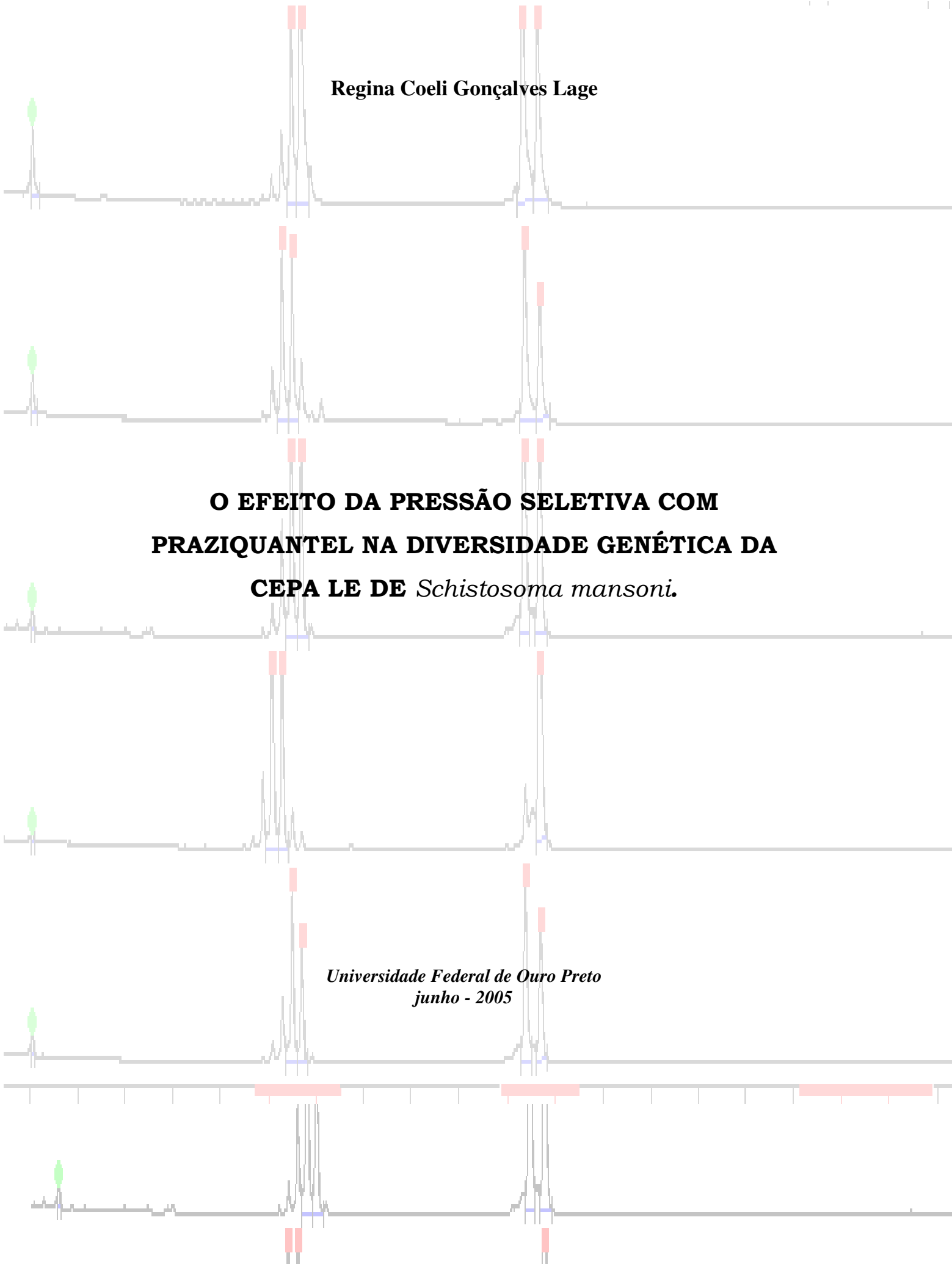


Regina Coeli Gonçalves Lage

**O EFEITO DA PRESSÃO SELETIVA COM
PRAZIQUANTEL NA DIVERSIDADE GENÉTICA DA
CEPA LE DE *Schistosoma mansoni*.**

*Universidade Federal de Ouro Preto
junho - 2005*



Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

O efeito da pressão seletiva com praziquantel na diversidade genética da cepa LE de Schistosoma mansoni.

AUTOR: Regina Coeli Gonçalves Lage

Orientadores: Dr. Élio Hideo Babá

Dr. Guilherme Corrêa Oliveira

Co-orientador: Prof. Paulo Marcos Zeck Coelho

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

Ouro Preto, junho de 2005

L174e Lage, Regina Coeli Gonçalves.

O efeito da pressão seletiva com praziquantel na diversidade genética da cepa LE de *schistosoma mansoni* [manuscrito]. / Regina Coeli Gonçalves Lage. - 2005.

v, 105f.: il., color.; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Guilherme Corrêa Oliveira.

Co-orientadora: Prof. Élio Hideo Babá.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia molecular.

1. *Schistosoma mansoni* - Teses. 2. Drogas - Resistência - Teses.
3. Diversidade biológica - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de pesquisas em Ciências Biológicas. II. Título.

Este trabalho foi realizado no LABORATÓRIO DE Bioquímica e Biologia Molecular - ICEB/NUPEB/UFOP e LABORATÓRIO DE Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Renné Rachou CPqRR/FIOCRUZ-MG.

Suporte Apoio financeiro:
UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

*Dedico esse trabalho à minha Mãe
meu maior exemplo de força e
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Guilherme por acreditar na minha capacidade e ter proporcionado a oportunidade de aprender e trabalhar com ele. Foi muito importante o seu apoio e amizade.

Ao Élio Hideo Babá e a todos os professores da Nupeb-UFOP, por terem me recebido com tanto carinho. Pelo aprendizado que tenho certeza que vai ser muito importante para a minha formação acadêmica.

Ao Paulo Marcos por toda disponibilidade, carinho e atenção demonstrada durante o período que estivemos juntos. Foi um privilégio ter o seu apoio na minha dissertação.

A Neusa Araújo por todo o seu trabalho, dedicação e boa vontade demonstrada durante os experimentos que tive a oportunidade de acompanhar e aprender com você. Muito obrigada mesmo, sem você este trabalho não teria sido concluído.

Ao Álvaro Romanha e a Silvane Murta pelo aprendizado e por terem me recebido no Laboratório de Parasitologia Celular.

A Juciane Vaz que apesar do pouco tempo de convívio, tem sido a todo o momento uma grande amiga. Ao Guto pelo socorro do computador.

A todos os meus queridos colegas do laboratório de Parasitologia Celular e Molecular que tive a oportunidade de aprender e conviver. Em especial aos amigos Diana, Flavio, Fernanda, Mariana e Nilton que me acompanharam durante todo o momento de trabalho. A Héliida e a Andréa Carla pelos experimentos de proteoma.

A Júlia Babá por seu apoio e ensinamento durante os meus primeiros momentos de trabalho no Laboratório de Parasitologia Celular. Ao Nilton pelo aprendizado sobre os Microsatélites.

A Talita pelas análises estatísticas e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose e Malacologia, em especial a Suelene e a Liana pelo trabalho durante as infecções dos caramujos. A Ana Carolina, Luciana e Ana Karine pelo socorro nos experimentos de perfusão.

Aos colegas do Biotério do CPqRR pelo cuidado dos camundongos.

A Mauren (CPqRR) e a Cida (UFOP) pelo carinho e trabalho realizado.

Aos amigos do Laboratório de Triatomíneos pela amizade e pelos momentos de descontração, durante os encontros nos corredores. Ao pessoal do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular.

Aos amigos do curso de pós-graduação da UFOP pelo apoio e amizade durante a minha estadia em OP.

Aos meus queridos alunos do ensino médio pelos momentos de ausência.

A Sebastiana, minha grande amiga de OP pela hospitalidade.

A Silvia, Ciro e Kénia pelo carinho e cuidado ao realizarem seu trabalho.

A minha Mãe e ao meu Pai por serem um exemplo de vida e de dedicação, pelo constante apoio moral.

A toda minha família, em especial a Telinha e ao Juarez pelas idas e vindas. A minha Gainha, ao Rafinha da dindinha e aos amigos pelos momentos que estive ausente.

RESUMO

A esquistossomose é uma das doenças parasitárias que causam maior impacto na saúde humana em todo o mundo. No Brasil, ela é causada pelo platelminto trematodeo digenético *Schistosoma mansoni*. A medida de controle da esquistossomose mais importante é o emprego da quimioterapia específica em larga escala. Atualmente, o medicamento de escolha para o tratamento da esquistossomose causada por todas as espécies de *Schistosoma* é o praziquantel (PZQ). Apesar do PZQ ser eficaz e seguro, seu uso em larga escala em áreas endêmicas e tratamentos repetitivos podem causar a seleção de cepas resistentes. Isolados resistentes, ou com baixa susceptibilidade, já foram encontrados na natureza e também podem ser selecionados em laboratório. O impacto da seleção de indivíduos que apresentam o fenótipo de resistência em uma população ainda não foi estudado. Este trabalho teve como objetivo selecionar uma cepa de *S. mansoni* resistente ao PZQ e analisar o perfil genético da cepa selecionada em comparação com a que a originou utilizando marcadores polimórficos do tipo microssatélites. Para induzir a resistência ao PZQ foi utilizada a cepa de *S. mansoni* LE. Camundongos infectados foram tratados com doses crescentes de PZQ, até a dose curativa, durante sete gerações. O DNA de vermes obtidos a cada geração foi analisado utilizando seis *loci* de microssatélites. Os dados parasitológicos e genéticos obtidos foram comparados com dados da mesma cepa sem indução de resistência. Após seis gerações do parasito submetido ao tratamento com PZQ foi possível obter uma cepa de *S. mansoni* com susceptibilidade diminuída a PZQ. Vermes fêmeas apresentaram maior susceptibilidade a PZQ que vermes machos apenas na população selecionada. A pressão seletiva com PZQ diminuiu a diversidade genética de *S. mansoni*. Não houve diferença significativa quanto a diversidade genética de vermes fêmeas e machos. A obtenção de uma cepa resistente a PZQ é de fundamental importância para estudos de mecanismos de resistência e será também útil para a comparação dos níveis de sensibilidade de isolados de campo.

ABSTRACT

Schistosomiasis is one of the parasitic diseases that make a considerable impact upon public health worldwide. In Brazil, it is caused by the digenetic trematode *Schistosoma mansoni*. The most important schistosomiasis control measure is a large-scale specific chemotherapy. Currently, the drug chosen for schistosomiasis treatment is praziquantel (PZQ). Although PZQ is efficient and safe, its use on a large-scale in repetitive treatments, in endemic areas, may lead to the selection of resistant strains. Resistant or low susceptible to PZQ isolates have already been found in Nature, and can also be selected in laboratory. The impact of selecting strains with a resistance-phenotype has not been investigated yet. The present work was aimed at selecting a *S. mansoni* resistant strain to PZQ, analyzing its genetic profile in comparison with the origin strain by using polymorphic markers, microsatellite type. In order to induce resistance to PZQ, the LE *S. mansoni* strain was used. Infected mice were treated with increasing PZQ doses until the curative dose was reached throughout seven generations. DNA from worms obtained at each generation was analyzed by using six microsatellite loci. Parasitological and genetic data were compared with those from the same strain with no resistance induction. After six parasite generations submitted to PZQ treatment, it was possible to obtain a *S. mansoni* strain with a decreased susceptibility to PZQ. Female worms showed a higher susceptibility to PZQ when compared with males in the selected population. The selective pressure with PZQ led to a decreased genetic variability of *S. mansoni*. There was no significant difference concerning genetic variability between males and females. Obtaining a resistant strain to PZQ is important for a better understanding of the parasite resistance mechanisms which would be also useful for further comparisons of sensitivity levels among field isolates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O ciclo de vida de <i>Schistosoma mansoni</i>	3
Figura 2: Esquema de uma região de microssatélites.....	9
Figura 3: Esquema de DNA <i>Slippage</i>	10
Figura 4: A estrutura química do praziquantel.....	15
Figura 5: O ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> em Camundongos.....	26
Figura 6: Esquema do experimento de Indução de resistência.....	28
Figura 7: Eletrofluograma e tabela do programa Allelink.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Intervalo de confiança entre a razão do número de vermes.....	45
Gráfico 2: Intervalo de confiança entre a razão do número de vermes separados por sexo.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

- A.L.F- Automated Laser Fluorescence
- ED50- Dose efetiva capaz de matar 50% dos vermes
- EST- Etiqueta de Sequência transcrita
- Fst- Índice de Fixação
- LE- Cepa LE de *Schistosoma mansoni*
- LEi- Cepa LE de *S.mansoni* induzida a resistência ao PZQ
- LINE- Elemento repetitivo intercalado de sequência longa
- LTR- Repetição terminal longa
- MDR- Resistência a múltiplas drogas
- mRNA- RNA mensageiro
- mtDNA- DNA mitocondrial
- OXA- Oxaminiquina
- PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
- Pgp- P-glicoproteína
- PZQ- Praziquantel
- RFLP- Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
- rRNA- RNA ribossômico
- Rst- Índice de fixação análogo ao Fst
- SINE- Elemento repetitivo intercalado de sequência curta
- SSR- Repetições de seqüências simples
- STR- Repetições de seqüências em tandem
- VNTR- Número variável de repetições em tandem
- WHO- Organização Mundial de Saúde
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüência dos iniciadores para amplificação de microssatélites.....	32
Tabela 2: Razão entre as médias de vermes após o tratamento com PZQ.....	44
Tabela 3: Diferença entre a mediana da razão do número de vermes.....	45
Tabela 4: Percentual de redução de vermes machos e fêmeas.....	46
Tabela 5: Diferença entre a razão do número de vermes machos e fêmeas.	47
Tabela 6: Diferença entre as populações LEi e LE quanto à razão do número de vermes machos e fêmeas.....	48
Tabela 7: Distribuição da média de vermes recuperados, no fígado e mesentério, após tratamento da população LEi.....	51
Tabela 8: Distribuição da média de vermes recuperados, no fígado e mesentério, após tratamento na população LE.....	51
Tabela. 9 - Número e alelos mais freqüentes nas populações LE e LEi	53
Tabela. 10 -Número e genótipos mais freqüentes nas populações LEi e LE	54
Tabela. 11 - Genótipos de alelos mais freqüentes em vermes machos e fêmeas nas populações LE e LEi	55
Tabela 13 – Comparação entre heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada, e entre a proporção da heterozigosidade observada nas populações LE1 e LEi7 ^a	56
Tabela 14 – Comparação entre heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada e entre a proporção da heterozigosidade observada, entre a 1 ^a e 7 ^a gerações de LEi.....	58
Tabela 15 – Comparação entre heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada e entre a proporção da heterozigosidade observada, em cada <i>locus</i> , entre a 1 ^a e 6 ^a gerações de LE.....	58
Tabela 16 - Comparações entre os índices de endogamia (Fis) e diversidade genética dentro de diferentes gerações de LEi e LE e entre LE e LEi.....	60
Tabela 17- Intervalo de confiança e sinal de <i>f</i> em cada <i>locus</i> , geração e população analisada.....	60
Tabela 18 – Comparações entre os índices de diversidade interpopulacional dentro de diferentes gerações de LEi e LE e entre LE1 ^a e LEi 7 ^a	61
Tabela 19 - Média ponderada da diversidade genética (Heterozigosidade esperada) entre vermes machos e fêmeas.....	62

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A esquistossomose.....	2
1.2 O genoma e o transcriptoma de <i>S. mansoni</i>	5
1.3 A variabilidade genética de <i>S. mansoni</i>	7
1.3.1.Os marcadores moleculares do tipo Microssatélites.....	8
1.4 O uso de drogas no controle da esquistossomose.....	14
1.4.1 Praziquantel.....	14
1.4.2.A resistência a drogas esquistossomicidas.....	18
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Cepa Utilizada.....	25
3.2 Infecção de Moluscos.....	25
3.3 Infecção e tratamento de Camundongos.....	27
3.4 Perfusão e Coleta dos vermes.....	27
3.5 Protocolo utilizado na Indução de Resistência a praziquantel (PZQ).....	27
3.6 Avaliação da atividade terapêutica.....	31
3.7 Obtenção de DNA.....	31
3.8 Iniciadores para PCR de microssatélites.....	31
3.9 PCR de microssatélites.....	33
3.0.1 Determinação do tamanho dos alelos de microssatélites.....	34
3.0.2 Análise Genética de populações “LEi” e “LE”.....	36
3.0.3 Análises Estatísticas.....	40
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Análise dos dados parasitológicos:.....	43
4.1.1 O efeito da seleção com praziquantel na recuperação de vermes.....	43
4.1.2 A ação de PZQ na recuperação de vermes machos e fêmeas.....	46
4.1.3 Distribuição de parasitas nos camundongos e oograma.....	50
4.2ANÁLISES GENÉTICAS:.....	52
4.2.1 Análises de frequências genotípicas e alélicas.....	52
4.2.2 Análises do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	56
4.2.3 Análises de endogamia e diversidade genética.....	59
4.2.4 Índice de Diversidade interpopulacional.....	61
4.2.5 Índices de Diversidade entre vermes fêmeas e machos.....	62
4.2.6 Resumo das análises genéticas.....	63
5. DISCUSSÃO.....	64
6.CONCLUSÕES.....	73

7. PERSPECTIVAS.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
9. ANEXOS.....	90



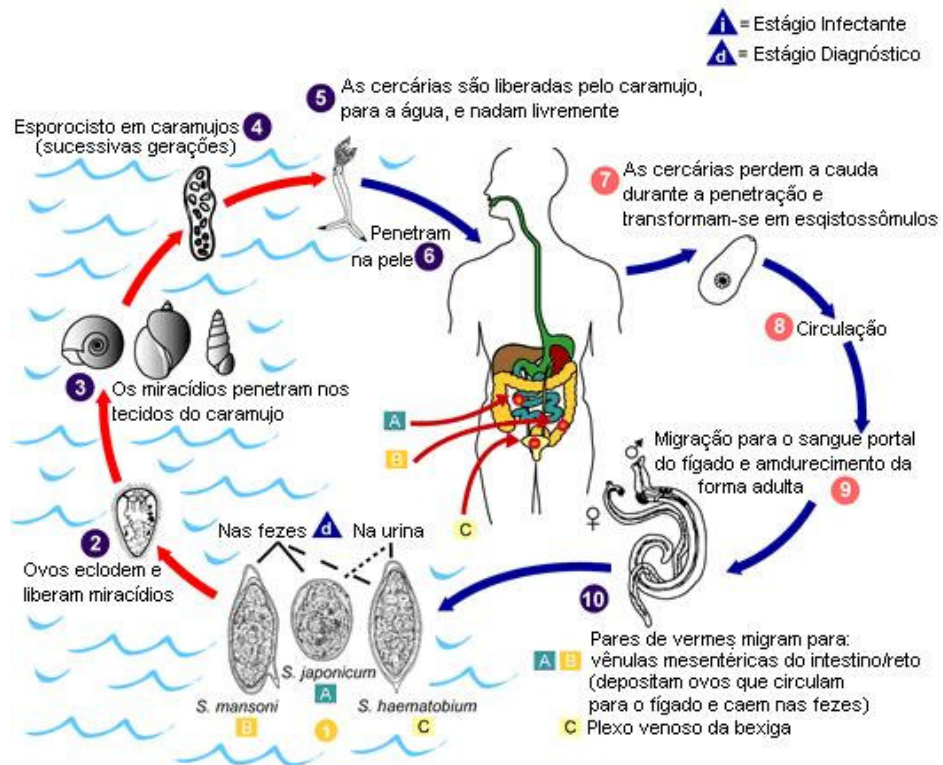
I.INTRODUÇÃO

1.1 A Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Essa doença é endêmica em 74 países e afeta cerca de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, estando outras 600 milhões sob o risco da infecção (Katz & Peixoto., 2000). Na América do Sul, o Brasil é o país com a maior prevalência de esquistossomose. Existem cerca de 8 milhões de pessoas infectadas e aproximadamente 30 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas, sob risco de contrair a doença (Katz & Peixoto, 2000; Chitsulo *et al.*, 2000). A ausência de dados epidemiológicos precisos indica a necessidade de adequado levantamento nacional da prevalência da esquistossomose que continua a ser importante endemia parasitária, justificando esforços maiores para seu controle (Katz & Peixoto, 2000).

Entre as principais espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem são de relevância médica: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. *S. mansoni* é a única espécie causadora da esquistossomose no Brasil, tendo se instalado, principalmente, devido às condições ambientais favoráveis encontradas em nosso território (Melo & Coelho, 2004). Esta espécie ocorre também na África, em outros países da América do Sul e nas Antilhas. A distribuição geográfica desse parasito está condicionada à presença de moluscos de água doce, do gênero *Biomphalaria*, que são seus hospedeiros intermediários.

Os parasitos da espécie *S. mansoni* pertencem ao Filo Platyhelminthes e classe Trematodea. Apresentam dimorfismo sexual na fase adulta e são digenéticos. Para completar seu ciclo evolutivo (Figura 1) este parasito passa por cinco estágios larvários (miracídio, esporocisto primário e secundário, cercária, esquistossômulo), além do ovo. O ciclo evolutivo de *S. mansoni* inicia-se com a penetração ativa de cercárias na pele de hospedeiros vertebrados. Após a penetração, as cercárias perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, atingindo o coração direito e os pulmões dos hospedeiros. A partir dos pulmões, os vermes migram para coração esquerdo e alcançam a circulação geral. Ao atingirem o sistema porta, completa seu desenvolvimento e se acasalam. O acasalamento é indispensável para que as fêmeas completem seu desenvolvimento sexual. Os vermes se alojam no plexo mesentérico cerca de 45 dias após a infecção. A fêmea do verme adulto pode produzir até 300 ovos por dia (Pellegrino & Coelho, 1978).



www.p.vtourist.com/1/528363-life_cycle_of_Schistosoma.gif

Figura 1-O Ciclo de Vida de *Schistosoma mansoni*.

Uma parte dos ovos é retida na mucosa intestinal e nos capilares do sistema porta do hospedeiro, o restante é eliminado, juntamente com as fezes e eclodem, em contato com a água liberando o miracídio. Os miracídios, dentro dos moluscos, transformam-se em esporocistos primários e secundários e, em seguida, são liberadas as cercárias, fechando, assim, o seu ciclo evolutivo (Melo & Coelho, 2004).

A esquistossomose apresenta duas fases evolutivas, uma aguda e outra crônica. A fase aguda tem início em torno de 50 dias após a infecção e é caracterizada, em alguns pacientes, por sintomas como febre e eritema. A fase crônica pode apresentar três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e a forma mais grave hepatoesplênica (Siqueira *et al.*, 1997). A reação granulomatosa formada ao redor dos ovos retidos nos tecidos do fígado é a principal causa da patogenia da doença (Warren *et al.*, 1972).

A evolução da patologia da esquistossomose depende da interação entre o parasito e o hospedeiro. A linhagem do parasito e a carga parasitária são fatores importantes para a determinação da gravidade da doença. O estado imunológico do hospedeiro é um dos fatores mais importantes na determinação e na evolução das formas da doença (Lambertucci *et al.*, 1998).

A maioria das parasitoses humana vem diminuindo gradativamente de incidência, em consequência do desenvolvimento econômico e dos métodos de controle disponíveis, como o desenvolvimento de drogas e melhoria das condições sanitárias (Savioli, 2000; 2004). No entanto, a esquistossomose encontra-se ainda em expansão, principalmente em países da África e no Brasil, onde as precárias condições político-econômicas são ainda um sério problema para a melhoria das condições básicas de saúde da população. Normalmente, nas áreas onde ocorre infecção não existem condições sanitárias básicas e os habitantes vêm-se obrigados a entrar em contato com águas contaminadas com as cercárias de *Schistosoma*, ocorrendo uma rápida reinfecção (Katz & Peixoto, 2000).

A migração, movimentação de pessoas de áreas endêmicas e grandes projetos de construções de estradas e represas podem contribuir para o estabelecimento de novos focos de transmissão (Southgate *et al.*, 2001). Em Richard Toll, Senegal, houve um aumento da prevalência da esquistossomose de 1,9% para 71% em apenas dois anos (Talla *et al.*, 1990). Um importante exemplo da expansão da esquistossomose no Brasil se deu na região sul do país (Paraense *et al.*, 1987). Em 1997 foi detectada pela primeira vez a presença de *Biomphalaria* na região metropolitana de Porto Alegre (Esteio-Rio Grande do Sul), onde mais tarde foi confirmada a primeira infecção humana por *S. mansoni* autóctone na região. (Carvalho *et al.*, 1998). Existe atualmente uma baixa prevalência e produção de ovos de *S.*

mansoni, nesta região. No entanto, áreas de baixa magnitude de transmissão não devem ser negligenciadas. Existe um risco potencial de áreas de baixa endemicidade contribuírem para a expansão da esquistossomose (Graeff – Teixeira *et al.*, 2004).

O estudo da biologia deste parasito torna-se ainda necessário, já que na atualidade existe praticamente uma droga sendo usada no controle em massa da esquistossomose (WHO, 2002). Não existe até o momento nenhuma vacina efetiva contra *S. mansoni* (Fonseca *et al.*, 2005). Estudos do genoma e transcriptoma de *S. mansoni* contribuem para o melhor entendimento da biologia do parasito e para a geração de novas informações que podem ser usadas no desenvolvimento de novos alvos de drogas e vacinas contra a esquistossomose.

1.2 O genoma e transcriptoma de *S. mansoni*.

O genoma do *S. mansoni* é diplóide, formado de 7 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais (Short *et al.* 1979). O cromossomo sexual da fêmea é heterogamético (ZW) e o do macho é homogamético (ZZ). O tamanho do genoma haplóide é de aproximadamente $2,7 \times 10^8$ pb, consistindo de 60 % de seqüências de DNA altamente ou moderadamente repetitivas (Simpson *et al.*, 1982). 64% do genoma do *S. mansoni* é composto de repetições do tipo AT (Simpson *et al.*; 1982). Existe uma alta prevalência de elementos genéticos móveis no genoma de *Schistosoma*. Brindley *et al.* (2003) descreveram vários elementos genéticos móveis (MGEs) que colonizam o genoma de parasitos. Os MGEs são agrupados em duas categorias: Classe I - elementos que se transpõem através de RNAs intermediários chamados retrotransposons, os LTR que são uma longa seqüência repetida em tandem nas extremidades do DNA de retrovírus e retrotransposons e os SINES que são pequenos elementos móveis; Classe II - elementos que movem diretamente de DNA para DNA, são chamados de transposons. Alguns SINES, LTRs e transposons já foram identificados em *S. mansoni* (Brindley *et al.*, 2003).

O complexo gênico que codifica RNA ribossomal foi a primeira região de DNA repetitivo a ser descrita em *S. mansoni*. Esta região é constituída de unidades que são repetidas aproximadamente 100 vezes, por genoma haplóide (Simpson, 1984). Alguns elementos repetitivos como W1, W2 e D9 são encontrados no genoma feminino (Drew, 1995). Elementos repetitivos específicos de seqüências de DNA de vermes fêmeas foram usados como sondas para determinação do sexo de *S. mansoni* (Grevelding, 1999).

O genoma mitocondrial (mtDNA) de *S. mansoni* apresenta uma taxa de variação 3 a 5 vezes maior que o DNA genômico (Brown *et al.*, 1979). É altamente polimórfico, podendo variar no seu tamanho de 16,5 a 24,9 Kb (Pena *et al.*; 1995). Os mtDNA não expressam diploidia e nem herança mendeliana (Jannotti-Passos *et al.*, 1997; Bieberich, 2001). O mtDNA foi completamente seqüenciado e contém 36 genes (Le *et al.*, 2000).

Os Institutos TIGR e Sanger participam do projeto de seqüenciamento completo do genoma de *S. mansoni*. O projeto foi iniciado pela Organização Mundial da Saúde em 1994 com o objetivo de identificar novos alvos para droga, vacina e desenvolvimento de mapas cromossômicos. Aproximadamente 40-50% das seqüências formam um único agrupamento, sugerindo que aproximadamente 20-25% do total dos genes de *S. mansoni* foram descobertos. O seqüenciamento do genoma de *S. mansoni* em 3 vezes irá resultar na descoberta de aproximadamente 95% dos genes. A era genômica tem oferecido recursos para iniciar a era da genômica funcional, que poderá acelerar o desenvolvimento de estratégias de controle e tratamento para esquistossomose (LoVerde *et al.*, 2004).

As seqüências genômicas obtidas estão depositadas em banco de dados que podem ser acessados via o sites da TIGR e Sanger. Em 1992 foi iniciado, no Brasil, O Projeto Transcriptoma de *S. mansoni* e, como parte integrante deste projeto, foi criado o programa de descoberta de genes. Os principais objetivos deste programa foram descobrir e caracterizar novos genes de *S. mansoni*, na tentativa de pesquisar novos alvos para drogas e desenvolver vacinas. Antes do desenvolvimento destes programas, menos de 100 genes de *S. mansoni* haviam sido completamente seqüenciados e depositados em bancos de dados. O sucesso destes programas de transcriptoma deve-se à produção de ESTs (etiquetas de seqüências expressas), que são pequenas seqüências obtidas do final de cDNAs, aleatoriamente selecionados de bibliotecas de cDNA. Com esta técnica, fica menos dispendioso obter informações sobre o genoma do parasito já que o seqüenciamento genômico em larga escala é impraticável para laboratórios individuais, devido ao grande tamanho do genoma de *S. mansoni* (270 Mb). Estas seqüências podem ser usadas na busca de homologias em banco de dados de DNA e seqüências de proteínas, na tentativa de identificar os genes em que estas etiquetas foram derivadas (Franco *et al.*, 2000; Oliveira, 2001). Os trabalhos iniciais anteriormente citados formaram a base para o financiamento de projetos mais ambiciosos.

Estudos de transcriptoma deste parasito realizados nos estados de São Paulo e Minas Gerais geraram milhares de seqüências de todos os ciclos evolutivos de *S. mansoni*, utilizando as estratégias de EST e ORESTES (Oliveira *et al.*, 2004; Verjovski *et al.*, 2003).

Mais recentemente, a Rede Genoma de Minas Gerais gerou aproximadamente 20.000 ESTs convencionais que estão sendo armazenadas no banco de dados da rede. Um total de 124.640 ORESTES foi analisado, resultando em 30.988 seqüências de *S. mansoni* reunidas (SmAEs). Estima-se que o número de genes expressos seja de 14.000 a 20.000. Destes genes, 77% são genes que ainda não haviam sido caracterizados, sendo que 55% deles não apresentaram similaridade com genes de outros organismos (Verjovski *et al.*, 2003). Um dos principais benefícios dos estudos de transcriptoma é a identificação de novas proteínas que podem ser usadas como alvo para novas drogas esquistossomicidas e candidatas à vacina. Vários transcritos de genes de resistência a múltiplas drogas (MDR) foram identificados, estas evidências apontam para a existência de mecanismos de resistência a drogas em *S. mansoni* (Verjovski *et al.*, 2003).

1.3 A variabilidade genética de *S. mansoni*

A variação fenotípica intraespecífica em *S. mansoni* é grande (Rollinson *et al.*, 1986). Existem diferenças quanto à infectividade ao caramujo e ao hospedeiro definitivo, quanto à patogenia da doença, morfologia dos vermes e Susceptibilidade a agentes esquistossomicidas (Katz *et al.*, 1973; Dias *et al.*, 1982). Vários estudos estão sendo realizados, usando marcadores moleculares, com o objetivo de avaliar a possível relação entre diferenças fenotípicas e genéticas entre cepas de *S. mansoni* (McManus & Hope, 1993).

A variabilidade genética do *S. mansoni* foi inicialmente avaliada através de estudos de isoenzimas. A análise de isoenzimas de cepas de laboratório da África, Brasil e Caribe indicou que a variabilidade entre essas populações é relativamente baixa (Fletcher *et al.*, 1981). O DNA mitocondrial (mtDNA), por ser altamente polimórfico, foi utilizado como marcador de variabilidade em *S. mansoni* comprovando ser uma boa ferramenta para identificar diversidade entre diferentes clones de uma mesma cepa e dentro do gênero *Schistosoma* (Despres *et al.*, 1991).

A variabilidade genômica em *Schistosoma* foi também analisada com marcadores de DNA ribossomal (rDNA) e com marcadores do tipo polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). As análises de variabilidade utilizando esses marcadores sugerem que em populações naturais existe mais heterogeneidade que em populações mantidas em laboratório (Vieira *et al.*, 1991). Dias-Neto e colaboradores (1993) utilizaram a análise de polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente (RAPD) para analisar a variabilidade de cepas de *S. mansoni* mantidas em laboratório. Os resultados deste trabalho

mostraram que existe um alto grau de similaridade genômica entre as cepas estudadas. Outros trabalhos utilizando os marcadores RAPD foram também usados no estudo da variabilidade genética de *S. mansoni* (Barral *et al.*, 1993; Sire *et al.*, 1999). A variabilidade genômica de cepas de campo foi, posteriormente, comparada à variabilidade de cepas de laboratório utilizando o mesmo tipo de marcador RAPD. Foi possível observar neste trabalho que existe maior homogeneidade genética em cepas de *S. mansoni* mantidas em laboratório que entre cepas de campo (Pinto *et al.*, 1997). As diferenças genéticas entre cepas de *S. mansoni* de áreas endêmicas do Egito, sensíveis e resistentes a Oxamniquine ou PQZ foram analisadas utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD e SSR-repetições de seqüências simples. Os resultados destas análises indicam que é possível diferenciar cepas sensíveis e resistentes à droga, com o uso de marcadores moleculares do tipo RAPD e SSR (Tsai *et al.*, 2000).

Os marcadores do tipo polimorfismos de base única os SNPs, representam uma fonte abundante de polimórficos entre alelos de um determinado gene, podendo estar presentes em quase todos os *loci* gênicos. Devido à maior abundância e estabilidade são muito informativos quando comparados aos microssatélites. Entretanto, ainda não foram identificados muitos marcadores deste tipo em *Schistosoma mansoni*.

Devido à facilidade de identificação de microssatélites em banco de dados, vários *loci* de microssatélites foram identificados em *S. mansoni*. Este marcador tem mostrado alto poder informativo no estudo de populações.

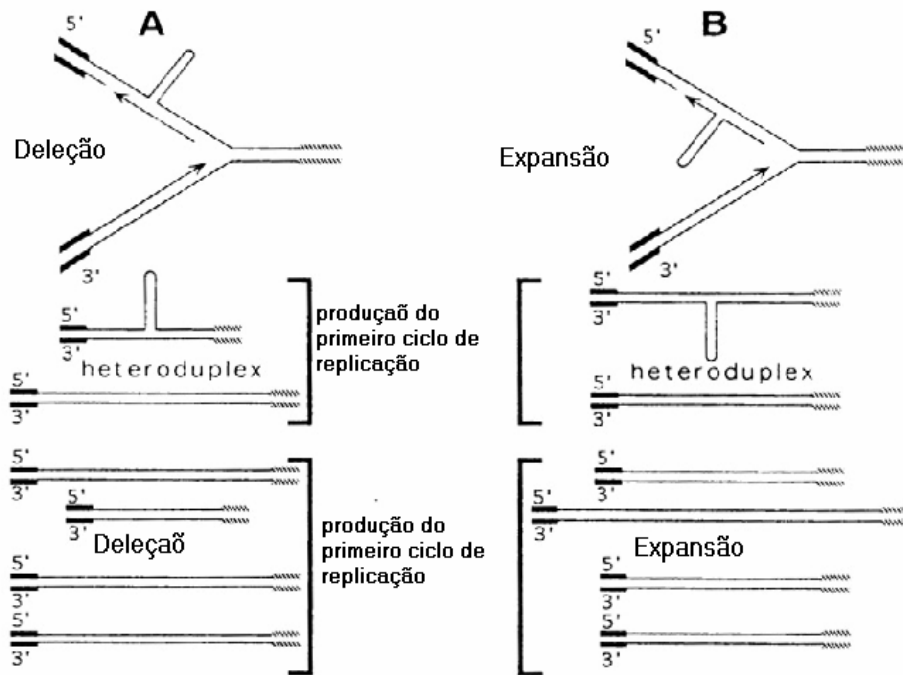
1.3.1 Os marcadores moleculares – Microssatélites

Microssatélites são pequenas seqüências de DNA constituídas normalmente de 1 a 6 pares de bases, repetidas uma após a outra (Figura 2). Estas repetições são distribuídas aleatoriamente pelo genoma de eucariotos, sendo também observadas em procariotos, vírus e DNA de organelas. Os microssatélites são também conhecidos como repetições de seqüências simples (SSR), seqüências curtas repetidas *em tandem* (STR) ou seqüências polimórficas que têm sido utilizadas com sucesso para mapeamento humano e também de outros genomas (Ashley & Dow, 1994). A ampla distribuição dos microssatélites e o alto grau de polimorfismo facilitaram a construção de mapas genéticos em humanos (Dietrich *et al.*, 1994; Dib *et al.*, 1996).



Figura 2- Esquema de uma região de microssatélites com uma repetição de nucleotídeos (ATT)₆ e seqüências flanqueadoras utilizadas para o desenho de iniciadores.

Os polimorfismos observados nos microssatélites são devidos a uma variação no número de unidades de repetição (Tauts, 1989; Weber & May, 1989). Os principais mecanismos moleculares responsáveis pela geração da variabilidade nos microssatélites são o deslizamento das fitas do DNA durante a replicação (*DNA slippage*) e a recombinação desigual. Durante a replicação pode ocorrer um erro no alinhamento das fitas, após o realinhamento em locais errados poderá haver a formação de uma alça. Se a alça formada estiver na fita molde, ocorrerá uma contração do microssatélite. Se estiver na fita nascente, haverá uma expansão do microssatélite (Figura 3). Experimentos *in vitro* demonstraram que o *DNA slippage* ocorre em taxas muito altas. Apesar disso, as taxas de mutações em microssatélites são menores devido aos sistemas de reparo de pareamento que podem diminuir a taxa de mutação em microssatélites de 100 a 1000 vezes (Schötterer, 2000). A recombinação desigual pode ser outro mecanismo responsável pelo polimorfismo em microssatélites. Esta recombinação é resultado do desalinhamento durante o pareamento de regiões repetidas em tandem. Como resultado deste desalinhamento, uma fita tem o número de repetições aumentado e outra fita o número diminuído em relação ao presente nas fitas originais. Algumas evidências, como o fato de mutações em microssatélites não variarem quando ocorrem mutações em genes responsáveis, por reduzir a frequência de recombinações homólogas, sugerem que a recombinação não é o principal mecanismo de geração de polimorfismo em microssatélites (Levinson & Gutman, 1987; Wierdl *et al.*, 1997).



www.crisceb.unina2.it/didattica/MalattieAdEspansione/grafico11a.jpg

Figura 3 – Esquema de formação de polimorfismo em microssatélites (DNA Slippage). O deslizamento das fitas de DNA durante a replicação pode levar à formação de uma alça na fita molde ou na fita nascente, que resulta na contração ou expansão do número de elementos repetitivos.

A variedade de alelos em microssatélites presentes em uma população é grande o suficiente para determinar um alto grau de discriminação entre os indivíduos na população quando múltiplos *loci* de microssatélites são examinados (Ferreira *et al.*, 1996).

Os microssatélites são estáveis e possuem expressão co-dominante, ou seja, ambos alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados experimentalmente. Além disso, são altamente multialélicos porque podem detectar e discriminar todos alelos por *locus* em uma população (Ferreira *et al.*, 1996).

A classificação dos microssatélites pode ser feita, de acordo com Weber (1990), da seguinte maneira: *perfeitos* quando existe somente um motivo único de repetição; *imperfeitos* quando existem uma ou mais bases diferentes da repetição entre as unidades de repetição e *compostos* quando existem dois motivos diferentes de repetição. Os motivos de repetição podem ser formados por uma ou mais bases, sendo mononucleotídeos, dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, etc.

A frequência de distribuição de microssatélites varia entre populações de uma espécie e entre espécies. No genoma de mamíferos, o tipo de repetição mais abundante é CA (Marx *et al.*, 2000), enquanto que em *S. mansoni* o tipo mais abundante é AT (Rodrigues *et al.*, 2002a). A taxa de mutação nos microssatélites varia de 10^{-2} a 10^{-6} por geração (Schötterer, 2000). Vários fatores, como o número de repetições, tipo de repetição, seqüência flanqueadora e recombinação podem influenciar na taxa de mutação dos microssatélites (Schötterer, 2000).

Os marcadores polimórficos do tipo microssatélites estão sendo amplamente utilizados em parasitologia. O uso de microssatélites como marcadores moleculares foram descritos em protozoários, algumas espécies de vetores e em helmintos (Barker, 2002). Em protozoários, os microssatélites são comuns e amplamente distribuídos como em outros eucariotos. Microssatélites com repetições do tipo dinucleotídeos e trinucleotídeos foram identificados no genoma de *Leishmania* (Rossi *et al.*, 1994) e, em seguida, foram utilizados com o objetivo de discriminar todas as espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* (Russel *et al.*, 1999). Os microssatélites foram também utilizados em *Trypanosoma cruzi*. Estudos de *T. cruzi*, utilizando estes marcadores, demonstraram que a reprodução sexual neste parasito é rara ou quase ausente e que a estrutura da população é clonal. Oliveira e colaboradores (1998) demonstraram a existência de populações de *T. cruzi* multiclonais em isolados de não-humanos.

Projetos de seqüenciamento genômico indicam que os microssatélites são abundantes no genoma de *Plasmodium falciparum* (Su & Wellems, 1996). Estes

marcadores são, desde então, usados em estudos de genética de populações e epidemiologia de malária. Os microssatélites em *Plasmodium falciparum* mostraram ser espécie específicos (Anderson *et al.*, 1999). Em helmintos, os primeiros microssatélites foram encontrados em seqüências da subunidade do DNA ribossomal de *Trichinella spp* (Zarlenga & Dame, 1992). Banco de seqüências de EST tem revelado microssatélites em outros helmintos, como *Haemonchus contortus*, *Strongyloides ratti*, *Trichuris trichiura* e outras espécies do gênero *Schistosoma*. Estes dados confirmam a presença e potencial utilidade de microssatélites para o estudo destes parasitos (Barker, 2002).

Em parasitos do gênero *Schistosoma*, vários *loci* contendo microssatélites polimórficos foram identificados. Durand *et al.*, 2000 isolaram e analisaram, quanto ao nível de polimorfismo, 33 *loci* de microssatélites de seqüências de banco de dados de *S. mansoni*. Destes microssatélites, 11 *loci* foram polimórficos com 2 a 8 alelos por *locus*. Blair *et al.*, 2001 isolaram e caracterizaram 10 *loci* polimórficos de microssatélites de seqüências de DNA genômico de *S. mansoni*, isolados da África. Com estes marcadores, vinte indivíduos de três populações africanas foram analisados e demonstraram ter alta variabilidade tanto entre indivíduos quanto entre populações. Bibliotecas de seqüências genômicas de *S. mansoni* foram usadas para a identificação de cinco *loci* de microssatélites. Estes *loci* foram descritos e caracterizados em populações de *S. mansoni* de cinco isolados brasileiros. Os marcadores isolados apresentaram polimorfismo de 5 a 8 alelos por *locus* (Curtis *et al.*, 2001). Estes mesmos *loci* foram também utilizados na análise da variabilidade genética de outras espécies de *Schistosoma* (Curtis *et al.*, 2001). Curtis *et al.* (2002) demonstraram, através de microssatélites, que a diferenciação genética de *S. mansoni* é moderada quando diferentes localidades são definidas como subpopulações. Quando as subpopulações são definidas em diferentes hospedeiros humanos, a diferenciação genética é grande. Seqüências de DNA de bancos de dados também foram utilizadas na identificação de seis *loci* de microssatélites por (Rodrigues *et al.*, 2002a). Quatro destes marcadores mostraram ser polimórficos (11 a 17 alelos por *locus*). Estes marcadores foram usados para fazer a análise da estrutura genética populacional de cepas de *S. mansoni* de campo e laboratório. As amostras de *S. mansoni* coletadas em campo têm maior variabilidade genética que amostras de laboratório. A diversidade genética de *S. mansoni* também foi estudada, com o uso de microssatélites, em cepas laboratório e de campo por Stohler e colaboradores. Este trabalho demonstrou que existe grande diferença entre cepas de campo e laboratório quanto à variabilidade genética. Corroborando aos achados de Rodrigues *et al* (2002a), as cepas de campo apresentaram

maior número de alelos que as cepas de laboratório. Após a pesquisa de microssatélites em 16.000 sequências de ESTs e 42.000 sequências de BAC, foram desenhados e testados, quanto ao polimorfismo, 55 pares de iniciadores (Rodrigues *et al.*, 2000b). Atualmente, estes iniciadores estão sendo utilizados na análise da estrutura genética de populações de *S. mansoni* de áreas endêmicas (dados do laboratório ainda não publicados). Recentemente, foram estudadas no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (CPqRR-Fiocruz), uma cepa de *S. mansoni* resistente à Oxamniquine-Map e a cepa LE sensível à mesma droga. Os resultados deste trabalho indicaram que existem diferenças significativas entre estas duas cepas e que marcadores moleculares polimórficos do tipo microssatélites podem ser utilizados para distinguir cepas resistentes a drogas (dados não publicados).

Além de serem utilizados na análise da variabilidade genética de populações de *S. mansoni*, os microssatélites estão sendo utilizados na análise da distribuição e comportamento do parasito. O modo de acasalamento entre vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* em condições naturais foi analisado por Prugnolle *et al.* (2004), utilizando 7 loci de microssatélites. Os resultados deste trabalho indicam que vermes machos e fêmeas parecem acasalar-se aleatoriamente. Este tipo de análise é de grande importância para verificar o papel do sistema de acasalamento na manutenção e distribuição das variações genéticas (Prugnolle *et al.*, 2004). A correlação entre heterozigosidade e o tamanho do clone de vermes fêmeas de *S. mansoni* foi determinada com marcadores moleculares microssatélites (Prugnolle *et al.*, 2004). A estrutura genética de *S. mansoni* e de dois de seus hospedeiros, *Rattus rattus* e *Biomphalaria glabrata*, foi determinada com microssatélites. Os dados da variabilidade genética de *S. mansoni* e de seus hospedeiros sugerem que a migração do parasito é determinada principalmente pelo hospedeiro vertebrado. Ratos e moluscos estão localmente adaptados a seus parasitos (Prugnolle *et al.*, 2005). A caracterização da estrutura genética de populações de parasitos e hospedeiros e a estimativa do fluxo gênico entre populações são essenciais para entender as interações coevolutivas entre hospedeiros e parasitos (Prugnolle *et al.*, 2005).

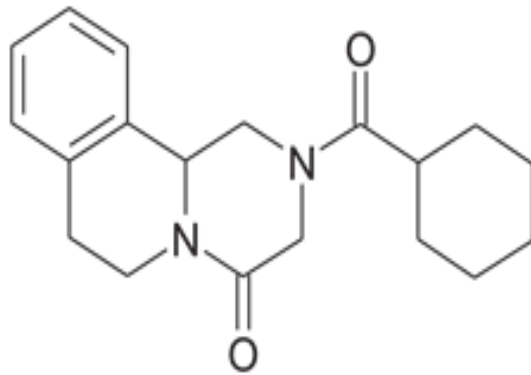
1.4 O uso de drogas no controle da esquistossomose

A utilização de drogas no controle da esquistossomose, apesar dos altos índices de reinfecção em áreas endêmicas, é ainda uma medida eficiente. As drogas são de vital importância não somente para o tratamento da infecção e controle da morbidade, mas também para o controle da transmissão (Savioli *et al.*, 2004). Para o controle de esquistossomose, as drogas recomendadas à Organização Mundial de Saúde são o uso do praziquantel e oxamniquina (WHO, 1995).

Na década de 80, a oxamniquina (OXA) foi muito usada para o tratamento em massa da esquistossomose (Katz, 1980). O principal mecanismo de ação da OXA está relacionado com a sua capacidade de inibir a síntese de ácidos nucléicos. A esterificação da droga pela enzima sulfotransferase produz compostos eletrofílicos capazes de alquilar o DNA e outras moléculas do parasito (Cioli, 1993). A OXA é uma droga com excelente eficácia esquistossomicida. Porém, não apresenta atividade contra as todas espécies de *Schistosoma* de importância médica (Foster, 1987) e tem um custo elevado. Devido às desvantagens citadas acima, a OXA, vem sendo gradualmente substituída pelo PZQ para o tratamento da esquistossomose.

1.4.1 Praziquantel

O praziquantel (PZQ) é a droga escolhida pela Organização Mundial da Saúde para o tratamento em massa, por ser efetivo contra todas espécies de *Schistosoma* que infectam o homem, apresentar alta taxa de cura, toxicidade baixa, nenhum risco genotóxico e atualmente ter baixo custo. O PZQ (Figura 4) é um pó de cor branca derivado de pirazino-isoquinolina, de gosto amargo, estável em condições normais. É praticamente insolúvel em água, solúvel em etanol e em alguns solventes orgânicos, como o clorofórmio. O PZQ é uma mistura racêmica, constituída dos isômeros levógiro e dextrógiro, o enantiômero (-), levógiro, é a única forma com atividade esquistossomicida reconhecida *in vivo* e *in vitro* (Andrews *et al.*, 1983; Xiao *et al.*, 1999). É uma droga de amplo espectro de ação, há uma boa resposta contra Cestódeos e Trematódeos, enquanto que os Nematódeos não são afetados (King & Mahmoud, 1989). O pico de ação de PZQ ocorre 1-2 horas após o tratamento. A sua eliminação é feita através da urina e fezes, sendo que mais de 80% da droga é eliminada após 24 hs (Steiner *et al.*, 1976).



www.chemsilico.com/CS_prHIA/HIA_graphics/HIA_rep_comp/15_Praziquantel_Vincristine.gif

Figura 4- A estrutura química do praziquantel . O enantiômero (-) levógiro.

A associação de diferentes drogas pode ser uma alternativa para a melhoria da terapêutica de várias doenças. Estudos de associação de PZQ com a cimetidina, um inibidor de citocromo P₄₅₀ e antagonista do receptor H₂ da histamina, têm demonstrado que a cimetidina aumenta a biodisponibilidade de PZQ (Jung *et al.*, 1997 e 1998; Olds *et al.*, 1999). Por possuírem diferentes mecanismos de ação, espera-se que a associação de PZQ com oxaminiquina tenha um efeito complementar (Delgado *et al.*, 1992). Vários autores têm avaliado a eficácia da associação OXA e PZQ no tratamento da esquistossomose. A utilização dessas drogas conjuntamente demonstrou ter pouca toxicidade. Porém, apresentam menor eficácia quando comparado ao uso de cada droga isoladamente (Grysczek *et al.*, 2004). No entanto, a associação de 100 mg/kg de PZQ com 200 mg/kg de OXA demonstrou ser mais eficiente na eliminação completa de parasitos que ao se empregar tratamentos um único tratamento com 400mg/kg de PZQ. A associação entre drogas pode ser um recurso eficaz para retardar ou evitar o aparecimento de resistência (comunicação pessoal).

A alteração da biodisponibilidade de PZQ está sendo relacionada com fatores como a alimentação, pois existe o aumento desta biodisponibilidade de PZQ após as refeições (Massmirembwa *et al.*, 1994). A ingestão de drogas como cloroquina, antiepiléticos e corticoesteróides podem causar a diminuição da biodisponibilidade de PZQ (Jung, 1998).

O tratamento com PZQ é feito por via oral, com dose única, com dosagem recomendada para o tratamento em larga escala de 40 a 60 mg/Kg. O seu uso é de grande efeito. O percentual de cura contra o *S. mansoni* é de 60 a 90%, causando a redução do número de ovos de 90 a 95%, dependendo do nível da infecção (Silva *et al.*, 1997). Esta droga é efetiva em pacientes de todas as idades e em diferentes formas clínicas da esquistossomose, incluindo casos hepatoesplênicos (Bassily *et al.*, 1985). A eficácia do PZQ depende da idade e sexo do parasito, formas imaturas e vermes fêmeas são menos sensíveis a PZQ (Pica-Mattocia & Cioli, 2004).

A maior desvantagem de PZQ é a sua baixa eficácia contra as formas imaturas de *Schistosoma* (Gryssels *et al.*, 2001). Algumas alternativas têm sido propostas para solucionar este problema como a associação de PZQ com artemether, droga ativa contra as formas imaturas do parasito. Outra alternativa é a modificação no tratamento com PZQ, que deverá ser usado em duas doses espaçadas por três semanas e, após a segunda dose, é feito o exame parasitológico (De Clercq *et al.*, 2000).

Os principais efeitos colaterais associados ao PZQ são dor de cabeça, náusea, vômito, dores abdominais e diarreia. A frequência e a severidade dos efeitos colaterais de PZQ estão diretamente correlacionadas com a intensidade da infecção (Polderman *et al.*, 1984). O tratamento de mulheres grávidas ainda é um assunto em debate. A agência que controla e libera os medicamentos nos Estados Unidos, o FDA (*Food and Drug Administration*), classificou o PZQ, no que se refere à gravidez, como presumidamente segura, baseado em estudos animais. Olds (2003) propõe que mulheres grávidas sejam tratadas. Para aquelas que estejam amamentando, o autor sugere a interrupção da amamentação por 48 horas. A organização Mundial da Saúde (2002) sugere que o tratamento com PZQ seja feito em mulheres grávidas e lactantes.

Os mecanismos moleculares de ação de PZQ não são bem conhecidos (Cioli, 2000). Alguns efeitos no parasito, como aumento da atividade muscular, seguido de contração e paralisia do verme e destruição do tegumento, foram associados ao tratamento com PZQ. As alterações morfológicas decorrentes da administração de PZQ são acompanhadas do aumento da exposição de antígenos do parasito (Harnett & Kusel, 1986). Alguns destes antígenos foram identificados e parecem estimular a resposta imune do hospedeiro, que é necessária para a completa atividade de PZQ (Fallon *et al.*, 1997; Brindley *et al.*, 1989). A membrana dos vermes afetados parece ser alvo primário de ação de PZQ, causando o aumento da permeabilidade da membrana para certos cátions mono e divalentes, particularmente o Ca^{2+} . O influxo de cálcio não é devido ao transporte direto

pelo PZQ, já que esta droga não atua como ionóforo (Pax *et al.*, 1978; Blair *et al.*, 1992). A contração muscular e destruição do tegumento do parasito causada por PZQ requerem Ca^{2+} extracelular (Xiao *et al.*, 1995). A destruição do tegumento do parasito, com um ativo mecanismo de defesa do hospedeiro levam à destruição dos vermes (Fallon *et al.*, 1992; Brindley, 1994). Vermes afetados desprendem dos tecidos do hospedeiro resultando em um deslocamento do parasito para o fígado, onde ocorrem reações inflamatórias, com conseqüente eliminação do parasito. O PZQ produz também mudanças bioquímicas, mas estas mudanças parecem ser uma ação secundária seguida da ação primária tegumental (Andrews, 1985; Wiest *et al.*, 1992).

As observações de que, tanto a contração muscular quanto a destruição do tegumento do parasito são cálcio dependente, levou Blair *et al.*, 1992 a sugerir que os canais de cálcio possam ser possíveis alvos de ação de PZQ. Tais canais são essenciais para a fisiologia e homeostase deste parasito. Estes canais são sítios críticos para entrada de cálcio, exibindo, então, um importante papel na regulação dos níveis de cálcio intracelular. Os mecanismos que levam à destruição da homeostase de Ca^{2+} por PZQ não são conhecidos. Os canais de Ca^{2+} consistem de um poro formado de subunidades-protéicas α_1 associadas a outras subunidades que modulam a atividade do canal. As subunidades auxiliares associadas com α são a α_2/δ , β e γ . Estas proteínas são importantes moduladores das propriedades da subunidade α_1 . As subunidades β ($\text{Ca}_v\beta$ s) são componentes intracelulares do complexo de canais de Ca^{2+} . Elas participam de muitas propriedades biofísicas do canal e quando co-expressas com subunidades α , aumentam a força de ligação e a densidade corrente de Ca^{2+} . As subunidades β dos canais de cálcio de *S. mansoni* parecem ter estruturas diferentes de outras subunidades β conhecidas. Quando coexpressas com subunidades α de células de mamíferos podem conferir sensibilidade a PZQ (Kohn *et al.*, 2001). Em sistemas heterólogos, entretanto, Valle e colaboradores (2003) seqüenciaram o cDNA que codifica para as subunidades $\text{SmCa}_v\beta_1$ e $\text{SmCa}_v\beta_2$ de cepas sensíveis e resistentes e não detectaram nenhuma diferença significativa nas seqüências destas subunidades. Mutações na subunidade β dos canais de cálcio ou diferenças na expressão de genes que codificam estes canais parecem estar relacionadas com pelo menos um dos mecanismos de resistência ao PZQ. O nível de mRNA que codifica para as subunidades $\text{SmCa}_v\beta_1$ e $\text{SmCa}_v\beta_2$ de várias cepas de diferentes estágios de desenvolvimento foi analisado por northern blot, não tendo sido observadas diferenças na expressão destas subunidades. A ausência dos sítios de fosforilação PKC nas subunidades β e a presença destes sítios em outras subunidades que não estão correlacionadas com a

sensibilidade ao PZQ, em sistemas heterólogos (Kohn *et al.*, 2003a; Kohn *et al.*, 2003b), nos mostra que ainda são necessários maiores estudos para avaliar o possível envolvimento da subunidade β dos canais de cálcio nos mecanismos de resistência a PZQ. Portanto, o mecanismo de ação do PZQ ainda não é totalmente conhecido e a resistência pode envolver diversos mecanismos (Greenberg, 2005).

1.5 A resistência a drogas esquistossomicidas

Apesar da disponibilidade de drogas de alta eficácia e baixa toxicidade, como OXA e PZQ, já foram relatados casos de resistência a drogas, e a reinfeção ainda é um grande problema no controle desta doença. Os principais fatores que podem levar ao desenvolvimento de resistência a drogas são o tratamento de apenas uma parte da população infectada, tratamentos em intervalos de tempo muito grandes, mudanças da dosagem da droga utilizada por um programa de controle e o tratamento com doses não curativas (Silva *et al.*, 1997).

Resistência a drogas pode ser definida como a diminuição permanente ou transitória da sensibilidade dos organismos a efeitos de drogas que interferem nas suas funções vitais. A resistência aparece nos descendentes dos parasitos que apresentaram resposta quimioterápica diminuída. A tolerância a drogas não deve ser confundida com a resistência, esta ocorre quando um parasito que nunca havia tido o contato com a droga apresenta diminuição na resposta terapêutica (Coles *et al.*, 1986).

As primeiras observações de que certos parasitos podem ser resistentes a drogas, foram feitas estudando-se *Trypanosomas*. Outras observações foram feitas em diversos organismos como vírus, fungos, bactérias, protozoários, vermes e alguns artrópodes (Cowman, 2001; Cortese *et al.*, 2002; Wootton *et al.*, 2002). Os mecanismos de resistência a drogas em muitos organismos são frequentemente similares. Os mecanismos de escape da ação de drogas mais comuns são: diminuição na captação da droga pela célula, diminuição ou inativação da droga após a sua entrada, alteração da formação do complexo alvo-droga, exclusão da droga para o exterior da célula e maior eficiência do reparo de DNA. Os mecanismos de ativação da droga podem ser suprimidos ou perdidos. A interação da droga com o alvo pode ser menos efetiva devido ao aumento da competição pelo substrato ou pela alteração do alvo. Estudos dos mecanismos de resistência a drogas podem nos ajudar na identificação de organismos resistentes antes do tratamento. Medidas de prevenção de resistência, como o uso racional de drogas e utilização de combinações de

drogas para minimizar o desenvolvimento de resistência são necessárias para evitar problemas graves, como a resistência de *Plasmodium falciparum* à cloroquina (Quellette *et al.*, 2001). Em algumas partes do mundo, *P. falciparum*, o agente responsável pela forma mais severa da malária, tem se tornado resistente a todos os agentes antimaláricos (White, 1998; Warhurst, 1999). A resistência a cloroquina está relacionada ao rápido influxo e baixo acúmulo da droga em parasitos resistentes (Krogstad *et al.*, 1987). O fenótipo de resistência a cloroquina está associado com os genes de resistência a múltiplas drogas (MDR) observados, também, em células tumorais. Os genes MDR estão associados a uma superexpressão de uma fosfoglicoproteína de membrana (PGP) que funciona como uma bomba de efluxo de drogas, depende de ATP, que reduz o acúmulo de compostos citotóxicos dentro da célula (Biedler, 1992). Existem, entretanto, outros mecanismos de resistência a drogas que não estão relacionados com genes MDR (Weellens, 1990).

Em relação à esquistossomose, desde a década de 70 foi relatada resistência a oxamniquina de cepas de campo e de laboratório. Em 1971, Rogers e Bueding demonstraram, pela primeira vez, a existência de uma cepa de *S. mansoni* resistente a uma droga esquistossomicida. (Araújo *et al.*, 1980; Silva *et al.*, 1997; Bonesso-Sabadini & Souza Dias, 2002). Trabalhos publicados recentemente registraram a ocorrência de resistência ao PZQ em algumas cepas de *S. mansoni* isolados da África e do Brasil. No entanto, estes resultados são controversos (Fallon *et al.*, 1995; Tsai MH *et al.*, 2000, Liang, Y.S *et al.*, 2001; William *et al.*, 2001; Bonesso-Sabadini *et al.*, 2002). Alguns autores consideram que a diminuição da eficiência desta droga seja devido à alta intensidade de infecção ou a diferentes condições imunológicas do hospedeiro, e não ao aparecimento de vermes resistentes (Gryseels *et al.*, 2001, Anthony & Sake, 2002).

Protocolos para medir a dose de PZQ necessária para matar 50% de parasitos (ED50) têm sido usados para monitorar a resistência à droga em cepas de campo. A susceptibilidade de cepas de campo brasileiras às drogas OXA e PZQ têm mudado. Quando os resultados de ED50 da cepa brasileira Ouh de *S. mansoni* são comparados a outros resultados de ED50 em cepas de campo, é possível observar que a susceptibilidade a droga de cepas de *S. mansoni* tem diminuído (Bonesso-Sabadini & Souza Dias, 2002). A ED50 foi também avaliada em nove isolados de *Schistosoma*. Desses isolados, quatro foram selecionados porque nunca haviam tido contato com PZQ. Cinco outros isolados foram selecionados porque já haviam apresentado resistência induzida a PZQ ou apresentaram resistência a esta PZQ no campo. Os resultados destas análises indicam que isolados de *S. mansoni* diferem quanto à susceptibilidade a PZQ e que a diminuição da

susceptibilidade à droga pode estar relacionada ao contato prévio do parasito com PZQ (Cioli *et al.*, 2004).

Fallon *et al.* (1994) utilizando isolados de um *pool* de cercárias de regiões geográficas diferentes demonstraram experimentalmente, que a resistência a drogas em *S. mansoni* pode ser induzida com doses sub-curativas de OXA ou PZQ. Após de passagens do parasito, em camundongos, foi possível observar resistência a PZQ em 93% dos vermes. Não houve resistência cruzada ao PZQ com OXA. Este trabalho foi o primeiro a demonstrar que a resistência a PZQ pode ser induzida experimentalmente e pode ter implicações se observadas no campo.

Alguns autores demonstraram a importância de fatores genéticos do parasito na determinação da resistência ou susceptibilidade a drogas. Os RFLPs com uma sonda de gene ribossomal, foram correlacionados com o aparecimento de resistência ao hycantone em *S. mansoni* (Brindley *et al.*, 1991). Vieira e colaboradores (1991) utilizando a mesma técnica, não encontraram correlação de polimorfismos com a resistência a OXA. A resistência a OXA é caracterizada pela perda da enzima ativadora da sua ação a sulfotransferase. Esta enzima está presente apenas em vermes sensíveis (Pica- Mattocia *et al.*, 1993). Cioli e colaboradores (1992) sugerem que o fenótipo de resistência a hycantone (similar a Oxamniquina) está relacionado apenas a um gene autossômico recessivo. Entretanto, estudos de modelos de seleção de resistência a anti-helminthos têm mostrado que a resistência em helminthos é geralmente determinada por mais de um gene dominante (Bennett *et al.* 1997).

Estudos de modelos de seleção com drogas onde o tratamento da população é feito normalmente com pequena persistência e baixa eficácia sugerem que ocorre a seleção de genes de resistência em uma população de indivíduos susceptíveis. O processo de seleção ocorre em 3 fases: na fase inicial do processo de seleção é comum encontrar dentro da população, indivíduos susceptíveis a droga. Em seguida, indivíduos heterozigotos para fenótipo de resistência são comuns. No final da seleção predomina na população, indivíduos homozigotos para o fenótipo de resistência (Bennet *et al.*, 1997). Em uma cepa de *S. mansoni* com resistência a hycantone induzida, foi observado que a seleção levou a diminuição dos alelos que determinam a susceptibilidade à droga (Gray, 1992). A população selecionada era geneticamente heterogênea e sugere que não existe a necessidade de que alelos de resistência sejam incluídos por um evento mutacional. A dominância dos genes de resistência a droga em *S. mansoni* foi relatada posteriormente, por Liang *et al.* (2003). Até o momento não foram identificados marcadores genéticos de

resistência de *S. mansoni* ao PZQ. Existe muito pouco conhecimento sobre a genética de resistência ao PZQ

Diante de tantas questões ainda não esclarecidas sobre a resistência a PZQ é proposto, neste trabalho, revelar possíveis modificações ocorridas na estrutura genética de uma população de *S. mansoni* sob o efeito do tratamento com PZQ. Para avaliar este efeito será selecionada uma cepa de *S. mansoni* com resistência a PZQ induzida. As consequências da seleção com PZQ sobre a estrutura genética da população serão avaliadas com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites. A disponibilidade de marcadores moleculares de grande polimorfismo como os microssatélites, fornecem hoje uma ferramenta importante para o conhecimento da biologia do parasito. Estes estudos podem auxiliar na descoberta de cepas ou populações de *S. mansoni* sensíveis e resistentes a drogas e à identificação de genes de interesse por estudos de ligação. A cepa resistente selecionada será útil para futuros estudos de mecanismos de resistência e também será utilizada para a comparação dos níveis de sensibilidade de isolados de campo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Analisar a estrutura genética da cepa LE de *Schistosoma mansoni* que sofreu pressão seletiva com praziquantel, através do uso de marcadores moleculares microssatélites.

2.2 Objetivos específicos:

- Induzir a seleção de *S. mansoni* a resistência através da pressão com PZQ.
 - Avaliar o impacto da pressão com PZQ na estrutura genética de populações de *S. mansoni* induzidas e não induzidas à resistência.
 - Avaliar o efeito de PZQ na variabilidade genética de vermes machos e fêmeas.
 - Avaliar aspectos parasitológicos de populações de *S. mansoni* da cepa LE, antes e após a indução de resistência a PZQ.
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepa Utilizada:

Neste trabalho, utilizamos a cepa LE de *S. mansoni*. Esta cepa foi isolada de um paciente residente em Belo Horizonte e está sendo mantida no Laboratório de Malacologia do CPqRR há mais de 35 anos, através de sucessivas passagens em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* e camundongos albinos da espécie *Mus musculus* (Pellegrino & Katz, 1968).

3.2 Infecção de Moluscos:

Para manutenção do ciclo de *S. mansoni* foram utilizados moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* (Figura 5). Estes caramujos são originários de exemplares capturados em Belo Horizonte (Pellegrino & Katz, 1968).

Para obtenção de miracídios para a infecção de caramujos, camundongos infectados com *S. mansoni* foram perfundidos e seus fígados foram coletados para serem utilizados na obtenção de ovos do parasito (Pellegrino & Katz 1968, com modificações). Os fígados foram triturados em um liquidificador contendo solução salina de NaCl 0,85%. O material triturado foi filtrado em gaze, dobrada em quatro, e colocado em um cálice de decantação na ausência de luz. Após sucessivas lavagens do material em água desclorada, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo os ovos foi colocado em placas de Petri contendo água desclorada a temperatura de 28°C, com luz artificial, até a eclosão dos miracídios.

Para a infecção de moluscos em massa foi utilizado um cristalizador, onde foram colocados 100 moluscos *Biomphalaria glabrata* em uma suspensão contendo cerca de 10 miracídios por molusco. Os moluscos permaneceram nesta suspensão durante 6 horas, sob luz artificial, e depois foram transferidos para aquários contendo 19 L de água, com sistema de água corrente durante 8 horas por dia, aeração constante e temperatura controlada de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Trinta dias após a exposição aos miracídios, os caramujos foram examinados individualmente afim de realizar uma seleção dos que eliminaram cercárias. Caramujos positivos foram colocados em um béquer e, então, expostos à luz durante aproximadamente 2 horas para a eliminação de cercárias. Após a exposição à luz, foi realizada a contagem de cercárias para a infecção de camundongos (Pellegrino & Katz, 1968). Uma alíquota de água contendo cercárias foi retirada de um béquer e distribuída em

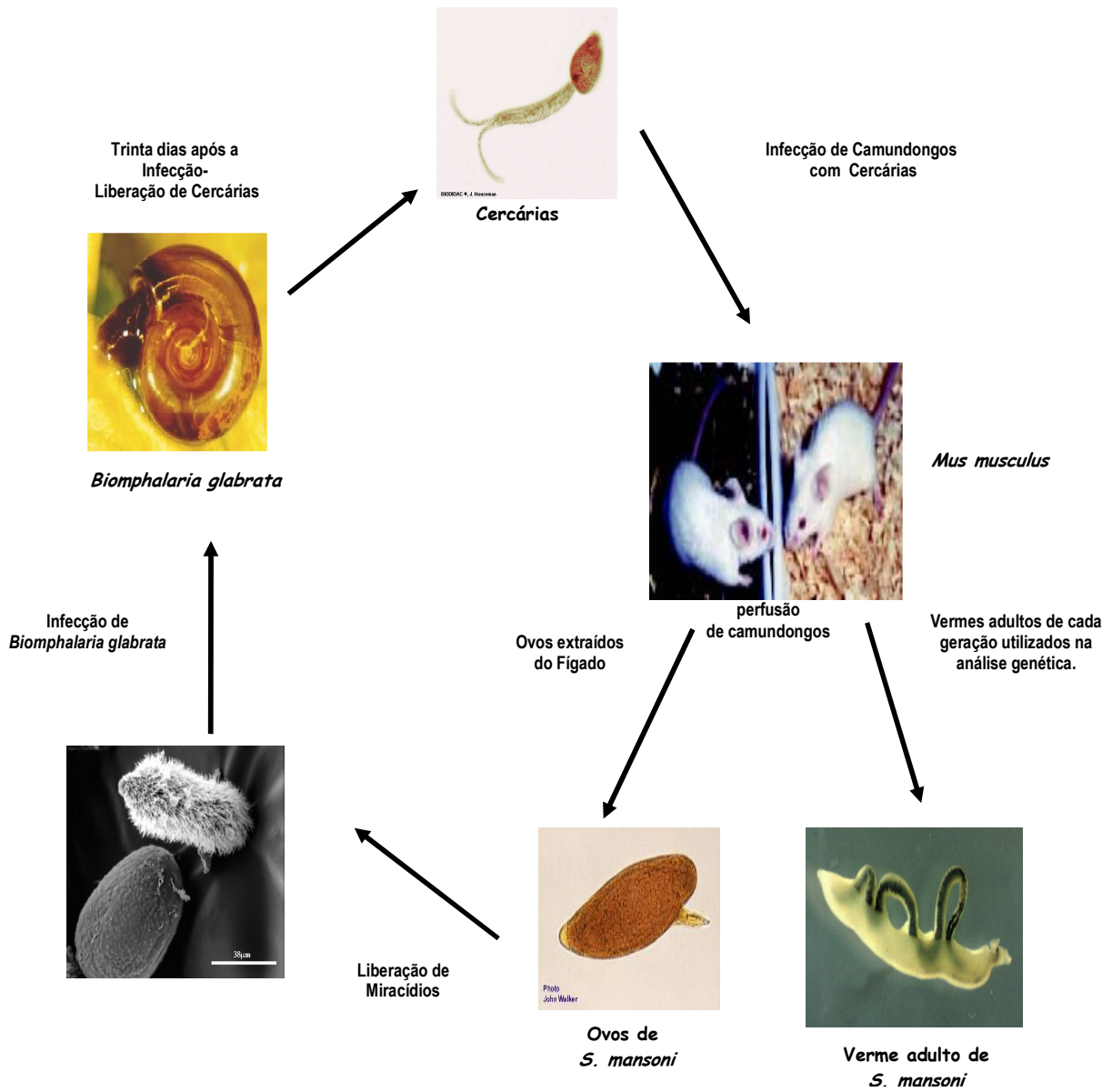


Figura 5- O ciclo de *Schistosoma mansoni* em camundongos.

Camundongos foram infectados com cercárias da cepa LE. Após 30 dias do primeiro tratamento os camundongos foram perfundidos e, então, retirados os vermes adultos e os ovos dos fígados para obtenção de miracídeos. Os miracídeos obtidos dos ovos infectaram caramujos que, após 30 dias, liberaram cercárias. Um novo ciclo é então iniciado.

uma placa escavada para realizar contagem das cercárias. As cercárias foram mortas com Lugol e contadas com o auxílio de uma lupa. As alíquotas a serem usadas na infecção de camundongos foram ajustadas a fim de se obter o equivalente a 200 cercárias, em um volume de aproximadamente 0,2ml.

3.3 Infecção e tratamento de Camundongos:

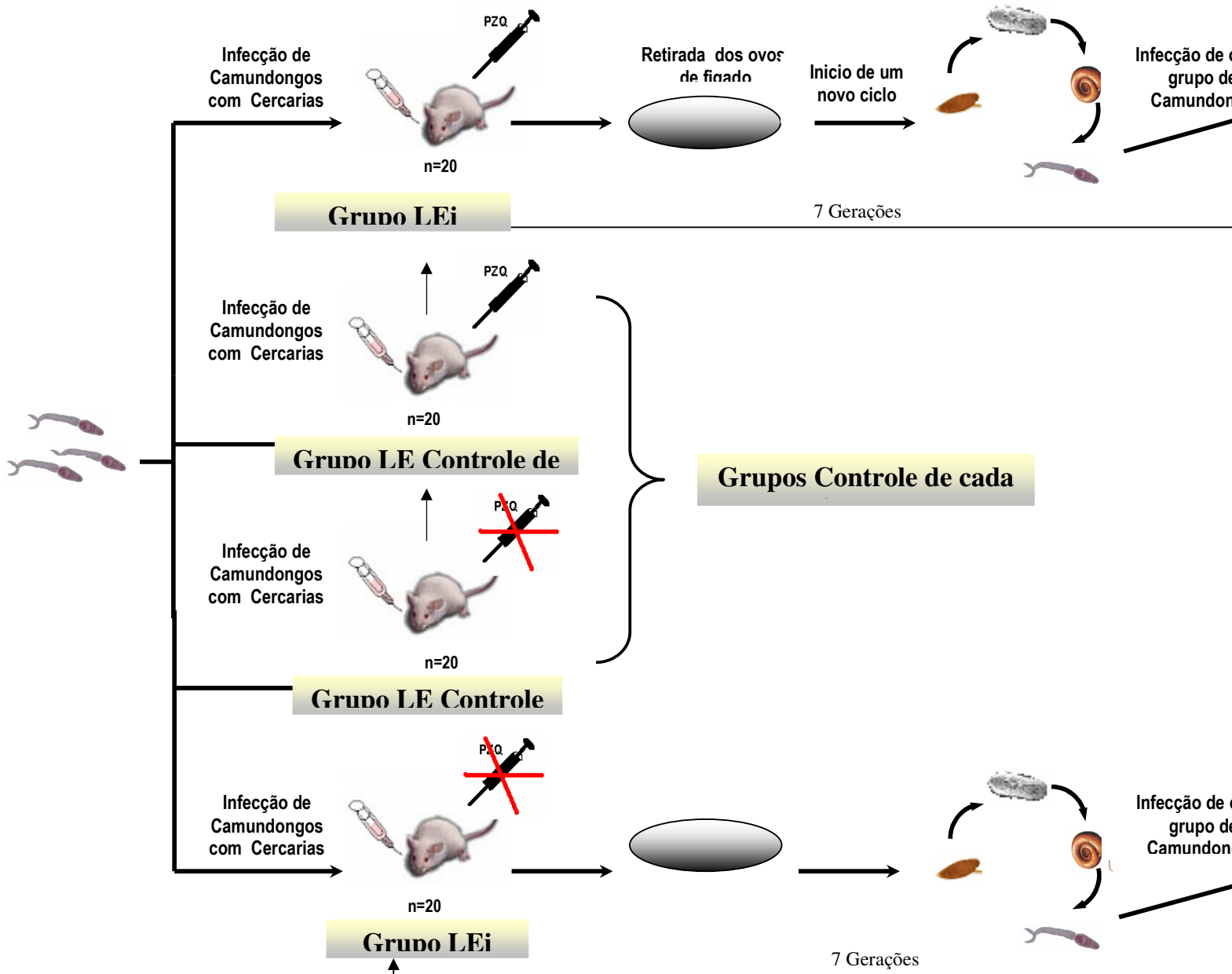
Para a infecção, foram utilizados camundongos suíços albinos (*Mus musculus*) fêmeas, com aproximadamente 45 dias de vida. Os camundongos foram infectados individualmente, no dorso, por via subcutânea com aproximadamente 200 cercárias cada um. Para realizar o tratamento, os camundongos foram pesados e divididos em grupos de 20 animais cada. Com o auxílio de um gral e pistilo, os comprimidos de PZQ foram macerados para a obtenção do medicamento em pó. A dose do medicamento foi ajustada por quilo de peso, de acordo com cada grupo experimental. Os fatores de correção foram calculados em função da quantidade de princípio ativo de cada comprimido. O PZQ em pó foi pesado em balança analítica, ressuspendido em água e administrado por via oral com o auxílio de seringa e agulha própria para gavagem.

3.4 Perfusão e Coleta dos vermes:

Quarenta e cinco dias após a infecção dos grupos controle e 30 dias após o primeiro tratamento dos grupos experimentais, os camundongos foram sacrificados por fratura cervical. Os camundongos dos grupos não tratados foram sacrificados 45 dias após a infecção para evitar a perda de animais por mortalidade.

Aberta a cavidade peritoneal, foi feita a ligadura da veia renal. Para permitir a recuperação dos vermes, foi feita a secção da veia porta. Com o auxílio de uma agulha acoplada a um pipetador automático, foi injetada solução salina a 0,85% heparinizada na aorta descendente, procedendo-se à perfusão das veias mesentéricas e coleta dos vermes ali presentes. A perfusão do fígado foi feita através da injeção de salina 0,85% heparinizada,

na



LEi – Grupo de camundongos infectados com a cepa LE de *S. mansoni*, utilizado no processo de indução de resistência a PZQ. Os ovos dos fígados dos camundongos obtidos a cada ciclo de vida do grupo LEi foram utilizados na manutenção do ciclo da geração seguinte (Figura 6). O grupo de camundongos denominado LEi foi infectado e selecionado por pressão de PZQ durante sete gerações. O regime de tratamento com doses crescentes de PZQ nas sete gerações está descrito abaixo :

Grupo LEi1^a: Primeira geração de parasitas. Camundongos foram submetidos ao tratamento com 2x 100mg/Kg de praziquantel, administrado 35 e 37 dias após a infecção. *S. mansoni* inicia sua postura de ovos com aproximadamente 31 dias de infecção. No primeiro ciclo, a primeira dosagem deve ser realizada após a produção de ovos com o objetivo de iniciar a pressão com PZQ.

Grupo LEi2^a: Segunda geração de parasitas. Camundongos foram submetidos ao tratamento com 2x 100mg/Kg de praziquantel, administrado 28 e 35 dias após a infecção.

Grupo LEi3^a: Terceira geração de parasitas. Camundongos foram submetidos ao tratamento com 2x 200mg/Kg de praziquantel administrado 28 e 35 dias após a infecção.

Grupo LEi4^a: Quarta geração de parasitas. Camundongos foram submetidos ao tratamento com 2x 200mg/Kg de praziquantel administrado 28 e 35 dias após a infecção.

Grupo LEi5^a: Quinta geração de parasitas. Camundongos foram submetidos ao tratamento com 2x 250mg/Kg de praziquantel administrado 28 e 35 dias após a infecção.

Grupo LEi6^a: Sexta geração de parasitas. Camundongos foram submetidos ao tratamento com 3x 300mg/Kg de praziquantel, administrado 28, 35 e 37 dias após a infecção.

Grupo LEi7^a: Sétima geração de parasitas. Camundongos foram submetidos ao tratamento com 3x 300mg/Kg de praziquantel administrado 28, 35 e 37 dias após a infecção.

Este protocolo de tratamento foi descrito por Fallon *et al.* (1994). A única modificação feita foi durante a terceira geração, em que foram administradas duas doses de 200 mg/kg. No trabalho de Fallon *et al.* (1994) foi administrada, durante a terceira geração, duas doses de 100 mg/kg. A modificação foi sugerida pelo Dr. Paulo Marcos com o objetivo de administrar, durante as duas primeiras gerações, a mesma dosagem de PZQ.

LEi controle - Grupo de camundongos infectados com a cepa LEi com passagens sucessivas e paralelas ao grupo experimental e não tratados. Este grupo foi analisado com o objetivo de avaliar a eficiência da infecção de *S. mansoni* em camundongos sem

tratamento, a cada passagem. O grupo LEi foi criado porque a partir dele foi feito as análises genéticas

LEi passagem - Grupo de camundongos infectados com a cepa original LE e não tratados, utilizado como controle do ciclo do parasito sem tratamento.

LE - Grupo de camundongos infectados com a cepa LE de *S. mansoni* e tratados, mas sem passar pelo protocolo de indução de resistência. Este grupo foi analisado com o objetivo de controlar a eficiência do tratamento com PZQ, comparar e avaliar a possível indução de resistência no grupo LEi. Estes camundongos foram infectados com parasitos da cepa LE, durante sete gerações, sempre obtida do estoque do moluscário e, então, submetidos aos mesmos tratamentos de cada geração de LEi analisada.

LE controle - Grupo de camundongos infectados com a cepa LE sem tratamento. Este grupo foi analisado com o objetivo de avaliar, a cada passagem, a eficiência da infecção de LE em camundongos sem tratamento.

A cada geração de *S. mansoni* estudada foram coletados 40 exemplares de vermes adultos de cada grupo, sendo 20 machos e 20 fêmeas. Estes vermes foram armazenados individualmente em microtubos e congelados para posterior extração de DNA e análise genética.

3.6 Avaliação da atividade terapêutica:

Os vermes obtidos na perfusão dos camundongos foram contados e avaliados segundo a sua distribuição no mesentério e fígado. O número de vermes mortos no fígado foi determinado através do esmagamento do órgão entre duas placas de vidro, seguido de exame sob uma lupa. Fragmentos do intestino delgado (aproximadamente 1cm) foram retirados e esmagados entre lâmina e lamínula para a detecção de ovos em seus variados estágios evolutivos. Foram observadas, no mínimo, duas lâminas de fragmentos do intestino de cada animal sacrificado para a verificação do oograma. Foi considerado alterado o oograma que não apresentou ovos em um ou mais estágios imaturos, de acordo com Pellegrino & Faria (1965).

3.7 Obtenção de DNA

Para a obtenção do DNA, os vermes individualizados foram digeridos em tampão de extração composto de 50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM EDTA, 100mM NaCl e 0,5 % de SDS, com 20µg/ml de proteinase K, durante 12 horas a 37°C. Após o período de digestão, os vermes foram colocados a 95°C para a desnaturação da proteinase K. Os ácidos nucléicos foram precipitados com etanol absoluto gelado, por 16 horas a -20°C, na presença de 0,3 M de acetato de sódio e centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm. Após a precipitação, o sedimento obtido foi lavado duas vezes com etanol 70%, gelado, para remover os sais formados durante a precipitação. Após a evaporação do etanol o DNA, obtido foi ressuspendido em 30µl de tampão TE e re-hidratando por 12 horas a 4°C. A concentração do DNA foi determinada por leitura espectrofotométrica em um aparelho Beckman DU-640 (Palo Alto, USA) a 260 e 280nm, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação da absorbância 260/280 nm.

3.8 Iniciadores para PCR de microssatélites:

Foram selecionados seis iniciadores que amplificavam *loci* contendo pelo menos, cinco alelos (Tabela 1). Os iniciadores que amplificam microssatélites foram obtidos no Laboratório de Parasitologia Celular do CPqRR, através da análise de seqüências de *S. mansoni* depositadas em bancos de dados e de bibliotecas genômicas enriquecidas com microssatélites (Rodrigues *et al.*, 2002a). Os iniciadores foram sintetizados (Invitrogen-São

Paulo), sendo que um dos iniciadores de cada par foi marcado no final 5' com fluoresceína, permitindo seu uso em análises no seqüenciador automático de DNA, A.L.F - Automatic Laser Fluorescence (Pharmacia-LKB) e análise com o programa ALF Fragment Manager.

Tabela 1- Seqüência dos iniciadores, temperatura de anelamento (TA), tipo de repetição do microssatélite e faixa de possíveis tamanhos de fragmentos obtidos na amplificação de microssatélites.

Iniciadores	Seqüência 5'- 3'	Repetição	Amplicons	TA
1TTA	ATTGGCGTCAGTAGAAGAGA *ATTCACCCATTGTCTTAAAACC	(ATT) ₁₁	146/176	60
SMBR6	CCTTAACAGACATACACG *ATACAGGCTATAATCTACA	(CTT) ₁₀	247/277	58
SMBR5	AACTAACATGATTATGATGAC *CAT TTG AAA AAC AAA ACC GCA	(ATT) ₇	448/478	58
13TAGA	ACAGCACCCGTCCGGAGG *TTAAAATTCATTCGAACTGAAG	(GATA) ₁₀	443/483	60
Doo3	GTCACAGATACCTGACGAGCTG *TCTATGTATCTCTACCCACCCCTATC	(CTAT) ₁₆	214/242	58
G5	GAATTACTGTCCCTTTATCTC *AAACTATTCATTA CTGTCGGG	(ATT) ₇	320/344	58

*Iniciador marcado com fluoresceína

3.9 PCR de microssatélites

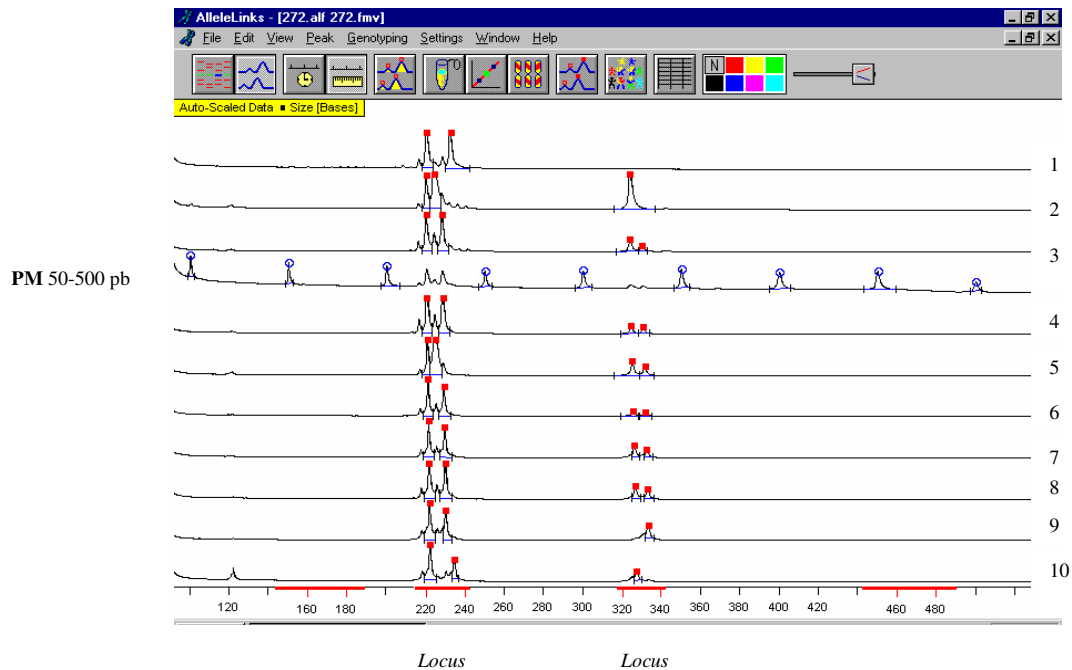
Em cada reação de PCR foram utilizados dois pares de iniciadores. Nestas reações foram realizadas a amplificação de fragmentos de DNA de vermes adultos das gerações F₁ a F₇ de cada grupo LE e LEi.

Para cada reação de PCR foram utilizados aproximadamente 2ng de DNA (2u), 0,5μl de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima fornecido pelo fabricante (1,5 mM de MgCl₂, Tris-HCl 10 mM pH=8,0, KCl 50 mM), 0,75 μl de KCl (0,5M), 10pmoles de cada iniciador e 0,6μL de dNTP 200 μM, para um volume total de reação de 15μl. A PCR foi realizada em termociclador Perkin Elmer modelo 2400, por 35 ciclos consistindo de 3 min a 95°C para desnaturação, 1 min de anelamento à temperatura média apropriada para cada par de iniciadores (Tabela 1), 30 seg a 72°C para a extensão e 30 seg a 95°C para desnaturação. O ciclo foi repetido por 35 vezes a partir do segundo passo e terminado com 30seg a 72°C. Os tubos foram mantidos a 4°C após o termino da reação.

Após a PCR, 3μl dos produtos de amplificação foram submetidos a análise por eletroforese em géis de poliacrilamida a 8%. Para a observação dos produtos, os géis foram fixados em 150 ml de solução de etanol a 10% (v/v) e 0,5% de ácido acético (v/v), e impregnados com nitrato de prata a 0,3%. Os géis foram, então, lavados em água deionizada e revelados em solução aquosa de hidróxido de sódio 3% (p/v) com 0,5% de formaldeído (v/v), até o aparecimento das bandas (Sanguinetti *et al.*, 1994).

3.0.1 Determinação do tamanho dos alelos de microssatélites

Para a determinação do tamanho dos alelos dos microssatélites amplificados, 1µl do produto da PCR foi desnaturado a 95°C por 3 min e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% com 7M de uréia, utilizando-se tampão de corrida TBE 0,6 X (1M de Tris, 0,83 M de ácido bórico e 10 mM de EDTA) em seqüenciador automático de DNA A.L.F - Automatic Laser Fluorescence (Pharmacia) por 3 horas. Também foram aplicados no gel a cada 10 canaletas com amostras, 10 fmoles de um padrão de peso molecular fluorescente de 50 pb (Pharmacia) como referência de mobilidade dos fragmentos. Esta metodologia permite a análise simultânea de até 36 amostras em cada corrida. Os resultados obtidos foram analisados no programa Allelink (Pharmacia). O Programa Allelink calcula o tamanho dos alelos de microssatélites baseado no tamanho do padrão de peso molecular. É gerada então, uma tabela em que são apresentados os *locus* analisados e os diferentes alelos encontrados por indivíduo analisado (Figura 7).



Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
27				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
28			Do@3	220,4	220,4	222
			Do@3	228,4	228,4	230
			G5	324,3	324,3	323
			G5	330,6	330,6	332
31			Do@3	220,6	220,6	222
			Do@3	224,8	224,8	226
			G5	325,0	325,0	326
32			G5	331,3	331,3	332
			Do@3	220,9	220,9	222
			Do@3	229,0	229,0	230
34			G5	325,3	325,3	326
			G5	331,6	331,6	332
			Do@3	221,3	221,3	222
			Do@3	229,4	229,4	230
			G5	326,0	326,0	326
			G5	332,3	332,3	332

Figura 7- Eletrofluograma e tabela gerada pelo programa Allelink com o tamanho dos alelos dos produtos de PCR dos loci *Doo3* e *G5*, em dez indivíduos analisados.

3.0.2 Análise Genética de populações “LEi” e “LE”.

O estudo da genética de populações dos isolados de *S. mansoni* selecionadas (LEi) e não selecionadas por PZQ (LE) consistiu da análise de microssatélites de vermes machos e fêmeas obtidos a cada geração do parasito. Os parâmetros utilizados para a análise da estrutura das populações foram: frequência genotípica e alélica, Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e coeficientes de endogamia (F). Os dados dos alelos por *locus* em cada indivíduo, obtidos pela amplificação dos microssatélites, foram determinados no programa Allelink (Pharmacia), em seguida tabulados e então lançados no programa Fstat versão 2.9.3.2 (Goudet, 2002) e Arlequin versão 2.000 (Schneider *et al.*, 2000).

O cálculo do equilíbrio de HW foi feito no Arlequin, pois o teste utilizado pelo programa é mais adequado para os dados das populações estudadas, por utilizar o teste de Guo e Thomson (1992). Este teste é mais adequado do que o teste χ^2 por levar em consideração fatores comuns na análise genética, como o número pequeno da amostra e a presença de alelos raros. Os demais testes foram realizados no programa Fstat.

O critério para a preferência da utilização do programa Fstat sobre o Arlequin foi principalmente devido à forma diferenciada de se calcular a heterozigosidade esperada (H_s), umas das principais medidas de diversidade gênica usada para analisar a diferenciação genética entre subpopulações. O Arlequin utiliza, em seus cálculos de diversidade, o estimador de Nei (1977) que não leva em consideração a heterozigosidade observada e fatores de correção para véis (desvio do valor verdadeiro). O programa Fstat utiliza o estimador de Nei e Chesser (1983) que avaliam estas características importantes de serem consideradas, pois a partir delas o valor de diferenciação encontrado representará uma estimativa real das populações analisadas. Os cálculos realizados no programa Fstat são descritos a seguir:

Cálculo da Frequência Alélica: determinados pela frequência de genótipos homozigotos e heterozigotos. (Nei & Kumar, 2000).

O cálculo da frequência do alelo i é dado por:

$$\text{Equação 1. } P_i = 2P_{ii} + \sum_{j \neq i} P_{ij}$$

onde:

i e j : alelos que variam de 1 até k alelos;

P_{ii} : frequência do genótipo homocigoto;

P_{ij} : frequência do genótipo heterocigoto;

ΣP_{ij} : somatório da frequência dos genótipos heterocigotos;

Cálculo da Frequência Genotípica esperada e observada: é feito diretamente pelo número de genótipos em cada população dividido pelo número de indivíduos (Nei & Kumar, 2000).

Diversidade Gênica: É uma medida de variação genética calculada através da frequência de heterocigotos esperados (H_s). A diversidade gênica em populações é também calculada pelos índices de Fixação ou estatísticas F de Wright, 1921. Estes índices medem a diversidade genética dentro de populações (F_{is}) e entre populações (F_{st}). Os índices de fixação de Wright foram redefinidos por Nei, 1977 para a sua utilização em populações reais. Os cálculos de F foram realizados como mostra a seguir:

- F_{IS} : (Nei, 1977): mede o endocruzamento dentro de uma população. Estima a diversidade gênica através do déficit de heterocigotos dentro das populações (equações 2 e 3).

$$\text{Equação 2. } F_{IS} = 1 - \frac{h_o}{h_s} \text{ onde:}$$

H_o = heterocigosidade observada dentro de uma população;

H_s = heterocigosidade esperada dentro de uma população.

Equação 3.
$$H_s = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_i p_i^2 - \frac{H_o}{2n} \right)$$

$\sum_i p_i^2$ = somatório da frequência alélica ao quadrado.

n = número de indivíduos.

- **F_{ST}**: (Nei, 1977): É um parâmetro que mede a diferenciação genética entre populações. É o endocruzamento entre subpopulações (S) dentro da população total (T). Serve como uma medida de distância genética entre subpopulações. Este índice é influenciado pelo tamanho da subpopulação e de fatores de seleção. Varia de 0 a 1, sendo:

0: nenhuma diferenciação genética;

0.05 a 0.15: moderada diferenciação genética;

0.15 a 0.25: grande diferenciação genética;

maior que 0.25: muito grande diferenciação genética.

1: Fixação de alelos (equação 4 e 5).

Equação 4.
$$F_{ST} = 1 - \frac{H_s}{H_T}$$
 onde:

H_T: Heterozigosidade esperada na população total.

Equação 5.
$$H_T = 1 - \sum_{i=1}^k \bar{p}_i^2$$

onde: $\sum \bar{p}_i^2$: Somatório da frequência média dos alelos nas populações analisadas.

k : número de alelos.

- **R_{ST}** (Slatkin, 1995): Este método reflete melhor o mecanismo de mutação no *locus* de microssatélites. É uma analogia do Fst assumindo o Modelo SMM (*Stepwise Mutation Model*), modelo de mutação na qual ocorrem mudanças passo a passo no número de repetições (Zhu *et al.*, 2000). O tamanho de alelos aumenta ou diminui por uma unidade de repetição.

Teste de Hardy-Weinberg (HW): O Equilíbrio de HW parte do pressuposto de que as populações estão em equilíbrio genético e as frequências genotípicas permanecem constantes ao longo das gerações. O equilíbrio de HW pode ser estimado em populações desconsiderando fatores evolutivos como:

- população grande e panmítica (cruzamento ao acaso);

- sem pressões seletivas;
- sem mutação e migração.

O modelo de HW pode nos ajudar a fazer suposições sobre os mecanismos evolutivos que podem estar atuando na população. O teste de Hardy-Weinberg mede o desvio da heterozigosidade observada em relação a heterozigosidade esperada, atendendo aos pressupostos de HW. Para detectar a significância estatística deste desvio, foi utilizado o teste Guo e Thompson (1992). Este teste é mais adequado do que o teste χ^2 por levar em consideração fatores comuns na análise genética, como o número pequeno da amostra e a presença de alelos raros.

3.0.3 Análises Estatísticas

Na avaliação estatística dos dados obtidos nas perfusões foi utilizado o programa de estatística SPSS©, v.11.

Cálculo da razão do número médio de parasitas (Equação 6):

$$\text{Equação 6. } Raza\o = \sum_{l=1}^2 \sum_{m=1}^2 \left(\frac{n_{ijklm}}{\bar{x}_{jklm}} \right).$$

onde:

j: população (LEi, LE controle), *j*=1,2;

k: passagem, *k*=1,7;

l: sexo (masculino, feminino), *l*=1,2;

m: órgão (mesentério, fígado), *m*=1,2;

n_{ijklm} : número de vermes no camundongo *i* no grupo tratado e no caso de população *j*, passagem *k*, sexo *l* e órgão *m*;

\bar{x}_{jklm} : média de vermes em todos os camundongos no grupo controle de infecção e em cada caso: população *j*, passagem *k*, sexo *l* e órgão *m*.

A razão do número médio dos vermes obtidos na perfusão do grupo tratado pelo seu controle foi utilizada para avaliar o número de vermes obtidos em cada perfusão, de acordo com a eficiência da infecção em cada passagem. Como o objetivo é avaliar a diferença de eficácia do tratamento sobre os vermes da população LEi e LE, a utilização da razão entre a leitura do indivíduo tratado e a média do grupo controle de infecção é mais recomendada.

Cálculo da Taxa de Redução (em porcentagem) do número de vermes segundo Cioli, 2004 (Equação 7):

$$\text{Equação 7. Taxa de Redução} = \frac{|\bar{x}_2 - \bar{x}_1|}{\bar{x}_2} \times 100$$

onde:

\bar{x}_1 : média do número de vermes obtidos nos camundongos em cada população (LEi ou LE) e em cada passagem no caso do Grupo Tratado;

\bar{x}_2 : média do número de vermes obtidos nos camundongos em cada população e em cada passagem no caso do Grupo de Controle de Infecção.

Teste Mann-Whitney:

Este teste não-paramétrico é utilizado para amostras independentes. Foi utilizado com o objetivo de verificar a diferença com o nível de significância de 0,05 ($\alpha=0.05$) entre o número de vermes obtidos nos grupos selecionados e não selecionados com PZQ. Para os casos com mais de dois grupos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis (Wayne W. D, 1978). É calculado a partir do ordenamento (Rank) de todas as observações do menor ao maior valor. A hipótese nula do teste é que as duas populações tenham distribuição idênticas.

Teste Wilcoxon

Para avaliar a existência de diferença significativa ($\alpha=0,05$), com o nível de significância de 0,05 entre o número de vermes fêmeas e machos, foi utilizado este teste não-paramétrico para amostras pareadas, pois a distribuição dos dados não foi normal (Wayne W. D, 1978). O resultado é calculado a partir da mediana de todas as observações. A hipótese nula do teste é que as duas medianas sejam idênticas.

4. RESULTADOS

4.1 Análise dos dados parasitológicos:

4.1.1 O efeito da seleção com praziquantel na recuperação de vermes.

Para avaliar o efeito do tratamento com PZQ durante o processo de indução de resistência, foi avaliada a razão entre a média do número de vermes recuperados na perfusão de camundongos e o percentual de redução de vermes nas populações LEi e LE. Como os resultados mais significativos foram observados quando as comparações foram feitas entre a 1^a, 6^a e 7^a gerações, iremos dar ênfase a estes resultados. Porém, a totalidade dos resultados pode ser vista em anexo. Na primeira geração dos parasitos os camundongos infectados foram tratados com 200 mg/kg de PZQ. Na sexta e sétima gerações foram tratados com 900mg/kg. O número de vermes recuperados após o tratamento foi maior na população LEi. Apesar da dose de PZQ ser cinco vezes maior na sétima geração de parasitos sob a seleção, o número de vermes recuperados foi o mesmo que na primeira geração. O percentual de redução de vermes foi 3,2 vezes menor na população LEi, que na população LE, na última geração analisada. O processo de indução de resistência com PZQ levou à diferenciação das populações LEi e LE quanto à média de vermes recuperados e quanto ao percentual de redução (Tabela 2). A seleção de vermes menos susceptíveis ao PZQ contribui para o aumento do número de vermes recuperados e para diminuição do percentual de redução. A cada geração submetida ao tratamento o número de vermes sensíveis à droga diminui, aumentando conseqüentemente o número de vermes recuperados.

Com o objetivo de avaliar se a seleção com PZQ pode contribuir para a diferenciação, quanto à razão do número de vermes recuperados, das populações LEi e LE foi calculada a significância da diferença entre estas populações utilizando a razão entre as médias do número de vermes recuperados nos grupos tratados pelos seus respectivos controles de infecção, durante as sete gerações. A razão entre o número de vermes foi maior no grupo LEi, este aumento foi significativo a partir da sexta geração. Na primeira geração a razão entre o número de vermes obtidos nas populações LEi e LE não é significativamente diferente. Nesta etapa os grupos LE e LEi foram os mesmos, já que em ambos grupos foram utilizados a mesma cepa LE submetida a apenas um tratamento (Tabela 3). O processo de indução de resistência levou a um aumento significativo da razão do número de vermes recuperados. Como a razão do número de vermes recuperados em LEi é significativamente maior que LE, podemos admitir supor que houve seleção de vermes menos susceptíveis a PZQ na população LEi (Tabela 3 e gráfico 1).

Tabela 2 - Razão entre as médias de vermes da população tratada sobre seu controle não tratado e percentual de vermes obtidos nas populações LEi e LE, após o tratamento com PZQ, nas gerações 1, 6 e 7.

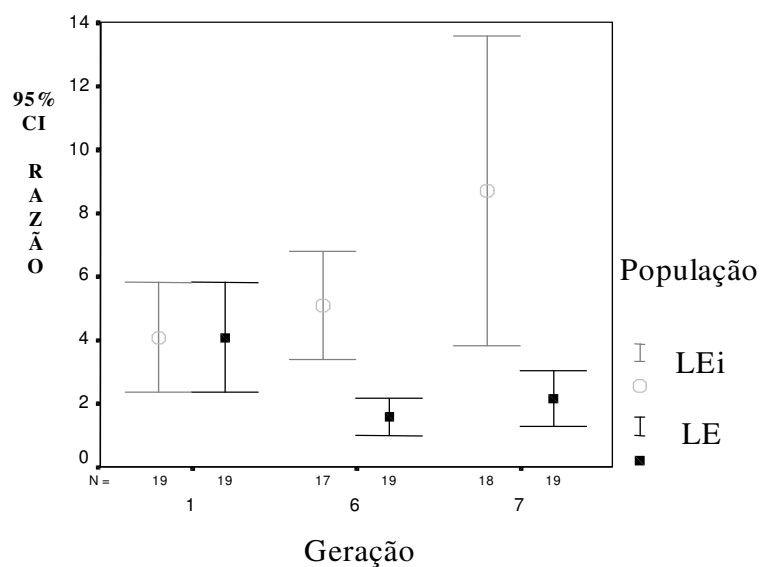
Geração	Cepa	Tratamento	Razão entre as médias de vermes	% Redução
1 ^a	LE	2x100mg/kg	0,87	13,42
			0,87	13,42
6 ^a	LEi	3x300mg/kg	0,78	21,68
	LE		0,4	59,88
7 ^a	LEi	3x300mg/kg	0,85	14,58
	LE		0,53	47,31

Tabela 3 - Diferença entre a mediana da razão do número de vermes obtidos nas populações tratadas sobre seu controle não tratado em LEi e LE, nas gerações 1, 6 e 7.

Geração	Cepa	Mediana	Valor-p*	Média	Desvio
1 ^a	LE	2,3085	-	4,0545	3,5813
6 ^a	LEi	4,3762	<0,001	5,0649	3,3062
	LE	1,2572		1,5577	1,2170
7 ^a	LEi	4,5845	<0,001	8,6885	9,8044
	LE	1,6541		2,1527	1,8513

*p- Teste Mann Whitney

Gráfico 1 : Intervalo de confiança entre a razão do número de vermes do grupo tratado pelo seu respectivo controle de infecção, nas populações LEi e LE.



4.1.2 A ação de PZQ na recuperação de vermes machos e fêmeas

Com o objetivo de avaliar a diferença da ação de PZQ em vermes machos e fêmeas foi calculada a taxa de redução e a razão da média do número de vermes fêmeas e machos nas duas populações estudadas (Tabelas 4, 5 e 6). A taxa de redução foi calculada a partir do número de vermes recuperados após o tratamento. Os resultados demonstraram que existe diferença na taxa de redução de vermes fêmeas e machos (Tabela 4). Na primeira geração de vermes obtidos após o tratamento com 200 mg/kg de PZQ houve maior redução no número de vermes fêmeas recuperados. A partir da sexta geração de vermes, após o tratamento com 900 mg/Kg de PZQ, a diferença entre a taxa de redução de vermes machos e fêmeas diminui em LE e LEi. Na sétima geração da população LEi a taxa de redução de vermes fêmeas é somente 2 vezes maior que a taxa de redução em vermes machos. Na população LE a taxa de redução de vermes fêmeas é 1vezes maior que em vermes machos. A taxa de redução do número de vermes fêmeas é maior que a taxa de redução de vermes machos após o primeiro tratamento e após o processo de indução de resistência (Tabela 4). De acordo com a taxa de redução de vermes, PZQ age diferencialmente sobre vermes machos e fêmeas.

Tabela 4 - Percentual de redução de vermes machos e fêmeas recuperados, nas gerações 1, 6 e 7, nas populações LEi e LE.

Geração	Percentual de Redução % em		Percentual de Redução % em	
	Vermes Machos		Vermes Fêmeas	
	LEi	LE	LEi	LE
1 ^a	6,9	6,9	46,1	46,1
6 ^a	19,8	59,0	23,1	60,5
7 ^a	8,7	46,4	18,3	48,5

A diferença entre a razão do número médio de vermes machos e fêmeas foi calculada para avaliar a ação de PZQ em vermes machos e fêmeas nas populações LEi e LE. Houve diferença significativa entre o número médio de vermes fêmeas e machos em LEi e LE na primeira geração, nesta etapa as populações LEi e LE são iguais. A razão do número médio de vermes machos recuperados foi maior que o número médio de vermes fêmeas em ambas populações. Na sétima geração houve diferença significativa entre a razão média de vermes recuperados fêmeas e machos somente na população LEi. Na população LE não foi possível observar diferença significativa entre o número médio de vermes fêmeas e machos (Tabela 5). A recuperação de vermes machos é significativamente maior que vermes fêmeas após o primeiro tratamento e após o processo de indução de resistência a PZQ. Observando a média de recuperação de vermes em cada sexo foi possível concluir que o tratamento com PZQ pode ser mais efetivo sobre vermes fêmeas que sobre vermes machos.

Tabela 5 – Diferença entre a razão do número de vermes machos e fêmeas obtidos populações LEi e LE, nas gerações 1, 6 e 7.

Geração	Cepa	Sexo	Mediana	Valor- p($\alpha=0,05$)*	Média	Desvio
1 ^a	LEi	Macho	1,92	0,002	2,72	2,13
		Fêmea	0,66		1,36	1,79
6 ^a	LEi	Macho	1,7857	0,309	2,2217	2,0325
		Fêmea	2,5905		2,8432	2,1745
	LE	Macho	0,618	0,904	0,9314	1,011
		Fêmea	0,5479		0,6263	0,4511
7 ^a	LEi	Macho	3,181	0,016	5,873	7,3489
		Fêmea	1,7683		2,8155	2,6822
	LE	Macho	0,8351	0,658	1,1379	0,9727
		Fêmea	0,6967		1,0148	0,9441

- Teste Wilcoxon

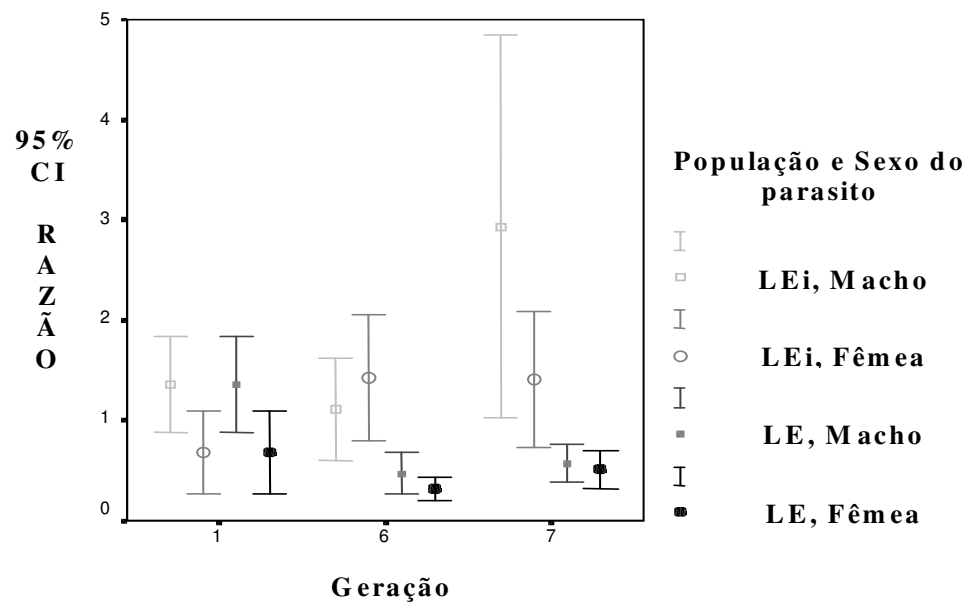
A razão do número de vermes machos e fêmeas recuperados, nas gerações 1, 6 e 7 foi avaliada separadamente para analisar a diferença entre as populações LEi e LE quanto à recuperação de vermes fêmeas e machos (Tabela 6). Na sexta e sétima gerações as populações LEi e LE se diferem significativamente quanto ao número de vermes machos e fêmeas recuperados. Tanto o número de vermes machos quanto fêmeas na população LEi é maior que o número de vermes machos e fêmeas na população LE (Tabela 6). As populações LEi e LE diferem quanto à recuperação de vermes machos e fêmeas no final do processo de indução de resistência (Tabela 6 e Gráfico 2) . Os dados mostrados até agora indicam, portanto, que houve seleção de vermes com PZQ e que a seleção foi observada para ambos os sexos.

Tabela 6 - Diferença entre as populações LEi e LE quanto à razão do número de vermes machos e fêmeas recuperados.

Geração	Sexo	Cepa	Mediana	Valor p*
1 ^a	Macho	LEi		
		LE	1,92	
	Fêmea	LEi	0,66	
		LE		
6 ^a	Macho	LEi	1,78	0,024
		LE	0,61	
	Fêmea	LEi	2,59	0,001
		LE	0,54	
7 ^a	Macho	LEi	3,18	0,003
		LE	0,83	
	Fêmea	LEi	1,76	0,001
		LE	0,69	

*Teste Mann-Whitney

Gráfico 2 - Intervalo de confiança entre a razão do número de vermes nas populações LEi e LE, separados por sexo.



4.1.3 Distribuição de parasitas nos camundongos e oograma

Para avaliar a distribuição de parasitas no mesentério e fígado após o tratamento com PZQ nas populações LEi e LE, foram realizadas a perfusão do sistema porta dos camundongos para a retirada dos vermes machos e fêmeas e em seguida foi feita a contagem dos mesmos, considerando a sua distribuição no fígado e mesentério separadamente. O número de vermes encontrados no grupo tratado foi então comparado com aquele encontrado no grupo de camundongos não tratados (controles de infecção). A média de vermes no mesentério foi sempre maior que no fígado nas populações LEi e LE (Tabelas 7, 8). Apesar do tratamento, não foi possível observar migração de vermes do mesentério para o fígado, em ambas populações.

O efeito de PZQ na postura de ovos do parasito foi avaliado através do oograma, em todas as gerações de LEi e LE. Fragmentos do intestino delgado foram examinados ao microscópio para identificação dos estágios de desenvolvimento de ovos e se eram viáveis ou estavam mortos. Pode ser observada alteração no oograma em ambas populações. Após a sétima geração 30% do oograma permaneceu sem alteração na população LEi, em LE 10% do oograma permaneceu sem alteração. Estes resultados indicam que existem mais vermes fêmeas eliminando ovos na população LEi. Não houve parada total de postura de ovos após o tratamento com dose curativa em ambas as cepas.

Tabela 7 - Distribuição da média de vermes recuperados, no fígado e mesentério, após tratamento da população LEi, nas gerações 1, 6 e 7.

Esquema de tratamento em LEi	Média - Distribuição de vermes		Total de vermes
	Mesentério	Fígado	Mesentério e Fígado
1 ^a - 2x100mg/Kg	24,37	3,47	27,84
6 ^a - 3x300mg/Kg	22,24	1,76	24,00
7 ^a - 3x300mg/Kg	51,00	6,90	57,90

Tabela 8 - Distribuição da média de vermes recuperados, no fígado e mesentério, após tratamento na população LE, nas gerações 1, 6 e 7.

Esquema de tratamento em LE	Média -Distribuição de vermes		Total de vermes
	Mesentério	Fígado	Mesentério e Fígado
1 ^a - 2x100mg/Kg	24,37	3,47	27,84
6 ^a - 3x300mg/Kg	16,32	0,89	17,21
7 ^a - 3x300mg/Kg	37,26	3,42	40,68

4.2. Análise Genética

4.2.1 Análises de frequências genotípicas e alélicas

O número e as frequências de alelos e genótipos de *loci* contendo microssatélites polimórficos nas populações LEi e LE, foram analisados e comparados para avaliar se o processo de indução de resistência pode contribuir para a mudança na estrutura genética da população selecionada. O número e as frequências de alelos e genótipos por *locus* foram determinados pelo programa Fstat.

O número de alelos foi semelhante em ambas populações, a distribuição alélica e os alelos mais frequentes na primeira e última geração são diferentes na maioria dos *loci* estudados. O número de alelos na população LEi da primeira e última gerações decresce nos *loci* Smbr 5, Smbr 6 e G5 e permanece o mesmo nos *loci* Doo3, 1TTA e 13TAGA. Na população LE, o número de alelos decresce nos *loci* Smbr5, 6, G5, 1TTA e 13TAGA permanecendo igual somente no *locus* Doo3 (Tabela 9).

O número de genótipos em ambas populações varia em cada *locus*. Os genótipos diferem tanto entre populações quanto em gerações diferentes da mesma população. O mesmo genótipo foram observados, nos *loci* Smbr 6 e G5 em LEi e *loci* Smbr 5, G5 e ITTA em LE quando a 1^a e a 7^a gerações foram comparadas (Tabela 10).

Os alelos mais frequentes são diferentes em vermes fêmeas e machos em todos os *loci* na população LEi. Na população LE foram encontrados os mesmos alelos nos *loci* Smbr 5 e Doo3 (Tabela 11). As distribuições genotípicas e alélicas diferem quanto à gerações da mesma população, ao sexo do parasito, a populações analisadas e aos *loci* estudados (Tabelas 10, 11 e 12). A variabilidade encontrada em cada *locus* pode ser aleatória, o processo de indução de resistência pode ter contribuído para a variação no número e frequência genotípica e alélica. No entanto, outros fatores como a diferenciação das populações determinada pela seleção aleatória de populações de laboratório, o isolamento destas populações para o estudo de diferentes gerações do parasito, diferenças entre o sexo dos parasitos e diferentes pressões seletivas sobre cada *locus* de microssatélites usado não devem ser desconsideradas.

4.2.2 Análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg

O índice de heterozigosidade observada e esperada foi calculado para avaliar a se ocorreu a redução da heterozigosidade observada na população LEi após a indução de resistência por comparação com a cepa LE. Para analisar esta hipótese foram calculados o desvio de Ho e He e a proporção de Ho entre as populações LE1^a e LEi7^a gerações. Houve redução significativa da proporção de Ho na população LEi, para os *loci* Smbr 5, G5 e Doo3. O desvio entre Ho e He foi significativo em todos os *loci* em ambas populações, exceção feita ao *locus* Doo3.

A manutenção do ciclo do parasita em laboratório pode ter contribuído para o aumento do desvio do equilíbrio de HW na maioria dos *loci* estudados, nas populações LEi e LE. O processo de indução de resistência não causou diferença significativa entre as populações LE1^a e LEi7^a gerações, quanto ao desvio da heterozigosidade observada e esperada (HW). No entanto, a Ho diminui significativamente em LEi7^a em três *loci* quando comparada ao Ho de LE1^a geração (Tabela. 13). O tratamento com PZQ pode ter selecionado parasitos menos susceptíveis a PZQ, a população selecionada por ser mais homogênia pode apresentar um maior número de indivíduos homozigotos o que acarretaria na diminuição na heterozigosidade observada e esperada.

Tabela 13 – Comparação entre heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada, nas populações LE1 e LEi7^a e entre a proporção da heterozigosidade observada, em cada *locus*, entre as populações LE 1 e LEi 7.

<i>locus</i>	LE1 ^a			LEi7 ^a			teste t
	Ho	He	P*	Ho	He	P*	P
Smbr 5	0,52	0,82	0,00	0,20	0,79	0,00	0,00277
Smbr 6	0,67	0,79	0,00	0,71	0,75	0,00	0,70914
G5	0,80	0,69	0,00	0,16	0,64	0,00	0,00001
Doo3	0,90	0,77	0,10	0,65	0,71	0,10	0,00633
1TTA	0,70	0,77	0,00	0,62	0,79	0,00	0,45076
13TAGA	0,45	0,81	0,00	0,65	0,87	0,00	0,07781

P*-valor p encontrado no teste de Guo e Thompson.

P*-Teste t para proporção de Ho entre as populações LEi e LE.

Para avaliar o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg devido a perda de heterozigosidade observada entre a primeira e última geração da população LEi foi calculado o índice de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e). O cálculo do desvio de HW foi realizado com o objetivo de avaliar se sucessivos tratamentos com PZQ podem contribuir para a homogenização da população, o que levaria a uma perda da heterozigosidade observada, aumento assim o desvio entre H_o e H_e . Na primeira geração da população LEi quatro dos seis *loci* estudados estão em equilíbrio de HW. Na sétima geração apenas o *locus* Doo3 está em equilíbrio de HW na população LEi. De modo interessante, observamos uma maior redução da heterozigosidade observada quando comparamos a primeira e sétima gerações no *locus* G5 (Tabela 14). Um indicativo da pressão seletiva do PZQ pode ser o maior número de *loci* em desequilíbrio HW notadamente no *locus* G5, na comparação entre a primeira e a sétima gerações da população LEi (Tabela. 14).

Para analisar o efeito da manutenção do ciclo do parasito na variabilidade genética do parasito foram calculados o desvio do equilíbrio de HW e a proporção de heterozigosidade observada em diferentes gerações de LE. A H_o foi menor na primeira geração nos *loci* Smbr6, Smbr5, ITTA e 13 TAGA. No *locus* G5 a H_o foi significativamente maior do que a esperada. Somente no *locus* Doo3 ocorreu o equilíbrio de HW. Na sexta geração ocorreu equilíbrio de HW nos *loci* Smbr 6, G5 e 1 TTA. Nos *Loci* Smbr5 e 13TAGA a H_o foi menor que ao H_e e o oposto foi observado para o *locus* Doo3. Não houve diferença significativa entre H_o de LE primeira e última geração, exceto para o *locus* 13 TAGA que foi maior na 6^a geração (Tabela 15). Não ocorreu diminuição na heterozigosidade observada em cinco dos seis *loci* estudados. O número de *loci* em desequilíbrio de HW aumentou da primeira (um *locus*) para a última geração estudada (três *loci*) (Tabela 15). Existe maior diferença entre a 1^a e 6^a gerações de LEi que entre a 1^a e 6^a gerações de LE.

Tabela 14 – Comparação entre heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada na primeira e da sétima gerações da população LEi e entre a proporção da heterozigosidade observada, em cada *locus*, entre a 1^a e 7^a gerações de LEi.

P*- Valor p encontrado no teste de Guo e Thompson.

<i>Locus</i>	LEi1 ^a			LEi7 ^a			Teste t
	Ho	He	P*	Ho	He	P*	Valor -p
Smbr 5	0,36	0,75	0,00	0,20	0,79	0,00	0,219362
Smbr 6	0,81	0,72	0,60	0,71	0,75	0,00	0,40161
G5	0,82	0,75	0,09	0,16	0,64	0,00	0,000389
Doo3	0,86	0,79	0,52	0,65	0,71	0,10	0,068475
1TTA	0,59	0,61	0,00	0,62	0,79	0,00	0,829941
13TAGA	0,80	0,89	0,11	0,65	0,87	0,00	0,290207

p- Teste t para proporção de Ho entre as gerações de LEi.

Tabela 15 – Comparação entre heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada nas populações LE1^a e LE6^a e entre a proporção da heterozigosidade observada, em cada *locus*, entre as populações LE1^a e LE6^a.

<i>Locus</i>	LE1 ^a			LE6 ^a			Teste t
	Ho	He	P*	Ho	He	P*	Valor-p
Smbr 5	0,52	0,82	0,00	0,69	0,77	0,00	0,183515157
Smbr 6	0,67	0,79	0,00	0,43	0,67	0,05	0,072296976
G5	0,80	0,69	0,00	0,71	0,57	1,00	0,624863591
Doo3	0,90	0,77	0,10	0,86	0,70	0,00	0,645475664
1TTA	0,70	0,77	0,00	0,78	0,62	0,44	0,486446079
13TAGA	0,45	0,81	0,00	0,73	0,78	0,00	0,024587885

P*-valor p encontrado no teste de Guo e Thompson.

p- Teste t para proporção de Ho entre as populações LE1^a e LE6^a.

4.2.3 Análises de endogamia e diversidade genética

Para avaliar se ocorreu mudança na variabilidade genética na população LEi na sétima geração devido à indução de resistência foi calculado o Fis- coeficiente de endogamia (Fis) e índice de diversidade genética em LE primeira e LEi sétima geração. Fazendo uma comparação entre estes índices nas duas populações analisadas observamos que em LEi sétima geração houve um aumento de 0,134-0,309 do Fis e uma redução significativa da diversidade genética (Tabela 16). A seleção do parasita com PZQ pode ter determinado a redução significativa da diversidade genética intrapopulacional e conseqüentemente o aumento do índice de endogamia. A partir desta observação podemos inferir que ocorreu a seleção de parasitas. Antes do processo de indução de resistência as duas populações eram iguais e ao longo deste processo elas se diferenciaram quanto à diversidade genética e quanto à susceptibilidade a PZQ. O aumento da endogamia de 2,5 vezes pôde também ser observado entre a primeira e sétima geração da população LEi. Porém, a diferença entre a proporção de heterozigotos entre a primeira e sétima geração de LEi não foi significativa. A indução de resistência pode ter contribuído para aumento do índice de endogamia na população, selecionando indivíduos aparentados. O cruzamento entre indivíduos aparentados pode aumentar o número de indivíduos homozigotos, causando a deficiência do número de indivíduos heterozigotos que é a medida usada para calcular o índice de endogamia Fis. Este efeito não pode ser observado analisando a proporção de heterozigotos na população pela medida de diversidade genética Hs (Tabela 16).

Foram calculados o coeficiente de endogamia (Fis) e o índice de diversidade genética em LE1^a e LE6^a para avaliar se a manutenção de ciclos de *S. mansoni* em camundongos pode determinar mudança na variabilidade genética da população LE. Não ocorreu alteração no índice de endogamia e diversidade genética da primeira para a última geração de LE. Considerando as comparações realizadas nos resultados citados acima foi possível observar que o tratamento com PZQ pode determinar a alteração na variabilidade genética de populações de *S. mansoni*. Existe menor diversidade genética e maior endogamia na população que passou pela pressão seletiva com PZQ (Tabela 16 e 17).

Tabela 16 - Comparações entre os índices de endogamia (Fis) e diversidade genética dentro de diferentes gerações de LEi e LE e entre LE e LEi.

	LEi1 ^a X LEi7 ^a	LE1 ^a X LEi7 ^a	LE1 ^a X LE6 ^a
Fis	0,126-0,309	0,134-0,309	0,134-0,040
Diversidade Genética (H _s)	0,740-0,760	0,667-0,571	0,770-0,690
P*	0,710839426	0,03957689	0,114072317

P*= diferença entre a diversidade genética (H_s).

Tabela 17- Intervalo de confiança e sinal de *f* em cada *locus*, geração e população analisada.

<i>Loci</i>	LE		LEi	
	1 ^a Geração	7 ^a Geração	1 ^a Geração	7 ^a Geração
SmBr6	0 (-0,05; 0,30)	+ (0,09; 0,68)	0 (-0,26;0,21)	0 (-0,27;0,13)
SmBr5	+ (-0,18; 0,56)	0 (-0,05; 0,30)	+ (0,32; 0,85)	+ (0,52;0,89)
G5	0 (-0,37; 0,03)	- (-0,71; -0,09)	0 (-0,33; 0,16)	+ (0,25; 1,1)
Doo3	- (-0,29; -0,05)	0 (- 0,50; 0,00)	0 (-0,29; 0,18)	0 (-0,17; 0,26)
1TTA	0 (-0,14; 0,26)	- (-0,58; -0,02)	0 (-0,43; 0,48)	+ (0,01; 0,39)
13TAGA	+ (0,26;0,62)	0 (-0,21; 0,24)	0 (-0,28; 0,41)	+ (0,02; 0,25)

O = intervalo de confiança contendo coeficiente de endogamia (Fis) positivos e negativos.

+ = intervalo de confiança contendo coeficiente de endogamia (Fis) positivos somente.

- = intervalo de confiança contendo coeficiente de endogamia (Fis) positivos negativos.

4.2.4 Índices de Diversidade interpopulacional

Para avaliar se os tratamentos com doses sucessivas de PZQ podem levar a diferenciação genética das populações LEi e LE, foram comparados e analisados os índices de diversidade populacional Rst e Fst. As análises de diversidade medem a diferenciação genética entre subpopulações através do cálculo da heterozigosidade. Existe grande diferenciação genética entre gerações diferentes de LEi (Rst = 0,240) e entre LE primeira geração e LEi sétima geração (Rst = 0,230). A diferenciação genética entre LE1^a e LE6^a é moderada (Rst = 0,080) (Tabela 18).

A manutenção em laboratório da cepa LE pode ter contribuído para a diferenciação de gerações sucessivas de LE. Os tratamentos sucessivos com PZQ podem ter levado a diferenciação genética de LEi7^a e LE1^a. Estes dados indicam que a seleção de parasitos com drogas e a manutenção do ciclo de vida do parasito em laboratório contribuem para a diferenciação na estrutura genética de populações de *S. mansoni*.

Tabela 18 – Comparações entre os índices de diversidade interpopulacional dentro de diferentes gerações de LEi e LE e entre LE1^a e LEi 7^a.

	LEi 1 ^a X LEi7 ^a	LE1 ^a X LEi 7 ^a	LE1 ^a X LE 6 ^a
Rst	0,240	0,230	0,080
Fst	0,090	0,090	0,085

4.2.5 Índices de Diversidade entre vermes fêmeas e Machos

Com o objetivo de analisar o efeito da indução de resistência na variabilidade de vermes fêmeas e machos foram analisadas a variabilidade genética entre vermes machos e fêmeas nas populações LEi e LE, através do cálculo da média ponderada da diversidade genética (H_s) em cada sexo do parasito . Não foi possível observar diferença significativa na diversidade genética de vermes machos e fêmeas, nas duas populações estudadas (Tabela 19). A indução de resistência não levou a mudança, quanto à diversidade genética, entre vermes fêmeas e machos.

Tabela 19 - Média ponderada da diversidade genética (Heterozigosidade esperada) entre vermes machos e fêmeas.

	LEi1 ^a X LEi7 ^a	Valor-P*	LE1 ^a X LEi7 ^a	Valor-P*	LE1 ^a X LE6 ^a	Valor-P*
Machos	0,74-0,64	0,22	0,76-0,64	0,06	0,76-0,67	0,9
Fêmeas	0,60-0,75	0,06	0,77-0,75	0,79	0,77-0,62	0,51

* Teste t de proporções de H_s .

4.2.6 Resumo das análises genéticas

Em resumo, os dados da análise genética das populações mostram que:

Os índices de diversidade intrapopulacional indicam que existe diferença significativa entre a diversidade genética de LE e LEi. A diversidade genética da população LEi foi menor que LE.

Os índices de diversidade interpopulacional sugerem que ocorreu grande diferenciação genética entre as populações estudadas. Esta diferenciação é maior entre a população induzida (LEi) e não induzida à resistência (LE).

Os dados de diversidade intrapopulacional e interpopulacional revelam que o processo de indução de resistência contribui para a diminuição da variabilidade genética do parasito o que pode ter levado a diferenciação das populações LEi e LE.



5. DISCUSSÃO

Praziquantel é a droga de escolha para o tratamento da esquistossomose (WHO, 1993). A intervenção quimioterápica é de importância crucial para o controle desta doença (Grysses *et al.*, 1994). Relatos de resistência ou tolerância a praziquantel, de cepas de *S. mansoni* de áreas endêmicas e de laboratório, têm preocupado a comunidade científica. O PZQ é a única droga, atualmente, utilizada nos programas de controle da esquistossomose. *S. mansoni* tem uma grande capacidade de desenvolver resistência a doses terapêuticas de uma determinada droga, especialmente quando o parasita está sob pressão de drogas (Kinoti, 1987).

A variabilidade de cepas de *S. mansoni* quanto à susceptibilidade a drogas esquistossomicidas foi demonstrada em diferentes regiões endêmicas, como no Senegal, Egito e no Brasil (Rogers & Bueding, 1971; Katz *et al.*, 1973; Vieira *et al.*, 1991; Brindley *et al.*, 1991; Fallon *et al.*, 1994; Stelma *et al.* 1995; Coelho *et al.*, 1998; Ismail *et al.*, 1996 e 1999; Araújo *et al.*, 1996; Tsais *et al.*, 2000; Gryssels *et al.*, 2001; Cioli *et al.*, 2004). Várias hipóteses têm sido levantadas para justificar as razões que levaram a diferenciação de cepas de *S. mansoni* quanto a sua susceptibilidade a drogas, em regiões endêmicas. Os principais fatores que podem justificar as diferenças de cepas de *S. mansoni*, quanto à susceptibilidade a drogas, são a alta carga parasitária, a intensa transmissão e re-infecção, a presença de vermes imaturos, a deficiência na resposta imune dos pacientes, o uso de drogas com baixa qualidade, diferenças na avaliação e critérios de cura ou até mesmo a resistência (Gryseels *et al.*, 2001; Doenhoff *et al.*, 2002).

Ismail *et al.* (1996, 1999) observaram, no Egito, que 2,3% dos indivíduos infectados não foram curados, embora tivessem sido tratados com doses sucessivas de praziquantel. Em laboratório, 80% dos isolados de campo apresentaram baixa susceptibilidade a droga. A menor susceptibilidade ao PZQ é um problema observado em cepas de campo e comprovado em laboratório. O primeiro trabalho descrito que mostra que é possível induzir a resistência de *S. mansoni* ao PZQ foi publicado por Fallon *et al.* (1994). Após sete gerações de *S. mansoni* submetidas ao tratamento com doses subcurativas e crescentes de PZQ, foi possível obter uma cepa resistente à droga. Para realizar o experimento de indução de resistência, Fallon *et al.*, (1994) utilizaram na infecção dos camundongos um *pool* de cercárias de isolados de Porto Rico, Brasil e do Egito. A justificativa dos autores para o uso de um *pool* de cercárias seria aumentar a probabilidade do número de diferentes genes gerados por mutação ou seleção. Após a sétima geração sob a pressão de PZQ, mais de 80% dos vermes selecionados sobreviveram à dose curativa de 3 x 300 mg/kg de PZQ. O percentual de redução de vermes após a

sétima geração foi de 7%. Comparando a cepa selecionada, resistente, com outras cepas não selecionadas, foi possível observar diferenças significativas entre a média e o percentual de redução de vermes recuperados. O resultados deste trabalho corroboram com os resultados apresentados por Fallon *et al.* (1994). Com poucas gerações do parasito submetidas à pressão seletiva com PZQ é possível induzir a seleção de *S. mansoni* menos susceptíveis a droga.

Neste trabalho foi feita a indução de resistência a PZQ utilizando uma cepa de *S. mansoni* de laboratório. O protocolo de indução de resistência proposto por Fallon *et al.* (1994) foi utilizado com uma modificação na dosagem de PZQ administrada durante a terceira geração. Como o principal objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de populações de *S. mansoni*, após a indução de resistência, foram selecionadas para as comparações parasitológicas e genéticas as populações de LEi7^a geração e LE original. Quanto à análise dos dados parasitológicos, observamos que, na cepa selecionada LEi, a média da razão do número de vermes recuperados é 2 x maior e o percentual de redução de vermes é cerca de 3x menor do que na cepa não selecionada (LE). Um intrigante dado observado foi que o tratamento com doses curativas de PZQ indica que o método de tratamento com três doses de 300mg/kg de PZQ é menos eficaz do que uma única dose curativa de 400 mg/kg. Alguns autores já demonstraram que o estado de maturação da infecção por *S. mansoni* e o estágio no qual o hospedeiro é tratado têm implicações para a evolução e a eficácia da droga (Xiao *et al.*, 1985; Sabah *et al.*, 1986). A resposta a PZQ em diferentes estágios de desenvolvimento do parasito foi avaliada em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Todos os estágios de desenvolvimento de *S. mansoni* apresentaram susceptibilidade ao PZQ em experimentos realizados *in vitro* (Andrew, 1980). Apesar desse relato, a maior sensibilidade ao PZQ das cercárias e vermes adultos, em relação aos outros estágios foi observada em estudos *in vivo* e *in vitro* (Sabah *et al.*, 1986; Pica-Mattocchia & Cioli, 2004). Como os estágios do parasito podem variar de susceptibilidade a PZQ. O protocolo de tratamento de camundongos com 35 dias de infecção pelo *S. mansoni*, usado por Fallon *et al.* (1994), pode justificar a menor eficácia de PZQ. Os vermes nesta fase da infecção, não estão completamente desenvolvidos.

Provavelmente a variabilidade genética de uma população de *S. mansoni* originada de um *pool* de cercárias de campo, como a que foi utilizada no trabalho de Fallon *et al.*, (1994) é bem maior que a variabilidade genética de uma população de laboratório. A seleção de uma determinada característica é facilitada quando a variabilidade de uma população é maior. Uma das possíveis explicações para as diferenças encontradas em

nossos trabalhos podem estar na cepa e no número de isolados utilizados no experimento de indução de resistência. Existem diferenças fenotípicas significativas dentro e entre populações de *S. mansoni*, como as diferenças, quanto a infectividade de caramujos de diferentes áreas (Saoud, 1966; Minchella *et al.*, 1995). Além disso, características biológicas de cepas de campo, como taxa de maturação de vermes e fecundidade, parecem ser diferentes de cepas de laboratório (Fallon *et al.*, 1997). Parasitos mantidos em laboratório por muitas gerações podem mudar suas características, e a seleção de parasitos resistentes pode também alterar a biologia de vermes (Ling *et al.*, 2001). Mesmo assim, ao utilizarmos uma cepa de *S. mansoni* de laboratório e diferentes metodologias de infecção de caramujos e camundongos, foi possível obter um isolado de *S. mansoni* com menor susceptibilidade ao PZQ.

Um modelo de estudo foi desenvolvido para verificar como o tratamento pode influenciar na diversidade genética do parasito. De acordo com este estudo, as frequências de cepas de parasitos resistentes podem aumentar dependendo da relação entre o valor adaptativo da cepa, o custo de resistência e a diminuição da pressão seletiva com drogas. Se a reprodução e a virulência estão ligadas à resistência, então o tratamento com drogas pode levar ao estabelecimento de múltiplas cepas do parasito com diferentes níveis de resistência. É esperado que os níveis de resistência permaneçam relativamente baixos quando a resistência tem um custo para o parasito (Feng *et al.*, 2001). Apesar de ser relatado que a resistência pode levar a um custo pela sobrevivência (Cioli *et al.*, 1992; Willian *et al.*, 2001b), no nosso trabalho, não foi possível observar diferença significativa entre a recuperação de vermes quando a infecção de camundongos dos grupos controles foi realizada com a cepa LE ou LEi. Em cepas resistentes do Senegal, Liang e colaboradores (2001b) demonstraram que, camundongos infectados com esta cepa apresentaram uma grande quantidade de ovos nos tecidos e fezes. Este trabalho mostra que o custo da resistência pode não ser observado em todas as cepas de *S.mansoni*.

Uma possível explicação para não termos observado o custo da resistência da cepa LEi é que a manutenção do ciclo do parasito com infecção controlada de caramujos e camundongos podem ter contribuído para que não ocorresse a diminuição na taxa de reprodução de vermes na população que sofreu pressão seletiva com PZQ. A população LEi isolada pode ainda ser constituída de uma proporção variável de indivíduos geneticamente sensíveis e resistentes. Deste modo o custo da resistência pode não ter sido manifestado ainda.

Normalmente, a distribuição de vermes no sistema porta de camundongos após aproximadamente 45 dias de infecção, é de 60-70% nos vasos mesentéricos, 20-30% na veia porta e 0-20% nas veias intra-hepáticas. É conhecido que a administração de drogas ativas contra o *S. mansoni* produz o deslocamento de vermes do mesentério para o fígado (Pellegrino & Katz, 1968). A migração de vermes do mesentério para o fígado, após o tratamento com PZQ, não foi possível de ser observada neste trabalho. Mais de 80% dos vermes em ambos os grupos analisados foram encontrados no mesentério após o tratamento. Como a perfusão dos camundongos tratados foi realizada após 30 dias de tratamento, esta pode ser uma das razões para o fato de não termos observado o deslocamento parcial ou total dos vermes para o fígado. Uma possível explicação é que após 30 dias do tratamento os vermes podem ter migrado novamente para o mesentério.

Outro parâmetro parasitológico que pode ser afetado pelo tratamento é o oograma. Os resultados do oograma realizado nos grupos LEi7^a geração e LE tratados com a mesma dosagem de LEi7^a nos mostram que existem variações na percentagem de ovos viáveis encontrados nos grupos LE (10%) e LEi7^a (30%). Os critérios para o uso do oograma como avaliação da atividade de drogas sugerem que a presença de ovos viáveis seja um indicativo da ineficiência da droga. É possível observar ovos maduros até 12 dias após o tratamento (Pellegrino *et al.*, 1962). Como os nossos camundongos foram sacrificados após 30 dias de tratamento serão necessários novos experimentos para observar mudanças no perfil migratório e no oograma.

A relação entre o tratamento e o sexo dos vermes recuperados também foi estudada. Quando avaliamos a taxa de redução e a razão do número médio de vermes machos e fêmeas recuperados isoladamente, foi possível demonstrar que vermes fêmeas são menos recuperados, que vermes machos na população LEi, durante a perfusão de camundongos. Vermes machos e fêmeas diferem em muitos aspectos de sua biologia. Cercárias de machos são mais infectantes que cercárias fêmeas, contraditoriamente à produção de cercárias fêmeas, que é maior que a produção de cercárias machos (Boissier *et al.*, 1999). Alguns autores sugerem que a alta proporção de machos durante a infecção é devido à competição entre fêmeas para ter acesso ao macho genotipicamente diferente. Um estudo mostrou que há uma relação entre a carga parasitária e a proporção de vermes machos (Boissier *et al.*, 2001 a e c). Alguns trabalhos têm demonstrado que vermes machos são mais eficientes que vermes fêmeas no processo de infecção. Além disso, o PZQ é mais eficiente na eliminação de vermes fêmeas que na eliminação de vermes machos (Pica Mattoccia *et al.*, 2004). Como existem grandes diferenças fenotípicas e de padrão de

expressão gênica entre vermes fêmeas e machos, é difícil assegurar que a menor recuperação de vermes fêmeas seja devido à ação de PZQ.

Apesar dos efeitos parasitológicos já terem sido avaliados em outros trabalhos, até o momento nenhum estudo tratou do seu impacto na população. Estudos de diversidade genética freqüentemente utilizam marcadores moleculares do tipo microssatélites. Quatro *loci* de microssatélites usados neste trabalho foram isolados de seqüências de ESTs e dois *loci* foram isolados de seqüências genômicas. Nenhum dos *loci* utilizados tem sua localização genômica conhecida. Não foi objetivo deste trabalho correlacionar um marcador com resistência. A distribuição alélica e genotípica em todos os padrões analisados foi aparentemente aleatória em todas as populações analisadas, não sendo possível, portanto, correlacionar um perfil de distribuição alélica ou genotípica com a pressão seletiva com PZQ.

A análise do desvio do equilíbrio de HW é um recurso importante para o estudo dos mecanismos evolutivos que podem estar atuando em uma determinada população. As comparações entre as heterozigosidades esperadas e observadas, nas diferentes gerações de LE_i e LE e entre LE e LE_i, mostra que ocorreu o desvio do equilíbrio de HW na maioria dos *loci* estudados. Este resultado é esperado, já que sabemos que em uma população real é impossível desconsiderar todos os fatores evolutivos e qualquer fator evolutivo altera o equilíbrio de HW. Neste trabalho, a migração, por não existir nas populações analisadas é o único fator evolutivo que pode ser desconsiderado. Na população LE_i¹ ocorreu o equilíbrio de HW na maioria dos *loci*, a variação encontrada pode ser aleatória dos *loci* utilizados. As comparações entre heterozigosidade observada demonstraram que houve maior perda de heterozigosidade observada na população LE_i⁷ (Tabela 14). Estes resultados corroboram com os resultados por Rodrigues e colaboradores (2002a).

Comparando à população LE ocorreu um aumento do índice de endogamia- Fis de 2,5 vezes e a diminuição significativa da heterozigosidade esperada (H_s) na população LE_i (Tabela 16). As estatísticas de diferenciação de populações F_{st} e R_{st} são as ferramentas mais utilizadas para o estudo de populações moderadamente estruturadas. A performance desses testes depende de fatores que muitas das vezes não são quantificados. É necessário que ambas as estatísticas sejam calculadas e que seja feita uma interpretação cuidadosa de ambos os dados para que a informação mais segura da estrutura da genética das populações seja alcançada (Balloux & Moulin, 2002b). Entre as populações LE e LE_i foram usados os dois índices de medida de diferenciação genética. Os resultados das análises de diferenciação demonstram pelo R_{st} que a diferenciação entre as populações é grande, tanto

entre LEi7^a e LE quanto entre as populações da primeira e sétima geração de LEi. As diferenças entre populações encontradas pelo Fst são moderadas em todas as populações comparadas. Como o Fst não leva em consideração a taxa de mutação em microssatélites, seus resultados podem subestimar as diferenças existentes entre as populações analisadas (Balloux & Moulin, 2002b). A pressão seletiva com PZQ e o processo de indução de resistência podem ter contribuído para a diferenciação genética destas populações. PZQ aparentemente levou a uma mudança na estrutura genética da população LE sob pressão. O cruzamento entre indivíduos relacionados por parentesco contribui para homogeneização genética da população. Esta hipótese pode ser confirmada pelo aumento dos índices de endogamia na população LEi.

A análise da estrutura genética das populações LE e LEi utilizando o coeficiente de Hardy-Weinberg, índices de diversidade genética e coeficientes de endogamia nos mostra que houve perda da diversidade genética em uma população sob pressão seletiva de droga (LEi). Os efeitos da manutenção de uma cepa de *S. mansoni* em laboratório e a pressão seletiva com PZQ podem ter contribuído para diminuir a da variabilidade da cepa LEi, já que dois fatores que contribuem para perda da diversidade genética estão atuando na população ao mesmo tempo. A perda de isoenzimas durante a passagem em laboratório indica que ocorre a seleção de certos genótipos de vermes durante a transmissão entre camundongos e moluscos (Coles, 1971). Em infecções experimentais a diversidade genética de vermes adultos é reduzida tanto no número de genótipos selecionados durante a infecção quanto na taxa de consangüinidade durante a manutenção do ciclo de vida do parasito em laboratório (Barral *et al.*, 1996).

A deriva genética e a seleção são dois dos principais fenômenos que reduzem a variabilidade genética dentro de populações de laboratório (Curtis & Minchella, 2000). Estas populações normalmente consistem basicamente de um pequeno grupo de indivíduos de uma população, causando o que em genética de populações é chamada de efeito fundador. Somente uma fração de genótipos representará a população real (Slatkin, 1987). A perda da variabilidade genética em populações de laboratório foi demonstrada por alguns autores com o uso de marcadores moleculares do tipo RAPD e Microssatélites (Dias *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2000 a; Stohler *et al.*, 2004).

Usando marcadores moleculares do tipo RAPD e sete *loci* de microssatélites, Prugnole *et al.*, 2002 demonstraram que a estrutura genética de *S. mansoni* é sexo específica. Uma estrutura genética sexo específica pode refletir diferenças no modelo de dispersão entre sexos. Foi demonstrado que machos são distribuídos mais aleatoriamente

em ratos selvagens que os genótipos de fêmeas. Os vermes machos podem dispersar mais que fêmeas para evitar o acasalamento consanguíneo, limitando, assim, o risco congênito. Dentro do mesmo hospedeiro foi observada grande similaridade genética entre vermes fêmeas. A frequência alélica de vermes machos encontrada foi diferente da frequência de vermes fêmeas. Com a análise do seis *loci* de microssatélites, não foi possível observar, neste trabalho, diferença significativa quanto à variabilidade genética de vermes machos e fêmeas. Esta observação pode estar relacionada à ausência de migração nas populações estudadas, aos diferentes *loci* e cepas utilizadas.

A cepa LEi passou a demonstrar diferença quanto à susceptibilidade ao PZQ à partir da sexta geração. Desde então, vêm sendo mantida em laboratório com doses curativas de PZQ (3 x 300 mg/Kg). A ausência da pressão seletiva com PZQ levou à inversão da resistência em dois dos cinco isolados de pacientes do Egito que haviam apresentado resistência a PZQ, durante cinco anos sob pressão com praziquantel. Os parasitas isolados que não apresentaram reversão da resistência apresentaram baixa produção de cercárias (Willian *et al.*, 2001b). A estabilidade de uns isolados e a reversão de outros indicam que fatores biológicos ou genéticos que conferem a diminuição da susceptibilidade ao PZQ variam entre diferentes isolados (Willian *et al.*, 2001b). Devido aos fatores citados acima, está por ser determinado se ocorrerá ou não reversão na cepa LEi.

Existem, atualmente, vários conceitos de resistência. Segundo a organização mundial da saúde, resistência é a habilidade que o parasita tem de sobreviver ou multiplicar-se, apesar da administração de uma determinada droga, em doses iguais ou maiores do que as usualmente recomendadas. A falta de resposta à droga aparece nos descendentes daqueles vermes que sobreviveram ao tratamento. Uma mudança na biologia do parasito, associada ao desenvolvimento de resistência a PZQ, pode afetar a transmissão e a patologia da infecção (Ling *et al.*, 2000). O estudo de parasitos resistentes a drogas é importante para entender a diversidade genética do parasito e para desenhar estratégias de controle da doença (Feng *et al.*, 2001). A perda da variabilidade genética em uma população, por exemplo, por pressão de droga, pode trazer problemas que variam desde a diminuição do seu poder adaptativo até a sua extinção. No caso do *S. mansoni*, o nível de polimorfismo encontrado na população e a aparente susceptibilidade ao tratamento geralmente observada, indicam que o uso contínuo do PZQ não está selecionando isolados resistentes (Botros *et al.*, 2005).

Os valores de ED₅₀ estão sendo usados como metodologia para avaliar em cepas de campo a susceptibilidade de PZQ. Cepas sensíveis ao PZQ apresentaram ED₅₀ até três vezes menores quando comparados ao ED₅₀ de cepas resistentes (Cioli *et al.*, 2004; Willian e Botros, 2004). As metodologias usadas para medir a ED₅₀ são variadas (Bonesso-Sabadini e Souza-Dias, 2002; Cioli *et al.*, 2004; Willian e Botros, 2004). Devido a estes fatores, é necessária a padronização dos critérios de avaliação de susceptibilidade para que realmente o problema da resistência a PZQ seja avaliado e para que medidas do controle do desenvolvimento de resistência sejam tomadas. Como o PZQ é praticamente a única droga sendo usada no controle da esquistossomose, a padronização e validação de testes de resistência a drogas são urgentemente necessários.

6. CONCLUSÕES

- A pressão seletiva com praziquantel altera a estrutura genética da cepa de *S. mansoni* LE diminuindo a sua variabilidade genética.
 - Os índices de F sugerem que a endogamia pode aumentar em uma população de *S. mansoni* com resistência ao PZQ induzida.
 - Após seis gerações de *S. mansoni* submetidas à pressão seletiva com praziquantel foi possível obter uma cepa com menor susceptibilidade ao PZQ.
 - Os microssatélites são uma boa ferramenta para verificar possíveis modificações na estrutura genética de uma cepa de *S. mansoni* com resistência ao PZQ induzida.
 - Após o tratamento com PZQ, não pode ser observada diferença quanto à variabilidade genética de vermes machos e fêmeas de *S. mansoni*.
 - Após o tratamento com PZQ é possível recuperar mais vermes machos que vermes fêmeas.
 - Mais de 80% dos vermes são recuperados no mesentério dos camundongos após 30 dias de tratamento com PZQ.
 - O oograma de camundongos tratados, avaliado após 30 dias de tratamento com doses curativas de PZQ apresentou ovos viáveis.
-

7. PERSPECTIVAS

A partir da população induzida a resistência ao PZQ (LEi) novos estudos estão sendo realizados:

- O ED50 de LEi foi determinado e foi comparado aos valores de ED50 de 3 cepas de *S. mansoni* de campo de Minas Gerais. O valor de ED50 de LEi foi maior que o valor de ED50 de cepas de campo.
 - O ED50 de outras cepas de campo está sendo determinado.
 - Estudos de proteoma dos vermes obtidos nas populações LEi e LE foram realizados. Foram identificadas proteínas diferencialmente expressas nos vermes obtidos dessa populações.
-

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, S. *et al.* The radiation-attenuated schistosome vaccine induces high levels of protective immunity in the absence of B cells. **Immunology**.vol.96(1) p.22-8,1999. 1980.
- Andrews, P. *et al.* The in vitro uptake of ¹⁴C-praziquantel by cestodes, trematodes, and a nematode. **J. Parasitol.** Vol.66(6): p.920-5, 1980.
- Andrews P. *et al.* Praziquantel. **Med Res Rev**.vol. 3.p.147-200,1983.
- Andrews P. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. **Pharmacol** vol.29(1).p.129-56, 1985.
- Anthony and Sake Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. **Trends in Parasitology**. Vol. 18,125-129, 2002.
- Araújo, N. *et al.* Susceptibility to chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 29: 890-894,1980.
- Araujo, N. *et al.* Susceptibility to chemotherapeutic agents of *Schistosoma mansoni* isolates from patients treated with oxamniquine and praziquantel and not cured. *Rev Soc Bras Med Trop.* Vol.29(5):p.467-76, 1996.
- Ashley, M.V., & Dow, B.D. The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications. In: **Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications**. Eds. B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner & R. DeSalle. Birkhäuser Verlag Basel - Switzerland. pp. 185-201.1994
- Balloux, F; Goudet, J. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. **Mol Ecol.** Vol. 11(4). P.771-83, 2002b.
- Botros, S. *et al.* Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. **Int J Parasitol.** Vol.35(7).p.787-91,2005.
- Barker, S.C; Murrell, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Exp Appl Acarol.**;vol.28(1-4):p.55-68, 2002.
- Barral, V. *et al.* Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome by using random amplified polymorphic DNA markers. **Mol. Bioch. Parasitol.** Vol.59.p. 211-222, 1993.
- Barral, V. *et al.* Distribution of schistosome genetic diversity within naturally infected *Rattus rattus* detected by RAPD markers. **Parasitology.** Dec;113 (Pt 6):511-7, 1996.
- Bassily, S. *et al.* Praziquantel for treatment of schistosomiasis in patients with advanced splenomegaly. **Ann. Trop. Med. Parasit.**vol. 79.p.629-634, 1985.
- Bennet, J.L. *et al.* The development of resistence to anthelmintics: A perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. **Experimental parasitology.** Vol. 87, p.260-267,1997.
-

- Bieberich, A.A; Minchella, D.J. Mitochondrial inheritance in *Schistosoma mansoni*: mitochondrial variable number tandem repeat mutation produces noise on top of the signal. **J.Parasitol.** vol.87(5):p.1011-5, 2001.
- Biedler, J.L. Genetic aspects of multidrug resistance. **Cancer.** Vol.15;70(6 Suppl).p.1799-809,1992.
- Blair, K.L. *et al.* Praziquantel: physiological evidence for its site(s) of action in magnesium-paralysed *Schistosoma mansoni*. **Parasitology.** Vol.104 Pt 1:59-66, 1992.
- Blair, K.L. *et al.* Studies on muscle cells isolated from *Schistosoma mansoni*: a Ca²⁺-dependent K⁺ channel. **Parasitology.** Vol.102. p.251-8, 1991.
- Boissier, J. *et al.* PCR effectiveness for sexing *Schistosoma mansoni* cercariae: application for sexing clonal cercarial populations. **Mol. Biochem. Parasitol.** Vol. 15;112(1).p.139-41, 2001a.
- Boissier, J; Mone, H. Relationship between worm burden and male proportion in *Schistosoma mansoni* experimentally infected rodents and primates. A meta-analytical approach. **Int. J. Parasitol.** Vol.31(14). p.1597-9, 2001C.
- Boissier, J. *et al.* A review of performance and pathogenicity of male and female *Schistosoma mansoni* during the life-cycle. **Parasitology.** Vol.119.p.447-54, 1999.
- Boissier, J. *et al.* Altered behavior of the snail *Biomphalaria glabrata* as a result of infection with *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol.** Vol.89(3). P.429-33, 2003.
- Bonesso-Sabadini, P.I.; Souza-Dias, L.C. Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** vol. 97, p.381-385, 2002.
- Brindley, P.J. *et al.* A Characterization of a programmed alteration in an 18S ribosomal gene that accompanies the experimental induction of drug resistance in *Schistosoma mansoni*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** vol. 88:p.7754-7758. (1991).
- Brindley, P.J. *et al.* Mobile genetic elements colonizing the genomes of metazoan parasites. **Trends Parasitol.** Vol.19(2). P. 79-87, 2003.
- Brindley, P.J. *et al.* A genomic change associated with the development of resistance to hycanthone in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.** vol. 34. p. 99-108, . 1989.
- Brindley, P.J. Drug resistance to schistosomicides and other anthelmintics of medical significance. **Acta Trop.** Vol.56(2-3):p. 213-31, 1994.
- Brown, W. M.*et al.* Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.** vol.76. p.1967-1971,1979.
- Carvalho,O.S. *et al.* First report of *Biomphalaria glabrata* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Vol.93(1). P.39-40,1998.
-

- Chitsulo, L. *et al.* The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop.** Vol.77.p.41-51, 2000.
- Cioli, D. *et al.* Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **Int. J. Parasitol.** vol 34.p.979-987, 2004.
- Cioli, D. *et al.* *Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. **Exp. Parasitol.** Vol.75(4): p.425-32, 1992.
- Cioli, D. *et al.* Drug resistance in Schistosomes. **Parasitol.Today** Vol.9(5): p.162-166, 1993.
- Cioli D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Curr. Opin. Infect. Dis.** Vol.13(6):p.659-663, 2000.
- Coelho, P.M.Z. *et al.* Activity of oxamniquine at skin, pulmonary and sexual maturation phases, on a *Schistosoma mansoni* strain (R1) previously reported as resistant at the adult phase. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Vol.93: p.267-268, 1998.
- Coelho, P.M. *et al.* *Biomphalaria tenagophila*/*Schistosoma mansoni* interaction: premises for a new approach to biological control of schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**;99(5 Suppl 1):109-11, 2004.
- Coles, G.C. Alteration of *Schistosoma mansoni* malate dehydrogenase isoenzymes on passage in the laboratory. **Comp. Biochem. Physiol. B.** vol. 15; 40(4). p.1079-83, 1971.
- Coles, G.C. *et al.* Drug resistance in schistosomiasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg** vol.80.p.34,1986.
- Cortese, J.F. *et al.* Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. **J. Infect. Dis.** Vol.1;186(7).p.999-1006, 2002.
- Cowman, A.F. Functional analysis of drug resistance in *Plasmodium falciparum* in the post-genomic era. **Int.J. Parasitol.** Vol.31(9). p.871-8, 2001.
- Curtis, J; Minchella, D.J. *Schistosoma* population genetic structure: when clumping worms is not just splitting hairs. **Parasitology. Today.** Vol. 16, p. 68-71, 2000.
- Curtis, J. *et al.* Schistosome genetic diversity: the implications of population structure as detected with microsatellitemarkers. **Parasitology.** Vol.125 Suppl:S p.51-9, 2002.
- Curtis, J. *et al.* Widespread heteroplasmy in schistosomes makes an mtVNTR marker "nearsighted". **J Hered.** Vol.92(3). P.248-53, 2001.
- De Clercq, D. *et al.* What is the effect of combining artesunate and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections? **Trop. Med. Int. Health.** vol 5:p.744-746, 2000.
- Delgado, V.S. *et al.* Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of
-

drugs on various strains and on both sexes of the parasite. **Parasitol. Res.**vol.78(8):p.648-54,1992.

Despres, L. *et al.* Isolation and polymorphism in mitochondrial DNA from *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.** Vol.47. p.139-142, 1991.

Dias, L.C.S. *et al.* Use of praziquantel in patients with schistosomiasis mansoni previously treated with oxamniquine and for hycanthone: resistance of *Schistosoma mansoni* to schistosomicidal agents. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.** Vol. 76:652-659, 1982.

Dias, N. E. *et al.* The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. **Mol. Bioch. Parasitol.** Vol. 57. p.83-88, 1993a.

Dietrich, M.R. The origins of the neutral theory of molecular evolution. **J. Hist. Biol.** Vol.27(1):p.21-59, 1994.

Dib, C. *et al.* A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. **Nature.** Vol. 14;380(6570).p.152-4,1996.

Doenhoff, M.J. *et al.* Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** Vol.96(5). P.465-9, 2002.

Doenhoff, M.J. *et al.* Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** vol. 81:p. 947-951, 1987.

Durand, P *et al.* Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. **Mol Ecol.** Vol.9(7):p.997-8. 2000.

Drew, A.C.; Brindley, P.J. Female-specific sequences isolated from *Schistosoma mansoni* by representational difference analysis. **Mol. Biochem. Parasitol.** Vol.71(2):173-81, 1995.

Eppert, A. *et al.* Distribution of schistosome infections in molluscan hosts at different levels of parasite prevalence. **J. Parasitol.** Vol.88(2) p.232-6, 2002.

Fallon, P.G. *et al.* Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. **Parasitology.**vol.105 Suppl:Sp.41-8, 1992.

Fallon, P.G; Doenhoff, M.J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 51:83-88, 1994.

Fallon, P.G. *et al.* *Schistosoma mansoni*: Maturation rate and drug susceptibility of different geographic isolates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** vol. 86, p.29-36, 1997.

Feng, Z. *et al.* The influence of drug treatment on the maintenance of schistosome genetic diversity. **J. Math. Biol.** Vol.43(1).p.52-68,2001.

Fenwick, A. *et al.* Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitol.** Vol.19(11). p.509-15, 2003.ct.

Ferreira, M. E., & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: **Embrapa-Cenargen**, 1995.

Fletcher M. *et al.* Genetic variation in *Schistosoma mansoni*: enzyme polymorphisms in populations from Africa, Southwest Asia, South America, and the West Indies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Vol. 30 (2): p.406-421, 1981c.

Fallon PG. *et al.* Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg.** Vol.53(1):p.61-2, 1995.

Fonseca, C.T. *et al.* Human T cell epitope mapping of the *Schistosoma mansoni* 14-kDa fatty acid-binding protein using cells from patients living in areas endemic for schistosomiasis. **Microbes Infect.** Vol.7(2):p.204-12, 2005.

Foster, R A review of clinical experience with oxamniquine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 81:55-59, 1987.

Franco, G.R. *et al.* The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art. **Int. J. Parasitol.** Vol. 10;30(4). P. 453-63, 2000.

Graeff-Teixeira, C. *et al.* The initial epidemiological studies in the low endemicity schistosomiasis area in Esteio, Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian state, 1997 to 2000. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** vol.99(5):p.73-78, 2004.

Greenberg, R.M. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? **Int J Parasitol.** Vol.35(1) p.-9, 2005.

Grevelding, C.G. Genomic instability in *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem Parasitol.** vol.25;101(1-2):p.207-16, 1999.

Grysccheck, R.C.B. *et al.* Tratamento da esquistossomose mansoni com praziquantel em duas doses únicas diárias consecutivas. **Rev. Soc. Brás. Clin. Méd.** vol.2:p.100-102, 2004.

Gryseels, B. *et al.* Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. **Trop. Med. Int. Health.** vol. 6: p.864-873, 2001.

Guo, SW; Thompson, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg. Proportion for multiple Aleles. **Biometrics.** Vol. 48, p.361-372, 1992.

Gray, G.D. *et al.* Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pastures contaminated with parasitic nematodes. **Int. J. Parasitol.** vol.22(4):p.417-25, 1992.

Goudet, J. **Fstat, versão 2.9.3** – Executable for Windows. 2002

Harnett, W; Kusel, J.R. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. **Parasitology.** Vol.93 (Pt 2): p.401-5, 1986.

- Ismail, M. *et al.* Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Vol.60:p.932-935,1999.
- Ismail, M. *et al.* Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **Am J Trop Med Hyg** 55:214-218,1996.
- Jannotti-Passos, L. K. *et al.* PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria Glabrata* snails. **J. Parasitol.**, vol.83(3) p. 395-399, 1997.
- Jung, H. *et al.* Pharmacokinetic study of praziquantel administered alone and in combination with cimetidine in a single-day therapeutic regimen. **Antimicrob. Agents. Chemother.** Vol.41(6): p.1256-9, 1997.
- Katz, N. Resultados atuais na terapêutica clínica da esquistossomose mansoni. **Rev .Inst. Med. Trop.** vol.22(Supl 4):p.123-133, 1980.
- Katz, N. *et al.* Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev Inst Med Trop** 7:381-387, 1973.
- Katz, N; Peixoto, S.V. Critical analysis of the estimated number of Schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. **Rev.Soc.Bras.Med.Trop.** vol.33.3: p.303-08, . 2000.
- Katz, N. *et al.* Estudos de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 7: 381-387, 1973.
- Kinoti, G.K. The significance of variation in the susceptibility of *Schistosoma mansoni* to the antischistosomal drug oxamniquine. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**;vol.82 Suppl 4:p.151-6, 1987.
- Kohn, A.B. Schistosome calcium channel beta subunits. Unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. **J. Biol. Chem.** Vol.5;276(40):p.36873-6, 2001.
- Kohn, A.B. *et al.* Specific sites in the Beta Interaction Domain of a schistosome Ca²⁺ channel beta subunit are key to its role in sensitivity to the anti-schistosomal drug praziquantel. **Parasitology.** Vol. 127(Pt 4):p.349-56, 2003.
- Krogstad, D.J. *et al.* Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. **Science.** Vol.27;238(4831):p.1283-5, 1987.
- Lambertucci, J.R. *et al.* Schistosomiasis and associated infections. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**vol.93 Suppl 1:p.135-9, 1998.
- Le, T.H. Mitochondrial genomes of human helminths and their use as markers in population genetics and phylogeny. **Acta. Trop. Dec** 1;77(3):243-56, 2000.
- Levinson, G; Gutman, G.A Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Mol.Biol. Evol.** 4:203-221, 1987.
- Liang, Y.S. *et al.* Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. **Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health.**;vol.34(2):p.274-80, 2003.
-

Liang, Y.S. *et al.* Biological characteristics of praziquantel-resistant and -susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, vol.95, p.715-723, 2001a.

Liang, Y.S.*et al.* In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **International Journal for Parasitology**. vol.31, p.1227-1235, 2001b.

Love, P.T *et al.* *Schistosoma mansoni* genome project: an update. **Parasitol Int.** vol.;53(2):p. 183-92, 2004.

Marx, K. A. *et al.* Experimental DNA melting behavior of the three major *Schistosoma* species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.107, p.303-307, 2000.

Masimirembwa, C.M; Hasler, J.A. Characterisation of praziquantel metabolism of chloroquine on the pharmacokinetics of praziquantel in rats and humans. **Biopharm. Drug. Dispos.** Vol.15: p. 33-43, 1994.

Melo, O.G; Coelho, P.M.Z *Schistosoma mansoni* e a doença. Em Neves D.P. **Parasitologia Humana**. Atheneu, São Paulo.p.193-212, 2004.

MCManus, D.P; Hope, M. Molecular variation in the human Schistosomes. **Acta tropica**, V.53, p.255-276, 1993.

Minchella, D.J. *et al.* Genetic diversity of *Schistosoma mansoni*: quantifying strain heterogeneity using a polymorphic DNA element. **Mol Biochem Parasitol.** Vol.68(2):p.307-13, 1994.

Minchella, D.J. *et al.* Distribution of schistosome genetic diversity within molluscan intermediate hosts. **Parasitology**. Vol.111 (Pt 2):p.217-20, 1995.

Mone, H; Boissier, J. Sexual biology of schistosomes. **Adv. Parasitol.** vol.57:p.89-189, 2004.

Montresor, A. *et al.*The WHO dose pole for the administration of praziquantel is also accurate in non-African populations. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** Vol.99(1): p.78-81, 2005.

Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. Hum. Genet.** Vol. 41(2):p.225-33, 1977.

Nei, M.; Chesser, R.K. Estimation of fixation indices and gene diversities. **Ann. Hum. Genet.**, vol. 47, p.253-259, 1983.

Nei, M.; Kumar, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. **Oxford University Press**, 2000.

Olds, G.R. *et al.* Double-blind placebo-controlled study of concurrent administration of albendazole and praziquantel in schoolchildren with schistosomiasis and geohelminths. **J. Infect. Dis.** Vol.79(4):p.996-1003, 1999.

- Olds, G.R. Administration of praziquantel to pregnant and lactating women. **Acta Trop** 86:185-195, 2003.
- Oliveira, G.C. *et al.* Genome and genomics of schistosome **Canadian journal of Zoology- Revue Canadienne de Zooloie**. v. 82, p.1,101-115, 2004.
- Oliveira, G; Johnston, D.A. Mining the schistosome DNA sequence database. **Trends Parasitol**. Vol.17(10):p.501-3, 2001.
- Paraense, W.L; Corrêa, L.R. Probable extension of schistosomiasis mansoni to southernmost Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** vol.82: 577, 1987.
- Pax, R. *et al.* A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. Vol.16;304(3):p.309-15, 1978.
- Pellegrino J, Katz N Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. **Adv. Parasitol**. Vol. 6: p.233-290, 1968.
- Pellegrino, J. *et al.* New approach to the screening of drugs in experimental *Schistosoma mansoni* in mice. **Am. J. Top. Med. Hyg**. Vol.11:p.201-215, 1962.
- Pellegrino, J. *et al.* Infection of the golden hamster with *Schistosoma mansoni* cercariae through the cheek pouch. **J. Parasitol**. vol.51:p.1015, 1965.
- Pellegrino, J; Siqueira, A. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. **Revista Brasileira de Malacologia e Doenças Tropicais**, vol.8, p.589-597, 1956.
- Pellegrino, J; Coelho,P.M.Z. *Schistosoma mansoni*, wandering capacity of a worm couple. **J. Parasitol**. Vol.64(1):p.181, 1978.
- Pena, H. B. *et al.* Intracellular promiscuity in *Schistosoma mansoni*: Nuclear transcribed DNA sequences are part of a mitochondrial minisatellite region. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**.92:915-919, 1995.
- Pica-Mattoccia, L; Cioli; D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **Int. J. Parasit** vol.34:p.527-533, 2004.
- Polderman, A.M. *et al.* Side effects of praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* in Maniema, Zaire. **Trans R Soc Trop Med Hyg**;78(6):752-4, 1984.
- Pinto, P.M. *et al.* Contrasting genomic variability between clones from field isolates and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. May-Jun;vol.92(3):p.409-14, 1997.
- Prugnolle, F. *et al.* Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. **Mol. Ecol. Jul**; vol.11(7):p.1231-8, 2002.
- Prugnolle, F; De Meeus T. Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. **Heredity. Mar**;vol.88(3):p.161-5, 2002.
-

- Prugnolle, F. *et al* Sex-specific genetic structure: new trends for dioecious parasites. **Trends Parasitol.** Vol.19(4):p.171-4, 2003.
- Prugnolle, F. *et al.* Sex-specific correlation between heterozygosity and clone size in the trematode *Schistosoma mansoni*. **Mol Ecol.** Sep;vol.13(9):p.2859-64, 2004.
- Prugnolle, F. F-statistics under alternation of sexual and asexual reproduction: a model and data from schistosomes (platyhelminth parasites). **Mol.Ecol. Apr**;vol.14(5):p.1355-65, 2005.
- Prugnolle, F. *et al.* Dispersal in a parasitic worm and its two hosts: consequence for local adaptation. **Evolution Int. J. Org. Evolution.** Feb;vol.59(2):p.296-303, 2005.
- Ouellette, M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. **Trop Med Int Health.** Vol.6(11):p.874-82, 2001.
- Rodrigues, N.B. *et al.* Populational structure of *Schistosoma mansoni* assessed by DNA microsatellites. **International Journal for Parasitology**, vol.32, p.843-851, 2002a.
- Rodrigues, N.B. *et al.* Characterization of new *Schistosoma mansoni* microsatellite loci in sequences obtained from public DNA databases and microsatellite enriched genomic libraries. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz** vol.97 (suppl.I) p.71-75, 2002b.
- Rogers, S.H; Bueding, E. Hycanthon resistance: development in *Schistosoma mansoni*. **Science** vol.172:p.1057-1058, 1971.
- Rollinson, D. *et al.* New approaches to schistosome identification. **Parasitol Today.** vol. 2(1):p.24-5, 1986.
- Rossi, V. *et al.* Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. **Mol. Biochem. Parasitol.** Jun;vol.65(2):p.271-82, 1994.
- Russell, R. *et al.* Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. **Mol. Biochem. Parasitol.** Vol. 20;103(1):p.71-7, 1999.
- Sabah, A.A. *et al.* *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. **Exp.Parasitolog.** 1986;61:294-303.
- Sanguinetti, C.J. *et al* Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v.42, p. 915-918, 1994.
- Saoud, M.F. *et al.* The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**;vol.60(5):p.585-600, 1966.
- Savioli, L. *et al.* Progress in the prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. **Parasitol. Int.** vol.53(2):p.103-13, 2004.
-

- Savioli, L. *et al.* Treatment for intestinal helminth infection. Review needed to take account of all relevant evidence, not only effects on growth and cognitive performance. **B.M.J.** vol.24;320(7251):1697-701, 2000.
- Siqueira, B.R. *et al.* Esquistosomose em sua forma crônica. Aspectos Clínicos. **Rev.Bras.Med.** vol. 54; p. 835-839, 1997.
- Schneider, S. A software for population genetic data analylis. Arlequin ver 2.000, **Genetics and biometry laboratory**, University of Geneva, Switzerland, 2000.
- Stohler, R.A. *et al.* A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasitol.** Vol.34(5):p.595-601, 2004.
- Sire, C. *et al.* Genetic diversity and recruitment pattern of *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* snail population: a field study using random-amplified polymorphic DNA markers. **J. Parasitol.** Vol.;85(3):p.436-41, 1999.
- Schötterer C. Evolucionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**; vol.109:p.365-371, 2000.
- Short, R.B. Somatic chromosomes of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, v.65, p.471-473, 1979.
- Silva, L.M; Andrade, ZA. Immunostimulation as adjuvant for the chemotherapy of experimental schistosomiasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** Vol.39(1):11-4, 1997.
- Simpson, A. J. G. *et al.* The arrangement of ribossomal RNA genes in *Schistosoma mansoni* - Identification of polymorphic structural variants. **Eur. J. Bioch.** Vol.139: p. 41-45, 1984.
- Su X, Wellems TE. Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. **Genomics.** Vol.33(3):p.430-44, 1996.
- Simpson, A. J. G. *et al.* The genoma of *Schistosoma mansoni*, isolation of DNA its size and repetitive sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.6, p.125-137, 1982.
- Slatkin, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, vol.139: p.457-462, 1995.
- Southgate, V.R. *et al.* Studies on the biology of Schistosomiasis with emphasis on the Senegal River Basin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** vol.96:p.75-78, 2001.
- Steiner, K. *et al.* The fate of praziquantel in the organism. I Pharmacokinetics in animals. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet** vol.1:p.85-95, 1976.
- Stelma, F.F. *et al.* Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg** vol.53: p.167-170, 1995.
-

- Stohler, R.A. *et al.* A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. **Int J Parasitol.** Apr;vol.34(5):p.595-601, 2004.
- Talla, I. *et al.* Outbreak of intestinal schistosomiasis in the Senegal River Basin. **Ann Soc belge Mèd Trop** 70: 173-180, 1990.
- Tauts, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic acids Research**, v. 17, p.4123-4130, 1989.
- Tsai, M.H. *et al.* Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction assay for identification of *Schistosoma mansoni* strains sensitive or tolerant to anti-schistosomal drugs. **J. Parasitol.** vol86(1):p.146-9, 2000.
- Utzinger, J. *et al.* Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. **Antimicrob Agents Chemother** .vol.47:p.1487-1495, 2003.
- Verjovski-Almeida, S. *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **NatGenet.** Vol.35(2):p.148-57, 2003.
- Vieira, L.Q. *et al.* Genomic variability in field populations of *Schistosoma mansoni* in Brazil as detected with a ribosomal gene probe. **Am J Trop Med Hyg** vol.44:p.69-78, 1991.
- Valle, C. *et al.* Sequence and level of endogenous expression of calcium channel beta subunits in *Schistosoma mansoni* displaying different susceptibilities to praziquantel. **Mol Biochem Parasitol.** Vol.31;130(2):p.111-5, 2003.
- Wellems, T.E. *et al.* Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. **Nature.** Vol. 17;345(6272):p.253-5, 1990.
- Warhurst DC. Drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **Infection.**;vol.27 Suppl 2:S55-8, 1999.
- Warren KS. The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** vol.66(3):p.417-34, 1972.
- Wayne, D.W. Livro Não-Paramétrico: **Applied Nonparametric Statistics.**Houghton Mifflin Company, 1978.
- Weber JL. Informativeness of human (dC-dA)_n polymorphisms.**Genomics.** vol.7:p.524-530, 1990.
- Weber, J.L. & MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, v.44, p.388-396, 1989.
- White, N.J. Drug resistance in malaria. **Br Med Bull.**;vol.54(3):p.703-15, 1998.
- WHO - World Health Organization The control of schistosomiasis. Second report of the WHO expert committee. **Technical Report Series** 830, p. 86, 1993.
-

WHO. **Organização Mundial da Saúde**. Disponível em <http://www.who.gov.Br>.

Weird, L. M. *et al.* Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. **Genetics**. Vol.146(3):p.769-79, 1997.

Wiest PM, OLDS GR. Clinical schistosomiasis. **R I Med**. Vol.75(4):p.179-85, 1992.

William, S. *et al.* Praziquantel-induced tegumental damage in vitro is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections. **Parasitol** vol.122:p.63-66, 2001.

William, S. *et al.* Stability and reproductive fitness of *Schistosoma mansoni* isolates with decreased sensitivity to praziquantel. **International Journal for Parasitology**, vol.31, p.1093-1100, 2001b.

William, S.; Botros, S. Validation of sensitivity to praziquantel using *Schistosoma mansoni* worm muscle tension and Ca²⁺-uptake as possible in vitro correlates to in vivo ED50 determination. **Int .J .Parasitol**.vol34(8):p.971-7, 2004.

Wootton, J.C. *et al.* Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. **Nature**, vol.418, 320, 2002.

Wright, S. Systems of mating. **Genetics**, v. 6, p. 111-178, 1921.

Xiao, S. *et al.* Therapeutic effect of praziquantel enantiomers in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 93:324-325, 1999.

Xiao, S.H. *et al.* Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. **J Infect Dis**. vol151(6):p.1130-7, 1985.

Zhu, Y. *et al.* A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatelliteloci. **J.Mol.Evol**. vol.50(4):p.324-38, 2000.

Zarlenga, D.S, Dame, J.B. The identification and characterization of a break within the large subunit ribosomal RNA of *Trichinella spiralis*: comparison of gap sequences within the genus. **Mol Biochem Parasitol**. Vol.51(2):p.281-9, 1992.

**TABELAS DE RESULTADOS DE PERFUSÕES DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM CEPA LE E LEi.**

Resultado 1º Geração- Grupo LE tratado Praziquantel (2x100mg-Kg)

Número de camundongos	Número de vermes vivos - Machos no mesentério	Número de vermes vivos - Fêmeas no mesentério	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no mesentério	Número de vermes vivos - Machos no Fígado	Número de vermes vivos - Fêmeas no Fígado	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no Fígado	Número total vermes
1	20	0	5	30	7	0	0	7	37
2	14	0	11	36	1	0	0	1	37
3	22	2	6	36	0	0	0	0	36
4	13	2	6	27	1	0	0	1	28
5	4	3	6	19	0	0	1	2	21
6	27	1	2	32	12	0	2	16	48
7	9	5	10	34	0	0	0	0	34
8	21	2	1	25	6	0	0	6	31
9	18	0	5	28	1	0	0	1	29
10	20	2	7	36	1	0	0	1	37
11	1	1	4	10	2	0	0	2	12
12	10	0	15	40	5	1	0	6	46
13	13	2	0	15	0	0	0	0	15
14	2	0	0	2	4	0	0	4	6
15	6	0	2	10	2	0	0	2	12
16	9	2	2	14	1	0	0	1	15
17	14	0	3	20	7	0	1	9	29
18	9	2	8	27	7	0	0	7	34
19	13	0	4	21	0	0	0	0	21
Total de vermes	245	24	97	462	57	1	4	66	528
X	12,8	1,26	5,1	23,84	3	0,42	0,21	3,47	27,78

Resultado 1º Geração- Grupo controle de Infecção grupo LE

Número de camundongos	Número de vermes vivos - Machos no mesentério	Número de vermes vivos - Fêmeas no mesentério	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no mesentério	Número de vermes vivos - Machos no Fígado	Número de vermes vivos - Fêmeas no Fígado	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no Fígado	Número de total vermes
1	16	2	16	50	1	0	0	1	51
2	17	7	3	30	0	0	0	0	30
3	12	12	3	30	1	0	0	1	31
4	2	10	2	16	0	0	0	0	16
5	20	4	2	28	0	1	0	1	29
6	14	3	12	41	2	0	0	2	43
7	19	1	5	30	0	1	0	1	31
8	10	5	11	37	2	0	0	2	39
9	21	6	2	31	0	0	0	0	31
10	12	2	17	48	7	0	1	9	57
11	8	4	4	20	8	0	1	10	30
12	10	4	5	24	2	0	0	2	26
13	10	7	6	29	2	0	0	2	31
14	16	3	2	23	6	1	0	7	30
15	6	4	9	28	1	0	0	1	29
16	12	12	1	26	1	1	0	2	28
17	3	11	10	34	0	0	0	0	34
18	11	9	1	22	1	0	0	1	23
19	5	5	6	22	0	0	0	0	22
Total de vermes	224	111	117	569	34	4	2	42	611
X	11,78	5,84	6,15	29,94	1,78	0,21	0,1	2,21	32,15

Resultado 6º Geração- Grupo LEI tratado Praziquantel (3x300mg-Kg)

Número de camundongos	Número de vermes vivos - Machos no mesentério	Número de vermes vivos - Fêmeas no mesentério	Número de vermes Acasalados	Número total de Vermes no mesentério	Número de vermes vivos - Machos no Fígado	Número de vermes vivos - Fêmeas no Fígado	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no Fígado	Número total vermes
1	1	2	0	3	0	1	0	1	4
2	8	6	5	24	0	0	0	0	24
3	0	5	1	7	0	1	0	1	8
4	3	2	4	13	1	2	0	3	16
5	0	3	0	3	0	0	1	2	5
6	4	3	3	13	2	0	2	6	19
7	4	9	1	15	0	1	0	1	16
8	1	2	0	3	1	4	0	5	8
9	11	12	7	37	1	0	0	1	38
10	4	3	0	7	2	0	0	2	9
11	4	2	4	14	0	1	0	1	15
12	1	1	2	6	2	1	0	3	9
13	0	2	0	2	0	0	0	0	2
14	6	8	2	18	0	0	0	0	18
15	2	4	1	8	1	1	0	2	10
16	4	8	4	20	0	0	0	0	20
17	4	3	4	15	1	1	0	2	17
Total de vermes	57	75	38	208	11	13	3	30	238
X	3,35	4,41	2,23	12	0,6	0,76	0,17	2	14

Resultado 6º Geração- Controle de Infecção grupo LEI

Número de camundongos	Número de vermes vivos - Machos no mesentério	Número de vermes vivos - Fêmeas no mesentério	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no mesentério	Número de vermes vivos - Machos no Fígado	Número de vermes vivos - Fêmeas no Fígado	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no Fígado	Número total vermes
1	6	20	3	32	1	0	0	1	33
2	1	4	1	7	0	0	0	0	7
3	5	0	9	23	0	0	0	0	23
4	2	3	7	19	0	0	0	0	19
5	0	1	3	7	0	2	0	2	9
6	4	4	6	20	2	0	0	2	22
7	0	2	7	16	0	0	1	2	18
8	3	5	7	22	1	0	0	1	23
9	3	8	3	17	0	0	0	0	17
10	3	6	6	21	1	0	1	3	24
11	2	2	3	10	0	0	0	0	10
12	2	4	4	14	0	1	0	1	15
13	1	0	3	7	0	1	0	1	8
14	9	14	2	27	0	0	1	2	29
15	1	6	2	11	0	0	0	0	11
16	8	3	3	17	1	0	0	1	18
total de vermes	50	82	69	270	6	4	3	16	286
X	3,12	5,1	4,31	17	0,37	0,25	0,18	1	18

Resultado 6º Geração- Controle de Infecção grupo LE

Número de camundongos	Número de vermes vivos - Machos no mesentério	Número de vermes vivos - Fêmeas no mesentério	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no mesentério	Número de vermes vivos - Machos no Fígado	Número de vermes vivos - Fêmeas no Fígado	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no Fígado	Número total vermes
1	8	9	4	25	1	4	0	5	30
2	13	9	4	32	1	4	0	5	37
3	13	12	9	43	0	4	0	4	47
4	10	11	1	23	3	3	0	6	20
5	8	10	3	24	1	3	0	4	28
6	9	24	7	47	0	1	0	1	48
7	21	35	5	66	1	0	0	1	67
8	13	24	9	55	0	0	0	0	55
9	9	12	4	29	0	4	0	4	33
10	17	20	6	49	0	0	0	0	49
11	16	29	7	59	0	5	0	5	64
12	10	15	2	29	0	0	0	0	29
13	10	16	8	42	0	1	0	1	43
14	14	30	11	66	0	1	0	1	67
15	8	14	3	28	2	1	0	3	31
16	10	13	2	27	0	9	0	9	36
17	26	17	3	49	0	2	2	6	55
18	27	21	3	54	0	0	0	0	54
19	16	15	0	31	2	5	0	7	38
20	5	9	2	18	1	1	0	2	20
Total de vermes	263	345	93	796	12	48	2	64	851
X	13,15	17,25	4,65	40	0,6	2,4	0,1	3	43

Resultado 6º Geração- Grupo LE tratado Praziquantel (3x300mg-Kg)

Número de camundongos	Número de vermes vivos - Machos no mesentério	Número de vermes vivos - Fêmeas no mesentério	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no mesentério	Número de vermes vivos - Machos no Fígado	Número de vermes vivos - Fêmeas no Fígado	Número de vermes- Acasalados	Número total de Vermes no Fígado	Número total vermes
1	7	1	6	20	1	0	0	1	21
2	4	12	0	16	0	0	0	0	16
3	9	10	2	23	0	0	0	0	23
4	5	5	4	18	0	3	1	5	23
5	2	3	0	5	0	0	0	0	5
6	8	7	8	31	2	0	0	2	33
7	1	2	0	3	0	1	0	1	4
8	0	1	0	1	0	1	0	1	2
9	3	7	12	34	0	1	0	1	35
10	5	10	3	21	1	0	0	1	22
11	8	11	8	35	0	0	0	0	35
12	3	6	8	25	0	0	0	0	25
13	3	7	0	10	0	0	0	0	10
14	4	3	1	9	1	0	0	1	10
15	3	12	3	21	0	1	0	1	22
16	1	3	3	10	0	0	0	0	10
17	2	4	5	16	1	1	0	2	18
18	3	3	1	8	0	0	0	0	8
19	2	2	0	4	0	1	0	1	5
total de vermes	73	109	64	310	6	9	1	17	327
X	3,8	5,7	3,36	16	0,31	0,47	0,05	1	17

Resultado 7º Geração- Grupo LEi tratado Praziquantel (3x300mg-Kg)

Número de camundongos	Número de vermes vivos - Machos no mesentério	Número de vermes vivos - Fêmeas no mesentério	Número de vermes-Acasalados	Número total de Vermes no mesentério	Número de vermes vivos - Machos no Fígado	Número de vermes vivos - Fêmeas no Fígado	Número de vermes-Acasalados	Número total de Vermes no Fígado	Número total vermes
1	2	5	15	37	0	1	0	1	38
2	2	10	16	44	0	1	1	3	47
3	1	17	15	48	1	17	9	36	84
4	0	1	33	67	0	0	0	0	67
5	8	8	17	50	0	1	1	3	53
6	8	11	17	53	0	3	0	3	56
7	2	8	8	26	1	5	1	8	34
8	1	14	16	47	0	0	0	0	47
9	9	18	15	57	1	1	0	2	59
10	6	15	27	75	0	0	0	0	75
11	5	22	11	49	0	6	0	6	55
12	6	11	16	49	0	1	0	1	50
13	3	3	3	12	1	4	7	19	31
14	7	14	37	95	1	4	5	15	110
15	6	7	18	49	0	3	1	5	54
16	24	30	21	96	0	0	0	0	96
17	5	14	17	53	0	4	2	8	61
18	1	6	2	11	2	5	4	15	26
total de vermes	96	214	304	918	7	56	31	125	1043
X	5,33	11,88	16,88	51	0,38	3,11	1,72	7	58

Resultado 7º Geração- Controle de Infecção grupo LEi

Número de camundongos	Número de vermes vivos - Machos no mesentério	Número de vermes vivos - Fêmeas no mesentério	Número de vermes-Acasalados	Número total de Vermes no mesentério	Número de vermes vivos - Machos no Fígado	Número de vermes vivos - Fêmeas no Fígado	Número de vermes-Acasalados	Número total de Vermes no Fígado	Número total vermes
1	12	60	3	78	0	5	0	5	83
2	7	7	15	44	0	0	0	0	44
3	8	26	27	88	1	12	0	13	101
4	10	18	32	92	1	2	0	3	95
5	24	26	20	90	0	1	0	1	91
6	20	41	14	89	1	2	0	3	92
7	18	32	11	72	0	0	0	0	72
8	12	10	11	44	1	1	0	2	46
9	2	5	0	7	0	0	0	0	7
10	12	30	14	70	0	2	1	4	74
11	13	15	5	38	0	1	0	1	39
12	14	33	11	69	0	1	0	1	70
total de vermes	152	303	163	781	4	27	1	33	814
X	12,6	25,25	13,58	65	0,33	2,25	0,08	3	68

Resultado 7º Geração- Grupo LE tratado Praziquantel (3x300mg-Kg)

Número de camundongos	Número de vermes vivos - Machos no mesentério	Número de vermes vivos - Fêmeas no mesentério	Número de vermes-Acasalados	Número total de Vermes no mesentério	Número de vermes vivos - Machos no Fígado	Número de vermes vivos - Fêmeas no Fígado	Número de vermes-Acasalados	Número total de Vermes no Fígado	Número total vermes
1	7	2	3	15	0	0	0	0	15
2	9	4	3	19	0	1	0	1	20
3	15	15	19	68	0	0	0	0	68
4	4	3	12	31	0	0	0	0	31
5	7	4	10	31	0	0	0	0	31
6	12	7	7	33	0	0	1	2	35
7	4	3	2	11	1	0	0	1	12
8	19	10	26	81	10	4	2	18	99
9	29	8	14	65	0	0	0	0	65
10	7	12	6	31	1	0	0	1	32
11	19	13	12	56	3	1	2	8	64
12	1	1	5	12	1	0	1	3	15
13	2	3	1	7	1	0	0	1	8
14	8	6	15	44	1	0	0	1	45
15	10	4	3	20	5	0	0	5	25
16	6	7	16	45	2	0	2	6	51
17	21	3	21	66	0	0	2	4	70
18	18	1	14	47	5	0	1	7	54
19	1	1	12	26	1	0	3	7	33
total de vermes	199	107	201	708	31	6	14	65	773
X	10,47	5,63	10,57	37	1,63	0,31	0,73	3	40

Resultado 7º Geração- Grupo LE controle de Infecção

Número de camundongos	Número de vermes vivos - Machos no mesentério	Número de vermes vivos - Fêmeas no mesentério	Número de vermes-Acasalados	Número total de Vermes no mesentério	Número de vermes vivos - Machos no Fígado	Número de vermes vivos - Fêmeas no Fígado	Número de vermes-Acasalados	Número total de Vermes no Fígado	Número total vermes
1	19	14	18	69	5	1	0	6	75
2	15	11	10	46	6	2	0	8	54
3	35	28	10	83	0	0	0	0	83
4	25	19	20	84	2	2	0	4	88
5	32	20	19	90	6	3	2	13	103
6	41	10	24	99	4	2	0	6	105
7	22	19	13	67	2	0	2	6	73
8	16	14	19	68	1	2	0	3	71
9	19	16	12	59	1	0	1	3	62
10	20	12	12	56	4	2	0	6	62
11	41	28	10	89	9	3	0	12	101
12	25	15	20	80	2	1	0	3	83
13	5	4	3	15	0	1	1	3	18
14	32	17	8	65	3	2	3	11	76
15	49	35	12	108	5	3	2	12	120
16	32	28	3	66	3	0	1	5	71
17	29	20	11	71	2	0	0	2	73
18	38	30	8	84	2	1	0	3	87
19	24	20	5	54	4	2	1	8	62
total de vermes	519	360	237	1353	61	27	13	114	1467
X	27,31	18,94	12,47	71	3,21	1,42	0,68	6	77

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)