

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Departamento de Genética

Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular - PPGBM

**Estrutura e dinâmica genética das populações de *Echinococcus vogeli* e
Echinococcus oligarthrus (Cestoda: Taeniidae)**

Dissertação de Mestrado

Guilherme Brzoskowski dos Santos

Porto Alegre, Março de 2012.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Departamento de Genética

Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular - PPGBM

**Estrutura e dinâmica genética das populações de *Echinococcus vogeli* e
Echinococcus oligarthrus (Cestoda: Taeniidae)**

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

Guilherme Brzoskowski dos Santos

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, Março de 2012.

Agradecimentos

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela sua orientação e confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

A Dra. Karen Haag, pela confiança de colocar sobre minhas mãos o trabalho que segue, e pela constante colaboração.

Ao Dr. Manoel do Carmo Pereira Soares, por ceder às amostras dos *Echinococcus* neotropicais e por ceder à utilização das sequências mitocondriais dos mesmos, além da constante colaboração. Ao grupo de pesquisa do Dr. Manoel, em especial a Elisabete Maria de Figueiredo Brito pela atenção.

Ao Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela participação em minha formação.

Aos professores do PPGBM, por todos os ensinamentos. Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos colegas de laboratório, pelas sugestões e amizade.

À minha família e à Janaína Sampaio, pela compreensão e paciência.

Resumo

A taxonomia dos cestóides do gênero *Echinococcus* está submetida a constante revisão. Dez espécies são atualmente aceitas para *Echinococcus*, duas delas são o *Echinococcus oligarthrus*, agente causador da equinococose unicística, e o *Echinococcus vogeli*, agente causador da equinococose policística e que parece ser a espécie mais patogênica do gênero. Existem haplótipos que ainda não foram determinados como espécies e permanecem dentro da categoria de variantes genéticas. Atualmente, os estudos genéticos em *Echinococcus* concentram-se na análise do DNA mitocondrial, um genoma que não recombina, de rápida evolução, e de herança materna na maioria dos animais. Além disso, esses estudos têm se concentrado em *E. granulosus* e *E. multilocularis*, usando uma ou poucas amostras de *Echinococcus* neotropical. Este estudo teve como objetivo analisar, utilizando sequências nucleares, a composição genética das duas espécies neotropicais, visando colaborar para a compreensão dos processos evolutivos do gênero *Echinococcus* e, conseqüentemente, contribuir para o correto manuseio do parasito nas regiões afetadas. No total, foram utilizados 45 isolados para extração de DNA e subseqüentes análises, 38 *E. vogeli*, 4 *E. oligarthrus*, 1 *E. granulosus*, 1 *E. ortleppi* e 1 *E. multilocularis*. As espécies foram determinadas a partir da amplificação e análise da sequência parcial (366 pb) do gene mitocondrial da citocromo-oxidase (cox1). Para os 45 isolados, 6 diferentes alvos nucleares (P-29, EG10, AG4, Ir, Er e TGF) foram amplificados por PCR e os diferentes genótipos foram selecionados através da técnica de SSCP. Os *loci* mais polimórficos encontrados em *E. vogeli* foram Ag4 e E10, ambos com 2 alelos, e nos *loci* Ir, Er, P-29 e Tgf, com um alelo. *E. oligarthrus* tem alelos exclusivos para cinco dos seis *loci* nucleares analisados; contudo, o alelo T2, do *locus* Tgf, também está presente em seis isolados de *E. vogeli*. O

fluxo gênico entre as metapopulações de *E. vogeli* das duas áreas geográficas parece ser restrito. Além disso, o fluxo gênico entre a população de *E. oligarthrus* e as demais populações é restrito. A AMOVA revelou que o nível mais significativo de variabilidade genética ocorre dentro das metapopulações, o segundo nível mais significativo foi encontrado entre as metapopulações dentro das suprapopulações do Acre e Pará. Os isolados amostrados no estado do Acre parecem formar um “cluster” distinto. Além disso, foi possível verificar que os isolados de *E. vogeli* amostrados no estado do Pará também tendem a constituir um “cluster” único, mas de forma menos uniforme. Os 11 haplótipos mitocondriais de *E. vogeli* constituem um grupo monofilético e distinto de *E. oligarthrus* e das demais espécies do gênero.

Abstract

Cestodes of the genus *Echinococcus* are subjected to a constant taxonomic revision. Ten species are currently accepted for the genus *Echinococcus*, two of them are *Echinococcus oligarthrus*, the agent of unicystic echinococcosis and *Echinococcus vogeli*, the agent of polycystic echinococcosis, which seems to be one of the most pathogenic species of *Echinococcus*. There are haplotypes that have not been determined as species and remain within the genetic variants category. Currently, the genetic studies on *Echinococcus* have focused on the analysis of mitochondrial DNA, a non-recombining, fast evolving and maternally inherited genome in most animals. Besides, these studies have been concentrated in the *E. granulosus* and *E. multilocularis*, using one or few samples from neotropical *Echinococcus*. This study aimed to analyze, using nuclear sequences, the genetic composition of the two neotropical species, which may support the understanding of evolutionary processes on the genus *Echinococcus* and, consequently, will contribute to the correct handling of the parasite in the affected regions. A total of 45 isolates were used for DNA extraction and further analyses, 38 *E. vogeli*, 4 *E. oligarthrus*, 1 *E. granulosus*, 1 *E. ortleppi* and 1 *E. multilocularis*. The species were determined by amplification and sequence analysis of a partial sequence (366 bp) of the mitochondrial cytochrome oxidase 1 gene (cox1). For the 45 isolates, 6 different nuclear targets (P-29, Eg10, Ag4, Ir, Er and Tgf) were amplified by PCR and the genotypes were screened by SSCP technique. In *E. vogeli*, the most polymorphic loci found were Ag4 and E10, both with 2 alleles, and the Ir, Er, P-29 and Tgf loci with 1 allele. *E. oligarthrus* has exclusive alleles for five of the six analyzed nuclear loci. However, the allele T2, from Tgf locus, is also present in six *E. vogeli* isolates. The gene flow between the metapopulations of *E. vogeli* seems to be

restricted. In addition, the gene flow between the *E. oligarthrus* population and the other populations of *E. vogeli* is restricted. The AMOVA revealed that the most significant level of genetic variability occurs within metapopulations, and the second most significant level of variability was found among metapopulations within suprapopulations of Acre and Pará. Isolates sampled in Acre seems to form a distinct cluster. Furthermore, it was possible to verify that the *E. vogeli* isolates sampled in Pará also are likely to form a single "cluster", but less uniform. The 11 mitochondrial haplotypes of *E. vogeli* constitute a monophyletic group and distinct from *E. oligarthrus* and other *Echinococcus* species.

Sumário

Agradecimentos.....	5
Resumo.....	4
Abstract.....	6
Capítulo 1. Introdução.....	10
1.1. Estudos Populacionais	10
1.2. <i>Echinococcus</i>	11
1.3. Ciclo de vida das espécies <i>Echinococcus vogeli</i> e <i>Echinococcus oligarthrus</i> e a importância destas para a saúde humana.....	14
1.4. As espécies neotropicais de <i>Echinococcus</i>	16
1.5. Distribuição geográfica da equinococose neotropical.....	21
1.6. Identificação das espécies do gênero <i>Echinococcus</i> e marcadores nucleares.....	24
1.7. Análise dos polimorfismos.....	26
1.8. Justificativa.....	28
1.9. Objetivo.....	29
Capítulo 2. Material e Métodos.....	30
2.1 Coleta e amplificação das amostras.....	30
2.2. SSCP e seqüenciamento.....	34
2.3. Análise estatística.....	36
Capítulo 3. Resultados.....	40
3.1. Diversidade dos seis loci nucleares e um mitocondrial das populações amostradas das espécies <i>E. oligarthrus</i> e <i>E. vogeli</i>	40
3.2. Estruturação populacional.....	43
3.3. Análise Filogenética.....	49

Capítulo 4. Discussão.....	52
Perspectivas.....	58
Referências Bibliográficas.....	59
Anexos.....	64

Capítulo 1. Introdução

1.1. Estudos populacionais

Dentre as inúmeras definições vigentes, de maneira geral, uma espécie pode ser definida em dois níveis: 1) nível genético: refere-se ao seu patrimônio hereditário, que lhe confere caracteres específicos. 2) nível ecológico: refere-se ao nicho, que é a unidade funcional que assegura à espécie os meios para sobreviver. Em verdade uma espécie, seja qual for a definição que se escolha, é a associação entre o nível genético e o ecológico, a qual aflora através de comportamentos específicos que permitem aos indivíduos do grupo, portadores de potencialidades hereditárias, inserirem-se em um nicho original e dele retirar os recursos indispensáveis, cruzar-se e perpetuar-se para garantir a manutenção da espécie (Ruffié, 1982).

Uma população, por sua vez, pode ser definida como um grupo de organismos da mesma espécie ocupando um dado espaço e tempo, compartilhando um mesmo “pool” genético (Ruffié, 1982). A existência de populações implica a ação de duas forças opostas entre as quais deve-se estabelecer um equilíbrio: 1) Certo grau de isolamento sexual, sem o qual as populações acabariam por se fundir no conjunto da espécie e perderiam a sua individualidade biológica, a espécie encontrar-se-ia em estado de panmixia e seria geneticamente homogênea, pois mesmo que apresente polimorfismos em determinados *loci*, as frequências alélicas seriam idênticas ou quase idênticas para todos os genes estudados dentro da zona de distribuição da população. 2) Trocas com populações vizinhas, sem as quais as populações poderiam divergir tanto que acabariam por se tornar interestéreis, haveria assim uma divisão da espécie em várias espécies

novas. Logo, a manutenção da estrutura populacional exige um mínimo de trocas genéticas entre todas as populações que constituem a espécie.

No entanto, os conceitos apresentados acima nem sempre podem ser aplicados na íntegra aos parasitos. Afinal, todos os indivíduos de uma única espécie em um único hospedeiro constituiriam uma população? Ou todos os indivíduos de todos os hospedeiros de um ecossistema representariam esta população?

Assim, os conceitos de infrapopulação, metapopulação e suprapopulação foram introduzidos para hierarquizar a estrutura populacional de grupos de organismos como os dos parasitos (Esch and Fernandez, 1975). A infrapopulação refere-se aos parasitos de uma única espécie em um hospedeiro individual. A metapopulação corresponde à composição de infrapopulações em uma determinada espécie hospedeira em um ecossistema. Já o nível hierárquico mais alto, a suprapopulação, reúne todos os parasitos de uma determinada espécie, em todas as fases de seu desenvolvimento, em todas as espécies hospedeiras, de um ecossistema.

1.2. *Echinococcus*

A equinococose é uma zoonose causada por helmintos do gênero *Echinococcus*, um platelminto pertencente à classe Cestoda, que na fase adulta infecta canídeos e felinos, alojando-se no intestino, e em sua fase larval tem como hospedeiro intermediário herbívoros de várias espécies, podendo também infectar seres humanos, em inúmeras regiões, tanto temperadas quanto tropicais do mundo (Torgerson & Heath, 2003), sendo que a espécie humana é considerada hospedeiro acidental (Figura 1).

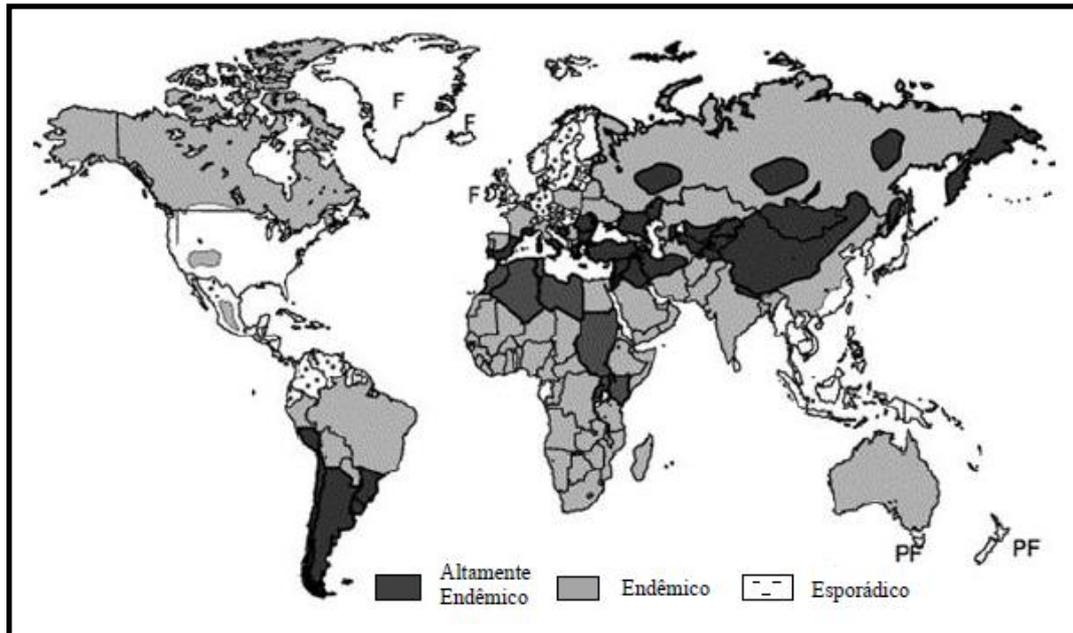


Figura 1. Distribuição geográfica das espécies do gênero *Echinococcus*. Diferentes níveis de endemia (Adaptado de Torgenson & Budke, 2003).

A taxonomia do gênero *Echinococcus* vem sofrendo inúmeras alterações ao longo das últimas décadas, já que novos dados moleculares e epidemiológicos vêm fornecendo evidências para a designação de espécies que antigamente eram reconhecidas apenas como linhagens.

Atualmente são aceitas dez espécies para o gênero *Echinococcus* (Moro *et al.*, 2009; Saarma *et al.*, 2009), seis delas são importantes no que diz respeito à saúde humana: *Echinococcus oligarthrus*, que causa a equinococose unicística; *Echinococcus vogeli*, a qual causa a equinococose policística, espécie conhecida como sendo a mais patogênica dentro do gênero; *Echinococcus multilocularis*, que causa a equinococose alveolar; *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus ortleppi* e *Echinococcus equinus*, que causam a equinococose cística (Nakao *et al.*, 2007; D’Alessandro & Rausch, 2008). As

quatro espécies sem relevância para a saúde humana são: *Echinococcus canadensis*, *Echinococcus intermedius*, *Echinococcus shiquicus* (Xiao *et al.*, 2005) e *Echinococcus felidis*, originalmente descrito por Ortlepp em 1937 (apud Hüttner *et al.*, 2008). Existem haplótipos que ainda não foram determinados como espécies e permanecem dentro da categoria de variantes genéticas (Figura 2).

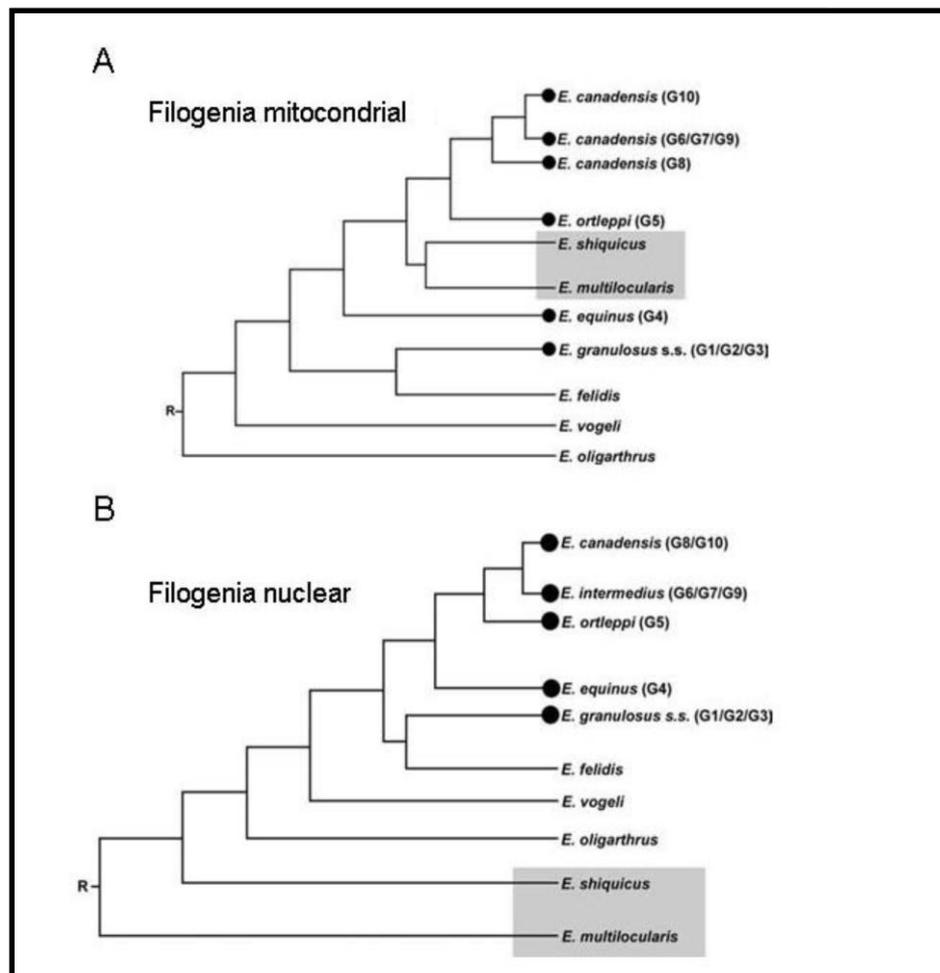


Figura 2. Relações filogenéticas obtidas para o gênero *Echinococcus* a partir do genoma mitocondrial (A), e de cinco genes do genoma nuclear. Os pontos pretos representam os antigos haplótipos de *Echinococcus granulosus* e que atualmente são considerados como espécies (Adaptado de Saarma *et al.*, 2009).

Embora muitos trabalhos tratem do assunto, a taxonomia do gênero *Echinococcus* ainda é algo confuso, em grande parte devido à pouca informação epidemiológica disponível. Nos últimos anos, novas espécies de *Echinococcus* têm sido descritas. No entanto, muitas destas descrições têm sido abandonadas e isso se deve em grande parte ao fortalecimento da área da taxonomia molecular, que muitas vezes se contrapõe a informações morfológicas.

1.3.Ciclo de vida das espécies neotropicais *Echinococcus vogeli* e *Echinococcus oligarthrus* e a importância destas para a saúde humana

Muitos são os trabalhos que informam sobre ciclo de vida, morfologia, ecologia e constituição genética dos organismos do gênero *Echinococcus*. No entanto, praticamente todos esses trabalhos utilizam como modelos as espécies *E. granulosus* e *E. multilocularis*. Na verdade, são quase desconhecidas as informações a respeito do ciclo de vida dos parasitos *E. oligarthrus* e *E. vogeli* e praticamente não existem estudos com enfoque genético sobre estas espécies. A partir da revisão de Thompson (1995) sobre *E. granulosus* e D'Alessandro & Rausch (2008) que enfocam no estudo dos parasitos neotropicais é possível discorrer sobre o ciclo de vida e características morfológicas das duas espécies neotropicais.

O hospedeiro definitivo de *E. vogeli* é sempre um canídeo, normalmente o cão selvagem ou doméstico, sendo justamente o cão doméstico o maior responsável pelas infecções em seres humanos (D'Alessandro, 1997). A espécie *E. oligarthrus* têm o gato selvagem como hospedeiro definitivo (D'Alessandro & Rausch, 2008).

O cestóide adulto é muito mais específico em relação ao seu hospedeiro definitivo do que o metacestóide, fase larval do parasito, em relação ao seu hospedeiro intermediário (Thompson, 1995). Fatores físicos e químicos, como a composição da bile, e mecanismos imunológicos são de grande importância para o desenvolvimento e maturação do verme adulto no intestino delgado de canídeos.

Após a fecundação do verme adulto, os ovos são liberados em diferentes estágios de maturação, através da proglote grávida, ainda no trato intestinal do hospedeiro definitivo, sendo que os ovos imaturos podem maturar no ambiente. Quando ingerido por um hospedeiro intermediário apropriado, comumente a paca, cutia ou mesmo seres humanos, ocorre à ativação das oncosferas as quais são capazes de migrar pela via linfática ou venosa, e sua localização final variará de acordo com as características fisiológicas do hospedeiro e da linhagem a que pertence o parasito (Harris *et al.*, 1989; Thompson, 1995; D'Alessandro & Rausch, 2008).

Logo que a oncosfera atinge um órgão do hospedeiro, normalmente o fígado ou o pulmão, ocorre o desenvolvimento que leva à formação do cisto hidático, o qual é externamente recoberto por tecido do hospedeiro. A camada mais externa, a camada adventícia que envolve o cisto, é formada pelo hospedeiro e composta de tecido conjuntivo e fibroblastos; abaixo desta, há a camada laminar, que é elástica e acelular; logo em seguida, tem-se a camada germinativa, um sincício, com células indiferenciadas que darão origem aos protoescólecis através de reprodução assexuada. O cisto é preenchido pelo líquido hidático formado por proteínas do parasito e do hospedeiro, sendo que cada protoescólex pode originar um novo adulto, reiniciando o ciclo de vida do helminto (Figura 3) (Thompson, 1995; D'Alessandro & Rausch, 2008).

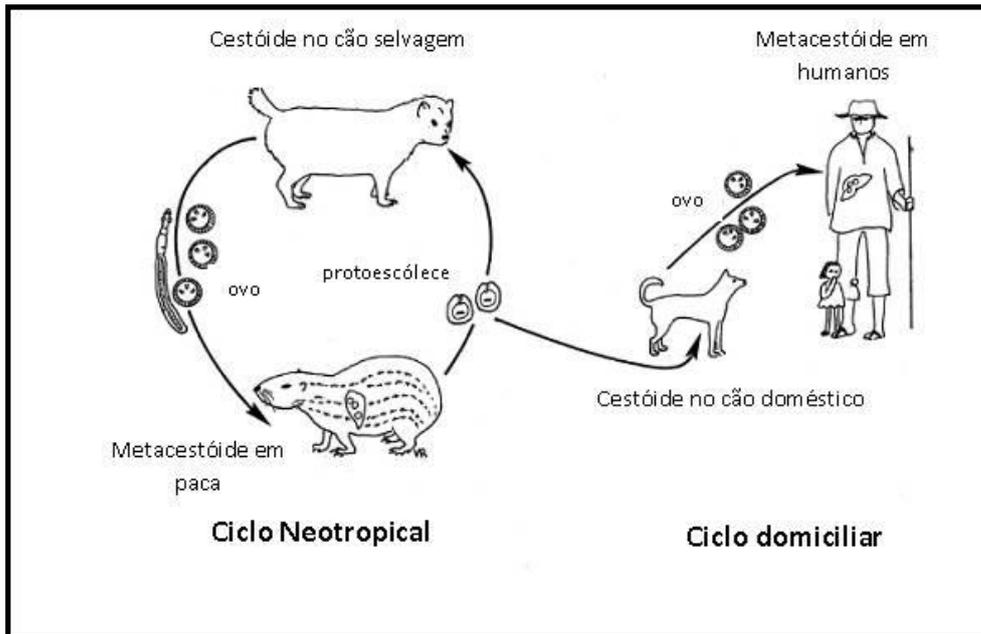


Figura 3. Ciclo de vida do *Echinococcus vogeli* em florestas neotropicais e curso da transmissão para humanos. A espécie *Echinococcus oligarthrus* tem como hospedeiro definitivo o gato selvagem ou doméstico. Modificado de D'Alessandro and Rausch, 2008.

1.4.As espécies neotropicais de *Echinococcus*

De todos os cestóides que parasitam seres humanos, aqueles pertencentes à família Taeniidae, Ludwig 1886, são considerados os mais patogênicos e letais. Assim como os cisticercos de *Taenia solium*, os metacestóides de *Echinococcus* são considerados agentes causadores de graves doenças em seres humanos, destacando-se aqui o *Echinococcus vogeli* (D'Alessandro & Rausch, 2008).

A espécie *E. oligarthrus* foi descrita por Karl Moritz Diesing, em 1863, a partir de material coletado pelo naturalista Johann Natterer, o qual localizou as amostras no intestino superior de pumas, *Felis puma concolor* (Tappe *et al.*, 2008). Muitas foram às controvérsias em relação à fase larval e adulta desta espécie que por vezes foi também denominada de *Taenia oligarthra* e *Echinococcus cruzi*. No entanto, graças aos estudos de Vernon Thatcher e Octavio Sousa, a redescrição de *E. oligarthrus* foi apresentada, com base em novo material coletado no Panamá, no ano de 1966. Estes mesmos autores deixaram em aberto a possibilidade deste parasito ser capaz de infectar seres humanos.

A segunda espécie exclusivamente neotropical descrita até o presente momento, o *E. vogeli*, por Rausch & Bernstein (1972), foi primeiramente encontrada no intestino delgado de cães do mato, *Spheothos venaticus*, oriundos do Equador e que foram posteriormente analisados no Zoológico de Los Angeles em 1968 (Tappe *et al.*, 2008).

Somente *E. oligarthrus* e *E. felidis* têm felinos como hospedeiros definitivos, as outras espécies do gênero parasitam Canídeos, incluindo o cão doméstico, *Canis lupus*, que é o principal meio de infecção para os humanos. Até o presente momento o cão do mato é o único hospedeiro natural conhecido da espécie *E. vogeli*, embora indivíduos da espécie *Cerdocyon thous*, graxaim, já tenham sido experimentalmente infectados. Essa raposa distribui-se por quase toda a América do Sul. Os vermes adultos das duas espécies neotropicais são de fácil diferenciação, já que o adulto de *E. oligarthrus* é o menor parasito do gênero, com 2-3 mm de comprimento, e *E. vogeli* o maior, com 12 mm de comprimento, chegando a desenvolver até 6 proglótides. Vermes adultos, de ambas as espécies, são capazes de reter cerca de 90 ovos em seu útero (Rausch *et al.*, 1978; Rausch *et al.*, 1981).

Os metacestóides de *E. vogeli* e *E. oligarthrus* parasitam indivíduos da infraordem Hystricognathi, pertencente a ordem Rodentia. Esses roedores eram os herbívoros terrestres dominantes na América do Sul no Mioceno, de 22 a 5 milhões de anos atrás. A paca, *Cuniculus paca*, é o hospedeiro intermediário natural de *E.vogeli* que é frequentemente encontrado parasitando o fígado destes animais, através da formação de vesículas esféricas contínuas ou esporadicamente isoladas, denominados cistos hidáticos. Dentro destes metacestóides são encontrados de 10 a 500 protoescóleces. Os cistos, de aspecto esbranquiçado e por vezes translúcido, situam-se no parênquima, sendo que a maioria fica perto da superfície, contrastando com a coloração escura do fígado, o que é um facilitador de sua identificação visual (D'Alessandro *et al.*, 1981; D'Alessandro & Rausch, 2008).

Acredita-se que muitos foram os casos de massas intra-abdominais, identificadas como abscessos, tumores no fígado, na bexiga, e no mesentério, antes de a equinococose policística ser caracterizada em seres humanos (D'Alessandro *et al.*, 1979). No hospedeiro humano, as vesículas conduzem lentamente ao envolvimento completo do fígado, podendo levar à invasão de outros órgãos, das cavidades pleurais e peritoneais. As primeiras informações referentes a infecções de *E. vogeli* em primatas, constam de um surto de equinococose em um zoológico na cidade de Los Angeles, EUA. Em meados da década de 1970, um cão selvagem capturado na Colômbia foi levado a este zoológico e permaneceu em uma jaula adjacente a inúmeros primatas, dentre eles orangotangos e gorilas. Dentro de 10 anos, um total de 16 grandes primatas haviam morrido devido à equinococose policística. Esse relato sugeriu um tempo de desenvolvimento para a doença em primatas de aproximadamente uma década (Howard & Gendron, 1980).

Várias são as espécies de mamíferos da América Central e do Sul reconhecidas como hospedeiras intermediárias de *E. vogeli* e *E. oligarthus*, destacando-se o gambá, *Didelphis marsupialis*; a cutia, *Dasyprocta punctata*; a cutia cinzenta, *D. fuliginosa*; o rato-espinho, *Proechimys semispinosus*; a paca, *Cuniculus paca*; os coelhos selvagens, *Sylvilagus floridanus* e *S. floridanus* (D'Alessandro *et al.*, 1979). Diferentemente do *E. vogeli* o metacestóide de *E. oligarthus* tem forma irregular e não produz proliferação no órgão afetado. Somente três casos de infecção em seres humanos, causados pelo *E. oligarthus*, foram descritos na literatura, um no Brasil, diagnosticado no coração de um homem adulto, um na Venezuela e um no Suriname, ambos diagnosticados na órbita ocular de crianças (Basset *et al.*, 1998; D'Alessandro & Rausch, 2008; Knapp *et al.*, 2009). Há a suspeita de um quarto caso, também descrito na órbita ocular, causado provavelmente por *E. oligarthus* (Murthy *et al.*, 2005; Basset *et al.*, 1998; Lopera *et al.*, 1989).

Infecções naturais pela fase adulta do *E. vogeli* são encontradas com grande frequência nos cães do mato, *Speothus venaticus*, os quais parecem ter uma pequena importância em relação à transmissão direta a seres humanos. Contudo, as pacas fazem parte do cotidiano alimentar dos habitantes da região neotropical e as vísceras destes animais são rotineiramente utilizadas para a alimentação dos cães domésticos, que se tornam os maiores responsáveis, graças à ação humana, pelas conseqüentes infecções.

Os casos de equinococose neotropical são raros, se comparados com os alveolares e císticos, isto, provavelmente, porque o ciclo de vida dessas duas espécies é predominantemente selvagem. Contudo, nas últimas décadas, cães domésticos têm sido introduzidos na região amazônica, aumentando o potencial de transmissão desses parasitos de cães para seres humanos devido ao contato diário entre ambos. Além disso,

a população da região amazônica possui acesso limitado a serviços médicos básicos, o que leva a sugerir a existência de um grande número de pessoas que não recebem o tratamento adequado para esta doença que é, sem dúvida, subestimada em termos de ocorrência na região amazônica (Knapp *et al.*, 2009).

Até março de 2007, no total, 172 casos de equinococose neotropical foram divulgados, destes 81 são casos dos quais se tem informações precisas. A idade dos pacientes variam de 6 a 77 anos, em média 43 anos, sendo que 45% eram do sexo masculino e 55% do feminino (D'Alessandro & Rausch, 2008). A grande maioria destes pacientes nasceu e viveu durante a maior parte de sua vida em áreas rurais da América Central e do Sul. Na maior parte dos casos, os pacientes afetados pela equinococose policística alegavam fortes dores abdominais e a presença de uma massa volumosa no abdômen, perto do fígado, órgão afetado em aproximadamente 80% dos casos. Mais seis pacientes, todos nascidos no estado do Acre, foram diagnosticados, no ano de 2010, com equinococose policística mesentérica (Siqueira *et al.*, 2010).

O exame de raios-X e a tomografia são técnicas utilizadas para identificação da equinococose (Meneghelli *et al.*, 1992). Mais recentemente foram implementados testes moleculares e imunológicos para a confirmação destes parasitos. Até o momento, a combinação de ELISA e do teste de imunoblot, para a detecção de anticorpos contra antígenos, do parasito são as metodologias mais recomendadas, embora a ocorrência de falsos positivos, pacientes infectados com outros parasitos, e de falso negativo, devido a não detecção de anticorpos contra proteínas do cisto, seja frequente, aproximadamente em 20% dos casos (D'Alessandro & Rausch, 2008). Os métodos mais precisos para identificar a espécie do gênero em uma determinada infecção podem ser feitos pela análise do tamanho dos ganchos rostelares e por meio de dados moleculares.

1.5. Distribuição geográfica da equinococose neotropical

A equinococose causada pelos organismos *E. vogeli* e *E. oligarthrus* já foi descrita no México, Nicaraguá, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Venezuela, Peru, Brasil, Suriname, Uruguai, no norte da Argentina e Chile, sendo que o Brasil é o país com o maior número de casos descritos até o momento, representando 58% dos mesmos (D'Alessandro & Rausch, 2008).

Os ovos que são expelidos pelos cães do mato no ambiente não são um problema diretamente significativa para a saúde pública, diferentemente das pacas (Figura 4), hospedeiro intermediário, pois este herbívoro serve como fonte alimentar para muitos habitantes da região neotropical e as vísceras destes animais são constantemente utilizadas na alimentação dos cães domésticos, os quais são a maior fonte de contágio para humanos (D'Alessandro & Rausch, 2008).



Figura 4. Distribuição da cutia, *Dasyprocta punctata*, e da paca, *Cuniculus paca*, na América Central e do Sul. Modificado de D'Alessandro & Rausch, 2008.

Casos de infecções pelas espécies neotropicais de *Echinococcus* encontrados na Nicarágua, Costa Rica, sul da Argentina, Uruguai e Chile estão fora da distribuição geográfica conhecida do cão do mato (Figura 5). Podem-se levantar três hipóteses para explicar a ocorrência de tais casos: os canídeos que servem de hospedeiro definitivo têm uma distribuição territorial mais extensa do que a conhecida atualmente; o parasito responsável pelas infecções é o *E. oligarthrus*, pois a ocorrência de felinos, hospedeiro

definitivo deste parasito nestas regiões é comum; ou o *E. vogeli* pode estar parasitando outros hospedeiros da família dos canídeos, ainda não identificados.



Figura 5. Distribuição do cão do mato, *Speothos venaticus*, na América Central e do Sul. Modificado de D'Alessandro & Rausch, 2008.

Na Argentina e Uruguai, foram relatados 11 casos de equinococose por Viñas e por Dévé e Dardel, infelizmente não foi possível identificar a espécie devido à ausência de ganchos (apud Tappe *et al.*, 2008). Entretanto, os autores acreditam que é muito provável que se trate do parasito *E. oligarthrus*, já que o hospedeiro definitivo de *E. vogeli* nunca foi encontrado nestes países e, além disso, por análises morfológicas, foi descartada a possibilidade de estas infecções terem sido causadas pelo *E. granulosus* (Tappe *et al.*, 2008).

1.6. Identificação das espécies do gênero *Echinococcus* através de marcadores mitocondriais nucleares

As células de organismos eucarióticos contêm mitocôndrias, as quais são essenciais para formação de trifosfato de adenosina (ATP). Tais organelas possuem seu próprio DNA (mtDNA) e essa característica, somada ao fato de a mitocôndria possuir taxa de evolução relativamente rápida e herança exclusivamente materna, além de não sofrer recombinação, são úteis para a discriminação de organismos intimamente relacionados (McManus & Thompson, 2003). Assim, sequências curtas de DNA, DNA *barcode*, podem ser úteis para distinguir indivíduos de espécies diferentes, o que é utilizado para uma grande gama de organismos, incluindo helmintos (Hajibabaei *et al.*, 2007). O gene mitocondrial codificador da citocromo c oxidase subunidade 1 (cox 1) é utilizado em análises moleculares, com o intuito de identificar as variantes existentes nas espécies do gênero *Echinococcus* (Bowles *et al.*, 1992).

Embora dados gerados por marcadores mitocondriais tenham a importância já mencionada, somente através da utilização de marcadores genéticos construídos a partir

de genes nucleares seria possível obter as frequências alélicas de alelos de um determinado *locus*, analisar regiões não codificadoras e codificadoras do genoma nuclear e determinar a possível ocorrência de fecundação cruzada. Para tanto, são comumente investigados, no genoma nuclear, marcadores genéticos que tenham como utilidade avaliar a estrutura das populações de parasitos. Marcadores podem ser selecionados através da análise dos genomas de *E. granulosus* e *E. multilocularis* disponíveis (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/Echinococcus>). Assim, seguem os genes candidatos a serem utilizados na construção de marcadores genéticos para as espécies do gênero *Echinococcus*:

(A) O gene codificador da mdh, que já se mostrou bom marcador de fluxo gênico em estudos prévios em *E. granulosus* (Haag *et al.*, 1999; Badaraco *et al.*, 2007).

(B) Genes codificadores dos antígenos de superfície, Em10 e Eg10 descritos em *E. multilocularis* e *E. granulosus* respectivamente, que participa de funções de adesão, mobilidade e sobrevivência celular.

(C) Gene codificador do antígeno P-29 presente no fluido do cisto hidático de *E. granulosus*, o qual é um promissor candidato para construção de vacinas de prevenção à equinococose.

(D) Gene codificador de um receptor tirosina quinase, denominado EmER presente em *E. multilocularis*, tem como possíveis funções a mediação da comunicação célula-célula que ocorre entre parasitos eucariotes e seus respectivos hospedeiros.

(E) Gene codificador do receptor de insulina de organismos endoparasitos, denominado EmIR presente em *E. multilocularis*, tem importante papel no desenvolvimento do

parasito, possivelmente contribuindo para interação parasito-hospedeiro.

(F) Gene codificador do fator de crescimento em *Echinococcus*, denominado Tgf. O mesmo já foi utilizado para diferenciar espécies dentro do gênero *Echinococcus* (Saarma *et al.*, 2009).

1.7. Análise de polimorfismos

Atualmente, com o progresso das técnicas de sequenciamento, uma grande quantidade de dados é gerada, o que tornou possível identificar tanto diferenças pequenas, causadas por substituições de bases, quanto grandes modificações, como deleção ou adição de regiões. Este avanço permitiu que estudos antes direcionados tão somente a comparações entre espécies fossem naturalmente incrementados por análises ao nível do indivíduo. Um problema que surgiu logo em seguida a tal processo foi a abundante quantidade de informação obtida através do sequenciamento e conseqüentemente a necessidade de empregar um maior tempo na análise de tais dados. Foi a partir deste momento que técnicas relativamente simples e informativas surgiram para sumarizar a quantidade de dados gerados e para incrementar as informações obtidas a partir de amplificações genômicas.

Uma destas metodologias é a técnica de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), uma técnica rápida e sensível para detecção de substituições de bases (Orita *et al.*, 1989). Tal técnica parte do princípio de que as moléculas de fita simples de DNA têm sua mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida influenciada tanto pelo tamanho quanto pela forma. A partir da obtenção do produto de PCR, o mesmo é

desnaturado por elevação na temperatura, possibilitando que as fitas simples de DNA assumam uma estrutura de dobramento determinada por interações intramoleculares dependente da composição das suas sequências (Hayashi, 1991). Através de testes empíricos, estimou-se que a probabilidade de detecção de alterações causadas pela substituição de uma única base nitrogenada é de mais de 99% em fragmentos que variam de 100 pb até 300 pb e de aproximadamente 89% em fragmentos de 300 pb até 400 pb (Hayashi & Yandell, 1993).

Complicações na técnica de SSCP podem ser geradas por vários fatores, como:

1) Inserção de erro pela enzima DNA-polimerase na amplificação dos fragmentos de DNA analisado. É possível que tais erros durante a ação da polimerase nunca gerem uma subpopulação significativa de moléculas mutadas desde que se realize a PCR com a quantidade usual de molde, aproximadamente 10^4 moléculas por reação, com baixa concentração de “primers” e com temperatura de anelamento elevada (Innis & Gelfand 1990); 2) Alterações na migração do fragmento no gel de poliacrilamida. É necessário manter a temperatura constante durante toda a migração eletroforética, também se deve evitar a formação de bolhas entre o gel e a superfície (Hayashi, 1992).

Muitas foram às mutações somáticas já detectas pela técnica de SSCP, destacam-se: mutações na família dos oncogenes RAS, no gene p53 e no gene responsável pelo retinoblastoma (Hayashi, 1991), além de estudos realizados com parasitos do gênero *Echinococcus* (Badaraco *et al.*, 2008; Haag *et al.*, 1999; Simsek *et al.*, 2010). De forma geral, o emprego da técnica de SSCP é usado para a detecção de novas mutações, identificação dos alelos circulantes em uma população e visualização de genótipos heterozigotos.

1.8. Justificativa

O *E. vogeli* e *E. oligarthrus* têm ciclos de vida exclusivos, hospedeiros definitivos específicos. Assim, esclarecer qual espécie está presente em determinada infecção, tanto em humanos quanto no restante dos animais, é de particular importância para o correto desenvolvimento de vacinas, drogas para controle das helmintíases, e para a implementação de programas de controle mais eficientes.

As duas espécies neotropicais, *E. vogeli* e *E. oligarthrus*, se mantêm, principalmente, por meio do ciclo silvestre. Como a região de ocorrência destes organismos é de grande extensão, basicamente centrada na floresta amazônica, é possível que cada uma das respectivas espécies seja constituída por subpopulações. Desta forma, o isolamento geográfico pode estar atuando sobre essas populações, o que poderia contribuir para o surgimento de novas linhagens genéticas. Como não existem informações sobre a constituição genética destes helmintos, à exceção de algumas sequências do gene da citocromo oxidase (cox 1), o desenvolvimento de marcadores genéticos é de grande urgência. É possível que existam linhagens distintas dentro de cada uma destas espécies, e que estas linhagens tenham preferência por determinado hospedeiro intermediário. Além disso, não se sabe o quão divergentes são o *E. oligarthrus* e o *E. vogeli* um em relação ao outro e mesmo em relação às outras espécies do gênero.

1.9 Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo analisar, por meio de sequências nucleares, a composição genética das espécies neotropicais *E. vogeli* e *E. oligarthrus* e das populações que as constituem.

Os objetivos específicos foram:

(A) Avaliar a variabilidade em sequências de genes nucleares em populações dos parasitos *E. vogeli* e *E. oligarthrus* da região Norte do Brasil;

(B) Descrever a estrutura e dinâmica genética das populações de *E. vogeli* e *E. oligarthrus*, que parasitam ungulados, canídeos, felídeos e seres humanos na região de estudo.

(C) Contribuir para solução de problemas taxonômicos do grupo através da implementação de marcadores genéticos eficazes para a distinção entre as espécies do gênero *Echinococcus*.

Capítulo 2. Material e Métodos

2.1 Coleta e amplificação das amostras

As amostras de *Echinococcus spp.* foram obtidas de hospedeiro humanos pelo professor colaborador, Dr. Manoel Soares, em hospitais dos estados do Acre, Amazonas e Pará, durante cirurgias de pacientes infectados (Figura S3). Além disso, foram obtidas amostras de hospedeiros intermediários e definitivo oriundos de animais silvestres (Tabela 1).

Um total de 45 isolados foram usados neste trabalho, 38 *E. vogeli*, quatro *E. oligarthrus* do Norte do Brasil, um isolado de *E. granulosus*, um de *E. ortleppi* e um de *E. multilocularis* (Tabela 1). A extração do DNA foi feita através de procedimento padrão (McManus & Simpson, 1985). A identificação preliminar das espécies feita com base nas características clínicas dos pacientes e/ou morfologia do parasito foi confirmada a partir da amplificação da sequência parcial do gene mitocondrial da citocromo oxidase, *cox1*, utilizando os primers 5'-TTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3' (direto) e 5'TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG 3' (reverso) gerando um fragmento de 366 pb (Bowles *et al.*, 1992). Cada uma das reações continha entre 30-100 ng de DNA, 10 mM de dNTP, 10 pmois de cada uma dos “primers”, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U da DNA-polimerase *Taq* (INVITROGEN®), buffer 20mM Tris-HCL (pH 8,4), 50mM KCl e água mili-Q para completar o volume final de 25 µl. As amplificações foram feitas por “touchdown” utilizando as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 90 s seguidos por uma temperatura de anelamento inicial de 55°C que é reduzida um grau a cada dois

ciclos nos 20 primeiros ciclos do programa. Os 10 ciclos restantes ocorrem com uma temperatura de anelamento de 45°C. Todos os passos têm duração de 30 segundos com exceção último passo de extensão que tem a duração de cinco minutos.

Tabela 1. Procedência das 45 amostras de *Echinococcus spp.* analisadas no presente estudo.

Amostras	Espécie	Cox1	Órgão	Hospedeiro	Cidade	Local de coleta	Coordenadas Geográficas
1	<i>E. oligarthrus</i>	O1	Baço	Cutia	Anajás	Pará	Latitude 0° 59' 13" S Longitude 49° 56' 24" O
2	<i>E.vogeli</i>	V6	Fígado	Humano	Muaná	Pará	Latitude 1° 31' 40" S Longitude 49° 13' 1" O
3	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Paca	Anajás	Pará	Latitude 0° 56' S Longitude 49° 45' O
4	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Tatu	Anajás	Pará	Latitude 0° 56' 47" S Longitude 49° 45' 33" O
5	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Tatu	Anajás	Pará	ND
6	<i>E. oligarthrus</i>	O1	Baço	Cutia	Anajás	Pará	ND
7	<i>E. oligarthrus</i>	O1	Baço	Cutia	Anajás	Pará	Latitude 0° 56' S Longitude 49° 43' O
8	<i>E.vogeli</i>	V1	Intestino	Cão-do-mato	Anajás	Pará	Latitude 0° 55' S Longitude 49° 45' O
9	<i>E.vogeli</i>	V7	Fígado	Paca	Anajás	Pará	Latitude 0° 54' S Longitude 49° 45' O
10	<i>E.vogeli</i>	V2	Fígado	Paca	Boca do Acre	Amazonas	Latitude 8° 45' 8" S Longitude 67° 23' 52" O
11	<i>E.vogeli</i>	V3	Fígado	Paca	Boca do Acre	Amazonas	Latitude 8° 47' S Longitude 67° 9' 52" O
12	<i>E.vogeli</i>	V3	Pulmão	Paca	Boca do Acre	Amazonas	Latitude 8° 47' S Longitude 67° 9' 52" O
13	<i>E.vogeli</i>	V5	Fígado	Paca	Boca do Acre	Amazonas	Latitude 8° 54' S Longitude 67° 10' O
14	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Paca	Boca do Acre	Amazonas	Latitude 8° 48' S Longitude 67° 10' O
15	<i>E.vogeli</i>	V3	Fígado	Paca	Boca do Acre	Amazonas	Latitude 8° 54' S Longitude 67° 6' O
16	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Humano	Currálinho	Pará	Latitude 1° 48' 50" S Longitude 49° 47' 42" O
17	<i>E.vogeli</i>	V8	Fígado	Humano	Cametá	Pará	Latitude 2° 14' 38" S Longitude 49° 29' 45" O
18	<i>E.vogeli</i>	V5	Fígado	Humano	Tarauacá	Acre	Latitude 8° 9' 39" S Longitude 70° 45' 57" O
19	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Humano	Paragominas	Pará	Latitude 2° 59' 45" S Longitude 47° 21' 10" O
20	<i>E.vogeli</i>	V4	Fígado	Humano	Anajás	Pará	Latitude 0° 59' 13" S Longitude 49° 56' 24" O
21	<i>E.vogeli</i>	V2	Mesentério	Humano	Santa Rosa	Acre	Latitude 9° 25' 58" S Longitude 70° 29' 34" O
22	<i>E.vogeli</i>	V5	Fígado	Humano	Rio Branco	Acre	Latitude 9° 58' 29" S Longitude 67° 48' 36" O
23	<i>E.vogeli</i>	V2	Fígado	Humano	Feijó	Acre	Latitude 8° 9' 51" S Longitude 70° 21' 13" O
24	<i>E.vogeli</i>	V2	Fígado	Humano	Brasileia	Acre	Latitude 11° 00' 58" S Longitude 68° 44' 53" O
25	<i>E.vogeli</i>	V3	Fígado	Humano	Boca do Acre	Amazonas	Latitude 8° 45' 8" S Longitude 67° 23' 52" O
26	<i>E.vogeli</i>	V1	Mesentério	Humano	Maroxewara	Pará	Latitude 5° 3' 30" S Longitude 50° 8' 13" O
27	<i>E.vogeli</i>	V2	Fígado	Humano	Sena Madureira	Acre	Latitude 9° 3' 56" S Longitude 68° 39' 25" O
28	<i>E.vogeli</i>	V9	Fígado	Humano	Almeirim	Pará	Latitude 1° 31' 24" S Longitude 52° 34' 54" O
29	<i>E. oligarthrus</i>	O1	Baço	Cutia	Anajás	Pará	Latitude 0° 56' S Longitude 49° 46' O
30	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Paca	Anajás	Pará	Latitude 0° 56' S Longitude 49° 46' O
31	<i>E.vogeli</i>	V4	Fígado	Tatu	Anajás	Pará	Latitude 0° 55' S Longitude 49° 45' O
32	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Tatu	Anajás	Pará	Latitude 0° 55' S Longitude 49° 45' O
33	<i>E.vogeli</i>	V10	Fígado	Paca	Boca do Acre	Amazonas	Latitude 8° 48' S Longitude 67° 12' O
34	<i>E.vogeli</i>	V4	Fígado	Paca	Anajás	Pará	Latitude 0° 46' S Longitude 49° 34' O
35	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Tatu	Anajás	Pará	Latitude 0° 50' S Longitude 49° 40' O
36	<i>E.vogeli</i>	V4	Fígado	Paca	Anajás	Pará	Latitude 0° 48' S Longitude 49° 32' O
37	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Paca	Anajás	Pará	Latitude 0° 48' S Longitude 49° 44' O
38	<i>E.vogeli</i>	V11	Fígado	Humano	Pauini	Amazonas	Latitude 7° 42' 49" S Longitude 66° 58' 35" O
39	<i>E.vogeli</i>	V2	Fígado	Humano	Feijó	Acre	Latitude 8° 9' 51" S Longitude 70° 21' 13" O
40	<i>E.vogeli</i>	V1	Mesentério	Humano	Curuçá	Pará	Latitude 0° 43' 44" S Longitude 47° 50' 53" O
41	<i>E.vogeli</i>	V1	Fígado	Humano	Melgaço	Pará	Latitude 1° 48' 16" S Longitude 50° 42' 44" O
42	<i>E.vogeli</i>	V1	Mesentério	Humano	Chaves	Pará	Latitude 0° 9' 36" S Longitude 49° 59' 18" O
43	<i>E. granulosus</i>	G1	Fígado	Bovino	Alegrete	Rio Grande so sul	ND
44	<i>E. ortleppi</i>	G5	Pulmão	Bovino	Dom Pedrito	Rio Grande so sul	ND
45	<i>E. multilocularis</i>	M1	ND	Macaco	ND	Suíça	ND

Amostras 11 e 12 são oriundas do mesmo hospedeiro.

ND: Dados não disponíveis..

Para os 45 isolados, seis marcadores genéticos nucleares (P-29, Eg10, Ag4, Ir, Er e Tgf) foram amplificados por PCR (Figura 6, Tabela 2). As amplificações foram realizadas em um volume final de 25µL contendo 30-100 ng de DNA, 10 mM de dNTP, 10 pmois de cada uma dos “primers”, 1,5mM de MgCl₂, 1 unidade da polimerase *Taq* (INVITROGEN ®), buffer 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCL. Os fragmentos de DNA foram amplificadas sob as seguintes condições térmicas: uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 90 s seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 90 s. A última etapa de extensão final a 72 °C por cinco min. Quando bandas inespecíficas surgiram, a temperatura de anelamento foi elevada para 60 °C.

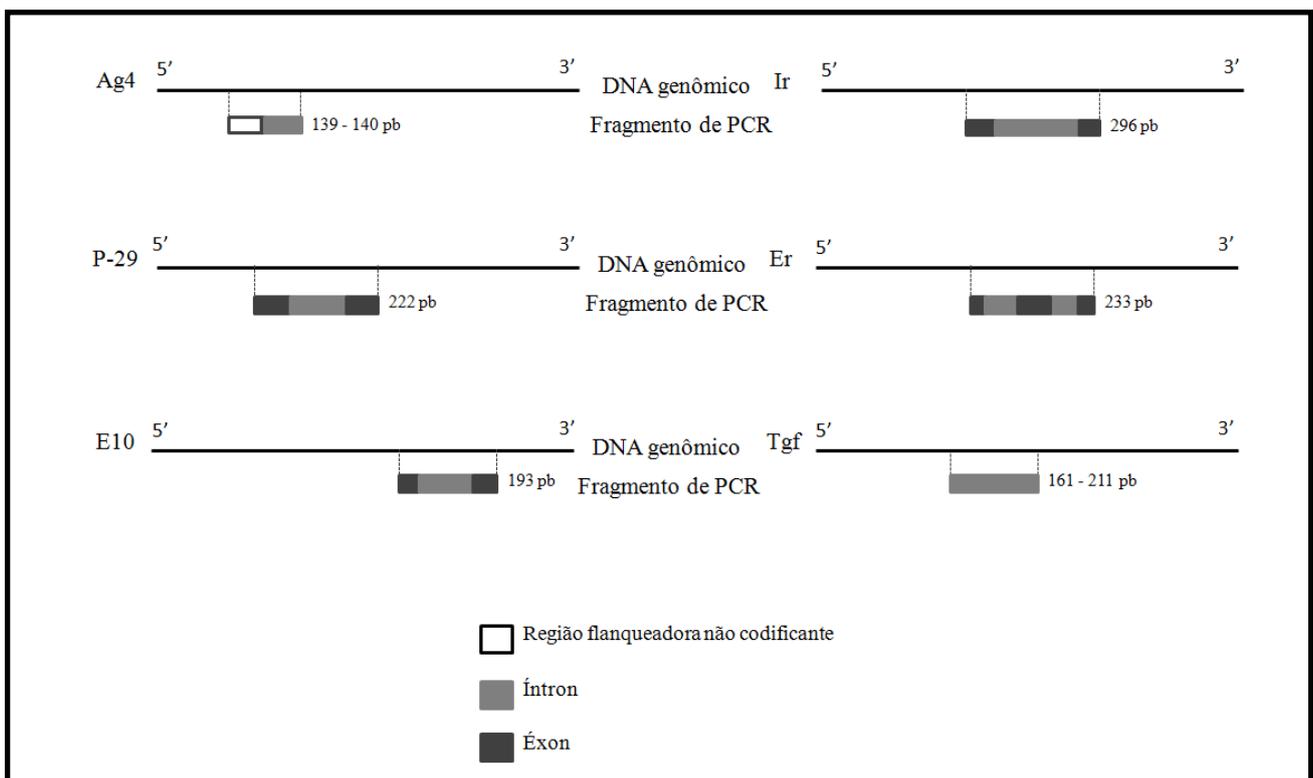


Figura 6. Fragmentos gerados nas reações de PCR dos seis marcadores nucleares utilizados. Os retângulos em cinza escuro representam regiões de éxon, em cinza claro de íntron e, em branco, regiões flanqueadoras não codificadoras.

2.2. SSCP e sequenciamento

Primeiramente, os amplicons foram submetidos a SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) para identificação de polimorfismos nos marcadores nucleares. Os produtos de PCR foram desnaturados a 95 °C por 5 minutos juntamente com a solução desnaturante (99% formamida, 1% de xileno e 10 mg de azul de bromofenol) na proporção 1:1, rapidamente transferidos para o gelo e em seguida submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. A técnica de SSCP foi realizada utilizando o kit GeneGel Clean SSCP (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. As melhores condições de temperatura, voltagem e tempo de corrida dos géis de SSCP foram determinadas individualmente para cada marcador nuclear (Tabela 2).

Tabela 2. Primers, tamanho dos fragmentos obtidos e condições da SSCP para cada um dos seis marcadores nucleares utilizados para os isolados de *E. oligarthrus* e *E. vogeli*.

Marcador	Tamanho (bp)	Primers	Condições da SSCP
Ag4	139-140	5'-TGACAAACTCTGGGGTA-3' 5'-AGAACCCTAAGAGGACC-3'	12°C; 250V; 2h
E10	193	5'-GGACCCTAAAATTGGTTTCCC-3' 5'-CTTGGATTTTTCCACCAAGAA-3'	20°C; 250V; 2h
Er	233	5'-CGCGACTCAACTGCTGTACTT-3' 5'-GTACCTATCGGGAGATTTCGAA-3'	20°C; 200V; 2:30h
Ir	296	5'-CAGCCTTAAGTCACTGTCCAA-3' 5'-GTTGGGCGAGGAATTAGGAAT-3'	20°C; 200V; 2:30h
P-29	222	5'-CATTGCATCTAAAGTCGTGG-3' 5'-ACATCAGAAGCTTCCGTCAG-3'	20°C; 250V; 2h
Tgf	161-211	5'-CCGAACTGACTTAAACATGTTGG-3' 5'-CACCATGAAAGTTAAAAGTGTGTT-3'	20°C; 200V; 2h

Após a triagem dos diferentes mutantes pela técnica de SSCP (Figura 7), pelo menos cinco isolados representativos de cada um dos genótipos encontrados foram selecionados para sequenciamento. Genótipos heterozigotos do *locus* Tgf, foram confirmados por excisão da banda, purificação e sequenciamento. O heterozigoto do *locus* Ag4 foi confirmado por clonagem e sequenciamento de cada isoforma. Padrões de SSCP iguais sempre apresentaram a mesma sequência nucleotídica. Os produtos de PCR obtidos a partir de isolados de *E. granulosus*, *E. multilocularis* e *E. ortleppi* foram diretamente sequenciados.

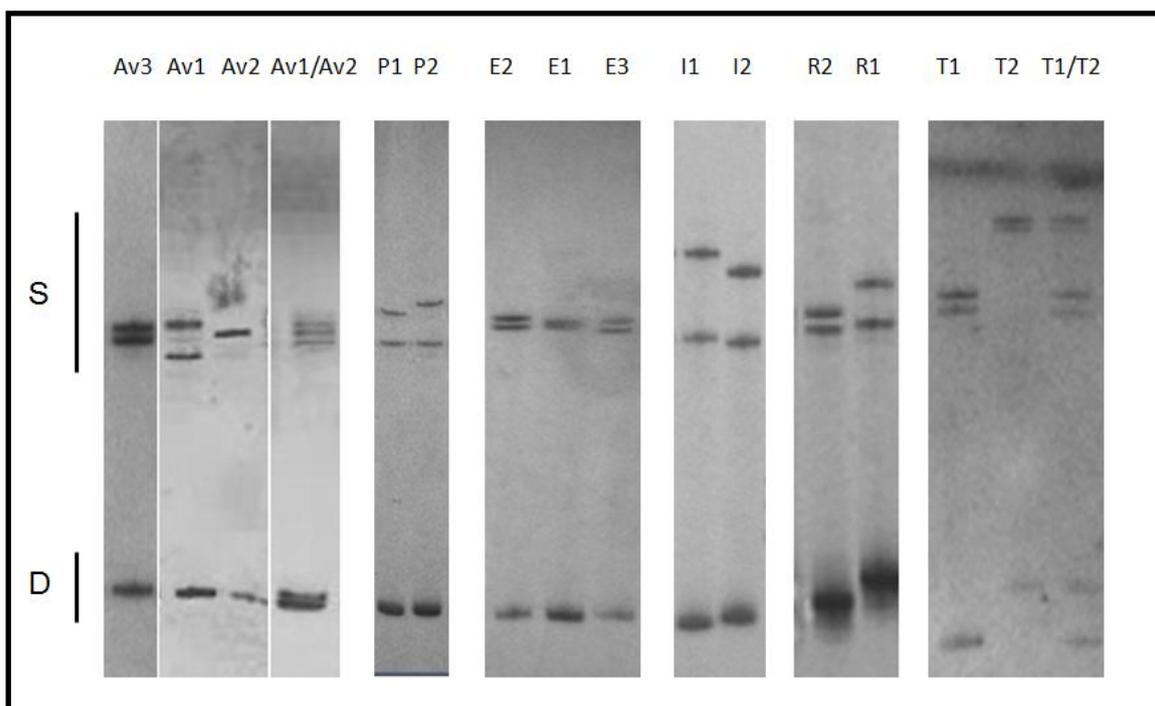


Figura 7. Padrões eletroforéticos dos distintos alelos dos 6 marcadores nucleares. S = bandas formadas pela estrutura secundária da fita simples do DNA. D = fita dupla. Av = Ag4; P = P-29; E = E10; I = Ir; R= Er; T = Tgf.

2.3. Análise *in silico*

As 38 amostras de *E. vogeli* obtidas foram separadas como segue: suprapopulação do Acre, formada pela metapopulação de amostras coletadas no estado do Acre e Amazonas de infecções causadas em animais não humanos (AA) e metapopulação de amostras coletadas no estado do Acre e Amazonas de infecções causadas em humanos (AH), e suprapopulação do Pará, formada pela metapopulação de amostras coletadas no estado do Pará de infecções causadas em animais não humanos (PA) e metapopulação de amostras coletadas no estado do Pará de infecções em humanos (PH). Os quatro isolados de *E. oligarthrus* foram coletados no estado do Pará, mas formam uma população isolada (PO) por pertencerem a uma espécie distinta (Figura 8).

As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa DNASTAR (versão 8.1.3, 2010). Em seguida, as sequências dos seis marcadores nucleares, sem os sítios de “gap”, foram concatenadas (1244 nt), gerando dois haplótipos para cada um dos 45 isolados de *Echinococcus*.

A diversidade nos seis *loci* nucleares e um mitocondrial, para as espécies *E. oligarthrus* e *E. vogeli*, foram estimadas através dos seguintes parâmetros: número de sítios segregantes (S), número de haplótipos (h), diversidade nucleotídica (π) e número médio de diferenças nucleotídicas (Nei & Li, 1979; Nei, 1987), usando o programa DNAsp versão 5.0 (Librado & Rozas, 2009). As diversidades dos haplótipos nucleares e do haplótipo mitocondrial foram calculadas para as suprapopulações e metapopulações predefinidas neste trabalho. Os sítios onde haviam adições/deleções foram removidos.

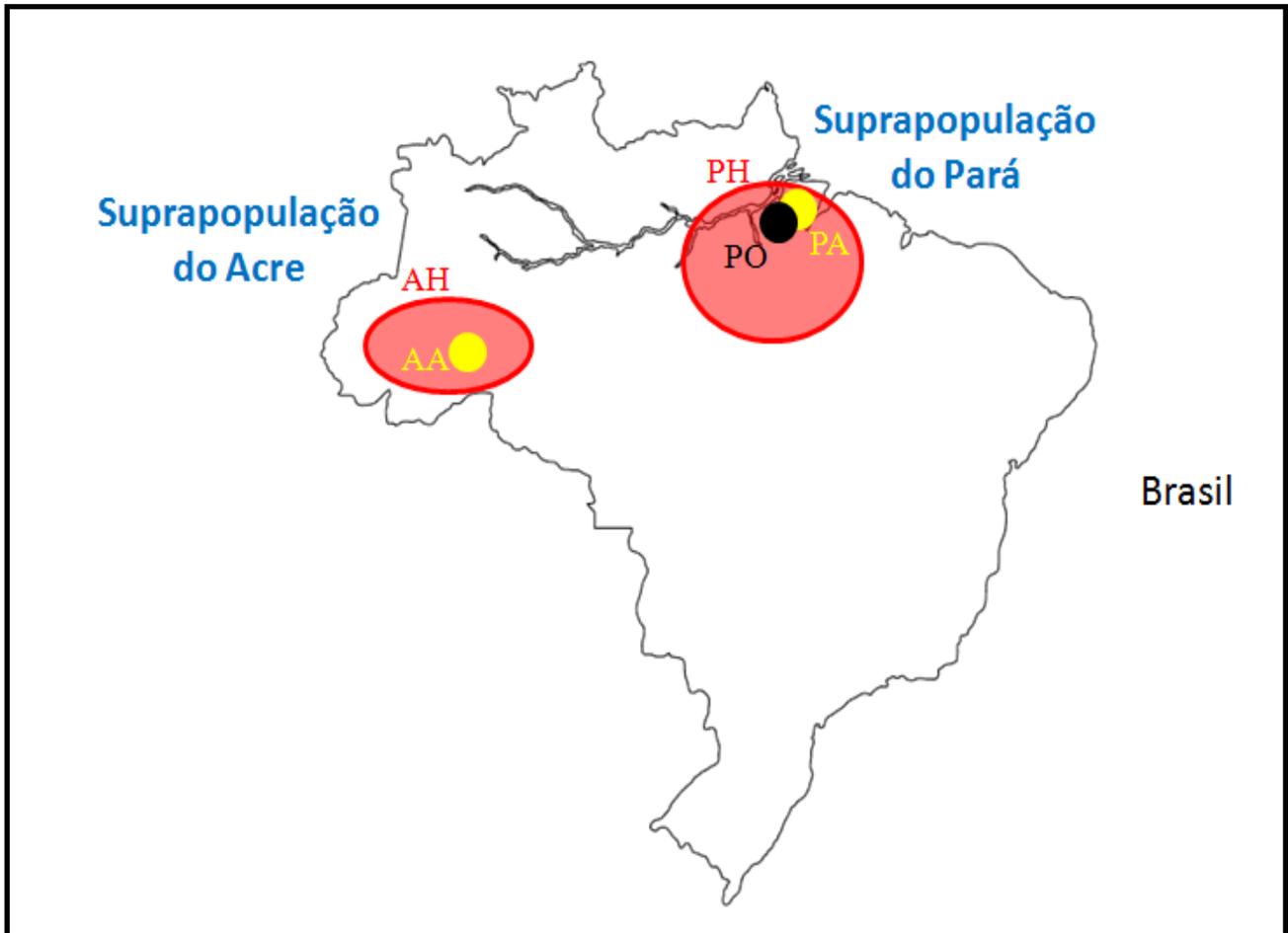


Figura 8. Distribuição das 42 amostras de *Echinococcus* neotropicais. Em vermelho, a localização das metapopulações oriundas de infecções em seres humanos (AH e PH), em amarelo, amostras de infecções em animais não humanos (AA e PA). Em preto, amostras de *E. oligarthrus* (PO). A suprapopulação do Acre é formada por AA e AH e a do Pará por PA e PH.

Foi utilizado o programa Arlequin versão 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) para avaliar o fluxo gênico dos 42 isolados de *Echinococcus* spp. baseado no índice F_{ST} (Reynolds *et al.*, 1983) e a estruturação genética dos 38 isolados de *E. vogeli* baseado na

AMOVA (Análise de Variância Molecular – Excoffier *et al.*, 1992) e índices de fixação (F_{ST} , F_{SC} e F_{CT}) de acordo com os seguintes níveis hierárquicos: (1) dentro das metapopulações; (2) entre as metapopulações (AA = Acre, infecções causadas em animais não humanos, AH = Acre, infecções em seres humanos, PA = Pará, infecções causadas em animais não humanos e PH = Pará, infecções em seres humanos); e (3) entre suprapopulações do Acre e Pará formadas por isolados pertencentes as duas populações de uma mesma área geográfica. Foram utilizadas as sequências nucleares concatenadas e as sequências mitocondriais. Os sítios onde haviam adições/deleções foram removidos.

Foi utilizado o programa Structure versão 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) para elucidar a existência de estruturação entre os isolados de *Echinococcus* neotropicais. Foram utilizadas as populações: AH, AA, PA, PH. Foi gerado o parâmetro K que representa cada um dos “clusters” inferidos. Foram gerados dois conjuntos de dados, o primeiro com K = 4, assumindo-se que cada uma das quatro metapopulações constituem “clusters” distintos, e o segundo com K = 2, assumindo-se que existem dois “clusters”, suprapopulações do Acre e Pará. As estimativas Q (coeficiente estimado de associação de cada indivíduo em cada “cluster”) foram calculadas. O valor de r foi calculado para determinar se a região de amostragem interfere na composição dos genótipos destes parasitos. Valores de r igual ou menor que um indicam influência do local de amostragem sobre a estrutura populacional e/ou estruturação populacional. Foram utilizadas frequências alélicas dos seis marcadores nucleares e do mitocondrial em conjunto para realizar as análises.

A distância evolutiva entre os 11 haplótipos de *E. vogeli* e um de *E. oligarthrus* foi inferida por Neighbor-Joining a partir do fragmento de *cox1* obtido. Foi utilizado o

fragmento de *cox1* de *Taenia mustelae* como grupo externo. A árvore filogenética foi testada com 10.000 replicações e representa a história evolutiva dos isolados analisados. As distâncias evolutivas foram testadas usando o programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

Capítulo 3. Resultados

3.1. Diversidade dos seis *loci* nucleares e um mitocondrial das populações amostradas das espécies *E. oligarthrus* e *E. vogeli*

Os 4 isolados de *E. oligarthrus* possuem apenas um alelo para cada um dos sete *locus* estudados. Os *loci* mais polimórficos encontrados em *E. vogeli* foram Ag4, E10, e Tgf, ambos com dois alelos, enquanto os *loci* Er, Ir e P-29 mostraram-se monomórficos (Figura S1 e Tabela 3). *E. oligarthrus* possui alelos exclusivos para cinco dos seis *loci* nucleares analisados. O alelo T2, do *locus* Tgf, também está presente em seis isolados de *E. vogeli* (Tabela 3). O alelo Av2, do *locus* Ag4, está presente em três isolados, todos pertencentes à suprapopulação do Acre, um deles heterozigoto, já o alelo Av1 é o mais frequente entre os indivíduos analisados de *E. vogeli*. O alelo E1, do *locus* E10, está presente nas duas regiões analisadas, ao contrário do alelo E2 que se restringe a 11 isolados, todos da suprapopulação do Pará (Tabela 3).

Tabela 3. Genótipos dos 38 isolados de *Echinococcus vogeli* e dos 4 isolados de *Echinococcus oligarthrus*, determinados a partir dos padrões de SSCP.

Genótipo	Órgão*	Região*	Hospedeiro*	Loci						n
				Ag4	Eg10	P-29	Ir	Er	Tgf	
p1	F,P,M	A,P	Ta,Pa,H	Av1/Av1	E1/E1	P1/P1	I1/I1	R1/R1	T1/T1	19
p2	F,M	P	Ta,Pa,Cm,H	Av1/Av1	E2/E2	P1/P1	I1/I1	R1/R1	T1/T1	11
p3	F,M	P	H	Av1/Av1	E1/E1	P1/P1	I1/I1	R1/R1	T2/T2	3
p4	F	A,P	Pa	Av2/Av1	E1/E1	P1/P1	I1/I1	R1/R1	T1/T2	2
p5	F	A,Am	Pa,H	Av2/Av2	E1/E1	P1/P1	I1/I1	R1/R1	T1/T1	1
p6	F	A	Pa	Av2/Av2	E1/E1	P1/P1	I1/I1	R1/R1	T1/T2	1
p7	F	A	Pa	Av1/Av2	E1/E1	P1/P1	I1/I1	R1/R1	T1/T1	1
p8	B	P	C	Av3/Av3	E3/E3	P2/P2	I2/I2	R2/R2	T2/T2	4
Total										42

*Órgão: F (fígado), P (pulmão), M (mesentério) e B (baço);

*Região: A (estado do Acre), Am (estado do Amazonas) e P (estado do Pará);

*Hospedeiro: Ta (tatu), C (cutia), Cm (cão do mato), H (humano) e Pa (paca).

Na Tabela 4 estão os índices de diversidade das sequências nos sete *loci* analisados. Os valores de S e π mostram que os *loci* Ag4 e Tgf, os quais possuem 2 alelos em *E. vogeli*, têm maior número de sítios segregantes, 4 e 3, respectivamente, e maior diversidade nucleotídica, 0,028 e 0,018, respectivamente. O *locus* E10 possui apenas um sítio segregante. Os *loci* P-29, Ir, e Er são monomórficos (Tabela 4). O *locus* mitocondrial, *cox1*, possui o maior número de haplótipos, 11, e de sítios segregando, 11. Entretanto sua diversidade nucleotídica é menor que a encontrada nos *loci* Ag4, E10 e Tgf (Figura S2 e Tabela 4).

Tabela 4. Índices de diversidade de sequência de *E. vogeli* e *E. oligarthrus* (valores entre parênteses) em cada um dos *loci* analisados para os 42 espécimes neotropicais de *Echinococcus*.

	<i>Loci</i>						
	Ag4 (140 nt)	E10 (193 nt)	P-29 (222 nt)	Ir (296 nt)	Er (233 nt)	Tgf (160 nt)	Cox1 (366 nt)
Sítios Polimórficos (S)	4 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0)	11 (0)
Número de haplótipos (h)	2 (1)	2 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (1)	11 (1)
Diversidade nucleotídica (π)	0,028 (0)	0,005 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,018 (0)	0,004 (0)
Número médio de diferenças nucleotídicas (k)	4 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0)	1,595 (0)

De maneira geral as suprapopulações do Acre e Pará se equiparam em relação à diversidade (π) e ao número médio de diferenças nucleotídicas (k), uma vez que não há grande discrepância em relação aos valores, tanto para as sequências nucleares, quanto para as mitocondriais. A suprapopulação do Acre possui três haplótipos nucleares e seis mitocondriais, e a do Pará quatro e sete, respectivamente (Tabela 5).

Toda a diversidade nas sequências nucleares da suprapopulação do Acre está restrita às amostras obtidas de animais silvestres (metapopulação AA). No entanto, em relação aos dados mitocondriais, não há grande diferença entre as duas populações, pois ambas têm quatro haplótipos e diversidade nucleotídica de 0,003. (Figura S2 e Tabela 5).

Tabela 5. Índices de diversidade de sequência do concatenado das sequências nucleares (1244 nt) nas metapopulações AA, AH, PA e PH e suprapopulações do Acre e Pará. Os resultados apresentados entre parênteses são referentes aos dados mitocondriais (366 nt).

Populações	<i>n</i>	Sítios Polimórficos (S)	Número de haplótipos (h)	Diversidade nucleotídica (π)	Número médio de diferenças nucleotídicas (k)
AA	7	7 (3)	3 (4)	0.00223 (0.00392)	2.769 (1.381)
AH	9	0 (4)	1 (4)	0 (0.00300)	0 (1.056)
Total	16	7 (5)	3 (6)	0.00117 (0.00341)	1452 (1.200)
PA	12	4 (3)	3 (3)	0.00057 (0.00279)	0.714 (0.985)
PH	10	4 (6)	3 (6)	0.00142 (0.00340)	1.768 (1.200)
Total	22	4 (7)	4 (7)	0.00107 (0.00306)	1.333 (1.078)

O Total representa a referida suprapopulação a que pertencem às populações indicadas.

3.2. Estruturação populacional

O fluxo gênico entre as metapopulações das duas áreas geográficas parece ser restrito, como indicado pelos altos e significativos valores de F_{st} , 0,249 entre PH e AH; 0,199 entre PH e AA; 0,511 entre PA e AH e 0,382 entre PA e AA (Tabela 6). Além disso, o fluxo gênico entre a população PO e as demais populações é restrito (Tabela 6). O mesmo é fortemente corroborado quando os resultados gerados pelas sequências mitocondriais são observados (Tabela 7).

Entretanto, os valores de F_{st} , gerados pelo concatenado nuclear, entre as populações de animais e seres humanos dentro de cada suprapopulação não são concordantes, uma vez que foram encontradas diferenças estatisticamente significantes

entre AH e AA, mas não entre PH e PA (Tabela 6). O mesmo não ocorre com os resultados gerados pelas sequências mitocondriais, já que foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, referentes aos valores de F_{ST} , entre PH e PA, mas não entre AH e AA (Tabela 7).

Tabela 6. Valores de F_{ST} par a par, entre as populações de *Echinococcus* neotropicais, baseado no concatenado de sequências nucleares. AA = Acre, infecções em animais não humanos, AH = Acre, infecções em humanos, PA = Pará, infecções em animais não humanos e PH = Pará, infecções em humanos, PO = Pará, *E. oligarthrus*.

	AH	AA	PH	PA
AH		-	-	-
AA	0,292*		-	-
PH	0,249*	0,199*		-
PA	0,511**	0,382**	0,190 ^{N.S.}	
PO	1**	0,947**	0,960**	0,984**

AH (n=9), AA (n=7), PH (n=10), PA (n=12), PO (n=4).

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

^{N.S.}, não significante.

Tabela 7. Valores de F_{ST} par a par, entre as populações de *Echinococcus* neotropicais, baseado nas sequências de Cox1. AA = Acre, infecções causadas em animais não humanos, AH = Acre, infecções em humanos, PA = Pará, infecções causadas em animais não humanos e PH = Pará, infecções em humanos, PO = Pará, *E. oligarthrus*.

	AH	AA	PH	PA
AH		-	-	-
AA	0,007 ^{N.S.}		-	-
PH	0,282**	0,275*		-
PA	0,524**	0,466**	0,413**	
PO	0,973**	0,968**	0,953**	0,973**

AH (n=9), AA (n=7), PH (n=10), PA (n=12), PO (n=4).

*P < 0.05; **P < 0.01.

N.S., não significante.

A AMOVA revelou que o maior nível de variabilidade genética (69,42%) a partir do concatenado de sequências nucleares e a partir das sequências mitocondriais (59,11%) ocorre dentro das metapopulações (Tabela 8 e Tabela 9). O segundo nível mais significativo de variabilidade genética foi encontrado entre as metapopulações dentro das suprapopulações do Acre e Pará, tanto a partir de dados nucleares (21,52%) quanto a partir de dados mitocondriais (25,30%). A menor porcentagem da variância molecular encontra-se entre as suprapopulações do Acre e Pará, 9,07% a partir de dados nucleares e 15,59% dados mitocondriais (Tabela 8 e Tabela 9). Estes dados são corroborados pelos índices de fixação calculados pela AMOVA (Tabela 10).

Tabela 8. Análise da Variância Molecular (AMOVA) entre os indivíduos de *Echinococcus* neotropicais baseado no concatenado de sequências nucleares. Os dados seguem a estrutura hierárquica definida nos Materiais e Métodos.

Origem da variação	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da Variação
Entre suprapopulações	6,959	0,078	9,07
Entre metapopulações dentro das suprapopulações	8,151	0,185	21,52
Dentro das metapopulações	43,008	0,597	69,42
Total	58,118	0,860	

Tabela 9. Análise da Variância Molecular (AMOVA) entre os indivíduos de *Echinococcus* neotropicais baseado na sequência do marcador mitocondrial. Os dados seguem a estrutura hierárquica definida nos Materiais e Métodos.

Origem da variação	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da Variação
Entre suprapopulações	6,282	0,167	15,59
Entre metapopulações dentro das suprapopulações	6,373	0,272	25,30
Dentro das metapopulações	21,582	0,634	59,11
Total	34,237	1,073	

Tabela 10. Valores do índices de fixação calculados pela AMOVA a partir do concatenado de sequências nucleares e das sequências mitocondriais.

	FST	FSC	FCT
Dados Nucleares	0,305**	0,236**	0,090 ^{N.S.}
Dados Mitocondriais	0,209**	0,408**	0,155 ^{N.S.}

**P < 0.01.

^{N.S.}, não significante

Com o intuito de elucidar se a estruturação populacional dos isolados de *E. vogeli* amostrados na região neotropical é influenciada pela localização geográfica, foi utilizado o programa *Structure*. Foi possível verificar, partindo-se de quatro metapopulações, AA, AH, PA e PH que a constituição genética dos isolados parece ser influenciada pela região de amostragem ($r = 0,307$) (Figura 9). Quando um valor de $K = 2$ é assumido, percebe-se mais claramente que há uma estruturação influenciada pelo local de amostragem ($r = 0,383$). Pode-se inferir que os isolados amostrados no estado do Acre parecem formar um “cluster” distinto. Além disso, é possível verificar, com menos intensidade, que os isolados de *E. vogeli* amostrados no estado do Pará também tendem a constituir um “cluster” único, mas de forma menos uniforme (Figura 9 e Figura 10).

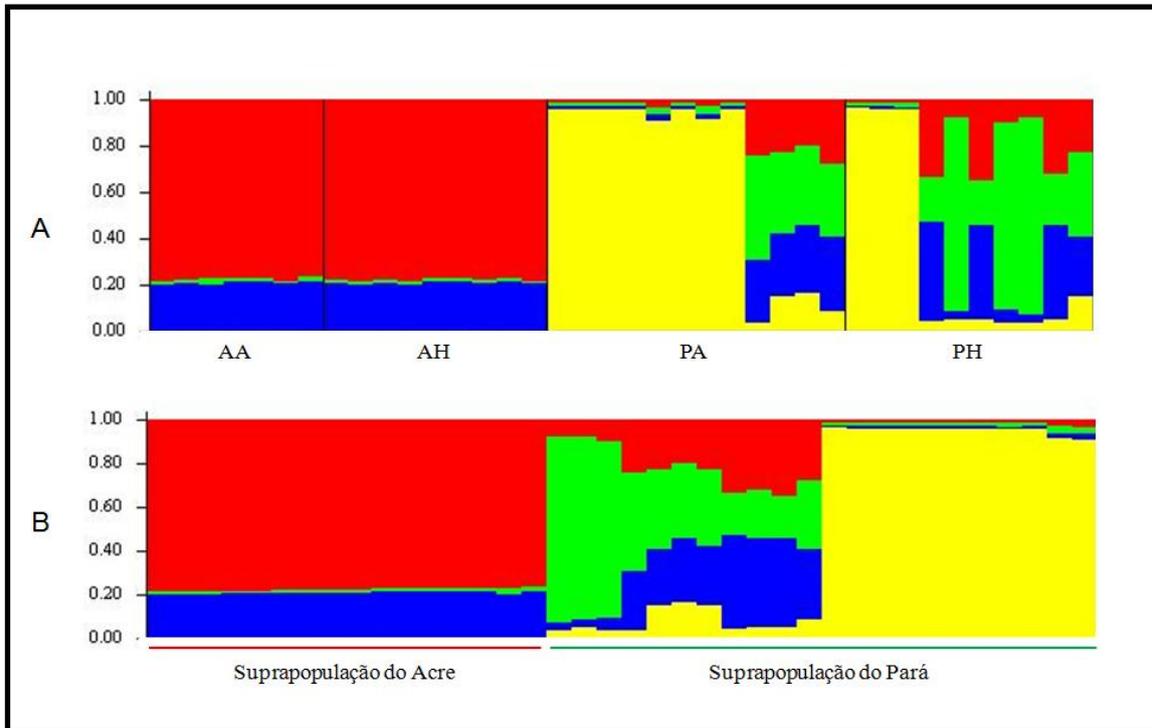


Figura 9. Síntese das estimativas de Q . Cada um dos 38 isolados de *Echinococcus vogeli* está representado por uma única barra na vertical. Os valores da ordenada indicam a proporção de ancestralidade que cada genótipo tem em cada um dos “clusters”, representados por cores distintas ($K = 4$). (A) representa os isolados separados de acordo com as metapopulações. (B) representa os isolados separados de acordo com as suprapopulações.

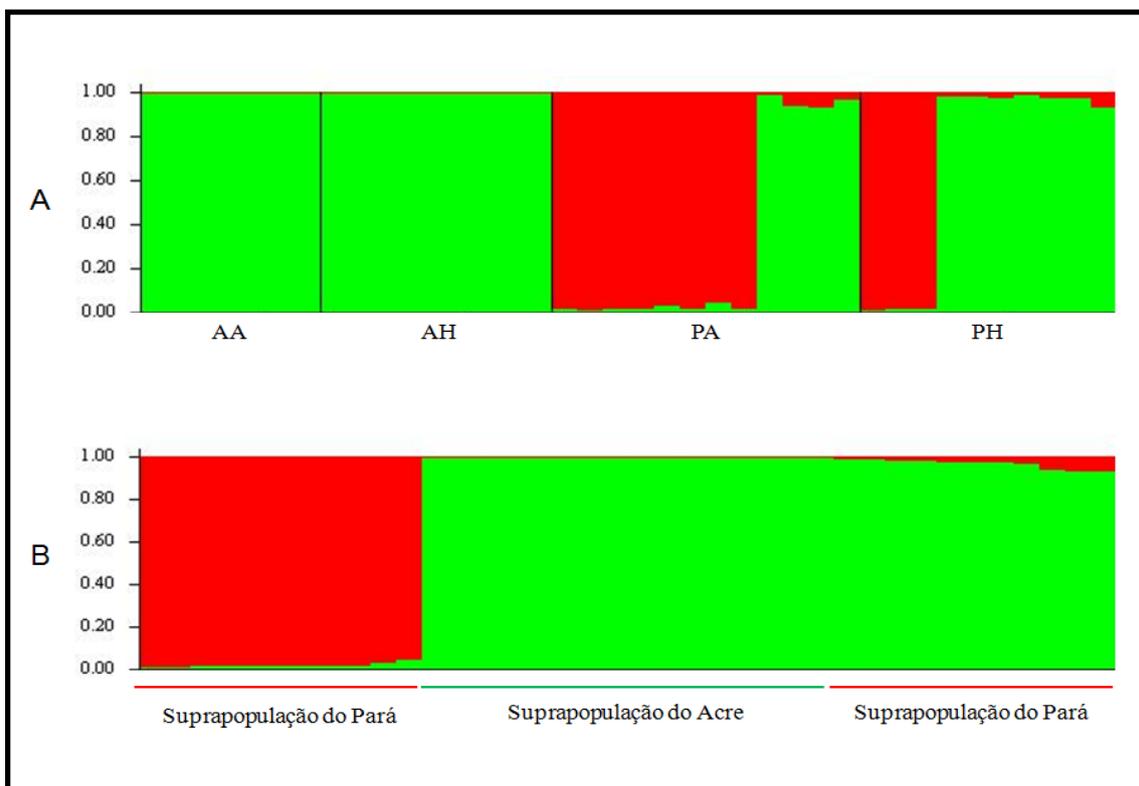


Figura 10. Síntese das estimativas de Q . Cada um dos 38 isolados de *Echinococcus vogeli* está representado por uma única barra na vertical. Os valores da ordenada indicam a proporção de ancestralidade que cada genótipo tem em cada um dos “clusters”, representados por cores distintas ($K = 2$). (A) representa os isolados separados de acordo com as metapopulações. (B) representa os isolados separados em suprapopulações.

3.3. Análise Filogenética

Os resultados da filogenia, inferida por Neighbor-Joining, construída com os dados mitocondriais mostram que os 11 haplótipos mitocondriais constituem um grupo monofilético, divergem pouco uns dos outros e da sequência referência utilizada, o que é corroborado por um valor de “bootstrap” igual a 99 (Figura 11). Os quatro isolados de

E. oligarthrus que possuem o haplótipo O1 formam um único clado independente juntamente com a sequência utilizada como referência (“bootstrap” = 90). Entretanto é possível notar que há uma diferenciação maior entre o haplótipo O1 e a sequência referência de *E. oligarthrus* (Figura 11).

A filogenia confirma a grande diversidade haplotípica encontrada para as populações amazônicas de *E. vogeli*, e sugere que elas formam um grupo monofilético, ou seja, uma origem evolutiva comum, distinta da espécie neotropical *E. oligarthrus*, e das demais espécies do gênero (Figura 11).

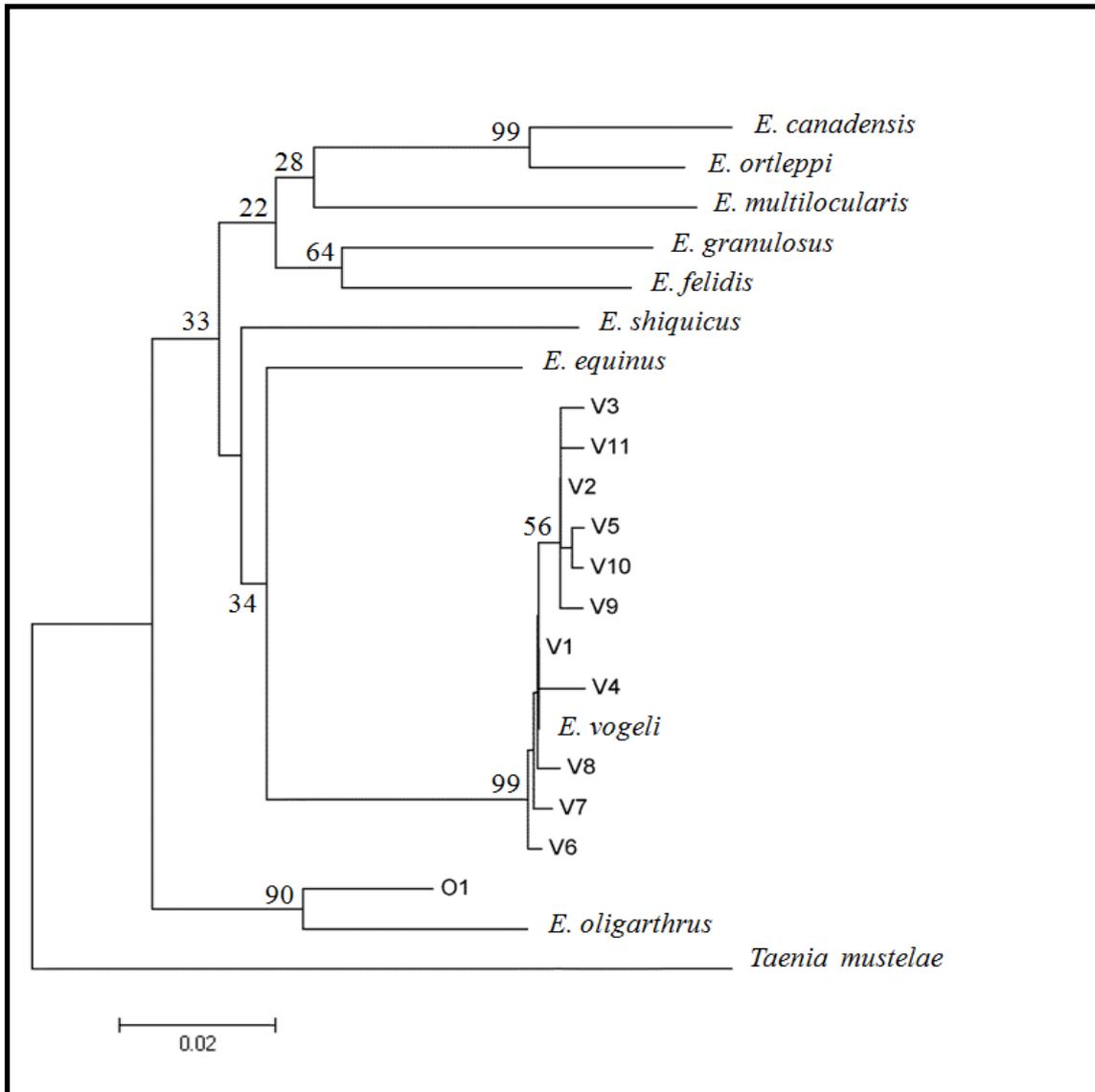


Figura 11. Filogenia dos 11 haplótipos (V1 – V11) de *E. vogeli*, 1 *E. oligarthus* (O1), 1 *E. granulosis*, 1 de *E. multilocularis* e 1 de *E. ortleppi* amostrados neste trabalho. A filogenia foi inferida por Neighbor-Joining utilizando o fragmento de *cox1* (366 nt). Os valores em cada um dos nós são as proporções de “bootstrap”. A barra na filogenia representa o número estimado de substituições. Foram utilizadas as sequências referências: *E. vogeli*, acesso: NC009462.1, *E. oligarthus*, acesso: AB208545.1 e a sequência de *Taenia mustelae*, acesso: EU544563.1 como grupo externo ao gênero *Echinococcus*. Além disso, foram incorporadas a filogenia as sequências de *E. shiquicus*, acesso: JF906151.1, *E. equinus*, acesso: EF143834.1, *E. canadensis*, acesso: AB650535.1 e *E. felidis*, acesso: EF558356.1.

Capítulo 4. Discussão

As análises das regiões codificadoras e não codificadoras do genoma de *E. oligarthrus* e *E. vogeli* revelam interessantes características biológicas e populacionais. Primeiro, existe um alto grau de diferenciação entre as duas espécies neotropicais e entre as espécies *E. granulosus*, *E. multilocularis* e *E. ortleppi*. Entretanto, não foi detectada variabilidade genética dentro da espécie *E. oligarthrus* e a variabilidade genética encontrada em *E. vogeli* parece ser reduzida. Uma situação similar foi encontrada para as espécies *E. multilocularis* (Haag *et al.*, 1997) e em diferentes haplótipos de *E. granulosus* (Haag, *et al.*, 1999), onde baixos valores de diversidade nucleotídica foram encontrados. Segundo, a autofecundação parece ser o sistema de reprodução predominante em *E. vogeli*. Terceiro, parece haver influência da região de amostragem em relação aos diferentes genótipos amostrados.

Nesta amostra de *Echinococcus* de diferentes hospedeiros dos estados do Acre, Amazônia e Pará encontrou-se uma maior prevalência de *Echinococcus vogeli* (90%), sendo que *E. oligarthrus* ocorre em menor prevalência (10%). A espécie *E. vogeli* foi encontrada parasitando três hospedeiros intermediários distintos, paca, tatu e seres humanos e um hospedeiro definitivo, o cão do mato. Os quatro isolados de *E. oligarthrus* foram encontrados em seu hospedeiro intermediário natural, a cutia, o que corrobora dados já publicados (Basset *et al.*, 1998; D'Alessandro, 1997; D'Alessandro & Rausch, 2008).

Estudos anteriores encontraram uma porcentagem de infecção no fígado de 80%, tanto em animais silvestres, quanto em seres humanos (D'Alessandro, 1997;

D'Alessandro & Rausch, 2008). Neste trabalho encontramos uma prevalência de 86% de infecções no fígado, 14% no mesentério (todas em humanos), e 1% no pulmão (provinda de infecção em paca). As quatro infecções causadas pelo *E. oligarthrus* foram encontradas no baço. Do ponto de vista biológico estes dados são importantes, pois, demonstram a plasticidade destes parasitos, e do ponto de vista epidemiológico estes também têm relevância, já que confirmam os possíveis agentes de transmissão da doença para humanos.

Haag *et al.*, (1999) estudaram o padrão de SSCP da região promotora do gene *mdh*, denominada Ag4, somada ao primeiro íntron, que está localizado logo após o primeiro códon, de 110 isolados de *E. granulosus* de diferentes hospedeiros. Foram identificados 6 alelos diferentes, sendo alguns alelos restritos a alguns haplótipos. No presente estudo foram encontrados 3 alelos diferentes e distintos daqueles encontrados nas espécies do sul do Brasil, um deles restrito a espécie *E. oligarthrus*. O gene *Tgf* foi utilizado por Saarma *et al.* (2009) a fim de realizar inferências filogenéticas, e se mostrou muito útil para a diferenciação das espécies do gênero *Echinococcus*. Uma situação similar foi encontrada ao se analisar, pelos padrões de SSCP, o fragmento do gene *Tgf*, que se mostrou polimórfico. Até onde temos conhecimento, este é o primeiro trabalho que utiliza os genes P-29, Ir, Er e E10 como marcadores nucleares para geração de informações a nível populacional. Destacamos aqui o fragmento de E10 que têm ao menos 3 alelos para as espécies neotropicais, dois deles restritos a espécie *E. vogeli*.

Considerar apenas a informação do DNA mitocondrial fornece uma visão limitada da história natural dos organismos (Anderson, 2001). Por isso, novos marcadores nucleares analisados conjuntamente aos mitocondriais serão cruciais na elucidação da dinâmica evolutiva das populações de *Echinococcus*.

De uma forma geral cestóides têm características genéticas que os tornam suscetíveis à formação de linhagens adaptadas a novos hospedeiros e a capacidade do parasito adulto, que é hermafrodita, de realizar autofecundação pode ser vantajosa em infecções com baixa densidade de vermes. Porém a frequência com que isto ocorre na natureza foi ainda pouco mensurada (Smyth and Smyth, 1964; Thompson, 1995).

Os dados aqui apresentados informam para o *locus* Ag4 um heterozigoto que foi encontrado no haplótipo V5. O *locus* Tgf se mostrou polimórfico nas metapopulações de animais do Acre e Pará. Os heterozigotos foram encontrados nos haplótipos V3 e V7. Para o *locus* E10, também polimórfico em *E. vogeli*, não foram encontrados heterozigotos. Quando se analisa os genomas de *E. multilocularis* e *E. granulosus* (disponíveis em <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/Echinococcus>) para os três *loci* mencionados, é possível verificar que os mesmos se encontram em diferentes “contigs”, o que pode ser um indicativo de que estes *loci* estão separados e que a ocorrência de recombinação seria possível entre os mesmos.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem apenas sugerir, de maneira cautelosa, que a autofecundação deve estar atuando nas populações com maior frequência que a fecundação cruzada. Entretanto, sabe-se que no hospedeiro intermediário ocorre reprodução assexuada e proliferação clonal, e que cada um dos proescólices formados tem o potencial de gerar um verme adulto. Ao serem ingeridos pelo hospedeiro definitivo, os protoescólices originarão uma população geneticamente idêntica de vermes no trato digestivo do hospedeiro definitivo. Os parasitos adultos são hermafroditas, e se reproduzem principalmente por autofecundação, embora existam algumas evidências de fertilização cruzada (Thompson & Lymbery, 1996; Lymbery *et al.*, 1997; Haag *et al.*, 1999). Entretanto, dada uma população de vermes adultos no

hospedeiro definitivo, espera-se que a fecundação cruzada ocorra entre genótipos idênticos (geitonogamia), o que, em termos populacionais, equivale à autofecundação (Criscione & Blouin, 2006). Isso poderia estar ocorrendo entre os isolados de *E. vogeli*.

Apesar das evidências que sugerem o cruzamento entre indivíduos de linhagens ou mesmo de espécies diferentes (Thompson & Lymbery, 1996; Lymbery *et al.*, 1997; Haag *et al.*, 1999), as populações das duas espécies neotropicais do Pará de *Echinococcus*, mesmo em simpatria, permanecem bem diferenciadas. Os valores de F_{ST} suportam que as populações das espécies *E. oligarthrus* e *E. vogeli* estão bastante diferenciadas entre si e constituem unidades evolutivas distintas.

O valor de F_{CT} resultou baixo e não significativo, tanto para os dados nucleares quanto para os mitocondriais, sugerindo que a diferenciação entre as suprapopulações do Acre e Pará não é significativa (Tabela 10). Entretanto, parece haver diferenciação significativa tanto entre os haplótipos de metapopulações de distinta suprapopulação, quanto entre os haplótipos de metapopulações distintas de uma mesma suprapopulação, o que é corroborado pelos valores altos e significativos dos índices de fixação, F_{SC} e F_{ST} , encontrados (Tabela 10). Além disso, os resultados obtidos pela AMOVA mostram que a maior parte da variância molecular se encontra dentro das metapopulações e entre as mesmas (Tabela 8 e Tabela 9). Os resultados obtidos através do programa “structure” corroboram estes dados, uma vez que é possível observar tanto para $K = 2$ quanto para $K = 4$ que a suprapopulação do Pará é mais variável, embora um dos genótipos encontrados, o mais frequente em *E. vogeli*, denominado P1, esteja presente em ambas as suprapopulações.

É possível que as metapopulações constituídas por infecções obtidas em seres humanos não sejam “clusters” únicos, o que pode ser observado pelos valores discordantes de F_{ST} , uma vez que foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre AH e AA, para dados nucleares, mas não para dados mitocôndrias. Entre para as metapopulações PH e PA, também foi encontrada discordância, mas desta vez os dados mitocondriais apresentam diferença estatisticamente significativa. Isso poderia estar ocorrendo, pois as metapopulações AH e PH foram amostradas em uma área geográfica maior que as amostras das metapopulações AA e PA (Figura 8).

De forma geral, os valores de F_{ST} entre as metapopulações de *E. vogeli* sugerem que o fluxo gênico não é suficiente para que ocorra a total homogeneização das metapopulações separadas geograficamente (Tabela 6 e Tabela 7).

Foram encontrados três isolados homocigotos (T2/T2) e três heterocigotos (T1/T2) para o *locus* Tgf. Interessantemente o alelo T2 foi encontrado nos quatro isolados de *E. oligarthrus* analisados. Não podemos determinar se este é de fato um indício de introgressão gênica ou um gene ancestral entre as duas espécies. De qualquer maneira, a diversidade nuclear é importante, pois, em hospedeiros definitivos recém infectados, há uma grande liberação de ovos, enquanto que nos animais em que a infecção já está estabelecida há mais tempo, há a liberação de poucos ovos (Torgerson, 2006). Sendo assim, hospedeiros definitivos recém infectados poderiam aumentar rapidamente a quantidade, no ambiente, de ovos de genótipos novos, isto traria consequências importantes para o controle da doença, pois combinações gênicas vantajosas se dispersariam rapidamente entre os hospedeiros.

A filogenia inferida por Neighbor-Joining utilizando o fragmento de *cox1* revela que os 11 distintos haplótipos de *E. vogeli* caracterizados neste trabalho constituem um grupo monofilético, oriundos de um único ancestral em comum. O mesmo ocorre com o haplótipo de *E. oligarthrus*, encontrado nos quatro isolados, que também constitui um grupo monofilético com a sequência referência, acesso: AB208545.1. Estes resultados confirmam que as espécies neotropicais *E. oligarthrus* e *E. vogeli* são unidades evolutivas distintas.

Perspectivas

- 1) Devido ao pouco conhecimento que se tem a respeito das espécies *E. oligarthrus* e *E. vogeli*, seria importante aumentar o número de isolados amostrados, principalmente visando à coleta em locais diferentes dos apresentados neste trabalho. É possível que a distribuição das espécies neotropicais se estenda até a região sul do Brasil.
- 2) Investigar de forma profunda, com a construção de novos marcadores nucleares, o possível indício de introgressão gênica, pois se o mesmo ocorre é provável que em algum momento as espécies *E. oligarthrus* e *E. vogeli* compartilham seu hospedeiro definitivo. Este conhecimento contribuiria tanto para o entendimento de processos ligados à plasticidade do genoma destes organismos, quanto para o melhor manejo desta parasitose.

Referências Bibliográficas

- Anderson, T. J. (2001). The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. *Trends in Parasitology*, *17*, 183-8.
- 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. *Experimental Parasitology*, *119*, 453-9.
- Basset, D., Girou, C., Nozais, I. P., D'Hermies, F., Hoang, C., Gordon, R., D'Alessandro, A. (1998). Neotropical echinococcosis in Suriname: *Echinococcus oligarthrus* in the orbit and *Echinococcus vogeli* in the abdomen. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *59*, 787-90.
- Bowles, J., Blair, D., McManus, D. P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *54*, 165-174.
- Criscione, C. D. & Blouin, M. S. (2006). Minimal selfing, few clones, and no among-host genetic structure in a hermaphroditic parasite with asexual larval propagation. *International Journal of Organic Evolution*, *60*, 553-62.
- D'Alessandro, A. (1997). Polycystic echinococcosis in tropical America: *Echinococcus vogeli* and *E. oligarthrus*. *Acta Tropica*, *47*, 43-65.
- D'Alessandro, A., Rausch, R. L., Cuello, C., Aristizabal, N. (1979). *Echinococcus vogeli* in man, with a review of polycystic hydatid disease in Colombia and neighboring countries. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *28*, 303-17.
- D'Alessandro, A., & Rausch, R. L. (2008). New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *21*, 380-401.

- D'Alessandro, A., Rausch, R. L., Morales, G. A., Collet, S., Angel, D. (1981). *Echinococcus* infections in Colombian animals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30, 1263-76.
- Esch, G. W. & Fernandez, J. C. (1975). A Functional Biology of Parasitism: Ecological and evolutionary implications - *Functional Biology Series*. Springer edition.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-91.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10, 564-567.
- Haag, K. L., Zaha, A., Araújo, A. M., Gottstein, B. (1997). Reduced genetic variability in coding and non-coding regions of *Echinococcus multilocularis* genome. *Parasitology*, 115, 521-530.
- Haag, K. L., Araújo, M., Gottstein, B., Siles-Lucas, M., Thompson, R. C., Zaha, A. (1999). Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology*, 118, 63-71.
- Hajibabael, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23, 167-172.
- Harris, A., Heath, D. D., Lawrence, S. B., Shaw, R. J. (1989). *Echinococcus granulosus*: ultrastructure of epithelial changes during the first 8 days of metacestode development in vitro. *International Journal for Parasitology*, 19, 621-629.
- Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA. *PCR Methods And Applications*, 34-38.

- Hayashi, K. (1992). PCR-SSCP-rapid and easy detection of DNA-sequence changes. *Human Cell : Official Journal of Human Cell Research Society*, 5, 180-4.
- Hayashi, K. and Yandell, D. W. (1993). How sensitive is PCR-SSCP? *Human Mutation*, 2, 338-46.
- Howard, E.B. and Gendron, A.P., (1980). *Echinococcus vogeli* infection in higher primates at the Los Angeles Zoo. *The Smithsonian Society*,4, 379-382.
- Hüttner, M., Nakao, M., Wassermann, T., Siefert, L., Boomker, J. D., Dinkel, A., Sako, Y., Mackenstedt, U., Roming, T., Ito, A. (2008). Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *International Journal Parasitology*, 38, 861-868.
- Innis, M. A. and Gelfand, D. H. (1990). Optimization of PCRs. In PCR protocols. *Academic Press*, 3-12.
- Knapp, J., Chirica, M., Simonnet, C., Grenouillet, F., Bart, J. M., Sako, Y., Itoh, S., Nakao, M., Ito, A., Laurence, M. (2009). *Echinococcus vogeli* infection in a hunter, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 2029-31.
- Librado, P. and Rozas, J. (2003). DnaSP v5, A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 2496-7.
- Lopera, R. D., Meléndez, R. D., Fernandez, I., Sirit, J., Perera, M. P. (1989). Orbital hydatid cyst of *Echinococcus oligarthrus* in a human in Venezuela. *The Journal of Parasitology*, 75, 467-70.
- Lymbery, A. J., Constantine, C. C.,Thompson, R. C. (1997). Self-fertilization without genomic or population structuring in a parasitic tapeworm. *Evolution*, 289.
- McManus, D. P. and Thompson, R. C. (2003). Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology*, 127, 37-51.

- McManus, D. P. & Simpson, A. J. (1985). Identification of the *Echinococcus* (hydatid disease) organisms using cloned DNA markers. *Molecular Biochemical Parasitology*, *17*, 171-178.
- Meneghelli, U. G., Martinelli, A. L., Bellucci, A. D., Villanova, M. G., Velludo, M. A., Magro, J. E. (1992). Polycystic hydatid disease (*Echinococcus vogeli*): Treatment with albendazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, *86*, 151-6.
- Moro, P. L., Schantz, P. M. (2009). Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases*. *13*, 125-133.
- Murthy, R., Honavar, S. G., Vemuganti, G. K., Naik, M., Burman, S. (2005). Polycystic echinococcosis of the orbit. *American journal of ophthalmology*, *140*, 561-3.
- 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*, 713-722.
- Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. *Columbia University Press*, 512.
- Nei, M. & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS*, *76*, 5269-73.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, *5*, 874-9.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, *155*, 945-959.
- Rausch, R. L. and Bernstein, J. J. (1972). *Echinococcus vogeli* sp. n. (Cestoda: Taeniidae) from the bush dog, *Spheothos venaticulus* (Lund). *Parasitology*, *23*, 25-34.

- Rausch, R. L., D'Alessandro, A., Rausch, V. R. (1981). Characteristics of the larval *Echinococcus vogeli* Rausch and Bernstein, 1972 in the natural intermediate host, the paca, *Cuniculus paca* (Rodentia: Dasyproctidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 30, 1043-52.
- Rausch, R. L., Rausch, V. R., D'Alessandro, A. (1978). Discrimination of the larval stages of *Echinococcus oligarthrus* (Diesing, 1863) and *E. vogeli* Rausch and Bernstein, 1972 (Cestoda: Taeniidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 27, 1195-1202.
- Reynolds, J., Weir, B. S., Cockerham, C. C. (1983). Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105, 767-779.
- Ruffié, J. O Polimorfismo das populações - Tratado do ser vivo. (1982). *Editora Fragmentos*, 1-166.
- Saarma, U., Jõgisalu, I., Moks, E., Varcasia, A., Lavikainen, A., Oksanen, A., Simsek, S., Andresiuk, V., Denegri, G., González, L. M., Ferrer, E., Gárate, T., Rinaldi, L., Maravilla, P. (2009). A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology*, 136, 317-28.
- Simsek, S., Balkaya, I., Koroglu, E. (2010). Epidemiological survey and molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in cattle in an endemic area of eastern Turkey. *Veterinary Parasitology*, 172, 347-9.
- Siqueira, N. G., Almeida, F. B., Suzuki, Y. C., Lima, R. N., Machado-Silva, J. R., Rodrigues-Silva, R. (2010). Atypical polycystic echinococcosis without liver involvement in Brazilian patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104, 230-3.
- Smyth, J. D. & Smyth, M. M. (1964). Natural and experimental hosts of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*, with comments on the genetics and speciation in the genus *Echinococcus*. *Parasitology*, 54, 493-514.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.
- Tappe, D., Stich, A., Frosch, M. (2008). Emergence of polycystic neotropical echinococcosis. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 292-7.
- Thompson, R. C. (1995). Biology and systematics of *Echinococcus*. In: Thompson R. C., Lymbery A. J., editors. *Echinococcus and hydatid disease*. London: CAB International, 1-37.
- Thompson, R. C. & Lymbery, A. J. (1996). Genetic variability in parasites and host-parasite interactions. *Parasitology*, 112, 7-22.
- Torgerson, P. R. (2006). Canid immunity to *Echinococcus* spp.: impact on transmission. *Parasite Immunology*, 28, 295-303.
- Torgerson, P. R. & Budke, C. M. (2003). Echinococcosis – an international public health challenge. *Research in Veterinary Science*, 74, 191-202.
- Torgerson, P. R. & Heath, D. D. (2003). Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 127, 143-158.
- Xiao, N., Qiu, J., Nakao, M., Li, T., Yang, W., Chen, X., Schantz, P. M., Craig, P. S., Ito, A. (2005). *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *International Journal for Parasitology*, 35, 693-701.

Anexos

```

Av1 : TGACAAACTCTGGGGTATATAATCGGCCCTCCGTCGCCGCCCTTGTCTTTTCGACAGCTTGCCTCCGTATGGTAGGTTGGGGTGTCTGTCTCTATTACCCACT : 108
Av2 : TGACAAACTCTGGGGTATATAATCGGCCCTCCGTCGCCGCCCTTGTCTTTTCGACAGCTTGCCTCCGTATGGTAGGTTGGGGTGTCTGTCTCTATTACCCACT : 108
Av3 : TGACAAACTCTGGGGTATATAATCGGCCCTCCGTCGCCGCCCTTGTCTTTTCGACAGCTTGCCTCCGTATGGTAGGTTGGGGTGTCTGTCTCTATTACCCACT : 107
E.ortleppi : TGACAAACTCTGGGGTATATAATCGGCCCTCCGTCGCCGCCCTTGTCTTTTCGACAGCTTGCCTCCGTATGGTAGGTTGGGGTGTCTGTCTCTATTACCCACT : 108
E.granulos : TGACAAACTCTGGGGTATATAATCGGCCCTCCGTCGCCGCCCTTGTCTTTTCGACAGCTTGCCTCCGTATGGTAGGTTGGGGTGTCTGTCTCTATTACCCACT : 108
E.multiloc : TGACAAACTCTGGGGTATATAATCGGCCCTCCGTCGCCGCCCTTGTCTTTTCGACAGCTTGCCTCCGTATGGTAGGTTGGGGTGTCTGTCTCTATTACCCACT : 107
TGACAAACTCTGGGGTATATAATCGGCCCTCCGTCGCCGCCCTTGTCTTTTCGACAGCTTGCCTCCGTATGGTAGGTTGGGGTGTCTGTCTCTATTACCCACT

```

```

Av1 : GATTTGCTTTAGCCTGGTCCCTCTTAGGGTTCT : 140
Av2 : GATTTGCTTTAGCCTGGTCCCTCTTAGGGTTCT : 140
Av3 : GATTTGCTTTAGCCTGGTCCCTCTTAGGGTTCT : 139
E.ortleppi : GATTTGCTTTAGCCTGGTCCCTCTTAGGGTTCT : 140
E.granulos : GATTTGCTTTAGCCTGGTCCCTCTTAGGGTTCT : 140
E.multiloc : GATTTGCTTTAGCCTGGTCCCTCTTAGGGTTCT : 139
ATTTCCTTAGCCTGGTCCCTCTTAGGGTTCT

```

```

E1 : GGACCCATAAAATGGGTTTCCCTGGTCGGGAAATTCGAAATCTCTCTTTTCAGACAAAGAGTTCATCATCAAACCGGCAGACAAAGTCCGCAAAGGTTTTTTTCCAGAT : 108
E2 : GGACCCATAAAATGGGTTTCCCTGGTCGGGAAATTCGAAATCTCTCTTTTCAGACAAAGAGTTCATCATCAAACCGGCAGACAAAGTCCGCAAAGGTTTTTTTCCAGAT : 108
E3 : GGACCCATAAAATGGGTTTCCCTGGTCGGGAAATTCGAAATCTCTCTTTTCAGACAAAGAGTTCATCATCAAACCGGCAGACAAAGTCCGCAAAGGTTTTTTTCCAGAT : 108
E.ortleppi : GGACCCATAAAATGGGTTTCCCTGGTCGGGAAATTCGAAATCTCTCTTTTCAGACAAAGAGTTCATCATCAAACCGGCAGACAAAGTCCGCAAAGGTTTTTTTCCAGAT : 108
E.granulos : GGACCCATAAAATGGGTTTCCCTGGTCGGGAAATTCGAAATCTCTCTTTTCAGACAAAGAGTTCATCATCAAACCGGCAGACAAAGTCCGCAAAGGTTTTTTTCCAGAT : 108
E.multiloc : GGACCCATAAAATGGGTTTCCCTGGTCGGGAAATTCGAAATCTCTCTTTTCAGACAAAGAGTTCATCATCAAACCGGCAGACAAAGTCCGCAAAGGTTTTTTTCCAGAT : 108
GGACCCATAAAATGGGTTTCCCTGGTCGGGAAATTCGAAATCTCTCTTTTCAGACAAAGAGTTCATCATCAAACCGGCAGACAAAGTCCGCAAAGGTTTTTTTCCAGAT

```

```

E1 : GCTTGTTCGACTAAATTTTCACTAAGCCCTACCTAAAACCTTTCTTTCACTTTCGAGGATTTTTCTTCTTGGTGGAAAAATCCAAG : 193
E2 : GCTTGTTCGACTAAATTTTCACTAAGCCCTACCTAAAACCTTTCTTTCACTTTCGAGGATTTTTCTTCTTGGTGGAAAAATCCAAG : 193
E3 : GCTTGTTCGACTAAATTTTCACTAAGCCCTACCTAAAACCTTTCTTTCACTTTCGAGGATTTTTCTTCTTGGTGGAAAAATCCAAG : 193
E.ortleppi : GCTTGTTCGACTAAATTTTCACTAAGCCCTACCTAAAACCTTTCTTTCACTTTCGAGGATTTTTCTTCTTGGTGGAAAAATCCAAG : 193
E.granulos : GCTTGTTCGACTAAATTTTCACTAAGCCCTACCTAAAACCTTTCTTTCACTTTCGAGGATTTTTCTTCTTGGTGGAAAAATCCAAG : 191
E.multiloc : GCTTGTTCGACTAAATTTTCACTAAGCCCTACCTAAAACCTTTCTTTCACTTTCGAGGATTTTTCTTCTTGGTGGAAAAATCCAAG : 193
GCTTGTTCGACTAAATTTTCACTAAGCCCTACCTAAAACCTTTCTTTCACTTTCGAGGATTTTTCTTCTTGGTGGAAAAATCCAAG

```

```

R1 : CGCGACTCAACTGCTGTACTTTTAAAAACTTTAAAGATCAGTTTCCATGTATTTTTCCACAATGTAAGTAAATCACAAGAAAAGTCCCTTACACTTCCTTCATA : 108
E2 : CGCGACTCAACTGCTGTACTTTTAAAAACTTTAAAGATCAGTTTCCATGTATTTTTCCACAATGTAAGTAAATCACAAGAAAAGTCCCTTACACTTCCTTCATA : 108
E.ortleppi : CGCGACTCAACTGCTGTACTTTTAAAAACTTTAAAGATCAGTTTCCATGTATTTTTCCACAATGTAAGTAAATCACAAGAAAAGTCCCTTACACTTCCTTCATA : 108
E.granulos : CGCGACTCAACTGCTGTACTTTTAAAAACTTTAAAGATCAGTTTCCATGTATTTTTCCACAATGTAAGTAAATCACAAGAAAAGTCCCTTACACTTCCTTCATA : 108
E.multiloc : CGCGACTCAACTGCTGTACTTTTAAAAACTTTAAAGATCAGTTTCCATGTATTTTTCCACAATGTAAGTAAATCACAAGAAAAGTCCCTTACACTTCCTTCATA : 108
CGCGACTCAACTGCTGTACTTTTAAAAACTTTAAAGATCAGTTTCCATGTATTTTTCCACAATGTAAGTAAATCACAAGAAAAGTCCCTTACACTTCCTTCATA

```

```

R1 : TCCTCAAAATTTGACGTTGTAAAACATCGTACAGTGAATAATCTAAGAAATACCAGAAAAACAATTA AAAACATACGTTCTCGTGGTCTAAACGACTAAGGATTCC : 216
E2 : TCCTCAAAATTTGACGTTGTAAAACATCGTACAGTGAATAATCTAAGAAATACCAGAAAAACAATTA AAAACATACGTTCTCGTGGTCTAAACGACTAAGGATTCC : 216
E.ortleppi : TCCTCAAAATTTGACGTTGTAAAACATCGTACAGTGAATAATCTAAGAAATACCAGAAAAACAATTA AAAACATACGTTCTCGTGGTCTAAACGACTAAGGATTCC : 216
E.granulos : TCCTCAAAATTTGACGTTGTAAAACATCGTACAGTGAATAATCTAAGAAATACCAGAAAAACAATTA AAAACATACGTTCTCGTGGTCTAAACGACTAAGGATTCC : 216
E.multiloc : TCCTCAAAATTTGACGTTGTAAAACATCGTACAGTGAATAATCTAAGAAATACCAGAAAAACAATTA AAAACATACGTTCTCGTGGTCTAAACGACTAAGGATTCC : 216
TCCTCAAAATTTGACGTTGTAAAACATCGTACAGTGAATAATCTAAGAAATACCAGAAAAACAATTA AAAACATACGTTCTCGTGGTCTAAACGACTAAGGATTCC

```

```

R1 : AATCTCCCGATAGGTAC : 233
E2 : AATCTCCCGATAGGTAC : 233
E.ortleppi : AATCTCCCGATAGGTAC : 233
E.granulos : AATCTCCCGATAGGTAC : 233
E.multiloc : AATCTCCCGATAGGTAC : 233
AATCTCCCGATAGGTAC

```

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
I1      : CAGCCTTAAGTCACTGTCCAAACTGAAGGACTGCTTCTCTGTACCAGACCTTTACATCTCCATTCATGAGGGCGATACGGGTAGTGTATTCTTGAGTCTCAGACGTGT : 108
I2      : CAGCCTTAAGTCACTGTCCAAACTGAAGGACTGCTTCTCTGTACCAGACCTTTACATCTCCATTCATGAGGGCGATACGGGTAGTGTATTCTTGAGTCTCAGACGTGT : 108
E.ortleppi : CAGCCTTAAGTCACTGTCCAAACTGAAGGACTGCTTCTCTGTACCAGACCTTTACATCTCCATTCATGAGGGCGATACGGGTAGTGTATTCTTGAGTCTCAGACGTGT : 108
E.granulos : CAGCCTTAAGTCACTGTCCAAACTGAAGGACTGCTTCTCTGTACCAGACCTTTACATCTCCATTCATGAGGGCGATACGGGTAGTGTATTCTTGAGTCTCAGACGTGT : 108
I.multiloc : CAGCCTTAAGTCACTGTCCAAACTGAAGGACTGCTTCTCTGTACCAGACCTTTACATCTCCATTCATGAGGGCGATACGGGTAGTGTATTCTTGAGTCTCAGACGTGT : 108

```

```

      *      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *
I1      : TTACCCAGCCCGGTACATTTGTCTATTATTCTACTATCTAGTCTGTATACAGCAGCAATTCGATGAGGCTTTTTTCGAGTCTGCGGGAGGTTGAAGATCAAGGTTG : 216
I2      : TTACCCAGCCCGGTACATTTGTCTATTATTCTACTATCTAGTCTGTATACAGCAGCAATTCGATGAGGCTTTTTTCGAGTCTGCGGGAGGTTGAAGATCAAGGTTG : 216
E.ortleppi : TTACCCAGCCCGGTACATTTGTCTATTATTCTACTATCTAGTCTGTATACAGCAGCAATTCGATGAGGCTTTTTTCGAGTCTGCGGGAGGTTGAAGATCAAGGTTG : 216
E.granulos : TTACCCAGCCCGGTACATTTGTCTATTATTCTACTATCTAGTCTGTATACAGCAGCAATTCGATGAGGCTTTTTTCGAGTCTGCGGGAGGTTGAAGATCAAGGTTG : 216
I.multiloc : TTACCCAGCCCGGTACATTTGTCTATTATTCTACTATCTAGTCTGTATACAGCAGCAATTCGATGAGGCTTTTTTCGAGTCTGCGGGAGGTTGAAGATCAAGGTTG : 216

```

```

      220      *      240      *      260      *      280      *
I1      : TTCGGGCAACAGCTCTCACTTCTCTTGCCCTTCTCCGCCACGTCAAACGCATCAACACCATTCTTAATTCCTCGCCCAAC : 296
I2      : TTCGGGCAACAGCTCTCACTTCTCTTGCCCTTCTCCGCCACGTCAAACGCATCAACACCATTCTTAATTCCTCGCCCAAC : 296
E.ortleppi : TTCGGGCAACAGCTCTCACTTCTCTTGCCCTTCTCCGCCACGTCAAACGCATCAACACCATTCTTAATTCCTCGCCCAAC : 296
E.granulos : TTCGGGCAACAGCTCTCACTTCTCTTGCCCTTCTCCGCCACGTCAAACGCATCAACACCATTCTTAATTCCTCGCCCAAC : 296
I.multiloc : TTCGGGCAACAGCTCTCACTTCTCTTGCCCTTCTCCGCCACGTCAAACGCATCAACACCATTCTTAATTCCTCGCCCAAC : 296

```

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
P1      : CATTCGATCTAAAGTCTGGATGCTTTCCAGAAGAATAAGGAGAAGATTACTACTACCGACAAACTGGGTACTGCTCTCGAGCAGGTTGCTTCCCAATCAGAAAAGGC : 108
P2      : CATTCGATCTAAAGTCTGGATGCTTTCCAGAAGAATAAGGAGAAGATTACTACTACCGACAAACTGGGTACTGCTCTCGAGCAGGTTGCTTCCCAATCAGAAAAGGC : 108
E.ortleppi : CATTCGATCTAAAGTCTGGATGCTTTCCAGAAGAATAAGGAGAAGATTACTACTACCGACAAACTGGGTACTGCTCTCGAGCAGGTTGCTTCCCAATCAGAAAAGGC : 108
E.granulos : CATTCGATCTAAAGTCTGGATGCTTTCCAGAAGAATAAGGAGAAGATTACTACTACCGACAAACTGGGTACTGCTCTCGAGCAGGTTGCTTCCCAATCAGAAAAGGC : 108
E.multiloc : CATTCGATCTAAAGTCTGGATGCTTTCCAGAAGAATAAGGAGAAGATTACTACTACCGACAAACTGGGTACTGCTCTCGAGCAGGTTGCTTCCCAATCAGAAAAGGC : 108

```

```

      *      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *
P1      : AGCTCCCCAAGCTTTGTATGTAACCTCTAGTTTAAACAAGGACCCCTTTTCATTTTGGCTCTGTCATCCATCCCTTTTATATCGGTTTATAGCTAAAAATGCTGACGGAAGCT : 214
P2      : AGCTCCCCAAGCTTTGTATGTAACCTCTAGTTTAAACAAGGACCCCTTTTCATTTTGGCTCTGTCATCCATCCCTTTTATATCGGTTTATAGCTAAAAATGCTGACGGAAGCT : 214
E.ortleppi : AGCTCCCCAAGCTTTGTATGTAACCTCTAGTTTAAACAAGGACCCCTTTTCATTTTGGCTCTGTCATCCATCCCTTTTATATCGGTTTATAGCTAAAAATGCTGACGGAAGCT : 213
E.granulos : AGCTCCCCAAGCTTTGTATGTAACCTCTAGTTTAAACAAGGACCCCTTTTCATTTTGGCTCTGTCATCCATCCCTTTTATATCGGTTTATAGCTAAAAATGCTGACGGAAGCT : 215
E.multiloc : AGCTCCCCAAGCTTTGTATGTAACCTCTAGTTTAAACAAGGACCCCTTTTCATTTTGGCTCTGTCATCCATCCCTTTTATATCGGTTTATAGCTAAAAATGCTGACGGAAGCT : 215

```

```

      220
P1      : TCTGATGT : 222
P2      : TCTGATGT : 222
E.ortleppi : TCTGATGT : 221
E.granulos : TCTGATGT : 223
E.multiloc : TCTGATGT : 223

```

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
T1      : CCGAACTGACTTAAACATGTTGGAATTGTACATCACTTTGGGCAGTGTGAGGGGCGGAACGGCACTTTTCATATTGCAGATAACTTGCCTCA~~~~~TTTA : 95
T2      : CCGAACTGACTTAAACATGTTGGAATTGTACATCACTTTGGGCAGTGTGAGGGGCGGAACGGCACTTTTCATATTGCAGATAACTTGCCTCA~~~~~TTTA : 95
E.ortleppi : CCGAACTGACTTAAACATGTTGGAATTGTACATCACTTTGGGCAGTGTGAGGGGCGGAACGGCACTTTTCATATTGCAGATAACTTGCCTCA~~~~~TTTA : 108
E.granulos : CCGAACTGACTTAAACATGTTGGAATTGTACATCACTTTGGGCAGTGTGAGGGGCGGAACGGCACTTTTCATATTGCAGATAACTTGCCTCA~~~~~TTTA : 95
E.multiloc : CCGAACTGACTTAAACATGTTGGAATTGTACATCACTTTGGGCAGTGTGAGGGGCGGAACGGCACTTTTCATATTGCAGATAACTTGCCTCA~~~~~TTTA : 95
          CCGAACTGACTTAAACATGTTGGAATTGTACATCACTTTGGGCAGTGTGAGGGGCGGAACGGCACTTTTCATATTGCAGATAACTTGCCTCA~~~~~TTTA

      *      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *
T1      : AACACCTGCATTTCTAGGCTTCAC~~~~~ATTCATTTGTTTAGAT~~~~~AAAACACACTTTTAA : 150
T2      : AACACCTGCATTTCTAGGTTTCACATCCCTGGTTTTAGTAACACCTAGATTCACCTACGCTCTCTGTGTTATGTAATTCATTTGTTTAGAT~~~~~AAAACACACTTTTAA : 200
E.ortleppi : AACACCTGCATTTCTAGGTTTCACATCCCTGGTTTTAGTAACACCTAGATTCACCTACGCTCTCTGTGCTATATGAATTC~~~~~GTTTAGAT~~~~~AAAACACACTTTTAA : 212
E.granulos : AACACCTGCATTTCTAGGTTTCACATCCCTGGTTTTAGTAACACCTAGATTCACCTACGCTCTCTGTGTTATATGAATTCATTTGTTTAGAT~~~~~AAAACACACTTTTAA : 203
E.multiloc : AACACCTGCATTTCTAGGTTTCACATCCCTGGTTTTAGTAACACCTAGATTCACCTACGCTCTCTGTGTTATATGAATTCATTTGTTTAGAT~~~~~AAAACACACTTTTAA : 203
          AACACCTGCATTTCTAGGTTTCACATCCCTGGTTTTAGTAACACCTAGATTCACCTACGCTCTCTGTGTTATATGAATTCATTTGTTTAGAT~~~~~AAAACACACTTTTAA

      220
T1      : CTTTCATGGTG : 161
T2      : CTTTCATGGTG : 211
E.ortleppi : CTTTCATGGTG : 223
E.granulos : CTTTCATGGTG : 214
E.multiloc : CTTTCATGGTG : 214
          CTTTCATGGTG

```

Figura S1. Alinhamento dos alelos de cada um dos seis marcadores nucleares de *E. vogeli*, *E. oligarthrus*, *E. ortleppi*, *E. granulosus* e *E. multilocularis* obtidos neste trabalho. Em preto as regiões conservadas, e em cinza claro e branco as regiões polimórficas.


```

      20          *          340          *          360
E.oligarth : ACAGGATAGTATTATCTGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
o1          : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
E.vogeli   : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
V11        : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTGCATGAT : 366
V10        : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
V9         : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
V8         : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
V7         : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
V6         : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
V5         : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
V4         : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
V3         : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
V2         : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
V1         : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
E.equinus  : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
E.canadens : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
E.shiquicu : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTT***** : 345
E.felidis  : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
E.ortleppi : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
E.multiloc : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
E.granulos : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
T.mustelae : ACAGGATAGTCTTTGCTCGCTTGTGCTTACATAATGTTTTGCATGAT : 366
          ActGGGtaTAGTttTgTctGCTTGTGT tt gataaatgtttt catgat

```

Figura S2. Alinhamento do gene *cox1* (366 nt) dos 11 haplótipos de *E. vogeli*, um de *E. oligarthrus*, *E. ortleppi*, *E. granulosus* e *E. multilocularis* obtidos neste trabalho. Foram utilizadas as sequências de *Taenia mustelae*, acesso: EU544563.1, *E. shiquicus*, acesso: JF906151.1, *E. equinus*, acesso: EF143834.1, *E. canadensis*, acesso: AB650535.1 e *E. felidis*, acesso: EF558356.1. Em preto as regiões conservadas, e em cinza claro e branco as regiões polimórficas.



Ilmo. Sr. dr.
MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Investigador Principal do Projeto

Ananindeua/PA, 02 de junho de 2010.

Senhor Coordenador,

Em atenção à carta de nº01/2010/SAHEP/IEC/SVS/MS, com o qual solicita autorização para utilização de material pertencente a esta Instituição no projeto intitulado **“Echinococcus neotropicais: epidemiologia molecular e morfologia em hospedeiros humanos e animais da bacia amazônica, Brasil”**, informamos a **aquiescência** quanto ao pleito solicitado conforme o preconizado na Resolução nº 347, de 13 de janeiro de 2005 e no Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa/MS.

Ademais, acrescentamos que atenda todas as recomendações ou orientações complementares solicitadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa deste Instituto.

Atenciosamente,

ELISABETH CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA SANTOS
Diretora do Instituto Evandro Chagas-
Secretaria de Vigilância em Saúde / MS



LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / EXPOSIÇÃO

NÚMERO LICENÇA 006 / 2007	Nº REGISTRO NO IBAMA CTF nº 900035	PERÍODO DE VALIDADE 02/01/08 a 30/12/2008	PROCESSO Nº 1805/2005/IEC/HEP/SVC/MS.
------------------------------	---------------------------------------	--	--

OBJETO:

- CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
- TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
- COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA)
- TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA
- EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES
- MANUTENÇÃO DE ANIMAIS EM CATIVEIRO
- OUTROS:

FAVORECIDO:

- ZOOLOGICO
- INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA
- PESQUISADOR
- EXPOSITOR/CONCURSO
- CRIADOURO COMERCIAL
- CRIADOURO CIENTÍFICO
- OUTROS:

FAVORECIDOS:

NOME: Manoel do Carmo Pereira Soares; Heloisa Marceliano Nunes; Liliane Almeida Carneiro; Nelson Bailão Ribeiro; Bernardo Farias da Conceição Max Moreira Alves.

INSTITUIÇÃO/ ENDEREÇO: Instituto Evandro Chagas – IEC/ MS Seção de Hepatologia - Av. Almirante Barroso Nº 492 – MARCO- BELÉM/PA – CEP: 66.090-000.

RESPONSÁVEL PELA ATIVIDADE: Os favorecidos.

TRANSPORTADOR: Os favorecidos.

MEIO DE TRANSPORTE: Terrestre/ Fluvial/ Aéreo.

PROCEDÊNCIA/LOCAL DE COLETA /CAPTURA:ÁREAS DE JURISDIÇÃO DO ESTADO DO PARÁ..

DESTINO: SEÇÃO DE HEPATOLOGIA DO IEC /SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MS.

QUANTIDADE / TIPO	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
03 EXEMPLARES/MUNICÍPIO	<i>Agouti paca</i>	PACA
03 EXEMPLARES/MUNICÍPIO.	<i>Dsypos novencyctus</i>	Tatu
03 EXEMPLARES/MUNI	<i>Dasyprocta sp.</i>	Cutia

• OBSERVAÇÕES E CONDICIONANTES:

1. O uso desta licença é de caráter pessoal e intransferível.
2. O manejo de espécimes vivos para coleta do material biológico acima referido deve observar o cumprimento das demais regulamentações vigentes concernentes à atividade;
3. Ao término da validade desta licença, o responsável pela atividade deverá apresentar ao Ibama relatório de atividades e cópia das publicações resultantes dos trabalhos decorrentes do uso dos espécimes-objeto desta licença.
4. Cabe ao Ibama e aos pesquisadores favorecidos o direito de tomar público os dados resultantes das atividades aqui licenciadas, respeitados os direitos de propriedade intelectual.
5. Esta licença não exige o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória nº 2186-16/01 que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético; no caso de acesso ao componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante a autorização do Ibama, nos termos da Medida Provisória nº 2.186-16/2001, Decreto nº 3.945/2001 e Decreto nº 4.946/2003.

LOCAL E DATA DE EMISSÃO

Belém (PA), 30 de dezembro de 2007.

AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBO)

Maria do Carmo de O. Brígido
IBAMA - SUPES/PA
Matrícula 1336108

• ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:

1. CAPTURA DE ESPÉCIES QUE CONSTEM NAS LISTAS OFICIAIS (FEDERAIS, ESTADUAIS E MUNICIPAIS) DA FAUNA E FLORA BRASILEIRA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, ESPÉCIES ENDÊMICAS OU RARAS, OU QUE CONSTEM NO ANEXO I E II DA CONVENÇÃO SOBRE O COMÉRCIO INTERNACIONAL DE ESPÉCIES DA FAUNA E DA FLORA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO (CITES), SALVO QUANDO ESPECIFICADO;
 2. CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES DA FAUNA NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO;
 3. CAPTURA DOS ESPÉCIMES DA FAUNA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO DO PROPRIETÁRIO, ARRENDATÁRIO, POSSEIROU OU MORADOR DA ÁREA;
 4. CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES FAUNA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE.
- SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR) INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS.
 - VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.



4. EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS OU MATERIAIS ZOOLOGICOS.	
5. VALIDA SOMENTE SEM RASURAS.	

NÚMERO LICENÇA 082-BJ2005	Nº REGISTRO NO IBAMA *****	PERÍODO DE VALIDADE 14/10/2005 à 12/10/2006	DOCUMENTO 006812/2005-76
-------------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

OBJETO: <input checked="" type="checkbox"/> CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input type="checkbox"/> COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO <input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE ANIMAL SILVESTRE PROVENIENTE DE COLETA CIENTÍFICA <input type="checkbox"/> EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES <input type="checkbox"/> OUTROS (TRANSPORTE DE ANIMAIS DE CRIADOURO COMERCIAL)	FAVORECIDO: <input type="checkbox"/> ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA <input type="checkbox"/> PESQUISADOR <input type="checkbox"/> CRIADOURO CONSERVACIONISTA <input type="checkbox"/> CRIADOURO CIENTÍFICO <input type="checkbox"/> OUTROS - CRIDOR COMERCIAL
---	--

FAVORECIDO-ESPECIFICAÇÃO: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/MS
 ENDEREÇO: AV. ALMIRANTE BARROSO 492, BAIRRO MARCO – CEP: 66.090-000 – BELÉM/PA
 RESPONSÁVEL PELA CAPTURA/ COLETA/TRANSPORTE : EQUIPE ABAIXO DESCRITOS.

EQUIPE: SEÇÃO DE HEPATOLOGIA:

PESQUISADORES:

MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES

HELOISA MARCELIANO NUNES

LILIANE ALMEIDA CARNEIRO

NELSON BAILÃO REBEIRO.

TÉCNICOS DE NÍVEL MÉDIO:

BERNARDO FARIAS DA CONCEIÇÃO

DOMINGOS MACEDO DE SOUZA

MAX MOREIRA ALVES .

DATA DA EMISSÃO: BELÉM (PA), 10/11/2005	ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA Maria do Carmo Oliveira Brígido Médica Veterinária DAS-101.2 Núcleo de Fauna IBAMA-Pa SIAPE 1338106
---	---



NÚMERO LICENÇA 083 /2005	Nº REGISTRO NO IBAMA *****	PERÍODO DE VALIDADE 14/10/2005 à 14/10/2006	DOCUMENTO OF. Nº 1805/2005/SAHEP/IEC/SVC MS
OBJETO: <input checked="" type="checkbox"/> CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input type="checkbox"/> COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO <input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE ANIMAL SILVESTRE PROVENIENTE DE COLETA CIENTÍFICA <input type="checkbox"/> EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES <input type="checkbox"/> OUTROS (TRANSPORTE DE ANIMAIS DE CRIADOURO COMERCIAL)		FAVORECIDO: <input type="checkbox"/> ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA <input type="checkbox"/> PESQUISADOR <input type="checkbox"/> CRIADOURO CONSERVACIONISTA <input type="checkbox"/> CRIADOURO CIENTÍFICO <input type="checkbox"/> OUTROS - CRIDOR COMERCIAL	
FAVORECIDO-ESPECIFICAÇÃO: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS - IEC/MS ENDEREÇO: AV. ALMIRANTE BARROSO 492, BAIRRO MARCO - CEP: 66.090-000 - BELÉM/PA RESPONSÁVEL PELA CAPTURA/ COLETA/ TRANSPORTE : EQUIPE DO SETOR DE HEPATOLOGIA (VIDE VERSO)			
TRANSPORTADOR: VEÍCULO OFICIAL E AVIÃO DE LINHA TIPO DE TRANSPORTE:: AEREO E TERRESTRE PROCEDENCIA / LOCAL COLETA: AREAS DE INFLUÊNCIA DO MUNICIPIO DE ANAJÁS - ILHA DO MARAJÓ-PA DESTINO : AREAS TÉCNICAS E CIENTÍFICAS DO INSTITUTO EVANDRO CHAGAS/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/ SEÇÃO DE HEPATOLOGIA..			
LISTA DAS ESPÉCIES QUANTIDADE	GRUPOS A SEREM TRABALHADOS	MATERIAL A SER COLETADO.	
04 EXEMPLARES 04 EXEMPLARES 04 EXEMPLARES	<i>Agouti paca</i> <i>Dasybus novencyuctus</i> <i>Dasyprocta sp</i>	Paca Tatu Cutia	
OBSERVAÇÕES / CONDICIONANTES: 1- ESTA LICENÇA AUTORIZA SOMENTE O TRANSPORTE DOS ANIMAIS DESCRITOS NA LICENÇA . 2- ESTA LICENÇA NÃO EXIME O FAVORECIDO DE CUMPRIR O DISPOSTO NA M.P. Nº 2.186-16/01, QUE DISPÕE SOBRE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO. NO CASO DE ACESSO A AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO, ESTE SOMENTE DARÁ MEDIANTE AUTORIZAÇÃO EXPRESSA DO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (CGEN), NOS TERMOS DA MEDIDA PROVISÓRIA Nº 2.186-16/2001 E DECRETO Nº 3.945/2001.			
DATA DA EMISSÃO: BELÉM (PA), 10/11/2005	ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA  Médica Veterinária DAS-101.2 Núcleo de Fauna IBAMA-Pa SIAPE 1338106		
• VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO. • ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA: 1. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO CONSTANTE DE PROJETO ESPECÍFICO APROVADO. 2. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUENCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA Nº237 DE19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO. 3. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DE USO INDIRETO, SALVO QUANDO ESPECIFICADO.			

MOD. 09.008 1ª via - INTERESSADO - 2ª VIA - IBAMA / PROCESSO

Figura S3. Autorizações para coleta e utilização do material amostrado.