</b> – Abertura do quisto com extracção da areia hidática e da membrana germinativa	37
.....	
<b>Figura 12</b> – Lavagem da membrana germinativa de um quisto hidático	38
.....	
<b>Figura 13</b> – Membranas germinativas parcialmente degeneradas	39
.....	
<b>Figura 14</b> – Representação esquemática de parte do rDNA do <i>E.granulosus</i>	41
.....	
<b>Figura 15</b> – Representação esquemática de parte do DNA mitocondrial do <i>E.granulosus</i> (Imagem adaptada de <a href="http://www.jogg.info/12/Logan.htm">http://www.jogg.info/12/Logan.htm</a> )	43
.....	
<b>Figura 16</b> – Distribuição das amostras por órgão	51
.....	
<b>Figura 17</b> - Viabilidade das amostras distribuídas por órgão	52
.....	
<b>Figura 18</b> - Mapa da procedência das amostras utilizadas para o estudo	52
.....	
<b>Figura 19</b> – Número de amostras proveniente de cada localidade	53
.....	
<b>Figura 20</b> – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (ITS-1-PCR).	54
.....	
<b>Figura 21</b> – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (ITS-1-PCR).	54
.....	
<b>Figura 22</b> – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (Eg16-PCR) .	55
.....	
<b>Figura 23</b> – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (Eg16-PCR) .	55
.....	
<b>Figura 24</b> – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (Eg9-PCR) .	56
.....	
<b>Figura 25</b> – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (Eg9-PCR) .	56
.....	
<b>Figura 26</b> – Produtos ITS1-PCR digeridos com Rsa I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)	57
.....	

<b>Figura 27</b> – Produtos ITS1-PCR digeridos com Msp I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)	58
.....	
<b>Figura 28</b> – Produtos ITS1-PCR digeridos com Alu I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)	58
.....	
<b>Figura 29</b> – Produtos Eg9-PCR digeridos com Cfo I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)	59
.....	
<b>Figura 30</b> – Produtos Eg9-PCR digeridos com Cfo I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)	59
.....	
<b>Figura 31</b> – Produtos Eg9-PCR digeridos com Rsa I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)	60
.....	
<b>Figura 32</b> – Produtos Eg9-PCR digeridos com Rsa I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)	60
.....	
<b>Figura 33</b> – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR do gene COI	61
.....	
<b>Figura 34</b> – Alinhamento dos nucleótidos do COI de <i>Echinococcus granulosus</i> recolhidos em Portugal	62
.....	
<b>Figura 35</b> – Distribuição dos haplotipos pelas localidades de procedência das amostras	63
.....	
<b>Figura 36</b> – Comparação das sequências obtidas com uma sequência contida no banco de dados	65
.....	

---

<b>Tabela 1</b> - Identificação das diversas estirpes de <i>E.granulosus</i> descritas no Mundo	16
.....	
<b>Tabela 2</b> – Sequências dos primers utilizados para estudo da região ITS-1	41
.....	
<b>Tabela 3</b> – Enzimas de restrição utilizadas para estudo da região ITS-1	44
.....	
<b>Tabela 4</b> – Distribuição das amostras obtidas por espécie	48
.....	
<b>Tabela 5</b> – Distribuição das amostras obtidas por órgão parasitado	48
.....	
<b>Tabela 6</b> – Distribuição das amostras por idade, dos bovinos	49
.....	
<b>Tabela 7</b> - Distribuição das amostras obtidas por fertilidade, calcificação e contaminação, por espécie	49
.....	
<b>Tabela 8</b> - Distribuição das amostras obtidas por fertilidade, calcificação e contaminação por órgão, em cada espécie	50
.....	
<b>Tabela 9</b> – Caracterização sumária das amostras que foram amplificadas para o gene COI e enviadas para sequenciação	61
.....	
<b>Tabela 10</b> – Distribuição e frequências relativas dos haplotipos nas localidades de onde as amostras eram provenientes	63
.....	
<b>Tabela 11</b> – Índices de polimorfismos do gene COI nas diferentes localidades analisadas	64
.....	

µl – microlitros

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism

COI – Citocromo c oxidase sub-unidade 1

ddF – Dideoxy Fingerprint

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Sal bissódico do ácido Etileno Diamino Tetra Acético

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ITS-1 - Internal Transcribed Spacer 1

mtDNA – DNA mitochondrial

NDI – NADH desidrogenase sub-unidade 1

PCR – Polymerase Chain Reaction

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA – Ácido Ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

rRNA – RNA ribosomómico

SSCP – Single-Strand Conformation Polymorphism

# Capítulo I - Introdução

## 1.1 – Distribuição geográfica

### 1.1.1 - No mundo:

Desde há muitos anos que se sabe que a espécie *E. granulosus* tem uma elevada capacidade de adaptação a hospedeiros, quer definitivos quer intermediários e, por isso, a constante introdução de animais domésticos da Europa noutras partes do mundo e vice-versa, tem feito com que a distribuição deste parasita seja alargada (Figura 1) (Romig, 2003). Assim, podemos encontrar evidências da sua presença desde o norte do Ártico até ao sul da Terra do Fogo, na Argentina, apresentando uma distribuição cosmopolita com diversos níveis de prevalência quer no homem quer nos animais (Zanini *et al.*, 2006a e Zanini *et al.*, 2006b). O parasita apresenta uma tendência em se disseminar por outras zonas do globo onde anteriormente não era encontrado, levando a que a hidatidose/equinococose seja bem conhecida nos diferentes continentes da terra, tendo sido considerada também uma doença de imigrantes (Chrieki, 2002 e Raether & Hänel, 2003).

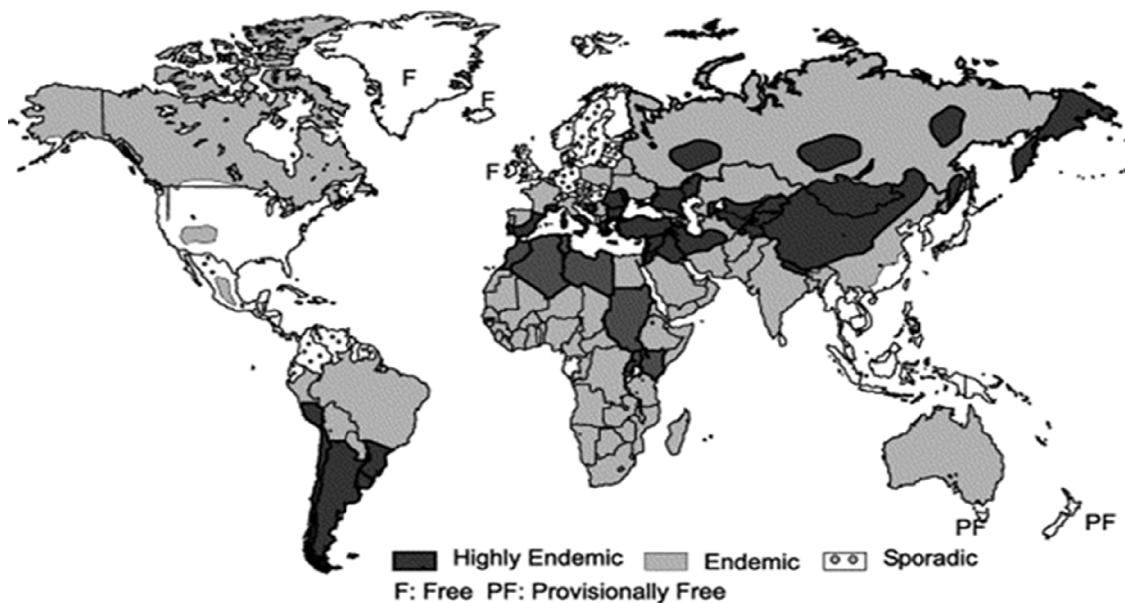


Figura 1 – Distribuição mundial do *E. granulosus* (Imagem adaptada de Eckert & Deplazes, 2004)

Na Austrália acredita-se que tenha sido introduzido através da importação de milhares de ovelhas merinas oriundas da região de Espanha em meados de 1800. Devido à completa ignorância da população acerca do padrão de transmissão e da importância para a saúde pública do parasita *E.granulosus* e, ainda, da abundância de potenciais hospedeiros, o parasita disseminou-se rapidamente no gado e cães australianos e por volta de 1860, a hidatidose humana era considerada o maior problema de saúde pública na região (Jenkins, 2006).

Um dos factos de grande importância para o estabelecimento e perpetuação da espécie *E.granulosus* na Austrália foi a capacidade do parasita em se incorporar nos animais nativos selvagens existentes na Austrália, permitindo a sua transmissão e manutenção do ciclo de vida (Jenkins, 2006).

Em relação ao continente Americano, a hidatidose/equinococose ocorre de forma disseminada desde o Alasca, na América do Norte, até à Patagónia, na América do Sul. No Norte da América há casos de hidatidose descritos no Canadá, Alasca e outras regiões provocados pela estirpe dos cervídeos (G8), ou estirpe silvática do Norte (Thompson *et al.*, 2006). O parasita mantém o seu ciclo de vida através de cães e lobos, como hospedeiros definitivos, e alces (*Alces alces*), caribus (*Rangifer tarandus*) e outros cervídeos, como hospedeiros intermediários, não infectando ungulados domésticos. Nos USA (excepto Alasca), foram diagnosticados casos de hidatidose em imigrantes que adquiriram a doença nos seus países de origem, existindo focos autóctones que envolviam a transmissão através de variados animais domésticos e silváticos, existentes nestas regiões (Moro & Schantz, 2006).

Diversos focos de transmissão de *E.granulosus* parecem ter sido encontrados nos anos 70, do século XX, nos estados do Oeste dos USA (Califórnia, Utah, Novo México

e Arizona), levando os investigadores a concluir que estes focos estariam associados unicamente às práticas culturais que envolviam o abate de ovinos e o acesso dos cães às vísceras dos mesmos (Moro & Schantz, 2006). Diversos genótipos de *E.granulosus* parecem ter sido introduzidos através de gado importado, como no caso dos genótipos dos ovinos e dos suínos, tendo-se estabelecido e adaptado ao gado local.

No México e América Central pouca informação existe acerca da dispersão desta parasitose e suas vias de transmissão, havendo alguns estudos no México que apontam para uma baixa prevalência desta doença (Palacio-Ruiz *et al.*, 2003 e Mata-Miranda *et al.*, 2007) e também para o aparecimento de casos autóctones (Maravilla *et al.*, 2004).

Na América do Sul, a hidatidose é uma doença largamente disseminada em diversos países como Chile, Brasil, Argentina (Kamenetzky *et al.*, 2002 e Pierangeli, *et al.*, 2007), entre outros. Na Argentina estão descritas quatro estirpes capazes de infectar humanos: estirpe dos ovinos (G1), estirpe da ovelha da Tasmânia (G2), estirpe bovina (G5) e a estirpe do camelo (G6). A estirpe dos suínos (G7) afecta apenas porcos e cães, não tendo sido descrito nenhum caso em humanos (Kamenetzky *et al.*, 2002). Em países como o Perú (Almeida *et al.*, 2007), Bolívia, Uruguai (Cabrera *et al.*, 1995), Colômbia, Equador e Venezuela, esta parasitose não tem sido considerada um problema de saúde pública, havendo apenas alguns casos reportados, que podem ser importados (Moro & Schantz, 2006).

Em relação à situação presente na Ásia Central, considera-se a hidatidose /equinococose como uma doença re-emergente, pois devido ao colapso da ex-URSS houve diversas reestruturações. Nestas reestruturações foi diminuído o controlo veterinário nos matadouros, podendo passar órgãos parasitados para o mercado. A população canina aumentou bastante tanto nas áreas rurais como urbanas. Estes factores

mais a lacuna na avaliação dos problemas de saúde pública existentes levaram a um aumento na transmissão da hidatidose em toda esta região (Torgerson *et al.*, 2006). No resto do continente Asiático a hidatidose encontra-se bastante disseminada havendo estudos acerca de estirpes circulantes na China, que parecem ser apenas a G1 e G6, não estando esclarecida a forma de disseminação (McManus *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2005; Bart *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006 e Li *et al.*, 2008).

No continente Africano e Médio Oriente a hidatidose é uma doença altamente endémica, em termos gerais (Magambo *et al.*, 2006 e Sadjjadi, 2006), estando descrita desde países da África Oriental até à África Ocidental e sendo, no entanto, considerada algo rara ou não documentada em países da África Central e Sudoeste africano. Pelo menos cinco das dez estirpes de *E.granulosus* (G1-G10) são infecciosas para humanos na África Sub-Sahariana, sendo que as mais comuns são a estirpe ovina (G1) e a estirpe do camelo (G6). A estirpe do cavalo (G4 ou *E.equinus*), estirpe bovina (G5 ou *E.ortleppi*) e, provavelmente, a estirpe do leão também são encontradas nesta região (Hüttner *et al.*, 2008 e Magambo *et al.*, 2006). Existe a possibilidade de na região sub-sahariana co-existirem outras estirpes de *E.granulosus* nos animais selvagens/domésticos e humanos (Magambo *et al.*, 2006). Nos países do Norte de África e Médio Oriente o parasita *E.granulosus* apresenta uma elevada taxa de prevalência (Bardonnet *et al.*, 2003, Azlaf & Dakkak, 2006 e Ok *et al.*, 2007), sendo a hidatidose alveolar menos prevalente que a hidatidose hepática (Oudni *et al.*, 2004). Diversos estudos indicam que os quistos hidáticos são encontrados em ovinos, bovinos e caprinos, sendo descritas diversas estirpes nesta região, como por exemplo: as estirpes ovina (G1), equina (G4) e do camelo (G6), entre outras (Sadjjadi, 2006). No Médio Oriente está documentada a existência de pelo menos duas estirpes (G1 e G6) no Irão

(Zhang *et al.*, 1998), tal como no Iraque, Líbano, Síria, entre outros países (Sadjjadi, 2006).

Na Europa, a hidatidose encontra-se com uma prevalência muito baixa em determinadas regiões (Norte e Centro) mas com uma prevalência média a elevada nas regiões do Sul, Sudeste e Oriente (Eckert *et al.*, 2001). Casos humanos de hidatidose ocorrem de forma esporádica, localizados no sul da Europa e alguns casos na zona de pastoreio do Reino Unido (Eckert & Deplazes, 2004), ainda que no País de Gales haja referência para a reemergência de *E.granulosus* no hospedeiro definitivo (cão) (Buishi *et al.*, 2005). Estes focos parecem coincidir com a distribuição da estirpe das ovelhas (G1), o que vem suportar a hipótese de que esta é a estirpe com maior infecciosidade para os humanos (Jenkins *et al.*, 2005 e Romig *et al.*, 2006). No centro da Europa estão presentes as estirpes G6-G10, sendo que a mais comum é a estirpe do porco (G6), referenciada como não infecciosa para humanos, apesar de já haver dados a contrariarem esta informação (Pawlowski & Stefaniak, 2003). Na Bulgária, segundo Breyer *et al.* (2004), também está presente a estirpe G1. No Norte da Europa foi descrita uma nova estirpe que infecta os cervídeos (G10) (Lavikainen *et al.*, 2003 e Hirvel-Koski *et al.*, 2003), parecendo ter uma baixa infecciosidade em humanos (Romig, *et al.*, 2006). As outras estirpes de *E.granulosus* podem ser encontradas de forma mais ou menos aleatória, mas não há focos descritos para as mesmas. Toda a região mediterrânica é considerada como de elevada endemicidade havendo mais que um genótipo em circulação (Euzéby, 1991; Siles-Lucas *et al.*, 1996; Mwambete *et al.*, 2004, Garippa, 2006, Capuano *et al.*, 2006, Varcasia *et al.*, 2006, Varcasia *et al.* 2007, Casulli *et al.*, 2008, Rinaldi *et al.*, 2008, Carmena *et al.*, 2008 e Varcasia *et al.*, 2008).

### 1.1.2 - Em Portugal:

O primeiro caso de hidatidose em Portugal foi descrito no Séc. XIX, por Filipe França, em terras alentejanas (Trinca, 2001) e, desde aquela altura que a hidatidose tem sido alvo de diversos estudos pelos investigadores portugueses. Nos anos 30, do Séc. XX, foi publicado um estudo por Cabeça & Vilar em que foi feito um levantamento dos casos humanos de hidatidose registados em alguns hospitais nacionais, no período compreendido entre o final do Séc. XIX e a altura da publicação do mesmo (Jorge, 2000 e Trinca, 2001).

Nos anos seguintes outros estudos foram realizados com o intuito de conhecer melhor a realidade em relação à hidatidose tanto em animais como em humanos. Para tal, investigadores como Tropa & Pego (1938), Ferreira *et al.* (1945) e Leitão (1960) apresentaram estudos quanto à presença do parasita em cães, descrevendo-a de forma mais pormenorizada e tecendo algumas considerações epidemiológicas (Jorge, 2000). Borges Ferreira (1980) considerou que do ponto de vista epidemiológico, o ciclo cão/ovino era o maior responsável pela hidatidose humana, não só pela frequência mas também porque os quistos de ovinos eram quase sempre férteis, enquanto os quistos provenientes do ciclo cão/bovino eram geralmente inférteis (David de Morais, 1998, Trinca, 2001).

No decorrer do Séc. XX muitos investigadores portugueses foram contribuindo para o conhecimento da hidatidose em Portugal, principalmente no campo da epidemiologia. Apesar de nunca ter sido realizado um estudo epidemiológico que englobasse todo o país, diversos estudos foram realizados em algumas regiões continentais, dos quais referiremos os que consideramos importantes neste contexto. Em 1985, David de Morais *et al.*, realizaram um estudo sero-epidemiológico, na região do

Alto Alentejo, tendo obtido uma prevalência de cerca de 3% de positividade para hidatidose.

Jorge (2000) realizou um estudo epidemiológico no distrito de Castelo Branco e concluiu que a região sul do distrito era considerada uma zona hiperendémica para a hidatidose humana, segundo as normas da OMS, pois a percentagem de familiares e/ou indivíduos vizinhos de pacientes operados ou com provas serológicas positivas para hidatidose era de aproximadamente 3%.

David de Morais (2007) apresentou um estudo epidemiológico relativo ao distrito de Évora, referente ao período 1979/2003, no qual concluiu que este distrito era, de facto, hiperendémico para a hidatidose, tendo também referido as zonas Norte e Centro de Portugal como hipoendémicas e a Região de Lisboa e Vale do Tejo como mesoendémica.

Em relação à hidatidose animal, David de Morais (1998) apresentou índices hidáticos em ovinos, bovinos e suínos abatidos em diversos matadouros nacionais e com hidatidose, num período compreendido entre 1944/1968, os quais variavam entre 0,3% no distrito de Castelo Branco e 6,2% no distrito do Porto (não tendo sido incluídos os matadouros municipais de Lisboa e do Porto).

Em termos de equinococose têm sido referidas diferentes taxas de prevalência variando entre 0% e 40%, referentes a diversos estudos realizados a nível de Portugal continental, sendo que os métodos utilizados foram diferentes (Trinca, 2001).

David de Morais (1998) apresentou uma revisão bibliográfica dos trabalhos sobre hidatidose realizados em Portugal nas várias vertentes: clínica, serológica, epidemiológica (humana e animal), etc.

Perante os vários trabalhos já publicados em e sobre Portugal continental, pode-se dizer que a hidatidose está presente de norte a sul do país apresentando uma maior prevalência no Alentejo.

## **1.2 - O Parasita**

### **1.2.1 - Sistemática**

Em 1801, Rudolphi estabeleceu de forma definitiva o género *Echinococcus*, palavra de origem grega em que “echinos” significa ouriço e “kókkos” vesícula (Andersen *et al.*, 1997 e Jorge, 2000).

**Filo** Plathelmyntes

**Classe** Cestoda

**Ordem** Cyclophyllidea

**Família** Taeniidae

**Género** *Echinococcus*

**Espécie** *Echinococcus granulosus*, Batsch, 1972

### 1.2.2 - Morfologia:

O parasita da espécie *E. granulosus* é um cestode de elevada importância médica na maioria das zonas endémicas (Rey, 2001) e aquele que apresenta menores dimensões (Trinca, 2001).

Para se proceder a uma caracterização mais correcta da morfologia do parasita é necessário ter em conta: o parasita adulto, o ovo e o quisto hidático (larva).

#### **Parasita adulto:**

O parasita adulto representa a mais pequena ténia de interesse médico, tendo um comprimento médio entre 2 a 8 mm, apresentando escólex, pescoço e estróbilo (Figura 2).



**Figura 2** – Parasita adulto de *E. granulosus* (Imagem cedida pela Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas, IHMT)

O escólex, órgão de fixação do parasita, é piriforme e apresenta um ápex. As suas estruturas de fixação são compostas por uma dupla coroa de ganchos rostelares, quitinosos, em número variável, e por quatro ventosas, que são as principais estruturas de fixação (Eckert *et al.*, 2001).

O pescoço é a parte posterior do escólex, curta e delgada e constitui a zona de crescimento dos proglótes.

O estróbilo habitualmente é composto por 3 segmentos ou proglótes nos quais se distingue a cutícula ou tegumento, o sistema reprodutor e o sistema excretor (Trinca, 2001).

Do ponto de vista reprodutor estamos perante um parasita com reprodução sexuada, hermafrodita, em que o primeiro proglótes é imaturo. No segundo proglótes, maduro ou sexuado, desenvolve-se primeiro o aparelho sexual masculino e depois o aparelho sexual feminino. O terceiro proglótes denominado por grávido (contem os ovos) e mede cerca de 2 a 3 mm de comprimento (Eckert *et al.*, 2001).

#### **Embrióforo ou ovo:**

Os embrióforos dos Taeniidae apresentam-se sob a forma sub-esférica com um diâmetro entre 30 a 36 $\mu$  (Figura 3). O embrião hexacanto ou oncosfera tem um diâmetro de 20 a 25  $\mu$ , tendo no interior três pares de ganchos de onde partem as fibras musculares que determinam os movimentos nestas estruturas (Eckert *et al.*, 2001).



**Figura 3** – Ovo de *E. granulosus* 400x (Imagem cedida pela Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas, IHMT)

**Quisto hidático:**

A forma larvar do parasita *E.granulosus* – hidátide unilocular, assume no domínio popular algumas designações sumamente conhecidas como “bolha de água”, “tumor branco”, etc., enquanto a nível científico já conheceu também diversas designações como por exemplo *E. cysticus* (Piekarski, 1962), *E. polymorphus* (Chermette, 1982/83), etc (Trinca, 2001 e David de Moraes, 1998).

Embora a espécie *E.granulosus* seja conhecida como a mais pequena ténia de interesse médico a sua forma larvar pode constituir a formação vesicular mais volumosa de todos os Taeniidae.

Estruturalmente, a hidátide unilocular é constituída por:

- Membrana adventícia ou periquística – estrutura que não pertence ao parasita, mas sim ao hospedeiro, sendo uma camada fibrosa externa resultante da compressão e reacção dos tecidos envolventes da hidátide. Com o envelhecimento do quisto hidático há uma tendência para a calcificação desta membrana (Trinca, 2001);

- Hidátide – Constitui a larva propriamente dita e é constituída por:

\* Estrato laminar – Estrutura mais externa do metaquisto, isolando-o e protegendo-o dos mecanismos de defesa do hospedeiro e permitindo a passagem de nutrientes indispensáveis ao desenvolvimento do parasita;

\* Membrana germinativa – Membrana nucleada e estratificada, constituindo o elemento “nobre” da hidátide, dado que assegura a reprodução assexuada do parasita; reveste o quisto hidático interiormente, é esbranquiçada e bastante delgada (Figura 4). As principais funções que lhe têm sido reconhecidas são as de prover o seu

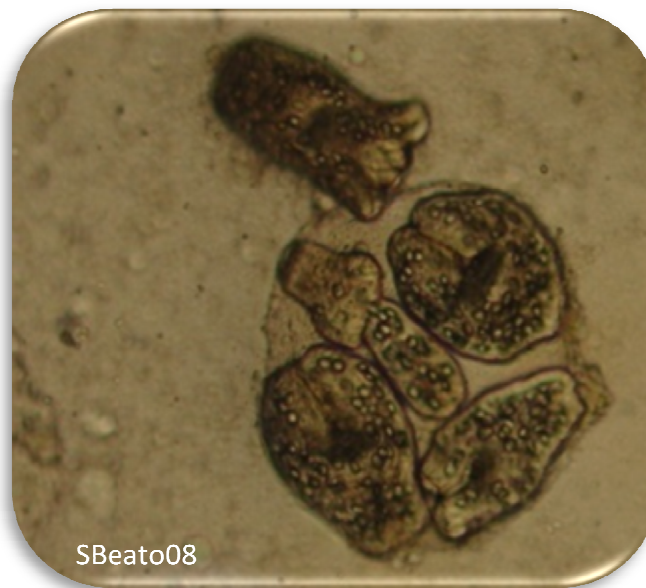
próprio crescimento e renovação, assegurar a formação do estrato laminar, elaborar o líquido hidático e garantir a continuidade da espécie através de vesículas prolíferas;



**Figura 4 – Membrana germinativa extraída de quisto hidático de fígado de ovino**

\* Vesículas Prolíferas – Originárias da membrana germinativa, formam-se por multiplicação celular e vão vacuolizando progressivamente para o interior do quisto hidático;

\* Protoscólices – São formas rudimentares ou potenciais vermes adultos, que apresentam no interior uma coroa de ganchos de quitina, sendo também discerníveis, microscopicamente, os esboços das quatro ventosas de fixação (Figura 5). São os elementos que garantem a perpetuação da espécie e a elevada capacidade de difusão da mesma;



**Figura 5 – Protoescolíces de um quisto de ovino, 400x**

\* Vesículas filhas – Formações que reproduzem inteiramente as hidátides mães; Diferem estruturalmente das vesículas prolíferas devido ao facto de possuírem membrana cuticular envolvente;

\* Líquido hidático – Líquido de preenchimento do quisto hidático no qual se encontram os elementos figurados, como vesículas prolíferas, protoescolíces, areia hidática e vesículas filhas. A sua formação advém de secreções e excreções do parasita e de transudados de tecidos do hospedeiro, contendo assim diversos compostos comuns ao soro do hospedeiro, mas em diferentes concentrações (David de Morais, 1998, Trinca, 2001 e Eckert *et al.*, 2001).

### 1.2.3 - Especiação

Até à actualidade foram descritas cerca de 16 espécies do género *Echinococcus* (David de Morais, 1998), mas apenas quatro destas são consideradas, anatomicamente

falando, pela OMS: *E. granulosus* (Batsch, 1796), *E. multilocularis* (Leuckart, 1963), *E. oligarthus* (Diensing, 1863) e *E. vogeli* (Rausch & Bernstein, 1972).

Estas quatro espécies encontram-se documentadas como sendo morfológicamente distintas nas duas fases que compõem o ciclo evolutivo do género *Echinococcus*, fase larvar e fase adulta (Trinca, 2001 e Eckert *et al.*, 2001).

A espécie que representa interesse de estudo médico em Portugal, até à actualidade, é a do parasita *E. granulosus*, sob o qual haverá incidência neste trabalho.

#### 1.2.4 - Sub-Especiação

Nos últimos 40 anos tem sido observada alguma variabilidade genética e fenotípica dentro da espécie *E. granulosus* e foram identificadas algumas estirpes (Tabela 1). Uma característica que é comum a todas, com excepção da estirpe que infecta o leão, é a utilização de cães e/ou outros canídeos como hospedeiros definitivos, com uma enorme variedade de hospedeiros intermediários, distribuição geográfica, tempo de maturação no hospedeiro definitivo, órgão de localização dos metacéstodes e na produção de protoscólices (Eckert & Deplazes, 2004).

A constatação das diferenças entre amostras procedentes de diversos hospedeiros e/ou diferentes origens geográficas levou a OMS a reconhecer oficialmente a existência de variantes intra-específicas da espécie *E. granulosus*, indicando que estas deveriam tomar a designação de estirpes até que o seu papel biológico, ecológico e epidemiológico fosse clarificado (Eckert *et al.*, 2001). Através dos novos resultados epidemiológicos e moleculares que têm sido publicados são apresentadas evidências

suficientes para que algumas das estirpes de *E.granulosus* (G1 a G10) sejam consideradas novas espécies (Jenkins *et al.*, 2005 e Romig *et al.*, 2006).

**Tabela 1** – Identificação das diversas estirpes de *E.granulosus* descritas no Mundo

<b>Genótipo</b>	<b>Hospedeiro intermediário</b>	<b>Infecção em humanos</b>	<b>Distribuição geográfica</b>	<b>Autor/Ano</b>
<b>G1</b>	Ovinos e outros animais domésticos	Sim	Por todo o Mundo	
<b>G2</b>	Ovelha da Tasmânia	Sim	Tasmânia e Argentina	
<b>G3</b>	Búfalos	Sim	Ásia	
<b>G4</b>	Cavalo	Baixa	Europa, Oriente, USA e África do Sul	
<b>G5</b>	Bovinos	Sim	Europa, Ásia, Oriente e África do Sul	
<b>G6</b>	Camelo	Sim	Oriente, África e Argentina	
<b>G7</b>	Porcos	Baixa	Europa, Rússia e América do Sul	
<b>G8</b>	Estirpe do Norte	Sim	América do Norte e Eurásia	Bowles <i>et al.</i> , 1994
<b>G9</b>	Humanos	Sim	Europa	Scott <i>et al.</i> , 1997
<b>G10</b>	Roedores da Finlândia	Não se sabe	Norte da Europa	Levikainen <i>et al.</i> , 2003

Estudos genéticos recentes vieram confirmar o conceito de diversidade de estirpes dentro da espécie *E.granulosus*, o qual anteriormente apenas se baseava em características morfológicas e biológicas. A identificação das diferentes estirpes deverá ser baseada numa combinação de diversos critérios, nomeadamente as características morfológicas, biológicas, bioquímicas e epidemiológicas e, ainda, como foi demonstrado nos últimos anos, em características genómicas, recorrendo a técnicas moleculares de análise do DNA (Eckert & Thompson, 1997).

A análise filogenética dos resultados obtidos através das técnicas moleculares demonstrou claramente a necessidade da reagrupação do estatuto taxonómico das estirpes desta espécie (Eckert & Thompson, 1997).

Com base no conhecimento actual dos ciclos de vida, variação intra-específica e epidemiologia da espécie *E.granulosus* podem-se desenvolver estudos de forma a obter certezas na localização taxonómica de cada estirpe, ou a descrever novas espécies, se tal for comprovado. Nos últimos anos tem existido alguma polémica acerca da classificação taxonómica de certas estirpes pois há investigadores que consideram que são espécies diferentes e outros que ainda não encontraram evidências para tal. No entanto, não há consenso para uma ou outra situação (McManus, 2006 e Thompson, 2008).

### 1.3 - Ciclo de vida

O hospedeiro definitivo, reconhecido como sendo o mais importante, na epidemiologia do parasita *E.granulosus*, na Península Ibérica parece ser o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), pois não foi encontrado em raposas (*Vulpes vulpes*) (David de Moraes, 1998, Trinca, 2001).

Apesar de quase todos os mamíferos poderem ser hospedeiros intermediários, uma vez que foram encontrados parasitados animais como ovinos, bovinos, equinos, caprinos, suínos, etc., os mais importantes são os ovinos, parecendo ser os hospedeiros ideais. Também foram encontrados animais selvagens parasitados, em algumas partes do globo terrestre (Dalimi *et al.*, 2006 e Zanini *et al.*, 2006b).

Em relação ao homem, esta parasitose torna-se comum em regiões onde existam grandes criações de gado e, conseqüentemente, elevado número de cães para guardar os rebanhos, mas o homem é considerado um hospedeiro acidental.

Quando o homem se insere no ciclo de vida do parasita, a hidatidose, que é uma zoonose restrita, é transformada numa antropozoonose (David de Moraes, 1998).

Ao ingerir vísceras parasitadas (com metacéstodes) de hospedeiros intermediários, o cão (hospedeiro definitivo) fica parasitado vindo a eliminar para o meio exterior, diariamente, os proglótes grávidos, de *E.granulosus*, através das suas fezes.

Os ovos podem ser disseminados para o exterior de diferentes formas como:

- Os proglótes após se libertarem do estróbilo irão percorrer o intestino até chegar ao ânus provocando prurido local. O cão, ao coçar-se, rebenta estes proglótes e ao lamber-se leva à disseminação dos ovos por toda a superfície do corpo.

- Os proglótes podem vir, sem se romperem, para o exterior contidos nas fezes e serem posteriormente ingeridos pelo hospedeiro intermediário ou, uma vez no exterior, rebentarem e libertarem os ovos que se podem espalhar um pouco por todo o lado.

- Os proglótes podem-se desagregar ainda no interior do intestino, libertando os ovos, sendo expulsos para o exterior com as fezes (Trinca, 2001 e David Morais, 1998).

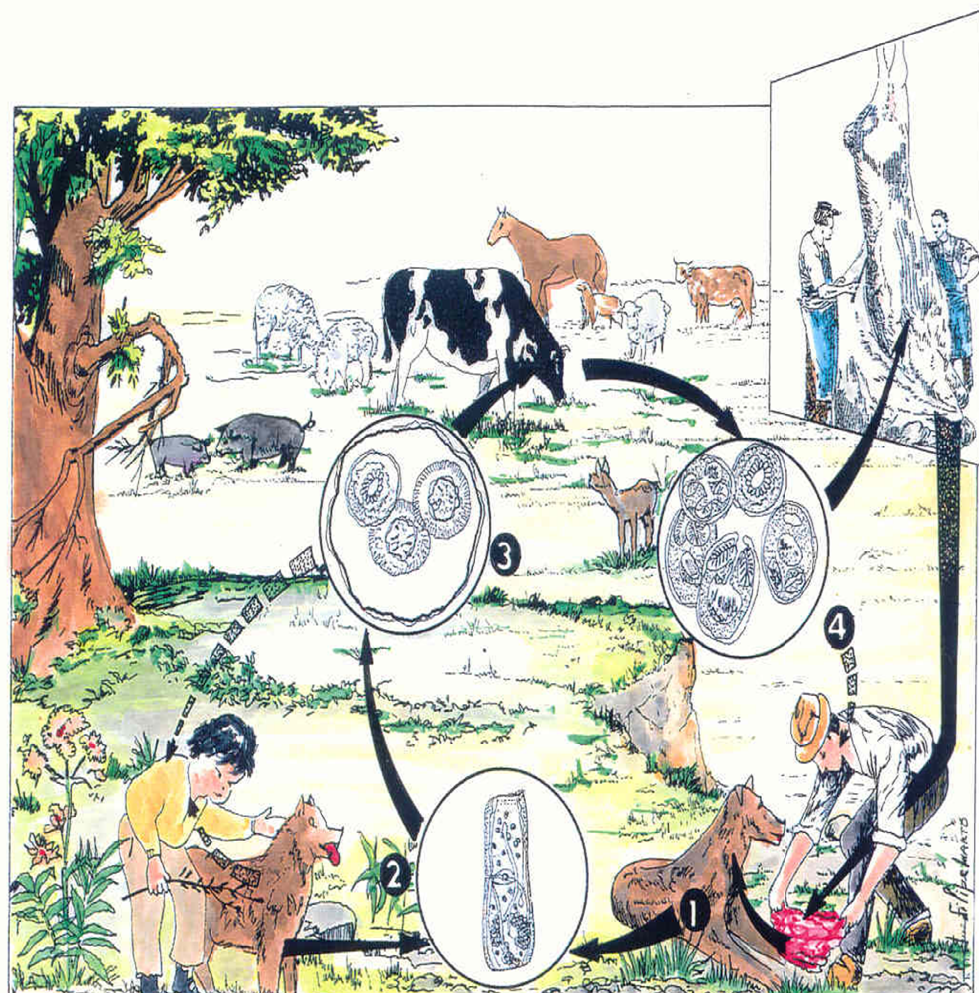
Estes ovos podem ser encontrados um pouco por todos os ambientes, como o solo, a água, a relva, entre outros, e ainda no pêlo do próprio cão.

Todos os hospedeiros intermediários infectam-se ao pastarem ou beberem água contaminada, visto falarmos de animais ruminantes. Em relação aos humanos, estes podem ser infectados de diversas formas, sendo a principal o contacto próximo com o cão, uma vez que os ovos podem-se espalhar por todo o pêlo do animal. Um simples gesto de passar a mão pelo pêlo do cão (ou ser lambido por este) leva a que os ovos adiram às mãos. Se as mãos não forem lavadas, ao serem levadas à boca conspurcadas, o Homem pode ingerir os ovos e tornar-se num hospedeiro accidental. Os homens também pode ser infectado de forma indirecta, ao ingerir alimentos que estejam conspurcados com os ovos ou ingerindo bebidas servidas em recipientes contaminados (Andersen *et al.*, 1997).

Quer accidentalmente no homem ou noutros hospedeiros intermediários, após a ingestão dos ovos, é dada continuidade ao ciclo de vida do parasita (Figura 6), pois os embriões hexacantos irão dar origem ao quisto hidático ou hidátide (forma larvar) (Trinca, 2001).

Para se conseguir prevenir a infecção humana ou animal, numa determinada região, é necessário conhecer perfeitamente o ciclo global do parasita e analisar o seu aspecto funcional, estudando as relações ecológicas de cada hospedeiro com outras espécies hospedeiras, nessa mesma região. Assim, foram descritos, na literatura, diferentes ciclos epidemiológicos onde baseiam a dinâmica da transmissão humana:

1. O ciclo silvático que ocorre entre herbívoros/carnívoros selvagens. Este ciclo ancestral pode ter sido a origem de um ciclo rural clássico através dos cães domésticos que podem ingerir os animais selvagens.
2. O ciclo rural que ocorre entre animais domésticos/cão e acidentalmente o homem.
3. O ciclo urbano que ocorre entre homem/cão, podendo ser um problema de saúde pública em muitos países (David de Moraes, 1998 e Trinca, 2000)



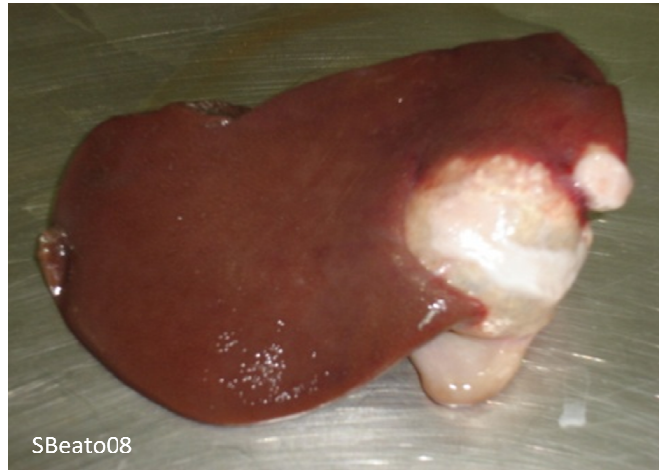
**Figura 6** – Ciclo de vida do *Echinococcus granulosus*: 1 – O cão, hospedeiro definitivo, infecta-se ao comer vísceras dos hospedeiros intermediários com metacéstodes (quistos hidáticos); 2 – Os proglótis grávidos do parasita *E. granulosus* são libertados no intestino do cão e eliminados com as fezes para o exterior; 3 – Os ovos contaminam o solo, água, ar e o próprio pelo do cão; 4 – Os embriões hexacantos darão origem, nos hospedeiros intermediários incluindo o homem, à formação de hidátides ou quistos hidáticos (Imagem cedida pela Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas, IHMT)

## 1.4 - Patologia

A hidatidose é uma patologia de desenvolvimento crónico (Craig *et al.*, 2007) em que os danos que o parasita, na forma adulta, pode causar limitam-se à zona a que este se fixa no intestino do hospedeiro definitivo, onde poderá levar à necrose das células às quais as ventosas aderem, ou à ruptura do epitélio da cripta de Lieberkühn. Em infecções massivas pode haver a produção excessiva de muco, mas em geral não se costumam observar danos importantes nem reacções celulares contra o parasita (Ponce Gordo, 1995).

No que concerne à fase larvar, nenhum outro parasita provoca lesões em tantas localizações anatómicas como as que o parasita *E.granulosus* produz. No entanto, na maioria das vezes a localização é hepática e/ou pulmonar, havendo sido reportados casos de localização no cérebro, no músculo, no osso, entre outros órgãos (Grácio *et al.*, 2002 e Vicidomini *et al.*, 2007).

Os principais problemas causados pela hidatidose são do tipo mecânico, devido ao tamanho e crescimento dos quistos. Assim, por exemplo, a maioria dos quistos hepáticos são assintomáticos (Figura 7), não apresentando sintomatologia clínica até atingirem um tamanho de cerca de 10cm (Ponce Gordo, 1995). No Homem o quisto hidático ao se instalar em diferentes órgãos e tecidos, torna possível o seu desenvolvimento, ainda que de forma lenta, podendo alcançar dimensões na ordem dos 20 cm (Jorge, 2000). A ruptura dos quistos pode ocorrer em qualquer localização, podendo provocar infecções bacterianas secundárias e/ou a disseminação das protoescólices por todo o organismo, originando uma hidatidose secundária múltipla, reacções anafiláticas de intensidade variável e inclusive a morte do hospedeiro (Andersen, 1997 e Trinca, 2001).



**Figura 7 – Fígado de ovino parasitado com *E. granulosus***

A nível bioquímico e metabólico podem existir mudanças em vários sistemas enzimáticos e no metabolismo proteico do hospedeiro, indicando a existência de alterações funcionais do órgão parasitado (Radfar & Iranyar, 2004).

## **1.5 - Diagnóstico**

### **1.5.1 - Clínico**

O diagnóstico clínico do quisto hidático é considerado muito difícil no início do parasitismo, pois a reacção provocada pela entrada do parasita no organismo é inaparente e assintomática. Quando o quisto atinge um certo volume torna-se possível ser reconhecido, caso seja superficial. Se o quisto é profundo pode haver confusão com quaisquer tumores do órgão afectado (Rey, 2001 e Trinca, 2001).

Quando a localização dos quistos hidáticos não for em locais que possam causar lesões graves, mesmo que o indivíduo tenha sido infectado na infância, o diagnóstico será feito muito mais tarde, a maior parte das vezes apenas na idade adulta ou então será feito como um achado acidental (Rey, 2001).

Em relação à sintomatologia, a hidatidose pode apresentar um quadro pobre de sinais e sintomas ou então pode-se revelar polimorfa e produzir diversas síndromes sem características específicas. Na maioria dos casos o diagnóstico diferencial faz-se com algumas doenças tumorais, sobretudo as que afectam o pulmão e o fígado.

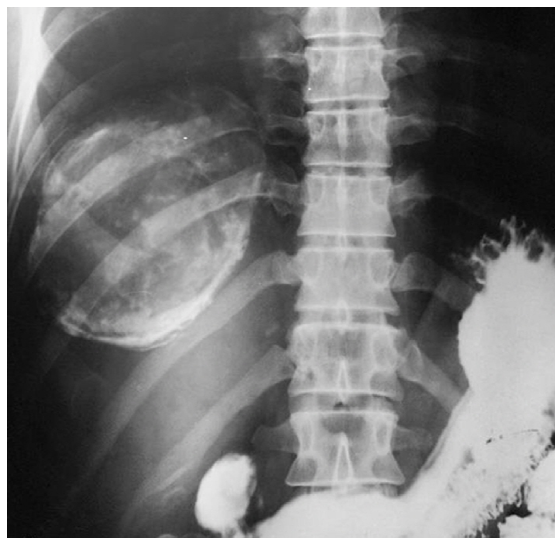
Nas áreas consideradas endémicas, assim como em centros de atendimento aos doentes, a possibilidade de uma etiologia hidática deverá estar bastante presente na abordagem clínica para ser comprovada ou excluída pelos métodos adequados, pois se não se verificar, o diagnóstico poderá tornar-se mais difícil e surgir como uma surpresa, por ocasião de um exame radiológico, durante uma intervenção cirúrgica ou ainda por um choque anafilático por ruptura de um ou mais quistos (Rey, 2001).

Em alguns casos o diagnóstico clínico poderá ser imediato, nomeadamente quando o doente, após um ataque de tosse, expulsa fragmentos de membranas quísticas ou vesículas murchas ou túrgidas, com a expectoração. Nas punções exploratórias ou evacuadoras, efectuadas devido à suspeita de outras patologias, o exame parasitológico pode também revelar a presença de areia hidática e assim permitir o diagnóstico correcto da hidatidose (Trinca, 2001).

Na maioria dos casos contribui para o diagnóstico clínico desta parasitose, o conhecimento da zona de residência/procedência dos doentes, da sua actividade profissional, dos seus hábitos de vida e da existência de outros casos diagnosticados na família, bem como em alguns vizinhos (Trinca, 2001 e Jorge, 2000).

### 1.5.2 – Imagiologia

A radiologia é um dos principais recursos para diagnosticar quistos localizados nos pulmões, em especial quistos que sejam pequenos e assintomáticos. O aparecimento de imagens circulares homogéneas e de contornos bastante nítidos, são muito sugestivas, mas a sombra radiológica não será suficiente para assegurar um diagnóstico específico (Lewall, 1998) (Figura 8).

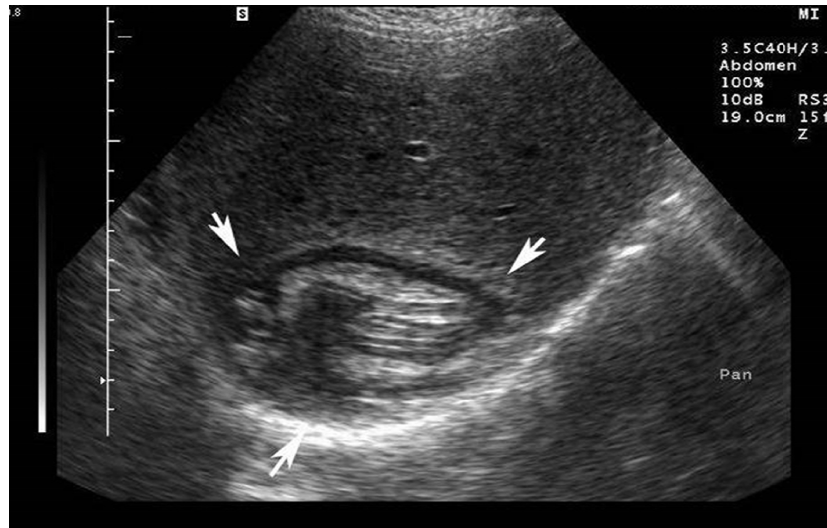


**Figura 8** – Quisto Hidático calcificado no quadrante superior do abdómen de um homem de 28 anos (Imagem adaptada de Yuksel *et al*, 2007)

Em quistos hepáticos localizados na região superficial e superior do fígado, o exame radiológico também é importante, pois projecta a sua sombra por cima do contorno do diafragma. Porém, nos quistos hidáticos profundos apenas os que apresentam uma membrana adventícia calcificada poderão ser visualizados, não sendo este um facto indicador de que o parasita esteja inactivo (Lewall, 1998 e Rey, 2001).

Quando a hidátide se localiza nos ossos o estudo radiológico é o elemento básico para o diagnóstico da doença.

Existem diferentes exames imagiológicos que poderão melhorar o diagnóstico da hidatidose humana tais como a cintiligrafia, a tomografia axial computadorizada, a ressonância magnética, a ecografia (Figura 9) ou ultrassonografia e a emissão de positrões (Lewall, 1998 e Yuksel *et al.*, 2007).



**Figura 9** – Quisto Hidático no fígado de um homem de 25 anos (Imagem adaptada de Yuksel *et al.*, 2007)

### 1.5.3 – Diagnóstico laboratorial tradicional

Os exames laboratoriais de rotina não permitem, por si só, o diagnóstico da hidatidose, pois, normalmente, não se encontram alterações na função hepática. Então, ao fazer um diagnóstico laboratorial deve-se ter em atenção se este é dirigido para o hospedeiro ou para o parasita.

Pode-se realizar um diagnóstico parasitológico directo, o qual consiste na identificação microscópica dos elementos parasitários. Este tipo de diagnóstico só deverá ser feito a seguir a uma rotura ou fissuração do quisto hidático, pois uma punção da hidátide, em condições normais, está contra-indicada. Exceptuando estes casos, anteriormente referidos, o diagnóstico parasitológico directo da hidatidose é impossível.

Outro método de diagnóstico será o imunológico, o qual se vai basear na evidência da reacção antigénio/anticorpo *in vitro*, pesquisa de antígenos e anticorpos circulantes (Sunita *et al.*, 2007), entre outros. Este é o método mais utilizado no diagnóstico da hidatidose, embora as novas técnicas na área da imagiologia sejam de grande auxílio para o diagnóstico.

As técnicas utilizadas no imunodiagnóstico da hidatidose têm sido a prova de Casoni (caída em desuso), a reacção de fixação do complemento, imunofluorescência, difusão dupla, imunoelectroforese, aglutinação em látex, hemaglutinação indirecta, “imunoblotting” e ELISA, entre outras, ainda que nem todas se tenham mostrado suficientemente sensíveis e específicas (Gottstein, 1992; Ponce Gordo, 1995; Biava *et al.*, 2001 e Zhang *et al.*, 2003).

No que diz respeito ao imunodiagnóstico da hidatidose animal, são poucos os resultados conseguidos, pois os investigadores sempre tiveram problemas devido à baixa sensibilidade das técnicas empregues e/ou devido a reacções cruzadas com outras parasitoses (Ponce Gordo, 1995 e David de Moraes, 1998).

#### **1.5.4 - Diagnóstico Molecular**

O métodos moleculares baseiam-se na análise de DNA, examinando o genoma do parasita directamente, logo não são confundidos com factores de variabilidade induzida pelo ambiente ou pelo hospedeiro, nem com factores associados ao ciclo de vida ou modificações pós translacionais (Gottstein, 1992; Bowles & McManus, 1993a e Singh, 1997). A variação genética pode ser investigada tanto no genoma mitocondrial como no genoma nuclear. O DNA mitocondrial (mtDNA) é útil para a discriminação de

microorganismos geneticamente semelhantes devido à sua rápida diferenciação na evolução. Como o mtDNA é haplóide, os haplótipos dos alelos podem ser determinados de forma menos ambígua e este mtDNA tem a vantagem adicional de não compreender recombinação interna, simplificando a sua análise (Nakao et al., 2000; Nakao *et al.*, 2007 e Badaraco *et al.*, 2008).

Ao longo dos anos foram sendo utilizadas diversas técnicas com base no uso de DNA para a genotipagem da espécie *E. granulosus* (Bowles & McManus, 1993b, Siles-Lucas & Gottstein, 2001, McManus, 2002), algumas das quais vão ser a seguir referenciadas.

### ***Restriction fragment length polymorphism (RFLP)***

A análise de polimorfismos usando enzimas de restrição (RFLP) pode ser aplicado a DNA ribossómico (rDNA) ou a outras regiões genómicas. O DNA é digerido por enzimas de restrição dando origem a fragmentos que podem ser separados por electroforese em gel de agarose, sendo transferidos depois para uma membrana de nitrocelulose ou “nylon” e hibridizada com uma sonda específica de DNA, previamente marcada com radioactividade ou outra aproximação ao “Southern Blot” (RFLP-SB) (Cuesta-Bandera *et al.*, 1988; Bowles & McManus, 1993c; Hope *et al.*, 1991 e Eckert *et al.*, 2001).

Esta técnica foi bastante utilizada nos anos 80 do século passado, sendo que a sua utilidade foi comprovada para o início da investigação da variação inter e intraespecífica no género *Echinococcus* (Bowles & McManus, 1993b). Foi demonstrado que estes estudos conseguem distinguir de forma clara um número de estirpes de diferentes de *E. granulosus*, sendo que o padrão é idêntico dentro de cada estirpe.

### ***Polymerase chain reaction (PCR)***

A comparação, entre organismos, de sequências nucleotídicas de segmentos de DNA oferece uma forma mais sensível e directa na detecção de variações genéticas. O desenvolvimento da PCR tornou possível a comparação de sequências para o estudo da variação genética, levando à diminuição do tempo extra usado nas técnicas que requeriam a clonagem de segmentos genéticos dos organismos (Bowles & McManus, 1993b, McManus & Thompson, 2003). Para tal foram usadas sequências mitocondriais, particularmente, fragmentos dos genes *cox 1* (cytochrome c oxidase subunit 1(CO1)) e *nad 1* (NADH dehydrogenase I (ND1)), através dos quais não foi possível a identificação das estirpes. Esta técnica tornou-se útil quando se começou a fazer comparação de sequências de *E.granulosus* e a verificar que havia um certo padrão referente às diferentes estirpes, tornando possível uma diferenciação entre as mesmas (McManus & Thompson, 2003).

Esta técnica também tem sido aplicada ao hospedeiro definitivo podendo detectar o genoma do parasita em infecções patentes e pré-patentes (Naidich *et al.*, 2006).

### **PCR-RFLP**

À técnica convencional de RFLP foi associada a PCR, sem que fossem perdidas as características de resolução e especificidade anteriores. Para tal foram usados os genes do RNA ribossomal (rRNA), os quais apresentam regiões codificantes altamente conservadas separadas por outras regiões não codificantes pouco conservadas (Gasser & Chilton, 1995 e McManus D.P., 2002). A região *internal transcribed spacer 1* (ITS1) foi escolhida para a amplificação sendo depois submetida à digestão por enzimas de

restrição. Padrões característicos de RFLP foram surgindo à medida que várias estirpes e espécies eram submetidas a esta técnica (Bowles & McManus, 1993b).

Uma das principais vantagens deste método é a sua elevada sensibilidade, pois basta um parasita adulto ou, então, cinco protoescólices fixadas em etanol para uma análise bem sucedida e, teoricamente, deveria ser possível genotipar estes parasitas com base apenas no DNA de uma protoescólice usando esta técnica (Bowles & McManus, 1993b). Esta técnica demonstrou ser rápida e ideal para a identificação de isolados recém colhidos e na investigação dos padrões de transmissão do parasita *E. granulosus*, especialmente em regiões onde as estirpes se distribuem de forma simpátrica (McManus, 2002).

#### ***Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)***

Esta técnica é também conhecido como PCR arbitrária, pois é uma técnica baseada em polimorfismos de DNA encontradas através da amplificação de DNA genómico usando um único “primer” de sequência nucleotídica arbitrária. Esta é uma técnica relativamente rápida e que usa poucas quantidades de DNA, mas apenas se obtêm resultados credíveis em condições cuidadosamente controladas, especialmente relacionadas com a qualidade e quantidade de DNA e do “primer” usados. Assim é recomendado o uso desta técnica simultaneamente com outras técnicas de amplificação de DNA (Eckert *et al.*, 2001, McManus, 2002).

Na genotipagem da espécie *E. granulosus* esta técnica permite distinguir geneticamente algumas das estirpes existentes mas tem sempre de acompanhar outras técnicas de DNA (Thompson, *et al.*, 1998, Eckert *et al.*, 2001; McManus, 2002, McManus & Thompson, 2003).

## Comparação de Sequências de DNA amplificadas por PCR

Esta técnica também designada como sequenciação do DNA tem sido amplamente usada no genoma mitocondrial do parasita, sendo que os genes em que é mais aplicada são o citocromo c oxidase sub-unidade 1 (COI) e o NADH desidrogenase sub-unidade 1 (ND1). Usando “primers” para zonas bastante conservadas destes genes consegue-se comparar a zona amplificada com outras sequências anteriormente publicadas das quatro espécies de *Echinococcus* e dos diferentes genótipos de *E.granulosus*, e, assim, determinar o genótipo das amostras pretendidas (Bowles & McManus, 1993b e Eckert *et al.*, 2001).

## Técnicas de detecção de mutações

Estas técnicas são alternativas para as técnicas de PCR e são aplicáveis em elevado número de amostras ao mesmo tempo.

Dentro deste tipo de técnicas, aplicadas à espécie *E.granulosus*, apenas se irão referir algumas como a *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), a *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), a *Dideoxy Fingerprint* (ddF), entre outras. No caso da SSCP, esta foi utilizada para a pesquisa de mutações, apresentando um elevado potencial, de forma a conseguir discriminar sequências de DNA que diferem em apenas um nucleótido. No caso do parasita *E.granulosus* a SSCP foi utilizada no genes COI e ND1 conseguindo ver as mutações existentes entre estirpes e diferenciar quatro destas estirpes de forma clara (Zhang *et al.*, 1999; Bowles & McManus, 1993b e Eckert *et al.*, 2001).

Quanto à AFLP, é semelhante à RAPD, podendo ser associada às mesmas enzimas de restrição. No entanto apresenta uma limitação pois serão necessárias grandes quantidades de DNA e as amostras da espécie *E.granulosus* em certas situações torna-se complicado pois os quistos podem apresentar poucas protoescólices e, assim, pouco DNA (Thompson, *et al.*, 1998).

O outro método de pesquisa de mutações ddF é um híbrido entre a SSCP e a sequenciação com marcação por “*dideoxy*” (marcação com fluorescência) em que a presença de uma mutação é dada pela diminuição da emissão de fluorescência. Esta técnica tem sido aplicada ao gene COI do parasita *E.granulosus* podendo discriminar entre as diferentes estirpes existentes no mundo, pois há produção de diferentes padrões de fluorescência (McManus, 2002 e McManus & Thompson, 2003).

### **Microsatélites**

Tem sido uma técnica pouco utilizada para o estudo do género *Echinococcus*. Estes têm-se tornado os marcadores genéticos mais utilizados num elevado número de microorganismos devido à sua abundância e ao elevado grau de polimorfismos (McManus & Thompson, 2003). Para a espécie *E.multilocularis* já se encontram disponíveis alguns microsatélites, conseguindo dividir a espécie em três grupos distintos, mas para a espécie *E.granulosus* há uma enorme lacuna neste aspecto. O desenvolvimento de microsatélites aplicáveis aos parasitas *E.granulosus* e *E.multilocularis* poderá trazer novas informações no estudo genético e de transmissão biológica dos mesmos (Thompson, *et al.*, 1998 e McManus & Thompson, 2003).

## 1.6 – Tratamento

A remoção cirúrgica de um quisto hidático continua a ser a intervenção de eleição para a hidatidose, contudo apresenta riscos podendo dar origem a infecções, possibilidade de choque anafilático, riscos de hidatidose secundária e ainda a possibilidade de ruptura de quistos internos. Ainda que possa ser realizada na maioria dos casos existem factores que indicam que se deve tentar encontrar tratamentos farmacológicos alternativos (Ponce Gordo, 1995).

Até ao momento não se encontrou um fármaco eficaz a 100% e que reúna consenso para a hidatidose. Em muitos casos coordena-se a aplicação do tratamento pré e pós-operatorio de forma a complementar a acção cirúrgica.

Segundo Ponce Gordo (1995), os fármacos que até à actualidade têm mostrado maior eficiência no tratamento da hidatidose são derivados benzimidazólicos (albendazol, mebendazol, etc.). Também se usa praziquantel mas ainda sem resultados conclusivos.

## Capítulo II - Objetivos

## 2.1 - Objectivos

Dada a importância da hidatidose na saúde pública em determinadas regiões geográficas, sendo que algumas regiões de Portugal se encontram dentro deste grupo, torna-se necessário a realização de estudos que refiram a prevalência de *E.granulosus* e a consequente caracterização molecular para uma melhor avaliação da patologia e sua evolução no hospedeiro intermediário. Devido à inexistência de informação em Portugal em relação aos tipos de genótipos existentes, foi proposto neste trabalho iniciar um estudo de caracterização molecular do *E.granulosus* em Portugal. Os principais objectivos deste estudo são:

- Estudar morfologicamente os quistos de *E.granulosus* provenientes de matadouros da Região da Beira Interior, Portugal;
- Estudar e caracterizar molecularmente das estirpes de *E.granulosus* existentes na região da Beira Interior, Portugal;
- Aplicar a técnica de PCR-RFLP ao estudo da hidatidose, usando “primers” diferentes para as mesmas enzimas;
- Sequenciar as amostras que suscitarem dúvidas após a aplicação da PCR-RFLP.

## Capítulo III - Material e Métodos

### 3.1 - Obtenção e transporte do material biológico parasitado

As amostras do parasita foram obtidas de 58 quistos hidáticos provenientes de qualquer localização orgânica, principalmente fígado e pulmão, desenvolvidos em ovinos e bovinos. Todas as amostras foram obtidas entre Outubro de 2007 e Maio de 2008, sendo os quistos fornecidos por matadouros municipais e privados da região da Beira Interior.

As vísceras dos animais contendo as amostras do parasita foram na sua maioria recolhidas nos respectivos matadouros no mesmo dia do sacrifício do animal, ou num prazo máximo de três dias após o mesmo, tendo sido conservadas durante este tempo refrigeradas, a uma temperatura entre 5 e 10 °C. O transporte foi realizado em contentores de tamanho adequado, sem refrigeração, sendo feita num espaço de tempo máximo de 3 horas. No laboratório foram processadas imediatamente, ou mantidas em câmara fria a 4°C durante um período máximo de 24 horas antes do seu processamento.

### 3.2 - Obtenção dos protoescólices

As diferentes amostras biológicas, constituídas pelas vísceras parasitadas foram depositadas em bandejas de tamanho adequado, sendo manipuladas seguindo o protocolo descrito por Ponce Gordo (1995), que indica que a superfície dos quistos e a zona adjacente do órgão parasitado sejam previamente desinfectadas com solução de Lugol. Seguidamente, com a ajuda de seringas estéreis de 10 ml, extraiu-se cerca de metade do líquido hidático (Figura 10A e 10B), abrindo o quisto a seguir e extraíndo o resto do líquido e areia hidática (Figura 11).



**Figura 10** – Extração do Líquido hidático. A) Punção do quisto. B) Extração do líquido hidático



**Figura 11** – Abertura do quisto com extração da areia hidática e da membrana germinativa

Lavaram-se bem as paredes da membrana germinativa do quisto hidático com soro fisiológico esterilizado, tendo como objectivo desprender as protoescólices e/ou cápsulas prolíferas que pudessem estar agregadas a membrana. Este líquido e areia hidática foram recolhidos em tubos estéreis de centrifuga, tendo sido adicionado soro fisiológico estéril e posteriormente centrifugados, num espaço de tempo máximo de 4 horas. Quando as membranas germinativas apresentavam elevada quantidade de protoescólices na sua parede interna, estes quistos eram colocados em caixas

de petri estéreis e lavadas com soro fisiológico (Figura 12). Em todo o momento foi mantido identificado e separado todo o material dos diferentes quistos analisados.



**Figura 12 – Lavagem da membrana germinativa de um quisto hidático**

Após centrifugação, 1500 r.p.m. durante 3 minutos, descartou-se o sobrenadante (líquido hidático) e observou-se ao microscópio óptico a presença ou ausência de material genético do parasita (protoescólices, cápsulas prolíferas, ganchos, etc.), tendo-se identificado e guardado as amostras que foram positivas, em etanol absoluto e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se o aspecto da membrana e/ou líquido hidático indicavam degeneração (membrana gelatinosa, líquido hidático turvo), ou o líquido hidático apresentava sinais de contaminação, o

quisto hidático era excluído (Figura 13). Nestes casos não costumam existir protoescólices ou caso estejam presentes estão em elevado estado degenerativo e com baixa percentagem de viabilidade.



**Figura 13** – Membranas germinativas parcialmente degeneradas

### 3.3 – Análise molecular das amostras parasitadas

Na análise molecular foi feita, inicialmente, a extracção do DNA do parasita *E.granulosus* usando o kit “High pure PCR template preparation kit” (Roche, Portugal), seguindo as instruções do fabricante. As amostras que estavam a  $-20^{\circ}\text{C}$  foram retiradas, descongeladas e, posteriormente, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos e lavadas em PBS (Phosphate Buffer Solution), para retirar o etanol em que estavam conservadas (3 ou mais vezes). Caso o sedimento aparente ter um volume inferior a 200  $\mu\text{l}$  dever-se-ia adicionar PBS estéril até perfazer o volume pretendido.

Num tubo estéril de 1,5 ml adicionaram-se 200  $\mu\text{l}$  de amostra, 200  $\mu\text{l}$  de tampão (*binding buffer*) e 40  $\mu\text{l}$  de proteinase k, homogeneizou-se e incubou-se a mistura a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos

e adicionou-se 100 µl de isopropanol, homogeneizou-se e transferiu-se o conteúdo para um tubo com filtro (*high pure filter tube*), o qual estava inserido num tubo colector. Centrifugou-se a 8000 rpm durante um minuto e rejeitou-se o tubo colector com o conteúdo, passando o filtro para outro tubo colector. Adicionou-se 500 µl de tampão “*removal inhibitors*” e centrifugou-se a 8000 rpm durante um minuto, adicionando, seguidamente, 500 µl de tampão “*washer*” e centrifugou-se do mesmo modo, descartando-se o tubo colector e o conteúdo e colocando o filtro noutra tubo colector. Voltou-se a adicionar tampão “*washer*” na mesma quantidade e procedeu-se de igual forma, tendo seguidamente feito uma centrifugação rápida (10 segundos a 13000 rpm) e descartou-se o tubo colector com o conteúdo. Inseriu-se o tubo com filtro num tubo estéril de 1,5 ml, adicionando 200 µl tampão de eluição, o qual foi previamente aquecido a 70°C, centrifugando a 8000 rpm durante um minuto. Identificou-se o tubo com número e data de extracção e guardou-se por cerca de 2 horas entre 2-8°C e, posteriormente, congelou-se a -20°C.

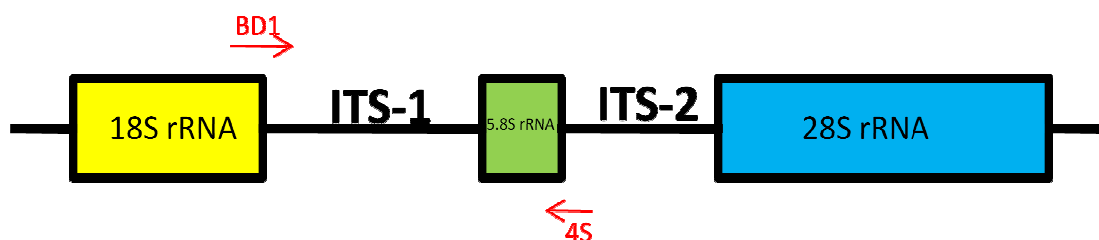
### 3.3.1 – Amplificação dos produtos extraídos

Após extracção procedeu-se à amplificação dos produtos usando para tal o kit Illustra™ puReTaq Ready-to-go PCR Beads (GE Healthcare, UK), o qual apresentava os tubos com uma mistura à qual apenas seria necessário adicionar a amostra, os oligonucleótidos e perfazer o volume final com água destilada.

Foram usados três pares de oligonucleótidos (Tabela 2), os quais eram direccionados para amplificar a região ITS-1 (Figura 14):

**Tabela 2** – Sequências dos “primers” utilizados para estudo da região ITS-1

Nome	Sequência	Autor
<b>BD1</b>	5' – GTCGTAACAAGGTTTCCGTA – 3'	Bowles & McManus (1993)
<b>4S</b>	5' – TCTAGATGCGTTTCGAA(G/A)TGTCGATG – 3'	
<b>PEg9 F1</b>	5' – ATGGCATGGGTAGCACGGAGAG – 3'	González, L.M (2002)
<b>PEg9 R1</b>	5' – GGTTTGGAATGGCGATGTTGA – 3'	
<b>PEg16 F1</b>	5' – CGCGCTATCGACCCACCAACAG – 3'	González, L.M (2002)
<b>PEg16 R1</b>	5' – ACTCCGTCCCGCTACTCCACTCC – 3'	

**Figura 14** – Representação esquemática de parte do rDNA do *E. granulosus*

Tiveram-se todos os cuidados com a assepsia, no uso destes tubos pois as contaminações podem ser uma fonte de grandes problemas em biologia molecular. Após se ter verificado que os tubos continham a mistura liofilizada nas proporções que o fabricante indica, para amplificação da região ITS-1, foi adicionado 1,1 µl de oligonucleótido BD1, 1,1 µl de oligonucleótido 4S (a concentração dos “primers” foi de 30 pmol), 10,0 µl de amostra e perpez-se o restante volume com água destilada, de forma a perfazer um volume final de 25 µl. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e colocou-se o mesmo em gelo até se colocar no termociclador (AVISO<sup>®</sup>, GmbH Mechatronic Systems). Foi necessário programar o termociclador para que a mistura em questão pudesse ser amplificada, o que foi feito de acordo com as seguintes condições: 95°C durante 2 minutos,

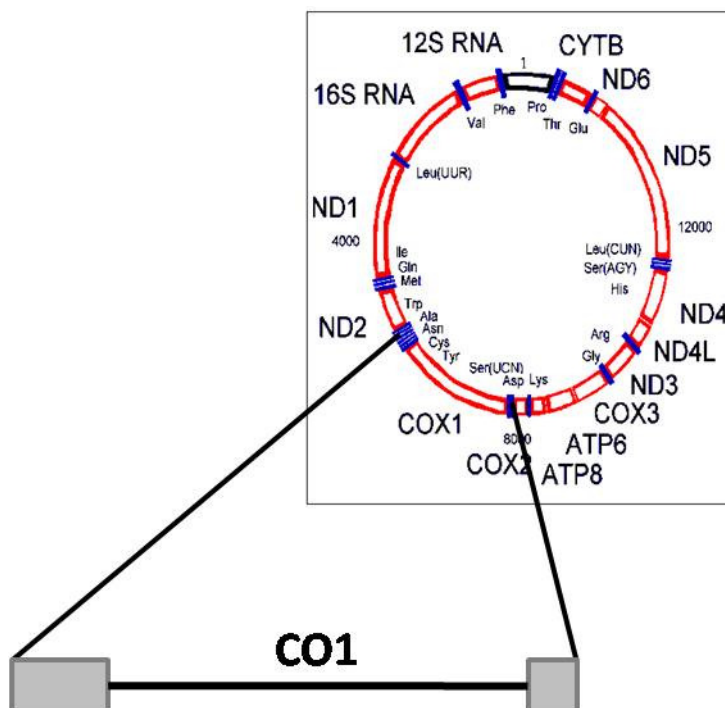
seguinte-se 35 ciclos com as condições de 95°C durante 1 minuto, seguidos de 50°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto, terminando com 72°C durante 7 minutos.

Para a amplificação com os “primers” EgF1 e EgR1 foram adicionados 2,2 µl de oligonucleótido PEG9F1, 3,0 µl de oligonucleótido PEG9R1 (a concentração dos “primers” foi de 50 pmol), 6,0 µl de amostra e fez-se o restante volume com água destilada, de forma a obter um volume final de 25 µl. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e colocou-se o mesmo em gelo até se colocar no termociclador. As condições de PCR utilizadas foram: 94°C durante 5 minutos, seguindo-se 35 ciclos com as condições de 94°C durante 1 minuto, seguidos de 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos, terminando com 72°C durante 10 minutos.

Para a amplificação com os “primers” Eg16F1 e Eg16R1 foram adicionados 2,2 µl de oligonucleótido PEG16F1, 2,0 µl de oligonucleótido PEG16R1 (a concentração dos “primers” foi de 50 pmol), 6,0 µl de amostra e fez-se o restante volume com água destilada, de forma a perfazer um volume final de 25 µl. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e colocou-se o mesmo em gelo até se colocar no termociclador. As condições de PCR utilizadas foram: 94°C durante 5 minutos, seguindo-se 35 ciclos com as condições de 94°C durante 1 minuto, seguidos de 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos, terminando com 72°C durante 10 minutos.

Para mais tarde se proceder à sequenciação, foram usados “primers” para amplificar o gene citocromo c oxidase sub-unidade 1 (Figura 15) e, para tal, foram aplicados os “primers” JB3 (5' - TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT - 3') e JB4.5 (5' - TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG - 3'), descritos por Bowles *et al.*, (1992). Para a amplificação foram adicionados 2,1 µl de oligonucleótido JB3, 3,7 µl de oligonucleótido JB4.5 (a concentração dos “primers” foi de 50 pmol), 5,0 µl de amostra e fez-se o restante volume com água destilada, de forma a perfazer um volume final de 25 µl. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e colocou-se o mesmo em gelo até se colocar no termociclador. As condições de PCR utilizadas foram: 95°C durante 5 minutos,

seguinte-se 35 ciclos com as condições de 94°C durante 50 segundos, seguidos de 45°C durante 50 segundos e 72°C durante 50 segundos, terminando com 72°C durante 10 minutos.



**Figura 15** – Representação esquemática de parte do DNA mitocondrial do *E. granulosus* (Imagem adaptada de <http://www.jogg.info/12/Logan.htm>)

### 3.3.2 – Electroforese em gel de agarose

Os produtos das reacções de amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1% em solução tampão TAE (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0) contendo 0,5  $\mu\text{gml}^{-1}$  de brometo de etídeo. A migração das moléculas de DNA foi avaliada por comparação com as de um marcador de tamanho molecular de 2000pb (HyperLadder II, Bionline). As amostras foram preparadas com 5 $\mu\text{l}$  de produto de PCR ao qual foi adicionado 1 $\mu\text{l}$  de tampão (Azul de Bromofenol com glicerol). A migração foi feita a 100V, durante aproximadamente 45 minutos. Os fragmentos de DNA foram visualizados após exposição a raios ultravioleta (Alphamager<sup>®</sup> HP, Alpha Innotech).

### 3.3.3 - Enzimas de Restrição

Foram aplicadas cinco diferentes enzimas de restrição, cortando em diferentes zonas do DNA amplificado, segundo mostra a tabela 3:

**Tabela 3** – Enzimas de restrição utilizadas para estudo da região ITS-1

Nome da Enzima	Sequência	Local de clivagem
Alu I	5' – AGCT – 3' 3' – TCGA – 5'	5' – AG↓CT – 3' 3' – CT↓GA – 5'
Rsa I	5' – GTAC – 3' 3' – CATG – 5'	5' – GT↓AC – 3' 3' – CA↓TG – 5'
Cfo I	5' – GCGC – 3' 3' – CGCG – 5'	5' – GCG↓C – 3' 3' – C↓GCG – 5'
Msp I	5' – CCGG – 3' 3' – GGCC – 5'	5' – C↓CGG – 3' 3' – GGC↓C – 5'

Como cada enzima tem uma actividade diferente foi necessário proceder a ajustes para adicionar 10 unidades de cada no respectivo tubo. Assim, cada uma tem um procedimento individualizado como é enunciado a seguir:

**Rsa I** : Num tubo esterilizado adicionar 8,0 µl de produto amplificado, 0,5 µl da enzima, 1,0 µl do tampão (fornecido pela casa comercial) e 5,5 µl de água desionizada, perfazendo um volume final de 15 µl. Homogeneizar e fazer uma centrifugação rápida. Incubar durante 4 horas a 37° C e, posteriormente, inactivar a acção da enzima a 65° C durante 20 minutos.

**Msp I** : Num tubo esterilizado adicionar 8,0 µl de produto amplificado, 1,0 µl da enzima, 1,0 µl do tampão (fornecido pela casa comercial), 1,0 µl de BSA e 4,0 µl de água desionizada,

perfazendo um volume final de 15  $\mu$ l. Homogeneizar e fazer uma centrifugação rápida. Incubar durante 4 horas a 37° C.

**Cfo I :** Num tubo esterilizado adicionar 8,0  $\mu$ l de produto amplificado, 0,5  $\mu$ l da enzima, 1,0  $\mu$ l do tampão (fornecido pela casa comercial), 1,0  $\mu$ l de BSA e 4,5  $\mu$ l de água desionizada, perfazendo um volume final de 15  $\mu$ l. Homogeneizar e fazer uma centrifugação rápida. Incubar durante 4 horas a 50° C e, posteriormente, inactivar a actividade da enzima durante 20 minutos a 80°C.

**Alu I :** Num tubo esterilizado adicionar 8,0  $\mu$ l de produto amplificado, 0,1  $\mu$ l da enzima, 1,0  $\mu$ l do tampão (fornecido pela casa comercial), 1,0  $\mu$ l de BSA e 6,9  $\mu$ l de água desionizada, perfazendo um volume final de 15  $\mu$ l. Homogeneizar e fazer uma centrifugação rápida. Incubar durante 4 horas a 37° C e, posteriormente, inactivar a actividade da enzima durante 20 minutos a 65°C.

Após a inactivação das enzimas de restrição foi feita uma electroforese em gel de agarose a 2,5% em solução tampão TAE (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0) contendo 0,5  $\mu$ gml<sup>-1</sup> de brometo de etídeo. A migração das moléculas de DNA foi avaliada por comparação com as de um marcador de tamanho molecular de 2000pb (HypperLadder II, Bionline). As amostras foram preparadas com 5 $\mu$ l de produto de PCR submetido à acção das enzimas de restrição ao qual foi adicionado 1 $\mu$ l de tampão (Azul de Bromofenol com glicerol). A migração foi feita a 100V, durante aproximadamente 60 minutos. Os fragmentos de DNA foram visualizados após exposição a raios ultravioleta (Alphamager<sup>®</sup>HP, Alpha Innotech).

### 3.3.4 – Purificação e sequenciação dos produtos amplificados

Os produtos de PCR amplificados foram enviados para purificação e posterior sequenciação para os serviços de sequenciação da empresa STAB VIDA (ITQB, Oeiras, Portugal), tendo sido sequenciado o gene COI, usando o “primer JB3”.

As sequências nucleotídicas parciais obtidas para o gene COI foram analisadas através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (Blast) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), permitindo a pesquisa de sequências semelhantes disponíveis nas bases de dados públicas, nomeadamente no GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Os alinhamentos das sequências nucleotídicas dos produtos de PCR sequenciados foram efectuados usando um programa de alinhamento múltiplo (ClustalW, [www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)), ainda que alguns ajustes tenham sido introduzidos à mão. Foram ainda utilizados os programas Mega 3.0 e Arlequin 3.1 e ainda o DNAsp para a obtenção dos haplótipos das amostras.

## Capítulo IV - Resultados

## 4.1 – Análise das amostras parasitadas

Foram obtidas um total de 58 amostras de fígados e pulmões de animais abatidos no matadouro de Alcains, na Beira Baixa, Portugal, de acordo com a seguinte tabela:

**Tabela 4** – Distribuição das amostras obtidas por espécie

AMOSTRA		OVINO (%)	BOVINO (%)
ÓRGÃO	<b>FÍGADO</b>	30 ( <b>56,6</b> )	2 ( <b>40</b> )
	<b>PULMÃO</b>	23 ( <b>43,4</b> )	3 ( <b>60</b> )
TOTAL		53	5

Das amostras recolhidas apenas 8,6% (5) eram de bovinos e 91,4% (53) eram de ovinos. No que respeita aos ovinos cerca de 56,6% das amostras foram obtidas a partir de fígados e 43,4% de pulmões parasitados. Em relação aos bovinos, 40% das amostras foram obtidas a partir de fígados e 60% de pulmões parasitados.

**Tabela 5** – Distribuição das amostras obtidas por órgão parasitado

AMOSTRA		OVINO (%)	BOVINO (%)	TOTAL
ÓRGÃO	<b>FÍGADO</b>	30 ( <b>93,8</b> )	2 ( <b>6,2</b> )	32
	<b>PULMÃO</b>	23 ( <b>88,5</b> )	3 ( <b>11,5</b> )	26

Das 32 amostras obtidas de fígados parasitados, cerca de 94% pertenciam a ovinos e apenas 6% pertenciam a bovinos. Em relação às 26 amostras de pulmões que apresentavam quistos, 88,5% pertenciam a ovinos e 11,5% pertenciam a bovinos.

Em relação à idade dos animais, todos os ovinos apresentavam uma idade superior a 18 meses, não sendo especificada a idade de cada animal. Em relação aos bovinos, as idades estão especificadas na tabela abaixo:

**Tabela 6** – Distribuição das amostras por idade, dos bovinos

Idades (meses)	BOVINO
35	1
130	2
216	2

As amostras de bovinos que foram analisadas apresentavam uma idade muito diversificada que ia desde 35 meses (aproximadamente 3 anos) até aos 216 meses (18 anos). Como apenas foram obtidas 5 amostras de bovinos elas distribuem-se como o apresentado na tabela anterior, apenas uma amostra de um animal com 35 meses, duas amostras de animais com 130 meses (aproximadamente 11 anos) e duas amostras de animais com 216 meses.

Uma análise da fertilidade dos quistos também implica falar dos quistos que estavam calcificados ou então das amostras que por razões diversas estavam contaminadas. Estes resultados estão especificados na tabela abaixo:

**Tabela 7** - Distribuição das amostras obtidas por fertilidade, calcificação e contaminação, por espécie

AMOSTRA		OVINO (%)	BOVINO (%)	TOTAL (%)
FERTILIDADE	FÉRTIL	29 (50)	1 (1,7)	30 (51,7)
	INFÉRTIL	7 (12,1)	0	7 (12,1)
CALCIFICADAS		11 (19)	4 (6,9)	15 (25,9)
CONTAMINADAS		6 (10,3)	0	6 (10,3)
TOTAL		53 (91,4)	5 (8,6)	58

No total de 58 amostras colhidas, 91,4% foram em ovinos. Destas, 10,3% apresentavam-se contaminadas e 19% estavam calcificadas. Em relação à fertilidade das amostras colhidas nos ovinos, 50% do total eram amostras férteis, revelando a presença de protoescólices e/ou ganchos no líquido hidático, enquanto apenas 12,1% das amostras colhidas em ovinos eram inférteis.

Das cinco amostras de bovinos colhidas, cerca de 8,6 % do total de amostras recolhidas, 4 (6,9%) encontravam-se calcificadas e apenas uma (1,7%) era fértil.

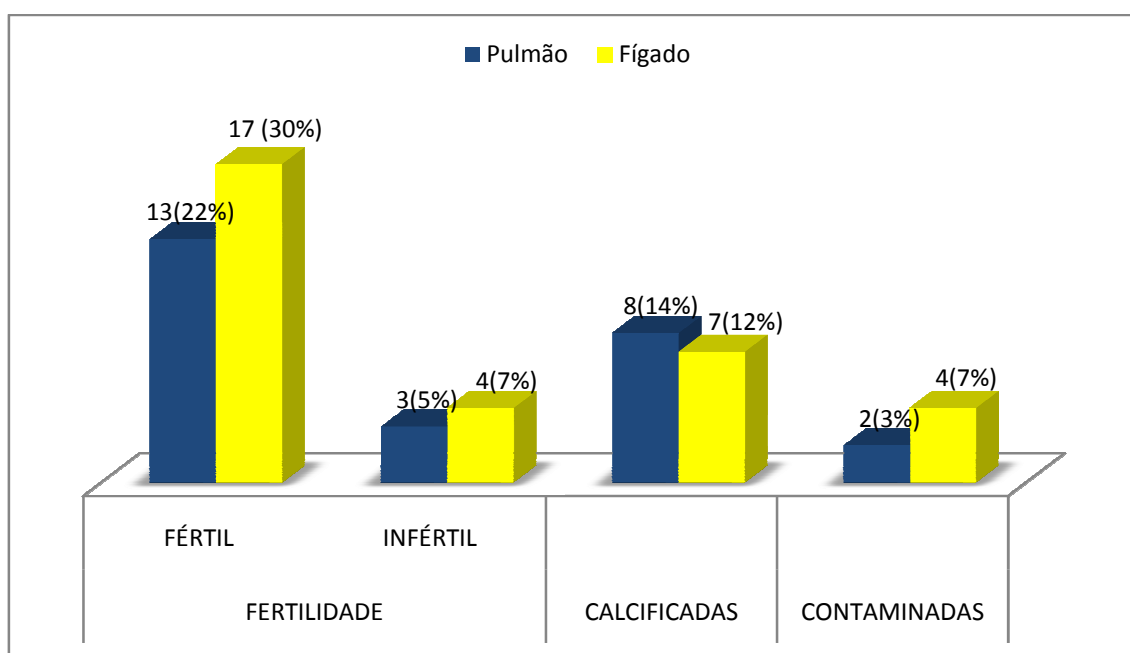
Ao efectuar as colheitas, viu-se que para além de apenas haver quistos em ovinos e bovinos, estes também estavam apenas distribuídos por dois órgãos, o fígado e os pulmões. Mas existem diferenças em termos de fertilidade, calcificação e contaminação tanto entre as espécies como nos órgãos parasitados, tal como é indicado na seguinte tabela:

**Tabela 8** - Distribuição das amostras obtidas por fertilidade, calcificação e contaminação por órgão, em cada espécie

	OVINO		BOVINO		TOTAL		
	Pulmão (%)	Fígado (%)	Pulmão (%)	Fígado (%)	Pulmão (%)	Fígado (%)	
FERTILIDADE	FÉRTIL	12 (52,2)	17 (56,7)	1 (33,3)	-	13 (50)	17 (53,1)
	INFÉRTIL	3 (13)	4 (13,3)	-	-	3 (11,5)	4 (12,5)
CALCIFICADAS	6 (26,1)	5 (16,7)	2 (66,7)	2 (100)	8 (30,8)	7 (21,9)	
CONTAMINADAS	2 (8,7)	4 (13,3)	-	-	2 (7,7)	4 (12,5)	
TOTAL	23	30	3	2	26	32	

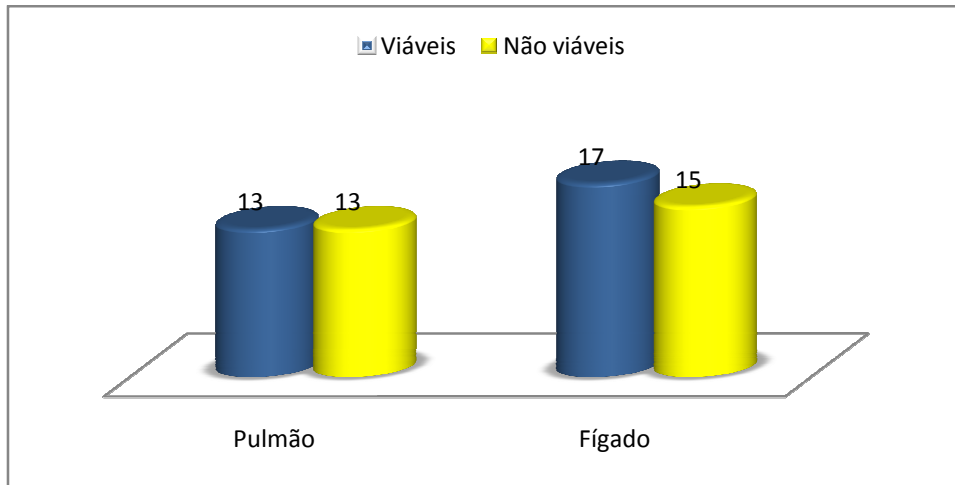
Nos ovinos, animais em que foram encontradas mais amostras de órgãos parasitados, 23 amostras de pulmões e 30 de fígado parasitados, foram encontradas 11 amostras calcificadas, sendo 6 nos pulmões e 5 no fígado e 6 amostras contaminadas sendo duas provenientes de pulmões e 4 de fígados. Em relação à fertilidade, apenas 7 amostras não eram férteis, sendo que 3 eram provenientes de pulmões e 4 de fígados, todas as outras amostras eram férteis, tendo-se encontrado 12 nos pulmões e 17 no fígado.

De bovinos, foram obtidas apenas 5 amostras parasitadas sendo que 3 eram provenientes de pulmões e 2 de fígado. Destas apenas uma era fértil e era proveniente de pulmões, as outras 4 amostras estavam calcificadas.



**Figura 16** – Distribuição das amostras por órgão

Como mostrado no gráfico anterior, a maior parte das amostras trabalhadas são férteis, tanto nos pulmões como no fígado, havendo poucas amostras inférteis, calcificadas e/ou contaminadas. As amostras inférteis, calcificadas e /ou contaminadas não eram viáveis para o estudo, logo foram rejeitadas, mas o número de amostras viáveis e não viáveis era muito semelhante (Figura 16).



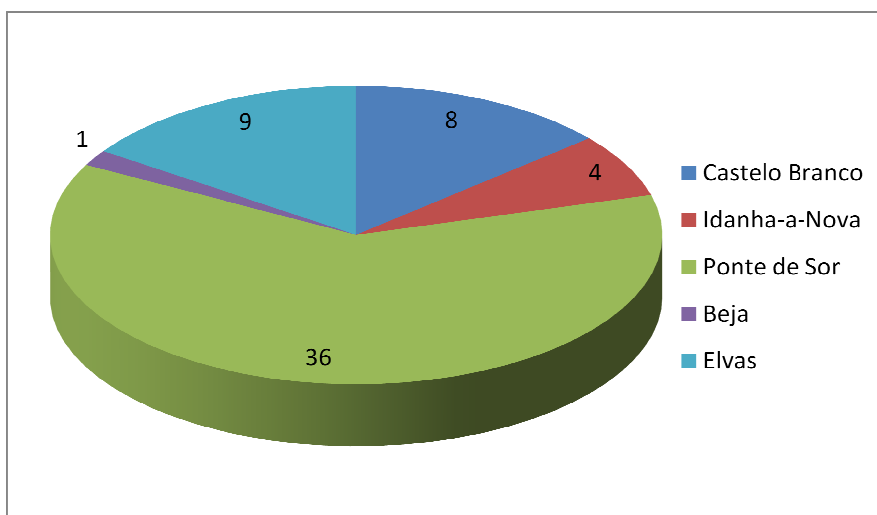
**Figura 17** - Viabilidade das amostras distribuídas por órgão

Em relação às amostras viáveis por órgão não há diferenças pois das amostras encontradas no pulmão, o número de amostras viáveis é igual ao de amostras não viáveis. Nas amostras de fígados o número de amostras viáveis (17) é ligeiramente superior ao de amostras não viáveis (15), mas a diferença é muito pequena (Figura 17).

As amostras trabalhadas eram provenientes de diferentes zonas tais como Beja, Castelo Branco, Elvas, Idanha-a-Nova e Ponte de Sor (Figura 18).



**Figura 18** - Mapa da procedência das amostras utilizadas para o estudo



**Figura 19** – Número de amostras proveniente de cada localidade

A grande maioria das amostras era procedente da zona de Ponte de Sor (Figura 19), seguindo-se Elvas, Castelo Branco, Idanha-a-Nova e Beja. A zona de Ponte de Sor é considerada como tendo diversos agrupamentos, ou seja, propriedades onde existem animais provenientes de diversos pequenos produtores, neste caso de procedência alentejana.

## 4.2 – Análise molecular das amostras parasitadas

### 4.2.1 – Amplificação da Região ITS-1

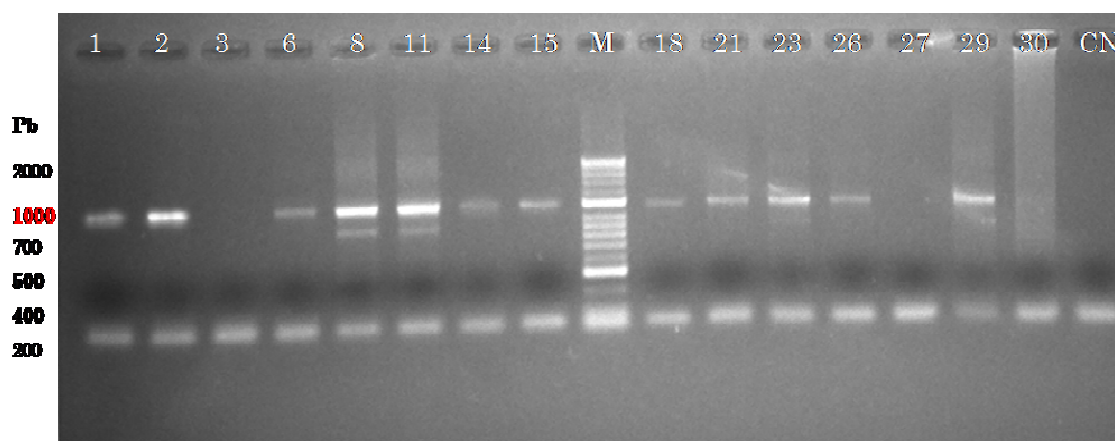
Para a realização da análise molecular das amostras parasitadas por *E.granulosus* foi estudada a região ITS-1, tendo sido feitas três amplificações diferentes.

#### **Amplificação ITS-1-PCR:**

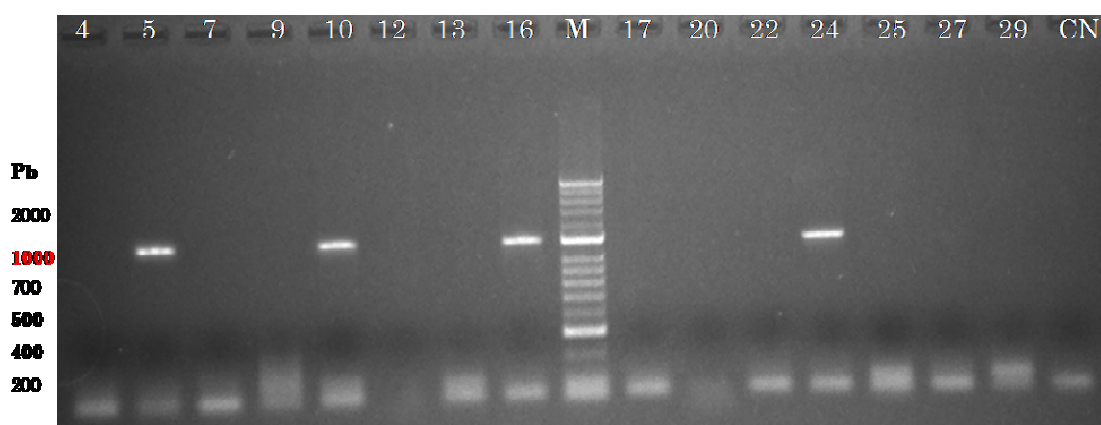
A partir das 30 amostras obtidas foi possível amplificar apenas 16 amostras e, destas apenas 11 foram submetidas à acção das enzimas de restrição. Após amplificação foram obtidos fragmentos com cerca de 1000 pb, sendo necessário, em alguns casos, proceder a uma variação do protocolo de PCR inicialmente definido. Assim, por exemplo, para maximizar as hipóteses de

amplificação recorreu-se, em algumas situações, ao aumento da quantidade de DNA utilizada passando de 5µl para 8µl ou 10µl.

A análise dos produtos amplificados revelou, em algumas amostras, a presença de um fragmento de DNA específico com o tamanho esperado, em alguns casos acompanhado por produtos de menores dimensões, resultantes de amplificações inespecíficas (Figura 20 e 21). A importância da presença destes fragmentos nas misturas de PCR não foi tida em consideração pois como estas amostras foram, posteriormente, submetidas à acção das enzimas de restrição não iria trazer problemas.



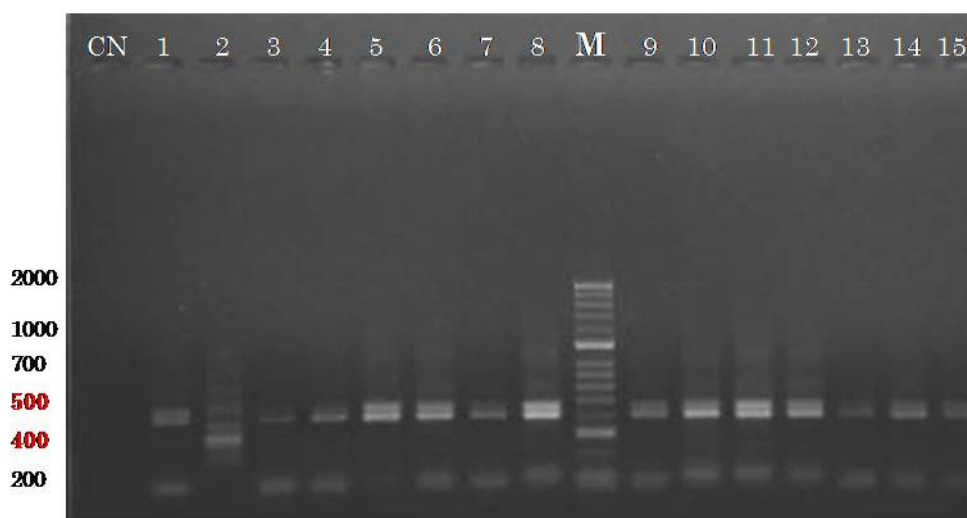
**Figura 20** – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (ITS-1-PCR) . (CN- Controlo Negativo; M-Marcador Molecular)



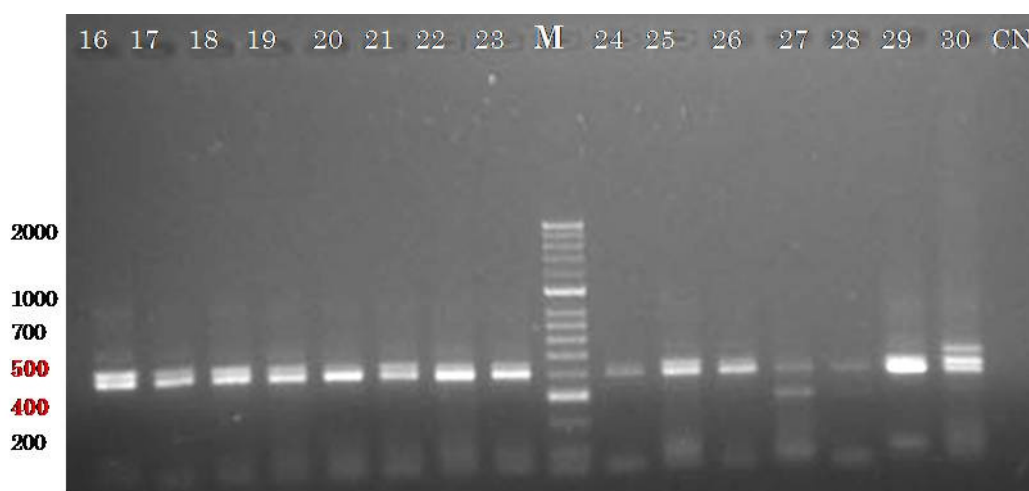
**Figura 21** – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (ITS-1-PCR) . Restantes amostras. (CN- Controlo Negativo; M-Marcador Molecular)

### Amplificação Eg16-PCR

Foram submetidas as 30 amostras, consideradas férteis após a observação microscópica, à amplificação pelos “primers” Eg16F e Eg16R, tendo amplificado uma zona da região ITS-1. Nesta região amplificada foram encontrados entre um a três fragmentos, com 400 a 500pb dependendo do isolado analisado (Figuras 22 e 23).



**Figura 22** – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (Eg16-PCR). (CN- Controlo Negativo; M-Marcador Molecular)

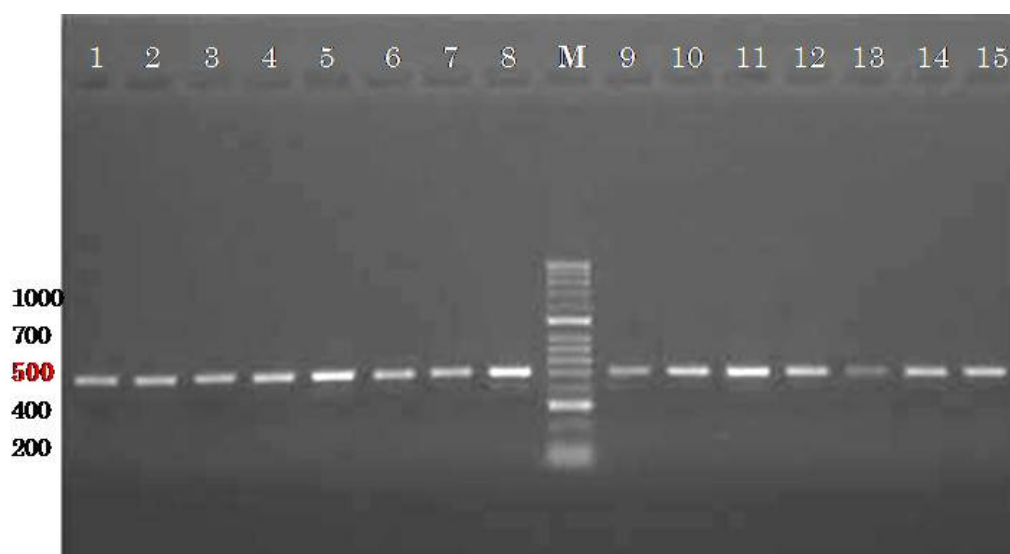


**Figura 23** – Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (Eg16-PCR). (CN- Controlo Negativo; M-Marcador Molecular)

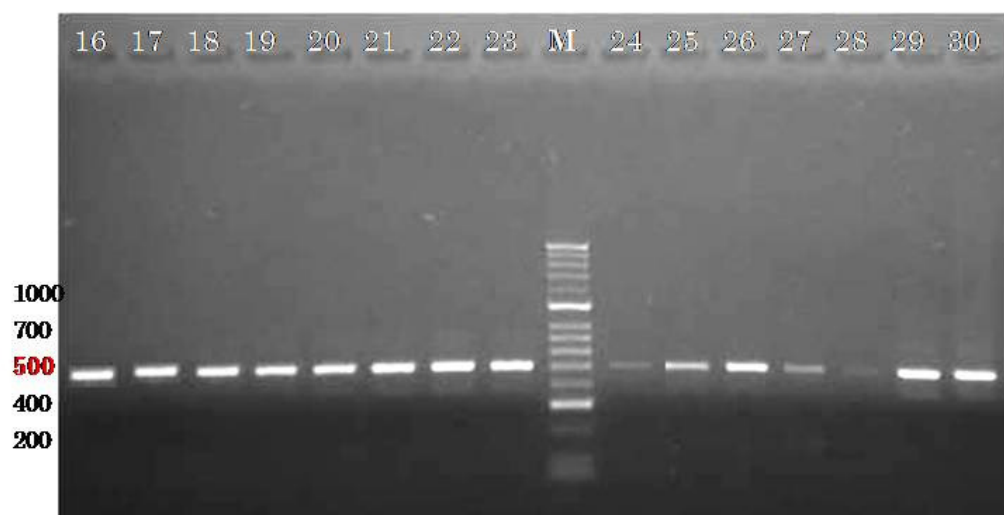
Nenhuma das amostras amplificadas pela Eg16-PCR foi submetida à acção das enzimas de restrição.

**Amplificação com Eg9-PCR:**

Das amostras recolhidas, 30 foram submetidas à amplificação através da Eg9-PCR, através dos “primers” específicos (Eg9F1 e Eg9R1), tendo amplificado uma zona da região ITS-1 e obtido um fragmento com cerca de 500 pb. Foram obtidos fragmentos de DNA com cerca de 500 pb (Figuras 24 e 25).



**Figura 24**– Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (Eg9-PCR). (CN- Controlo Negativo; M-Marcador Molecular)



**Figura 25**– Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS-1 (Eg9-PCR). (CN- Controlo Negativo; M-Marcador Molecular)

#### 4.2.2 – Aplicação de enzimas de restrição à região ITS-1

##### ITS-1-PCR:

Para avaliação do padrão de restrição, os fragmentos de cerca de 1000pb, incluídos na região ITS-1 obtidos por PCR, foram submetidos à acção de diversas enzimas de restrição (Bowles & McManus, 1993c; Ahmadi & Dalimi, 2006).

##### ✓ Rsa I

Ao aplicar a enzima de restrição Rsa I, foi obtido um padrão característico e idêntico em todas as amostras (Figura 26), tendo bandas com cerca de 700, 500, 200 e 100 pb.

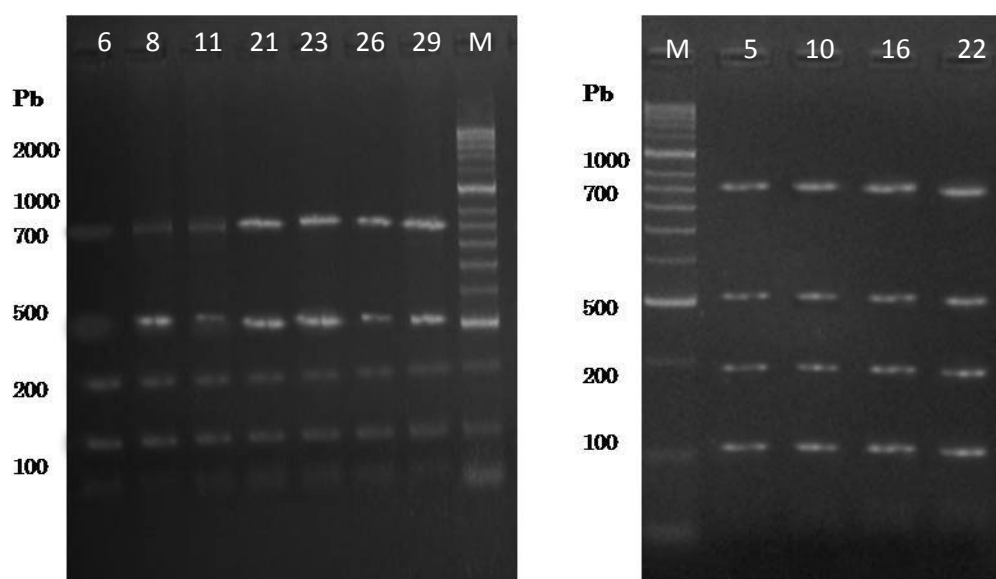
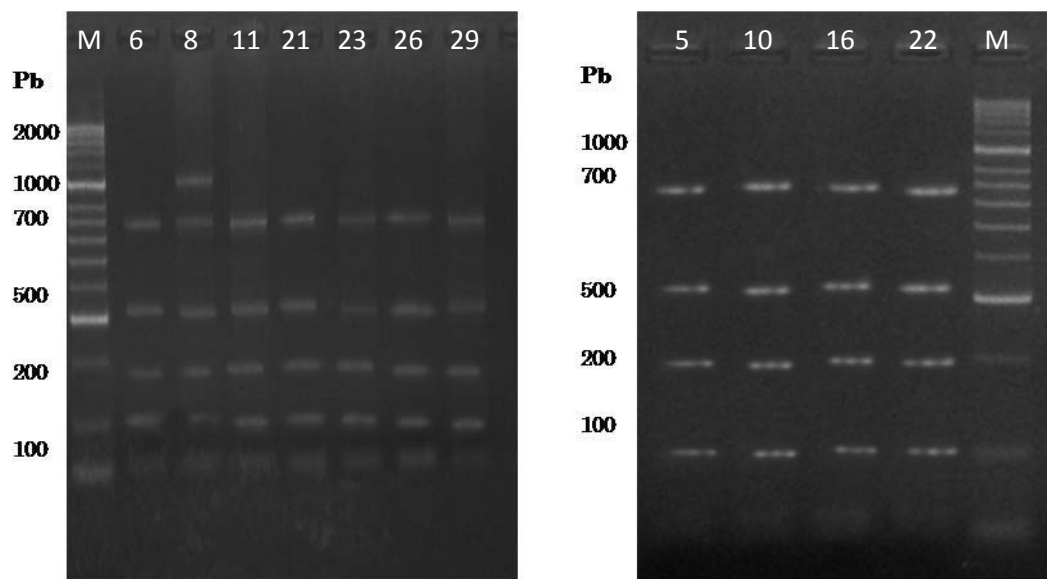


Figura 26 – Produtos ITS1-PCR digeridos com Rsa I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)

(M – Marcador Molecular)

##### ✓ MspI

Após a aplicação da enzima de restrição Msp I obtiveram-se padrões de digestão semelhantes na maior parte das amostras, apresentando cortes na região dos 700, 500, 200 e 100 pb, sendo que apenas uma amostra apresentava um fragmento de DNA com cerca de 1000pb (Figura 27).

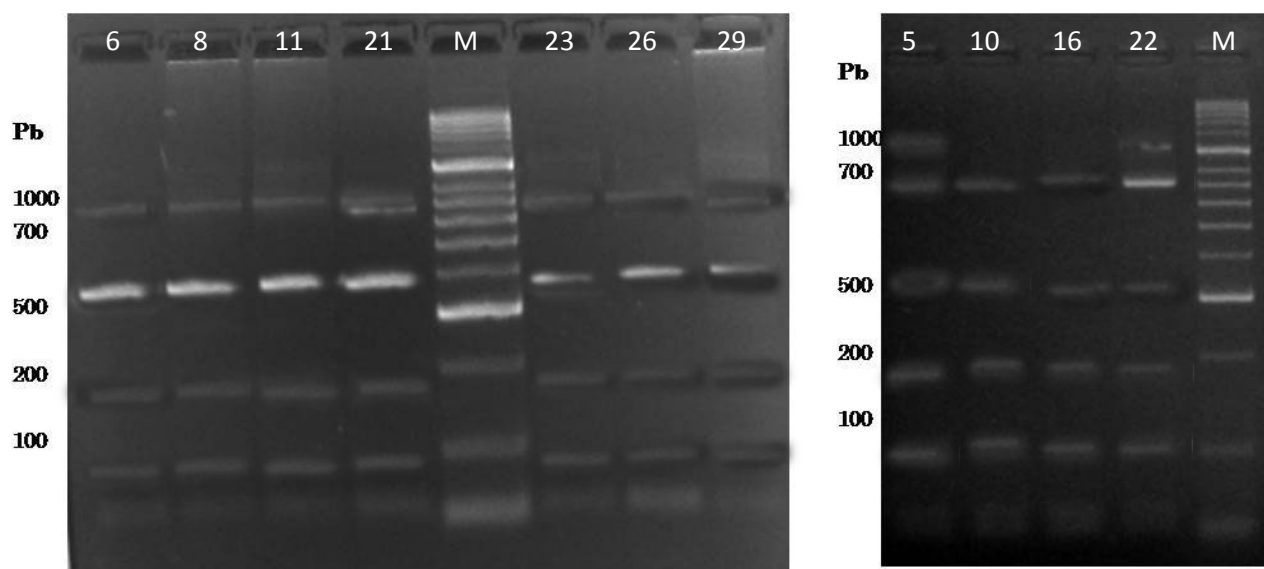


**Figura 27** – Produtos ITS1-PCR digeridos com Msp I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)

(M – Marcador Molecular)

✓ **Alu I**

Após aplicação da enzima Alu I foram obtidos padrões de digestão semelhantes em todas as amostras (700, 500, 200 e 100 pb) (Figura 28), existindo em algumas uma banda com cerca de 1000 pb, indicando que houve DNA que não foi digerido.



**Figura 28** – Produtos ITS1-PCR digeridos com Alu I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)

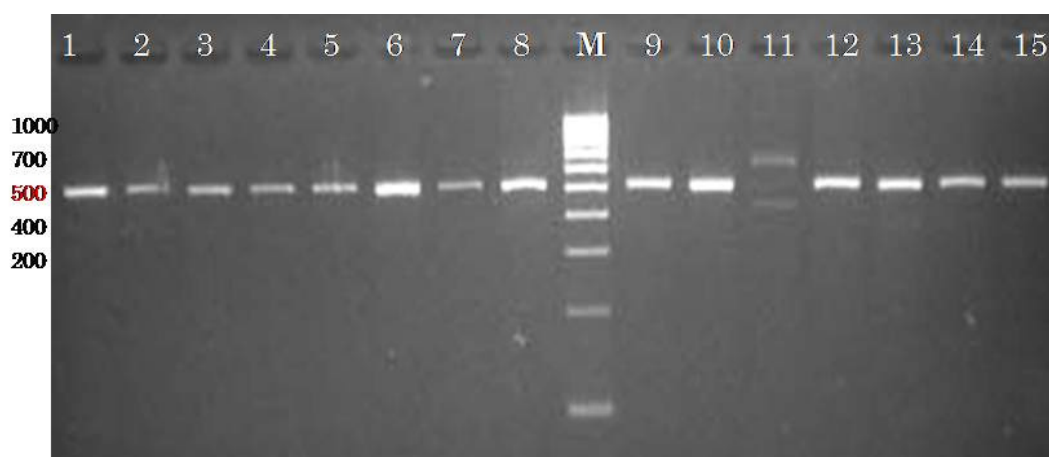
(M – Marcador Molecular)

Eg9-PCR:

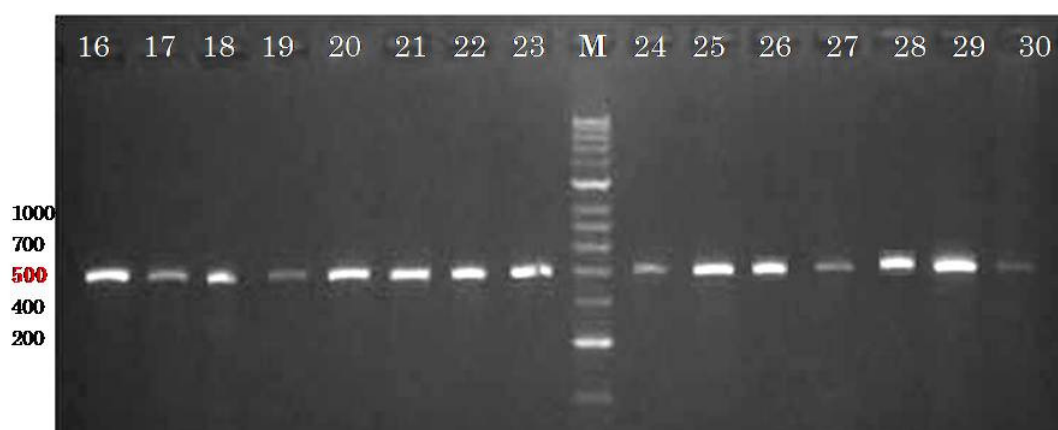
Para avaliação do padrão de restrição os fragmentos de cerca de 500 pb, incluídos na região ITS-1 obtidos por PCR, foram submetidos à acção de diversas enzimas de restrição (González et al., 2002).

✓ Cfo I

Ao aplicar a enzima Cfo I, às 30 amostras amplificadas, foi obtido um padrão semelhante na maior parte das enzimas, tendo uma banda com cerca de 500 pb, com excepção da amostra 11 onde se obtiveram duas bandas, uma com cerca de 700 pb e outra com cerca de 450 pb (Figura 29 e 30). Com esta enzima apenas se observou corte numa das amostras.



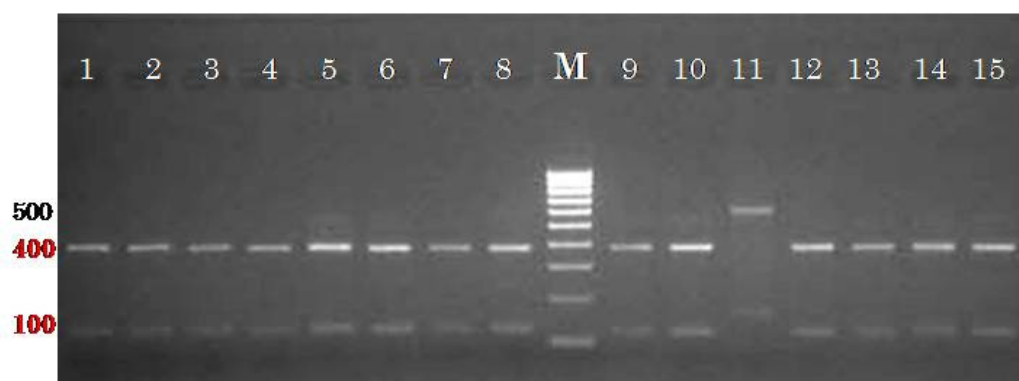
**Figura 29** – Produtos Eg9-PCR digeridos com Cfo I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)  
(M – Marcador Molecular)



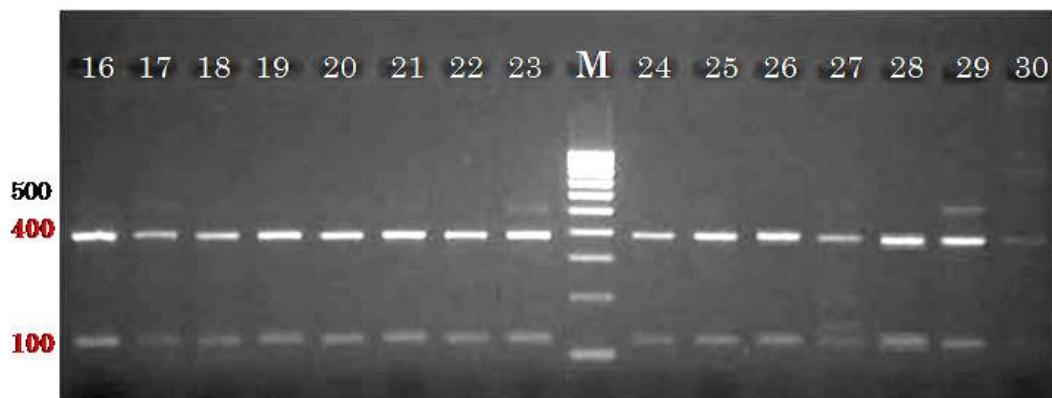
**Figura 30** – Produtos Eg9-PCR digeridos com Cfo I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%)  
(M – Marcador Molecular)

✓ **Rsa I**

Ao aplicar a enzima Rsa I, às 30 amostras amplificadas, foi obtido um padrão semelhante na maior parte das enzimas, tendo duas bandas com cerca de 400 e 100pb, respectivamente (Figura 31 e 32). Na amostra 11 foram duas bandas, uma com cerca de 500pb e outra com cerca de 150pb. Em diversas amostras foi observada uma ténue banda na região dos 500pb.



**Figura 31 – Produtos Eg9-PCR digeridos com Rsa I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%) (M – Marcador Molecular)**

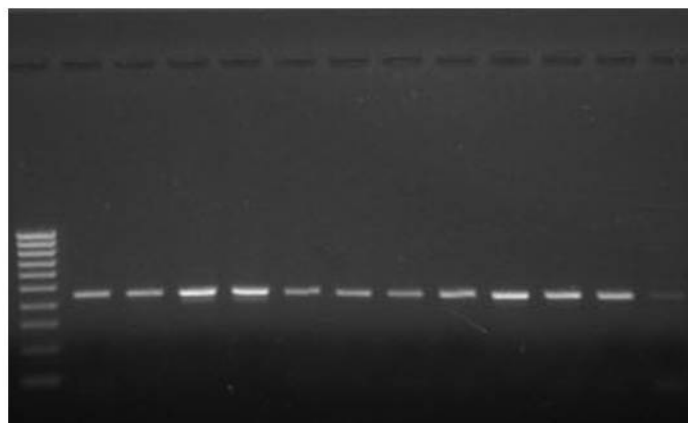


**Figura 32 – Produtos Eg9-PCR digeridos com Rsa I (Electroforese em gel de agarose a 2,5%) (M – Marcador Molecular)**

#### 4.2.3 – Sequenciação das amostras amplificadas

Para a sequenciação das amostras foi amplificado o gene citocromo c oxidase sub-unidade 1 (COI), usando para tal os “primers” JB3 e JB4.5 (Figura 33). Foram amplificadas com estes

“primers” algumas amostras que suscitaram dúvidas na genotipagem por PCR-RFLP para a região ITS-1 (Tabela 9), obtendo um fragmento com cerca de 400pb.



**Figura 33** - Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR do gene COI (M-Marcador Molecular)

**Tabela 9** – Caracterização sumária das amostras que foram amplificadas para o gene COI e enviadas para sequenciação

	Hospedeiro	Órgão	Localidade
Amostra 1 (Amostra 1)	Ovino	Pulmão	Ponte de Sor
Amostra 2 (Amostra 2)	Ovino	Pulmão	Ponte de Sor
Amostra 27 (Amostra 3)	Bovino	Pulmão	Castelo Branco
Amostra 18 (Amostra 4)	Ovino	Fígado	Elvas
Amostra 26 (Amostra 5)	Ovino	Pulmão	Castelo Branco
Amostra 15 (Amostra 6)	Ovino	Fígado	Idanha-a-Nova
Amostra 8 (Amostra 7)	Ovino	Fígado	Ponte de Sor

**Nota:** Não são apresentados dados da amostra 8 (Amostra 7) pois não foi obtida uma boa sequenciação

As amostras que foram amplificadas com os “primers” acima referidos foram mandadas sequenciar na empresa STABVIDA. As sequências obtidas das diferentes amostras foram alinhadas manualmente e agrupadas nas diferentes localidades de onde eram provenientes para se proceder à análise dos dados (Figura 34).

Amostra1	GT	TTG	AGT	ATT	AGT	GCT	AAT	TTT	GAT	GCG	TTT	GGG	TTC	TAT	GGG	TTG	T
Amostra2	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra3	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra4	..	A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	...	...	.
Amostra5	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra6	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra1	TG	TTT	GCT	ATG	TTT	TCT	ATA	GTG	TGT	TTG	GGT	AGC	AGG	GTT	TGG	GGT	C
Amostra2	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra3	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra4	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra5	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra6	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra1	AT	CAT	ATG	TTT	ACT	GTT	GGG	TTG	GAT	GTG	AAG	ACG	GCT	GTT	TTT	TTT	A
Amostra2	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra3	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra4	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra5	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra6	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra1	GC	TCT	GTT	ACT	ATG	ATT	ATA	GGG	GTT	CCT	ACT	GGT	ATA	AAG	GTG	TTT	A
Amostra2	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra3	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra4	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra5	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra6	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra1	CT	TGG	TTA	TAT	ATG	TTG	TTG	AAT	TCG	AGT	GTT	AAT	GTT	AGT	GAT	CCG	G
Amostra2	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra3	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra4	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G	...	...	...	.
Amostra5	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra6	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra1	TT	TTG	TGA	TGG	GTT	GTT	TCT	TTT	ATA	GTG	TTG	TTT	ACG	TTT	GGG	GGA	G
Amostra2	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra3	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra4	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra5	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra6	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra1	TT	ACG	GGT	ATA	GTT	TTG	TCT	GCT	TGT	GTG	TTA	GAT	AAT	ATT	TTG	CAT	G
Amostra2	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra3	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A	T	...	...	.
Amostra4	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra5	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra6	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
Amostra1	AT	ACT	TGG	TTT	GT												
Amostra2	..	...	...	...	..												
Amostra3	..	...	...	...	..												
Amostra4	..	...	...	...	..												
Amostra5	..	...	...	...	..												
Amostra6	..	...	...	...	..												

Figura 34 – Alinhamento dos nucleótidos do COI de *Echinococcus granulosus* recolhidos em Portugal

As sequências analisadas apresentaram três háplotipos diferentes, tendo sido classificados em Hap1, Hap2 e Hap3 (Tabela 10 e Figura 35). A distribuição e frequência relativas dos háplotipos encontrados em cada localidade estão descritas na Tabela 8.



**Figura 35** – Distribuição dos háplotipos pelas localidades de procedência das amostras

**Tabela 10** – Distribuição e frequências relativas dos háplotipos nas localidades de onde as amostras eram provenientes

<b>Ponte Sôr</b>	<b>Castelo Branco</b>	<b>Outras</b>
Hap1 (1,0)	Hap1 (0,5)	Hap1 (0,5)
	Hap2 (0,5)	Hap3 (0,5)

Na Tabela 11 estão descritos os háplotipos encontrados nas diferentes localidades de proveniência das amostras, a média do número de nucleótidos diferentes (K), a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e a diversidade háplotípica (Hd).

**Tabela 11** – Índices de polimorfismos do gene COI nas diferentes localidades analisadas

<b>Localidades</b>	<b>Haplótipo</b>	<b>K</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>Hd</b>
<b>Ponte Sôr</b>	Hap1	-	-	-
<b>Castelo Branco</b>	Hap1; Hap2	2	0,00573	1,000
<b>Outras</b>	Hap1; Hap3	3	0,00860	1,000
<b>Total</b>	3	1,66667	0,00478	0,600

O cálculo da diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) para as três localidades apresentou um baixo nível de polimorfismo,  $\pi=0,00478$ . A diversidade haplotípica foi de 0,600 para o conjunto das localidades, sendo que em Ponte de Sor não houve qualquer diversidade haplotípica.

As sequências obtidas para as amostras portuguesas foram alinhadas em conjunto com sequências homólogas que se encontram disponíveis na base de dados (GenBank: AY679145) e identificadas como pertencentes ao genótipo G1 (estirpe da Ovelha). Foi seleccionada a que apresentava maior homologia com as amostras portuguesas (Figura 36) e ao analisar o conjunto foram encontradas algumas diferenças nucleotídicas entre a estirpe de referência e as obtidas em Portugal. Havia alterações de nucleótidos comuns a todas as amostras portuguesas (C200T) e outras apenas encontradas numa ou noutra amostra.

				10				20				30				40			50
EgTunísia	G	TTT	GAG	TAT	TAG	TGC	TAA	TTT	TGA	TGC	GTT	TGG	GTT	CTA	TGG	GTT	GT		
Amostra1	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra2	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra3	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra4	-	...	A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	...	...	...	...
Amostra5	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra6	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
				60				70				80				90			
EgTunísia	T	GTT	TGC	TAT	GTT	TTC	TAT	AGT	GTG	TTT	GGG	TAG	CAG	GGT	TTG	GGG	TC		
Amostra1	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra2	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra3	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra4	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra5	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra6	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
				100				110				120				130			140
EgTunísia	A	TCA	TAT	GTT	TAC	TGT	TGG	GTT	GGA	TGT	GAA	GAC	GGC	TGT	TTT	TTT	TA		
Amostra1	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra2	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra3	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra4	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra5	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra6	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
				150				160				170				180			190
EgTunísia	G	CTC	TGT	TAC	TAT	GAT	TAT	AGG	GGT	TCC	TAC	TGG	TAT	AAA	GGT	GTT	TA		
Amostra1	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra2	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra3	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra4	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra5	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra6	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
				200				210				220				230			240
EgTunísia	C	TTG	GCT	ATA	TAT	GTT	GTT	GAA	TTC	GAG	TGT	TAA	TGT	TAG	TGA	TCC	GG		
Amostra1	-	...	T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra2	-	...	T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra3	-	...	T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra4	-	...	T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra5	-	...	T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra6	-	...	T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
				250				260				270				280			290
EgTunísia	T	TTT	GTG	ATG	GGT	TGT	TTC	TTT	TAT	AGT	GTT	GTT	TAC	GTT	TGG	GGG	AG		
Amostra1	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra2	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra3	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra4	-	...	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra5	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra6	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
				300				310				320				330			
EgTunísia	T	TAC	GGG	TAT	AGT	TTT	GTC	TGC	TTG	TGT	GTT	GAT	AAT	ATT	TTG	CAT	GA		
Amostra1	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra2	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra3	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra4	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra5	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra6	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
				340				350											
EgTurquia	T	ACT	TGG	TTT	GT														
Amostra1	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra2	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra3	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra4	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra5	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Amostra6	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Figura 36 – Comparação das sequências obtidas com uma sequência contida no banco de dados(GenBank: AY679145)

## Capítulo V - Discussão

A extensa variação na formação do complexo de espécies *E.granulosus* pode influenciar os padrões do ciclo de vida, especificidade do hospedeiro, taxa de desenvolvimento, antigenicidade, dinâmicas de transmissão, sensibilidade aos agentes quimioterapêuticos e patologia (Utuk, et al., 2008).

## 5.1 - Análise das amostras parasitadas

No universo de amostras do presente estudo, as mais fáceis de obter foram as de ovinos e, ainda, algumas de bovinos, podendo explicar-se esta situação devido ao facto da existência de um maior número destas reses nas quintas, em relação a outras espécies e, por outro lado, devido ao método de criação (mediante o pastoreio com cães de guarda, no caso dos ovinos, em sistemas de criação extensivos ou semi-extensivos, no caso tanto dos ovinos como dos bovinos. Em ambos os sistemas, o contacto do animal com os ovos do parasita é relativamente fácil, dado que ao alimentar-se estas espécies cortam o pasto muito próximo da base, o que faz com que a probabilidade de ingerir ovos presentes no solo seja maior. Por outro lado, circulando livremente pelos campos de pastoreio poderão ingerir directamente a erva dos solos que estejam contaminados com os ovos do parasita.

As amostras foram todas recolhidas num matadouro na Beira Interior, no Concelho de Castelo Branco (Alcains), mas eram provenientes de diferentes zonas do país desde Baixo Alentejo até à Beira Interior. A grande maioria das amostras era proveniente de um agrupamento que recebe animais provenientes do Alto Alentejo, ou seja, na sua maioria as amostras estudadas têm a sua proveniência do Alentejo, zona considerada endémica para a hidatidose (David de Moraes, 1998).

Os dados obtidos no presente estudo indicam, para as amostras de ovinos, uma maior incidência no fígado (56,6% do total de quistos) do que no pulmão (43,4%). Não foram encontradas grandes diferenças, em termos percentuais, entre os quistos férteis numa ou noutra localização

(56,7% para os quistos hepáticos e 52% para os quistos pulmonares), o que nos induz a pensar que as condições fisiológicas e mecânicas de cada órgão não influenciam no desenvolvimento completo do quisto (entendido como formação de protoescólices, o que permitiria continuar o ciclo no hospedeiro definitivo). Estes resultados estão de acordo com alguns dos publicados em Espanha (Ponce Gordo, 1995), referentes a regiões bastante próximas da região onde as amostras foram recolhidas.

No que diz respeito aos dados provenientes de amostras de bovinos, é de realçar o facto de haver um número muito pequeno de quistos viáveis, mas temos que ter em conta que as amostras analisadas foram também em número muito pequeno. Foram obtidos dados similares em Espanha (Llamazares *et al*, 1997 e Ponce Gordo, 1995) demonstrando a baixa viabilidade dos quistos de bovinos ali existentes, contrastando com resultados apresentados no Chile por Muñoz & Sievers (2005) que referem a presença de quistos férteis em cerca de 39% dos bovinos adultos. Em relação às amostras portuguesas obtidas não está clarificado o porquê da sua baixa viabilidade e fertilidade, mas poderá ser devida à acção que o sistema imune do hospedeiro exerce sobre o parasita, impedindo o seu desenvolvimento e podendo levar à morte do mesmo, daí os quistos encontrados serem de pequenas dimensões. Em todas as amostras encontradas a membrana germinativa apresentava-se amarelada e com fragmentos calcificados que se desfaziam ao tentar extraí-la, podendo este facto estar associado à administração de medicação de largo espectro aos animais, devido ao seu valor económico individual, que poderá levar a um efeito secundário sobre os quistos hidáticos, conduzindo à destruição da membrana germinativa (Ponce Gordo, 1995), facto que não pode ser comprovado neste trabalho.

Também convém destacar que há uma maior incidência de quistos no pulmão (55% do total de quistos) a qual é invertida quando se fala em quistos férteis, pois 57% do total de quistos férteis são encontrados no fígado. Estes resultados são coincidentes com os encontrados, na década de 90,

em Espanha, onde a diferença na incidência de quistos nos pulmões e fígado não era muito diferente da obtida neste trabalho (Ponce Gordo, 1995).

Não são apresentadas amostras obtidas em caprinos pois estes animais alimentam-se com maior frequência de folhagem em ramos de arbustos e outras pequenas árvores tendo, portanto, menor probabilidade de contaminação que as outras espécies. Por outro lado, não é costume sacrificar cabras com idade suficiente para que possam ter desenvolvido quistos hidáticos (Ponce Gordo, 1995).

No que diz respeito à não obtenção de amostras de suínos este acontecimento prende-se com o tipo de exploração onde estes animais crescem: costuma ser em quintas com criação intensiva, onde estes se desenvolvem longe dos cães e das pastagens, sendo alimentados por rações, tendo o contacto com os ovos do parasita muito limitado. Os animais que se desenvolvem em regime extensivo ou semi-intensivo são os que apresentam maior probabilidade de contaminação, contudo são em número inferior aos anteriores.

Em relação a outros animais que possam estar parasitados, como cavalos e javalis, em Portugal não há dados referentes aos mesmos, sendo difícil a obtenção de amostras no espaço de tempo reservado ao presente estudo.

## 5.2 - Análise molecular das amostras parasitadas

Uma identificação definitiva dos génotipos de *E. granulosus* implica o uso e a combinação de diversas técnicas para caracterização do DNA. Ao longo dos últimos anos diversos elementos de literatura têm sido publicados utilizando estudos moleculares para discriminar as estirpes/genótipos de *E. granulosus* (McManus, 2006; Craig *et al.*, 2007 e Utuk *et al.*, 2008). O uso da PCR-RFLP e a sequenciação de fragmentos do gene mitocondrial CO1 dá informação credível acerca da

identificação e variabilidade intra-específica do parasita *E. granulosus* (McManus, 2002). Até à actualidade vários estudos foram realizados com o recurso à caracterização molecular de isolados de *E. granulosus* recorrendo a PCR-RFLP em locais como México (Maravilla *et al.*, 2004 e Villalobos *et al.*, 2007), Sardinia (Varcasia *et al.*, 2006), Irão (Harandi *et al.*, 2002 e Ahmadi & Dalimi, 2006), Tunisia (M'rad *et al.*, 2005), Argentina (Rosenvitz *et al.*, 1999), Australia (Gasser & Chilton, 1995), Turquia (Utuk *et al.*, 2008) e Eslováquia (Snábel *et al.*, 2000), entre outros. Bowles e McManus (1993) examinaram mais de uma centena de isolados provenientes de diversos hospedeiros intermediários usando a PCR-RFLP da região ribossomal ITS-1 que lhes permitiram visualizar diferentes estirpes de ovelhas, camelos, cavalos, vacas e porcos. Apesar dos diferentes hospedeiros e localizações geográficas todos os isolados da “estirpe da ovelha” apresentaram um padrão para a PCR-RFLP idêntico. Neste estudo foram descritos também “primers” para amplificar a região ITS-1 que são usados até à actualidade.

### **5.2.1 – Amplificação da Região ITS-1**

A região ITS-1, pertencente ao DNA ribossómico já foi alvo de diferentes estudos por parte de investigadores que pretendiam genotipar a espécie *E. granulosus*, tal como foi referido anteriormente, tendo estes investigadores aplicado diferentes técnicas, tais como PCR-RFLP, sequenciação, PCR-SSCP, entre outras (Dinkel *et al.*, 2004). Para tal, e usando vários tipos de PCR com diferentes “primers” estudou-se esta zona do genoma do parasita.

#### **Amplificação ITS-1-PCR:**

Na primeira PCR aplicada, os “primers” usados foram descritos por Bowles & McManus (1993b) e já foram feitos diversos trabalhos no sentido de amplificar esta região genómica, obtendo um fragmento amplificado com cerca de 1000 pb (Bart *et al.*, 2004). Nesta PCR foi necessário fazer

algumas alterações, pois como ela está descrita na literatura não foi possível conseguir amplificação com as amostras portuguesas. Após alteração da temperatura de “annealing” e das quantidades de “primers” e amostra utilizados foi possível amplificar apenas 16 das 30 amostras, ou seja, ainda será necessário modificar algumas condições na PCR para que todas as amostras possam ser amplificadas com estes “primers”. Poderão existir algumas explicações para a não amplificação de determinadas amostras como por exemplo a presença de uma mutação frequente, nas amostras em estudo, na zona de ligação dos “primers”, ou ainda a quantidade de DNA utilizada não ser suficiente ou nem ser suficientemente puro para que haja a amplificação. Também se sabe que estas técnicas de biologia molecular são bastantes sensíveis à acção de certos inibidores pelo que poderia ter havido algum inibidor a interferir com algumas das amostras.

As amostras que amplificaram apresentaram um produto de amplificação com cerca de 1000pb tal como foi descrito por Bowles *et al.*, (1995), Hewerden *et al.*, (2000) e Bhattacharya *et al* (2008), tendo estes investigadores usado amostras provenientes de diversas regiões geograficamente distintas.

Segundo Villalobos *et al* (2007) as amostras ao serem amplificadas com os “primers” 4S e BD1 poderiam apresentar padrões específicos para as estirpes G1 (dois produtos de amplificação com 900 e 1000pb) e G7 (dois produtos de amplificação com 1000 e 1100pb), facto que nas amostras trabalhadas não se verificou, pois apenas três amostras apresentavam dois produtos de amplificação visíveis (Amostras 8, 11 e 23) e todas as outras amostras que mostraram apenas um produto de amplificação. Mais uma vez este facto pode ser devido a menor eficiência desta PCR, pelos mesmos motivos que foram mencionados anteriormente.

Utuk *et al.* (2008), com os mesmos “primers”, conseguiram amplificar a região ITS-1, com amostras provenientes da Turquia, tendo obtido dois produtos de amplificação, contrariamente ao obtido no presente estudo, embora todas as condições para a realização da PCR tivessem sido idênticas às utilizadas com as amostras portuguesas. Assim, torna-se necessário alterar algumas

condições de forma a conseguir uma melhor amplificação com as amostras obtidas em Portugal e, também, alargar a zona de colheita de amostras para posterior aplicação dos mesmos “primers” e verificar se é mantido o problema ou se apenas com estas amostras houve dificuldade na amplificação. Possivelmente, para a resolução mais concreta deste problema, o ideal seria sequenciar esta região ITS-1 para as amostras trabalhadas e desenhar, a partir da mesma sequenciação, novos “primers” e experimentá-los com as amostras que não amplificaram.

A amplificação desta região por si só, e, usando estes “primers”, não permite uma caracterização genética suficiente para determinar qual a estirpe de *E. granulosus* nas amostras em questão. Assim será necessária a aplicação de outras técnicas em conjunto com esta para essa caracterização, tal como a RFLP, para obter aquela caracterização.

### **Amplificação Eg16-PCR:**

No presente estudo recorreu-se aos “primers” e condições de PCR descritas por González *et al.* (2002), em amostras provenientes de Espanha, onde foram amplificados entre um a três fragmentos com tamanho compreendido entre 400 e 500pb da região ITS-1, no caso de se tratar de *E. granulosus* estirpe da ovelha e estirpe do porco. Caso alguma amostra seja de *E. multilocularis* apenas amplificaria um fragmento com cerca de 450pb, tal como se for uma amostra da estirpe do cavalo. Assim, pode-se dizer que este protocolo foi desenvolvido para se poder distinguir entre *E. granulosus* e *E. multilocularis*, tendo já sido aplicado por diversos investigadores como Manterola *et al.* (2006), Sobrino *et al.* (2006) e Manterola *et al.* (2008) e experimentado por nós neste estudo.

As condições da PCR utilizada foram idênticas às que os autores inicialmente preconizaram tendo apenas sido necessário acertar a concentração de “primers” ideal e a quantidade de amostra usada. Os resultados obtidos foram aceitáveis e muito favoráveis aos objectivos propostos. Efectivamente, nas 30 amostras estudadas foram obtidos fragmentos amplificados em todas elas,

podendo-se referir que esta PCR apresentava 100% de sensibilidade. Mas, foram obtidos fragmentos com diferentes tamanhos e diferente número de fragmentos por amostra, variando desde um a cinco diferentes por amostra. Com excepção das amostras 2 e 27 todas as outras apresentam um padrão de amplificação coincidente com o previsto para *E.granulosus*, segundo os resultados referidos por González et al (2002), ou seja, todas apresentam entre um a três fragmentos amplificados na zona correspondente entre 400-500pb. A amostra 2 tem um padrão diferente, pois apresenta um fragmento com maior concentração na região dos 400pb e depois outros com tamanho superior. A amostra 27, única de bovino, apresenta um fragmento amplificado com cerca de 500pb e outro que se encontra ligeiramente inferior aos 400pb.

Assim, os dados obtidos são concordantes com os publicados por investigadores que utilizaram estes mesmos marcadores em Espanha, país limítrofe com Portugal e com o qual se mantém importação e exportação de animais.

Esta PCR não pode distinguir entre as estirpes da ovelha e do porco, logo as amostras que amplificaram um a três fragmentos entre 400-500pb não nos indicam a estirpe que infectou essas amostras. Assim é necessária a aplicação de outra técnica para dar um resultado mais concreto da caracterização genética destas amostras. Por isso estas amostras foram sujeitas a enzimas de restrição para uma melhor análise.

Segundo o padrão de amplificação obtido não se encontra nas nossas amostras nenhuma de *E.multilocularis*, porém só com o uso de outras técnicas se poderia ter uma confirmação.

### **Amplificação com Eg9-PCR:**

Para a aplicação desta PCR foram usados os “primers” Eg9F e EG9R descritos por González *et al.* (2002), que amplificaram um fragmento, não repetitivo, com cerca de 500pb da região ITS-1. Este procedimento de PCR tem sido usado por outros investigadores e em amostras de outras regiões geograficamente distintas do mundo, tendo estes obtidos resultados concordantes (Sobrinho *et al.*, 2006 e Manterola *et al.*, 2008).

No presente trabalho as condições de PCR descritas por González *et al.* (2002), foram mantidas, com excepção da concentração de “primers” e amostra utilizada pois as amostras não continham todas a mesma quantidade de material genético do parasita, então foi necessário encontrar um valor que pudesse ser padronizado para todas as amostras.

Foram sujeitas à amplificação com estes “primers” 30 amostras provenientes de diferentes regiões do país havendo amplificação específica em todas elas, tendo sido amplificado um fragmento com cerca de 500pb em todas elas. Os resultados obtidos estão de acordo com os mencionados por alguns investigadores em outras regiões do mundo.

Esta PCR não permite distinguir as diferentes estirpes de *E.granulosus* existentes pelo que será necessário a aplicação de enzimas de restrição para ver se há diferenças genómicas que possam ser determinadas pela acção destas enzimas.

### **5.2.2 – Aplicação de enzimas de restrição à região ITS-1**

#### **ITS-1-PCR:**

Das 16 amostras que amplificaram com estes “primers” apenas 12 foram submetidas à acção das enzimas de restrição, pois havia amostras que apresentavam uma amplificação muito fraca e que não era viável para a aplicação das enzimas de restrição. Foram usadas apenas três enzimas de

restrição (Alu I, MspI e Rsa I) (Bowles & McManus, 1993b). Devido às dificuldades técnicas existentes na amplificação não foi possível aplicar outras.

✓ **Rsa I**

Em grande parte das amostras observou-se o mesmo padrão de corte, apresentando quatro fragmentos com diferentes pesos moleculares, uns que tinham uma maior expressão que outros dependendo da quantidade de DNA amplificado em cada amostra. Em diversas amostras verificava-se que faltavam alguns fragmentos, mas ao comparar com os resultados já publicados, estes também nem sempre são concordantes mesmo quando se trata da mesma estirpe pode haver o aparecimento ou não de certas bandas (Harandi *et al.*, 2002 e Utuk *et al.*, 2008). Mas em termos gerais os perfis apresentados correspondem à estirpe G1 (estirpe da ovelha). Contudo, há autores que dizem que a obtenção destes perfis é idêntica quando se trata de estirpe G1 ou estirpe G2, logo o uso desta enzima de restrição não nos permite identificar um genótipo em concreto (Rosenvitz *et al.*, 1999). Assim será necessário utilizar outras enzimas para uma possível identificação do genótipo das amostras.

✓ **MspI**

Ao aplicar a enzima Msp I, cada amostra apresentava três fragmentos perfeitamente distintos, sendo este padrão repetido em todas as amostras utilizadas. Numa amostra havia uma banda com cerca de 1000pb que poderia ser o DNA que não foi cortado pela enzima de restrição. Este facto pode ter ocorrido devido a alguns factores, como por exemplo: na região em que a enzima de restrição iria cortar poderia haver uma mutação e, por conseguinte, já não haver o corte por parte da enzima.

Ao obter um padrão idêntico em todas as amostras significa que o uso de apenas esta enzima não permite identificar o genótipo de *E.granulosus* que parasitava cada amostra ou então que todas as amostras estavam parasitadas pelo mesmo genótipo. Para uma melhor compreensão da utilidade

desta enzima de restrição e qual o seu comportamento no genoma das diversas estirpes de *E.granulosus* seria necessário submeterem-se à acção desta enzima as diferentes estirpes do parasita, tal como foi feito por diferentes autores Bowles & McManus (1993), Rosenvitz *et al.* (1999), M'rad *et al.* (2005), Utuk *et al.* (2008) e Bhattacharya *et al.* (2008), entre outros.

✓ **Alu I**

Ao adicionar a enzima Alu I à mistura de reacção houve o aparecimento de três fragmentos com diferentes tamanhos e facilmente distinguíveis. Segundo os autores Ahmadi & Dalimi (2006), os padrões seriam todos idênticos com excepção da estirpe do camelo (G6) que apresentava uma banda extra com cerca de 190pb. Assim, como neste trabalho foram observados padrões apenas com três fragmentos não existirá a estirpe do camelo nas amostras estudadas. Em algumas amostras aparecia um fragmento extra com cerca de 1000pb que poderia ser DNA do parasita que não sofreu a acção da enzima Msp I.

**Eg9-PCR:**

Foram aplicadas apenas duas enzimas de restrição (Cfo I e Rsa I) a esta PCR, pois segundo a literatura estas são as enzimas que podem produzir padrões diferentes perante as distintas estirpes que pertencem à espécie *E.granulosus* (González *et al.*, 2002).

✓ **Cfo I**

Ao adicionar a enzima Cfo I às amostras em análise, segundo González *et al.* (2002), consegue-se distinguir entre *E.granulosus* e *E.multilocularis*, porque se a amostra apresentar dois fragmentos (aproximadamente 375 e 125 pb cada) estamos perante o *E.multilocularis*, mas tiver apenas um fragmento com cerca de 500pb estamos perante *E.granulosus*.

Das 30 amostras a que esta enzima foi adicionada, 29 apresentaram apenas um fragmento com cerca de 500pb, logo estaríamos perante *E.granulosus*. A amostra 11 apresentou dois fragmentos, um com cerca de 700pb e outro com cerca de 400pb. Na literatura não há qualquer referência a uma situação destas, pelo que não se pode descrever mais nada acerca deste padrão, sendo o ideal sequenciar esta região e verificar a constituição nucleotídica da mesma.

### ✓ Rsa I

A enzima Rsa I ao ser adicionada às amostras, segundo González *et al.* (2002), tem a capacidade de diferenciar a estirpe da ovelha (G1) (que mostra dois fragmentos com 400 e 100pb, respectivamente) de outras estirpes que podem apresentar apenas um fragmento, como por exemplo a estirpe do cavalo (G4). A estirpe do porco (G7) pode dar resultados inconclusivos uma vez que pode apresentar apenas dois fragmentos com 500 e 450pb, respectivamente, ou também um padrão semelhante ao da estirpe da ovelha (Villalobos *et al.*, 2007).

As 30 amostras que foram submetidas à acção desta enzima de restrição apresentaram, na sua maioria, um padrão de fragmentos com 400 e 100pb, respectivamente, correspondendo aos resultados encontrados por outros autores (Moks *et al.*, 2005; Sobrino *et al.*, 2006; Manterola *et al.*, 2006 e Manterola *et al.*, 2008) em diferentes regiões geográficas. A amostra 11 mais uma vez mostra um padrão diferente, apresentando também dois fragmentos mas com tamanhos diferentes das outras amostras (500 e 150pb, respectivamente). Na literatura não há referência a fragmentos com estas características, daí que o ideal seria sequenciar esta região e analisar a sua constituição nucleotídica. Em algumas amostras aparece um terceiro fragmento com cerca de 500pb, facto que pode ser devido a factores como os que foram referenciados para a enzima Msp I.

O uso da PCR-RFLP neste estudo permitiu caracterizar molecularmente as amostras trabalhadas, não permitindo, no entanto, a correcta genotipagem de algumas delas. Tal como em outros estudos, é necessário o uso desta técnica com outras em conjunto para uma obtenção do correcto genótipo de *E. granulosus*, nomeadamente a sequenciação (Cruz-Reyes *et al.*, 2007) ou uma PCR específica (Dinkel *et al.*, 2004).

### 5.2.3 – Sequenciação das amostras amplificadas

Após os resultados pouco conclusivos para algumas das amostras analisadas através de PCR-RFLP e, seguindo os resultados publicados por outros autores, foi feita a amplificação do gene COI para se proceder à sequenciação do mesmo.

Das amostras em estudo foram seleccionadas algumas para sequenciação, tendo em conta que deveria haver representação das diferentes localidades de proveniência das amostras. Foram obtidas sequências com cerca de 350pb do gene COI, permitindo apresentar as primeiras sequências, ainda que parciais, de amostras de *E. granulosus* provenientes de diferentes regiões de Portugal continental e assim conseguir estabelecer uma comparação com as sequências encontradas noutras regiões geograficamente distintas do Mundo.

Neste estudo foram detectados três haplotipos diferentes para o gene COI num total de 6 amostras estudadas. Não foram encontradas grandes diferenças em termos de uma localidade com maior número de polimorfismos, pois o número de amostras é muito reduzido. Porém, em Castelo Branco foram encontrados dois haplotipos diferentes. Este facto também pode estar relacionado com o hospedeiro onde as amostras foram encontradas, pois as amostras sequenciadas provenientes de Castelo Branco eram uma de ovino e a outra de bovino. Para uma melhor análise polimórfica das

amostras provenientes das diferentes localidades será necessário aumentar o número de amostras estudadas.

Sabendo que a média da diversidade haplotípica encontrada foi média e que esta é um índice que reflecte a probabilidade de dois haplótipos escolhidos ao acaso numa população serem diferentes (Nei & Li, 1979), significa que há algumas diferenças nos haplótipos encontrados, pois em seis amostras sequenciadas foram encontrados três haplótipos diferentes.. Em relação à diversidade nucleotídica, ela foi muito pequena, sendo que esta reflecte a probabilidade de dois nucleótidos homólogos escolhidos ao acaso serem diferentes numa população (Nei & Li, 1979). Assim, também existe uma diversidade nucleotídica muito baixa nas amostras estudadas. Para uma melhor compreensão da variabilidade genética das estirpes de *E.granulosus* em Portugal seria necessário alargar o estudo a mais amostras e a outros locais de colheita.

Hagg *et al* (1998) compararam algumas espécies de *Echinococcus* e, também, várias estirpes de *E.granulosus*, tendo concluído que haveria uma baixa diversidade nucleotídica e haplotípica entre as estirpes deste último.

O uso do COI para genotipagem de amostras de *E.granulosus* tem sido um dos mais referidos, em conjunto com a sequenciação do gene NDI (Bardonnet *et al.*, 2002; Le *et al.*, 2002, e Turceková *et al.*, 2003), e tem permitido uma correcta diferenciação das estirpes de *E.granulosus* existentes e disseminadas pelas diferentes regiões geográficas do Mundo. Mas existem outros genes sequenciados com menor variabilidade genética que também são importantes para o conhecimento do genoma deste parasita (Stefanic *et al.*, 2004; Lavikainen *et al.*, 2006 e Camicia *et al.*, 2008).

A comparação das amostras portuguesas com algumas que se encontravam na base de dados permitiu concluir que as amostras sequenciadas pertenciam à estirpe G1 (estirpe da ovelha), a qual em muitos países é a estirpe mais infecciosa para humanos e outros animais e, também, a mais

comum (Eckert & Thompson, 1997; Bart *et al.*, 2006; Maillard *et al.*, 2007; Busi *et al.*, 2007; Villalobos *et al.*, 2007; Vural *et al.*, 2008).

Finalmente, para uma melhor compreensão das estirpes que provocam hidatidose em Portugal ter-se-á que continuar o estudo, alargando os locais de recolha de amostras e as espécies de hospedeiros em que são recolhidas as amostras.

## Capítulo VI - Conclusões

O presente trabalho procurou contribuir para a caracterização morfológica e molecular da espécie *E.granulosus* em Portugal, iniciando-se o estudo com amostras provenientes da região interior do país.

Face aos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. Das 58 amostras recolhidas cerca de 52% eram férteis e portanto podia-se extrair material genético das mesmas;
2. Houve uma maior quantidade de amostras de ovinos recolhidas em relação às de bovinos;
3. Não houve grande diferença, em termos de fertilidade, entre as amostras provenientes de fígados e as provenientes de pulmão;
4. A maior parte das amostras era procedente de Ponte de Sor (36 amostras);
5. A análise do DNA mitocondrial permitiu, por comparação com resultados publicados, confirmar a presença da estirpe G1 (estirpe da ovelha), em Portugal;
6. Foram encontrados 3 haplotipos, os quais apresentaram baixa variabilidade genética revelada pela análise do DNA mitocondrial, pois eram quase todos provenientes do mesmo tipo de hospedeiro;
7. O uso de PCR-RFLP não permite, por si só, genotipar a espécie *E.granulosus*, sendo necessário uma técnica ainda mais específica.

## Referências Bibliográficas

- ✓ AHMADI, N. & DALIMI, A. 2006. Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. *Infect Genet Evol*, **6**(2): 85-90.
- ✓ ALMEIDA, F.B., RODRIGUES-SILVA, R., NEVES, R.H., ROMANI, E.L. & MACHADO-SILVA, J.R. 2007. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* in livestock from Peru. *Vet Parasitol*, **143**(1): 50-58.
- ✓ ANDERSEN, F.L., OUHELLI, H. & KACHANI, M., 1997. *Compendium On Cystic Echinococcosis – In Africa And In Middle Eastern Countries With Special Reference To Morocco*, 1<sup>st</sup> Edition, Brigham Young University, Usa.
- ✓ AZLAF, R. & DAKKAK, A. 2006. Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco. *Vet Parasitol*, **137**(1-2): 83-93.
- ✓ BADARACO, J.L., AYALA, F.J., BART, J.M., GOTTSTEIN, B. & HAAG, K.L. 2008. Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. *Exp Parasitol*, **119**(4): 453-459.
- ✓ BARDONNET, K., BENCHIKH-ELFEGOUN, M.C., BART, J.M., HARRAGA, S., HANNACHE, N., HADDAD, S., DUMON, H., VUITTON, D.A. & PIARROUX, R. 2003. Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination. *Vet Parasitol*, **116**(1): 35-44.
- ✓ BART, J.M., ABDUKADER, M., ZHANG, Y.L., LIN, R.Y., WANG, Y.H., NAKAO, M., ITO, A., CRAIG, P.S., PIARROUX, R., VUITTON, D.A. & WEN, H. 2006. Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China. *Parasitology*, **133**(Pt 5): 571-579.
- ✓ BART, J.M., BARDONNET, K., ELFEGOUN, M.C., DUMON, H., DIA, L., VUITTON, D.A. & PIARROUX, R. 2004. *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology*, **128**(Pt 2): 229-234.

- ✓ BHATTACHARYA, D., BERA, A.K., BERA, B.C., MAITY, A. & DAS, S.K. 2007. Genotypic characterisation of Indian cattle, buffalo and sheep isolates of *Echinococcus granulosus*. *Vet Parasitol*, **143**(3-4): 371-374.
- ✓ BHATTACHARYA, D., BERA, A.K., BERA, B.C., PAN, D. & DAS, S.K. 2008. Molecular appraisal of Indian animal isolates of *Echinococcus granulosus*. *Indian J Med Res*, **127**(4): 383-387.
- ✓ BIAVA, M.F., DAO, A. & FORTIER, B. 2001. Laboratory diagnosis of cystic hydatid disease. *World J Surg*, **25**(1): 10-14.
- ✓ BORGES FERREIRA, L. D. 1980. As campanhas de luta contra a Equinococose/Hidatidose, em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **LXXV** (453): 1-30.
- ✓ BOWLES, J. & MCMANUS, D.P. 1993a. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol*, **23**(7): 969-972.
- ✓ BOWLES, J. & MCMANUS, D.P. 1993b. Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop*, **53**(3-4): 291-305.
- ✓ BOWLES, J. & MCMANUS, D.P. 1993c. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol*, **57**(2): 231-239.
- ✓ BOWLES, J., BLAIR, D. & MCMANUS, D.P. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*, **54**(2): 165-173.
- ✓ BOWLES, J., BLAIR, D. & MCMANUS, D.P. 1994. Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, **109** ( Pt 2): 215-221.
- ✓ BOWLES, J., BLAIR, D. & MCMANUS, D.P. 1995. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology*, **110** ( Pt 3): 317-328.

- ✓ BREYER, I., GEORGIEVA, D., KURDOVA, R. & GOTTSTEIN, B. 2004. *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. *Parasitol Res*, **93**(2): 127-130.
- ✓ BUIISHI, I., WALTERS, T., GUILDEA, Z., CRAIG, P. & PALMER, S. 2005. Reemergence of canine *Echinococcus granulosus* infection, Wales. *Emerg Infect Dis*, **11**(4): 568-571.
- ✓ BUSI, M., SNABEL, V., VARCASIA, A., GARIPPA, G., PERRONE, V., DE LIBERATO, C. & D'AMELIO, S. 2007. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol*, **150**(1-2): 75-83.
- ✓ CABRERA, P.A., HARAN, G., BENAVIDEZ, U., VALLEDOR, S., PERERA, G., LLOYD, S., GEMMELL, M.A., BARAIBAR, M., MORANA, A., MAISSONAVE, J. & ET AL. 1995. Transmission dynamics of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* in sheep in Uruguay. *Int J Parasitol*, **25**(7): 807-813.
- ✓ CAMICIA, F., PAREDES, R., CHALAR, C., GALANTI, N., KAMENETZKY, L., GUTIERREZ, A. & ROSENZVIT, M.C. 2008. Sequencing, bioinformatic characterization and expression pattern of a putative amino acid transporter from the parasitic cestode *Echinococcus granulosus*. *Gene*, **411**(1-2): 1-9.
- ✓ CAPUANO, F., RINALDI, L., MAURELLI, M.P., PERUGINI, A.G., VENEZIANO, V., GARIPPA, G., GENCHI, C., MUSELLA, V. & CRINGOLI, G. 2006. Cystic echinococcosis in water buffaloes: epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains. *Vet Parasitol*, **137**(3-4): 262-268.
- ✓ CARMENA, D., SANCHEZ-SERRANO, L.P. & BARBERO-MARTINEZ, I. 2008. *Echinococcus granulosus* infection in Spain. *Zoonoses Public Health*, **55**(3): 156-165.
- ✓ CASULLI, A., MANFREDI, M.T., LA ROSA, G., CERBO, A.R., GENCHI, C. & POZIO, E. 2008. *Echinococcus ortleppi* and *E. granulosus* G1, G2 and G3 genotypes in Italian bovines. *Vet Parasitol*.

- ✓ CHRIEKI, M. 2002. Echinococcosis--An Emerging Parasite In The Immigrant Population. *Am Fam Physician*, **66**(5): 817-820.
- ✓ 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. 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis*, **7**(6): 385-394.
- ✓ CRUZ-REYES, A., CONSTANTINE, C.C., BOXELL, A.C., HOBBS, R.P. & THOMPSON, R.C. 2007. *Echinococcus granulosus* from Mexican pigs is the same strain as that in Polish pigs. *J Helminthol*, **81**(3): 287-292.
- ✓ CUESTA-BANDERA, C., MCMANUS, D.P. & RISHI, A.K. 1988. Characterization of *Echinococcus granulosus* of Spanish origin by DNA restriction endonuclease analysis and Southern blot hybridization. *Int J Parasitol*, **18**(1): 137-141.
- ✓ DALIMI, A., SATTARI, A. & MOTAMEDI, G. 2006. A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. *Vet Parasitol*, **142**(1-2): 129-133.
- ✓ DANIEL MWAMBETE, K., PONCE-GORDO, F. & CUESTA-BANDERA, C. 2004. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop*, **91**(2): 87-93.
- ✓ DANIEL MWAMBETE, K., PONCE-GORDO, F. & CUESTA-BANDERA, C. 2004. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop*, **91**(2): 87-93.
- ✓ DAVID DE MORAIS, J., ROMBERT, P. C. & TRINCA, A. T. 1985. Subsídios para o conhecimento da epidemiologia da hidatidose rural no Alto Alentejo. Inquérito sero-epidemiológico efectuado em duas aldeias da freguesia de Santiago Maior. *Rev. Port.de Doenças Infecciosas*. **8** (1-4): 83-94.
- ✓ DAVID DE MORAIS, J.A. 1998. *A Hidatidologia Em Portugal*. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 334 Páginas.

- ✓ DAVID MORAIS, J.A. 2007. Hidatidose Humana Estudo Clinic-Epidemiológico no distrito de Évora durante um quarto de século. *Acta Med Port*, **20**: 1-10.
- ✓ DINKEL, A., NJOROGE, E.M., ZIMMERMANN, A., WALZ, M., ZEYHLE, E., ELMAHDI, I.E., MACKENSTEDT, U. & ROMIG, T. 2004. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int J Parasitol*, **34**(5): 645-653.
- ✓ ECKERT, J. & DEPLAZES, P. 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev*, **17**(1): 107-135.
- ✓ ECKERT, J. & THOMPSON, R.C. 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop*, **64**(1-2): 19-34.
- ✓ ECKERT, J. 1997. Epidemiology of *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus* in central Europe. *Parassitologia*, **39**(4): 337-344.
- ✓ ECKERT, J., GEMMELL, M.A., MESLIN F.-X. & PAWŁOWSKI, Z.S. 2001. *Who/Oie Manual On Echinococcosis In Humans And Animals: A Public Health Problem Of Global Concern*. World Organisation For Animal Health. Paris. 286 Páginas.
- ✓ EUZEBY, J. 1991. The epidemiology of hydatidosis with special reference to the Mediterranean area. *Parassitologia*, **33**(1): 25-39.
- ✓ FERREIRA, C., SMÕES, F. & COITO, F. 1945. Acerca do grau de infestação helmíntica dos cães de Lisboa. Lisboa: 1ª Reunião Biológica Portuguesa: 289-294.
- ✓ GARIPPA, G. 2006. Updates on cystic echinococcosis (CE) in Italy. *Parassitologia*, **48**(1-2): 57-59.
- ✓ GASSER, R.B. & CHILTON, N.B. 1995. Characterisation Of *Taeniid* Cestode Species By Pcr-Rflp Of Its2 Ribosomal Dna. *Acta Trop*, **59**(1): 31-40.

- ✓ GONZALEZ, L.M., DANIEL-MWAMBETE, K., MONTERO, E., ROSENZVIT, M.C., MCMANUS, D.P., GARATE, T. & CUESTA-BANDERA, C. 2002. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol*, **102**(1): 46-56.
- ✓ GOTTSTEIN, B. 1992. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. *Clin Microbiol Rev*, **5**(3): 248-261.
- ✓ GRÁCIO, M.A.A., JORGE, F., TRINCA, A. 2002. Human hydatid disease in Portugal: diagnosed cases and a seroepidemiological survey. *Acta Tropica* **83**(S1): S118
- ✓ HAAG, K.L., ARAUJO, A.M., GOTTSTEIN, B. & ZAHA, A. 1998. Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **93**(5): 695-702.
- ✓ HARANDI, M.F., HOBBS, R.P., ADAMS, P.J., MOBEDI, I., MORGAN-RYAN, U.M. & THOMPSON, R.C. 2002. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitology*, **125**(Pt 4): 367-373.
- ✓ HIRVELA-KOSKI, V., HAUKISALMI, V., KILPELA, S.S., NYLUND, M. & KOSKI, P. 2003. *Echinococcus granulosus* in Finland. *Vet Parasitol*, **111**(2-3): 175-192.
- ✓ HOPE, M., BOWLES, J. & MCMANUS, D.P. 1991. A reconsideration of the *Echinococcus granulosus* strain situation in Australia following RFLP analysis of cystic material. *Int J Parasitol*, **21**(4): 471-475.
- ✓ HUTTNER, M., NAKAO, M., WASSERMANN, T., SIEFERT, L., BOOMKER, J.D., DINKEL, A., SAKO, Y., MACKENSTEDT, U., ROMIG, T. & ITO, A. 2008. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (*Cestoda*: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol*, **38**(7): 861-868.
- ✓ JENKINS, D.J. 2006. *Echinococcus granulosus* in Australia, widespread and doing well! *Parasitol Int*, **55 Suppl**: S203-206.
- ✓ JENKINS, D.J., ROMIG, T. & THOMPSON, R.C. 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus spp.*--a global update. *Int J Parasitol*, **35**(11-12): 1205-1219.

- ✓ JORGE, F.M. 2000. *Hidatidose Humana no distrito de Castelo Branco contribuição para o seu conhecimento*. Tese De Mestrado. Ihmt – Universidade Nova De Lisboa. 83 Páginas.
- ✓ KAMENETZKY, L., GUTIERREZ, A.M., CANOVA, S.G., HAAG, K.L., GUARNERA, E.A., PARRA, A., GARCIA, G.E. & ROSENZVIT, M.C. 2002. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol*, **2**(2): 129-136.
- ✓ LAVIKAINEN, A., LEHTINEN, M.J., LAAKSONEN, S., AGREN, E., OKSANEN, A. & MERI, S. 2006. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology*, **133**(Pt 5): 565-570.
- ✓ LAVIKAINEN, A., LEHTINEN, M.J., MERI, T., HIRVELA-KOSKI, V. & MERI, S. 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, **127**(Pt 3): 207-215.
- ✓ LE, T.H., PEARSON, M.S., BLAIR, D., DAI, N., ZHANG, L.H. & MCMANUS, D.P. 2002. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, **124**(Pt 1): 97-112.
- ✓ LEITÃO, J. L. 1960. Referência à Equinococose em Portugal. *Arquivo de Patologia do I.P.O.* **32**: 71-122.
- ✓ LEWALL, D.B. 1998. Hydatid Disease: Biology, Pathology, Imaging And Classification. *Clin Radiol*, **53**(12): 863-874.
- ✓ LI, T., ITO, A., NAKAYA, K., QIU, J., NAKAO, M., ZHEN, R., XIAO, N., CHEN, X., GIRAUDOUX, P. & CRAIG, P.S. 2008. Species identification of human echinococcosis using histopathology and genotyping in northwestern China. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **102**(6): 585-590.
- ✓ LLAMAZARES, J.L.G., FILIPE, A.I.A., CARDEÑA, P.A.R. & FERNÁNDEZ, J.G.P. 1997. Estudio De La Fertilidad Y Viabilidad De Quistes Hidatídicos Ovinos. *Rev Esp Salud Pública*, **71**: 445-449.

- ✓ LÓPEZ, R.A., NOGUÉS, M.E., ROSENVITZ, M., KAMENETZJY, L. & CANOVA, S. 2002. Identificación De *Echinococcus Granulosus* Cepa Vaca (G5) En Perros Del Departamento Belén, Catamarca. Arch. Argent. Pediatr, **100**(6): 493-496.
- ✓ MAGAMBO, J., NJOROGÉ, E. & ZEYHLE, E. 2006. Epidemiology and control of echinococcosis in sub-Saharan Africa. *Parasitol Int*, **55 Suppl**: S193-195.
- ✓ MAILLARD, S., BENCHIKH-ELFEGOUN, M.C., KNAPP, J., BART, J.M., KOSKEI, P., GOTTSTEIN, B. & PIARROUX, R. 2007. Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries. *Parasitol Res*, **100**(3): 495-503.
- ✓ MANTEROLA, C., BENAVENTE, F., MELO, A., VIAL, M. & ROA, J.C. 2008. Description of *Echinococcus granulosus* genotypes in human hydatidosis in a region of southern Chile. *Parasitol Int*, **57**(3): 342-346.
- ✓ MANTEROLA, C., MELO, A., ROA, J.C. & MORA J. 2006. Descripción De Genotipos De *Echinococcus Granulosus* Obtenidos De Especímenes De Hidatidosis Humana. Rev. Chil. Cirur, **58**(6): 441-446.
- ✓ MARAVILLA, P., ANDREW THOMPSON, R.C., PALACIOS-RUIZ, J.A., ESTCOURT, A., RAMIREZ-SOLIS, E., MONDRAGON-DE-LA-PENA, C., MORENO-MOLLER, M., CARDENAS-MEJIA, A., MATA-MIRANDA, P., AGUIRRE-ALCANTARA, M.T., BONILLA-RODRIGUEZ, C. & FLISSER, A. 2004. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Acta Trop*, **92**(3): 231-236.
- ✓ MATA-MIRANDA, P., OSNAYA-PALMA, I., RODRIGUEZ-PRADO, U., GUTIERREZ-MARIN, A., TAWIL, M., HERNANDEZ-GONZALEZ, S., SOLANO-CEH, M., VILLALVASO, L., MARTINEZ-MAYA, J.J., MARAVILLA, P., GARCIA-DE-LA-TORRE, G. & FLISSER, A. 2007. Epidemiologic and ultrasonographic study of echinococcosis in a community in the state of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, **77**(3): 500-503.

- ✓ MCMANUS, D.P. & THOMPSON, R.C. 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology*, **127 Suppl**: S37-51.
- ✓ MCMANUS, D.P. 2002. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **96 Suppl 1**: S151-157.
- ✓ MCMANUS, D.P. 2006. Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitol Int*, **55 Suppl**: S31-37.
- ✓ MCMANUS, D.P., DING, Z. & BOWLES, J. 1994. A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Acta Trop*, **56**(1): 7-14.
- ✓ MOKS, E., JOGISALU, I., VALDMANN, H. & SAARMA, U. 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology*, **135**(5): 647-654.
- ✓ MORO, P. & SCHANTZ, P.M. 2006. Cystic echinococcosis in the Americas. *Parasitol Int*, **55 Suppl**: S181-186.
- ✓ M'RAD, S., FILISETTI, D., OUDNI, M., MEKKI, M., BELGUITH, M., NOURI, A., SAYADI, T., LAHMAR, S., CANDOLFI, E., AZAIEZ, R., MEZHOUD, H. & BABBA, H. 2005. Molecular evidence of ovine (G1) and camel (G6) strains of *Echinococcus granulosus* in Tunisia and putative role of cattle in human contamination. *Vet Parasitol*, **129**(3-4): 267-272.
- ✓ MUÑOZ, J.P. & SIEVERS, G. 2005. Estudios De La Fertilidad Y Viabilidad De Quistes Hidatídicos Bovinos En Chile. *Parasitol Latinoam*, **60**: 69-73.
- ✓ NAIDICH, A., MCMANUS, D.P., CANOVA, S.G., GUTIERREZ, A.M., ZHANG, W., GUARNERA, E.A. & ROSENZVIT, M.C. 2006. Patent and pre-patent detection of *Echinococcus granulosus* genotypes in the definitive host. *Mol Cell Probes*, **20**(1): 5-10.
- ✓ NAKAO, M., MCMANUS, D.P., SCHANTZ, P.M., CRAIG, P.S. & ITO, A. 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*, **134**(Pt 5): 713-722.

- ✓ NAKAO, M., SAKO, Y., YOKOYAMA, N., FUKUNAGA, M. & ITO, A. 2000. Mitochondrial Genetic Code In Cestodes. *Mol Biochem Parasitol*, **111**(2): 415-424.
- ✓ NEI, M. & LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(10): 5269-5273.
- ✓ OK, U.Z., OZKOL, M., KILIMCIOGLU, A.A., DINC, G., BAYINDIR, P., OSTAN, I., PABUSCU, Y., OZCAN, C., KORKMAZ, M., COSKUN, S., YUKSEL, H. & GIRGINKARDESLER, N. 2007. A province-based study using sampling method to investigate the prevalence of cystic echinococcosis among primary school children in Manisa, Turkey. *Acta Trop*, **103**(2): 116-122.
- ✓ OUDNI, M., M'RAD, S., MEKKI, M., BELGUTH, M., CABARET, J., PRATLONG, F., SAYADI, T., NOURI, A., MEZHOUD, H., BABBA, H. & AZAIEZ, R. 2004. Genetic relationships between sheep, cattle and human *Echinococcus* infection in Tunisia. *Vet Parasitol*, **121**(1-2): 95-103.
- ✓ PALACIOS-RUIZ, J.A., RAMIREZ-SOLIS, E., MORENO-MOLLER, M., CARDENAS-MEJIA, A., AGUIRRE-ALCANTARA, M.T., BONILLA-RODRIGUEZ, C., MATA-MIRANDA, P., MARAVILLA, P. & FLISSER, A. 2003. [Identification and integral management of a case of autochthonous hydatidosis in Mexico]. *Rev Gastroenterol Mex*, **68**(1): 41-45.
- ✓ PAWLOWSKI, Z. & STEFANIAK, J. 2003. The pig strain of *Echinococcus granulosus* in humans: a neglected issue?. *Trends in Parasitol*, **19**(10): 439
- ✓ PIERANGELI, N.B., SORIANO, S.V., ROCCIA, I., GIMENEZ, J., LAZZARINI, L.E., GRENOVERO, M.S., MENESTRINA, C. & BASUALDO, J.A. 2007. Heterogeneous distribution of human cystic echinococcosis after a long-term control program in Neuquen, Patagonia Argentina. *Parasitol Int*, **56**(2): 149-155.
- ✓ PONCE GORDO, F. 1995. *Caracterización Biológica De Las Cepas De Echinococcus Granulosus De Origen Español*. Tesis Doctoral. Madrid. 373 Páginas.

- ✓ RADFAR, M.H. & IRANYAR, N. 2004. Biochemical Profiles Of Hydatid Fluids Of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Veterinarski Archiv*, **74**(6): 435-442.
- ✓ RAETHER, W. & HANEL, H. 2003. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. *Parasitol Res*, **91**(5): 412-438.
- ✓ RAHIMI, H.R., KIA, E.B., MIRHENDI, S.H., TALEBI, A., HARANDI, M., FASIHI, JALALI-ZAND N. & ROKNI, M.B. 2007. A New Primer Pair In Its1 Region For Molecular Studies On *Echinococcus Granulosus*. Iran. *J Publ Health*, **36**(1): 45-49.
- ✓ REY, L., 2001. *Parasitologia*, 3ª Edição. Guanabara Koogan, Rio De Janeiro. Pág. 520-536.
- ✓ RINALDI, L., MAURELLI, M.P., CAPUANO, F., PERUGINI, A.G., VENEZIANO, V. & CRINGOLI, S. 2008. Molecular update on cystic echinococcosis in cattle and water buffaloes of southern Italy. *Zoonoses Public Health*, **55**(2): 119-123.
- ✓ ROMIG, T. 2003. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg*, **388**(4): 209-217.
- ✓ ROMIG, T., DINKEL, A. & MACKENSTEDT, U. 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int*, **55 Suppl**: S187-191.
- ✓ ROSENZVIT, M.C., ZHANG, L.H., KAMENETZKY, L., CANOVA, S.G., GUARNERA, E.A. & MCMANUS, D.P. 1999. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology*, **118 ( Pt 5)**: 523-530.
- ✓ SADJJADI, S.M. 2006. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitol Int*, **55 Suppl**: S197-202.
- ✓ SCOTT, J.C., STEFANIAK, J., PAWLOWSKI, Z.S. & MCMANUS, D.P. 1997. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, **114 ( Pt 1)**: 37-43.
- ✓ SILES-LUCAS, M., BENITO, M.C. & CUESTA-BANDERA, C. 1996. *Echinococcus granulosus*: genomic and isoenzymatic study of Spanish strains isolated from different intermediate hosts. *Vet Parasitol*, **63**(3-4): 273-282.

- ✓ SILES-LUCAS, M.M. & GOTTSTEIN, B.B. 2001. Molecular Tools For The Diagnosis Of Cystic And Alveolar Echinococcosis. *Trop Med Int Health*, **6**(6): 463-475.
- ✓ SINGH, B. 1997. Molecular Methods For Diagnosis And Epidemiological Studies Of Parasitic Infections. *Int J For Parasitol*, **27**(10): 1135-1145.
- ✓ SNABEL, V., D'AMELIO, S., MATHIOPOULOS, K., TURCEKOVA, L. & DUBINSKY, P. 2000. Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. *J Helminthol*, **74**(2): 177-181.
- ✓ SOBRINO, R., GONZALEZ, L.M., VICENTE, J., FERNANDEZ DE LUCO, D., GARATE, T. & GORTAZAR, C. 2006. *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Taeniidae) in the Iberian wolf. *Parasitol Res*, **99**(6): 753-756.
- ✓ STEFANIC, S., SHAIKENOV, B.S., DEPLAZES, P., DINKEL, A., TORGERSON, P.R. & MATHIS, A. 2004. Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ("sheep strain") in naturally infected dogs. *Parasitol Res*, **92**(4): 347-351.
- ✓ SUNITA, T., DUBEY, M.L., KHURANA, S. & MALLA, N. 2007. Specific antibody detection in serum, urine and saliva samples for the diagnosis of cystic echinococcosis. *Acta Trop*, **101**(3): 187-191.
- ✓ THOMPSON, R.C. 2008. The Taxonomy, Phylogeny and Transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol*, **119**(4): 439-446.
- ✓ THOMPSON, R.C., BOXELL, A.C., RALSTON, B.J., CONSTANTINE, C.C., HOBBS, R.P., SHURY, T. & OLSON, M.E. 2006. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. *Parasitology*, **132**(Pt 3): 439-447.
- ✓ THOMPSON, R.C., CONSTANTINE, C.C. & MORGAN, U.M. 1998. Overview and significance of Molecular Methods: What Role For Molecular Epidemiology? *Parasitology*, **117** Suppl: S161-175.

- ✓ TORGERSON, P.R., OGULJAHAN, B., MUMINOV, A.E., KARAEVA, R.R., KUTTUBAEV, O.T., AMINJANOV, M. & SHAIKENOV, B. 2006. Present situation of cystic echinococcosis in Central Asia. *Parasitol Int*, **55 Suppl**: S207-212.
- ✓ TRINCA, A.A.T.C. 2001. *Contribuição para o imunodiagnóstico da Hidatidose*. Dissertação para acesso à categoria de Investigador Auxiliar. IHMT – Universidade Nova De Lisboa. 134 Páginas
- ✓ TROPA, E. & PÊGO, F. 1938. Pesquisas parasitológicas em cães da cidade do Porto. *Revist. Trab.Lab. Cent. Patol. Vet.*, **4**: 133-144.
- ✓ TURCEKOVA, L., SNABEL, V., D'AMELIO, S., BUSI, M. & DUBINSKY, P. 2003. Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Trop*, **85**(2): 223-229.
- ✓ UTUK, A.E., SIMSEK, S., KOROGLU, E. & MCMANUS, D.P. 2008. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. *Acta Trop*, **107**(2): 192-194.
- ✓ VAN HERWERDEN, L., GASSER, R.B. & BLAIR, D. 2000. ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. *Int J Parasitol*, **30**(2): 157-169.
- ✓ VARCASIA, A., CANU, S., KOGKOS, A., PIPIA, A.P., SCALA, A., GARIPPA, G. & SEIMENIS, A. 2007. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitol Res*, **101**(4): 1135-1139.
- ✓ VARCASIA, A., CANU, S., LIGHTOWLERS, M.W., SCALA, A. & GARIPPA, G. 2006. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Sardinia. *Parasitol Res*, **98**(3): 273-277.
- ✓ VARCASIA, A., GARIPPA, G., PIPIA, A.P., SCALA, A., BRIANTI, E., GIANNETTO, S., BATTELLI, G., POGLAYEN, G. & MICAGNI, G. 2008. Cystic echinococcosis in equids in Italy. *Parasitol Res*, **102**(4): 815-818.

- ✓ VICIDOMINI, S., CANCRINI, G., GABRIELLI, S., NASPETTI, R. & BARTOLONI, A. 2007. Muscular cystic hydatidosis: case report. *BMC Infect Dis*, **7**: 23.
- ✓ VILLALOBOS, N., GONZALEZ, L.M., MORALES, J., DE ALUJA, A.S., JIMENEZ, M.I., BLANCO, M.A., HARRISON, L.J., PARKHOUSE, R.M. & GARATE, T. 2007. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico. *Vet Parasitol*, **147**(1-2): 185-189.
- ✓ VURAL, G., BACA, A.U., GAUCI, C.G., BAGCI, O., GICIK, Y. & LIGHTOWLERS, M.W. 2008. Variability in the *Echinococcus granulosus* Cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet Parasitol*, **154**(3-4): 347-350.
- ✓ YANG, Y.R., ROSENZVIT, M.C., ZHANG, L.H., ZHANG, J.Z. & MCMANUS, D.P. 2005. Molecular study of *Echinococcus* in west-central China. *Parasitology*, **131**(Pt 4): 547-555.
- ✓ YUKSEL, M., DEMIRPOLAT, G., SEVER, A., BAKARIS, S., BULBULOGLU, E. & ELMAS, N. 2007. Hydatid Disease Involving Some Rare Locations In The Body: A Pictorial Essay. *Korean J Radiol*, **8**(6): 531-540.
- ✓ ZANINI, F., GONZALO, R., PEREZ, H., APARICI, I., SOTO, X., GUERRERO, J., CERRONE, G. & ELISSONDO, C. 2006a. Epidemiological surveillance of ovine hydatidosis in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina, 1997-1999. *Vet Parasitol*, **138**(3-4): 377-381.
- ✓ ZANINI, F., LAFERRARA, M., BITSCH, M., PEREZ, H. & ELISSONDO, M.C. 2006b. Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of the patagonian grey fox (*Pseudalopex griseus*) in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina. *Vet Parasitol*, **136**(3-4): 329-334.
- ✓ ZHANG, L., GASSER, R.B., ZHU, X. & MCMANUS, D.P. 1999. Screening for different genotypes of *Echinococcus granulosus* within China and Argentina by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **93**(3): 329-334.

- ✓ ZHANG, L.H., CHAI, J.J., JIAO, W., OSMAN, Y. & MCMANUS, D.P. 1998. Mitochondrial genomic markers confirm the presence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Parasitology*, **116** ( Pt 1): 29-33.
- ✓ ZHANG, L.H., CHAI, J.J., JIAO, W., OSMAN, Y. & MCMANUS, D.P. 1998. Mitochondrial genomic markers confirm the presence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Parasitology*, **116** ( Pt 1): 29-33.
- ✓ ZHANG, W., LI, J. & MCMANUS, D.P. 2003. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev*, **16**(1): 18-36.
- ✓ ZHANG, Y., BART, J.M., GIRAUDOUX, P., CRAIG, P., VUITTON, D. & WEN, H. 2006. Morphological and molecular characteristics of *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* mixed infection in a dog from Xinjiang, China. *Vet Parasitol*, **139**(1-3): 244-248.