

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Estudo da resistência do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 ao praziquantel**

**por**

**Flávia Fernanda Búbula Couto**

**Belo Horizonte**

**Maior / 2014**

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Estudo da resistência do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 ao praziquantel**

**por**

**Flávia Fernanda Búbula Couto**

**Tese apresentada com vistas à obtenção  
do título de Doutor (a) em Ciências na área de  
concentração Doenças Infecciosas e  
Parasitárias.**

**Orientação: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho**

**Belo Horizonte  
Maio/ 2014**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C871 2014	<p>Couto, Flávia Fernanda Búbula.</p> <p>Estudo da resistência do <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon, 1907 ao praziquantel / Flávia Fernanda Búbula Couto. – Belo Horizonte, 2014.</p> <p>XX, 78 f: il.; 210 x 297mm.</p> <p>Bibliografia: 82 – 98</p> <p>Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.</p> <p>1. Esquistossomose mansoni/terapia 2. <i>Schistosoma mansoni</i>/parasitologia 3. Praziquantel/uso terapêutico I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação).</p> <p>CDD – 22. ed. – 616.963</p>
--------------	--

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Estudo da resistência do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 ao praziquantel**

**por**

**Flávia Fernanda Búbula Couto**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Presidente)

Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Dra. Roberta Lima Caldeira

Dra. Deborah Aparecida Negrão Corrêa

Dra. Florence Mara Rosa

Suplente: Dra. Marina de Moraes Mourão

**Tese defendida e aprovada em: 08/05/2014**

"A ciência é, no mais estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa diversão."

(Jacques Barzun)

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

(Galileu Galilei)

"Tudo posso naquele que me fortalece."

(Filipenses 4:13)

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais e irmãs que, com todo amor, me deram a base e o suporte para chegar até aqui. Ao Fábio, meu grande amor e amigo, por todo incentivo e por estar sempre ao meu lado. À minha querida avó (in memoriam), minha admiradora, por tudo que só ela sabia me fazer sentir.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente, a Deus por me dar forças para chegar aqui, por cada dia da minha vida e pelo infinito amor e cuidado comigo. Obrigada Senhor por estar sempre presente e por cada bênção na minha vida. Agradeço por me dar a certeza que, confiando em Ti, os momentos difíceis são passageiros e pequenos diante das coisas maravilhosas que tens preparado para mim.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, exemplo de pesquisador e pessoa, pelos ensinamentos, confiança e por me mostrar o quão gratificante e prazerosa pode ser a ciência. Obrigada por acreditar em mim desde o dia que fiz a seleção para ser sua aluna.

À Kika, minha co-orientadora, pelo incentivo, pelas correções sempre valiosas e por ser um exemplo de profissional competente.

À Neusa Araújo e ao Dr. Naftale Katz pela confiança, incentivo e por me darem a oportunidade de trabalhar com eles em outros projetos que são essenciais para meu crescimento científico e pessoal.

A todos do LESQ, equipe maravilhosa e de grande competência. Cada um de vocês tem uma importância enorme neste trabalho e na minha vida. Agradeço em especial às minhas queridas amigas pela amizade, momentos de descontração, de troca de experiências, ensinamentos e, principalmente, por torcerem e acreditarem em mim.

À Ana Carolina Alves de Mattos por seu incentivo e por ser parte essencial deste trabalho desde o início de tudo.

À Jussara, nossa secretária e minha querida amiga, que está sempre disponível e com muita boa vontade para nos ajudar.

Ao Wander e ao Dr. Élio Baba pelos valiosos ensinamentos, ajudas e discussões científicas.

À Liliane e ao Fábio pela ajuda na reta final com os experimentos de RT-PCR.

Ao Dr. Robert Greenberg por me receber tão bem em seu laboratório e me dar à oportunidade de viver uma das melhores experiências durante este trabalho.

Ao Moluscário do CPqRR, em especial à Delza, Dílcia, Lidiane e Sueleny, pela disposição e por toda ajuda com os caramujos.

À Equipe do Biotério, Central de Esterilização e Plataforma de PCR em Tempo Real – BH pelos serviços e colaboração prestados.

Aos funcionários e técnicos do René Rachou que, de alguma forma, contribuíram e ajudaram na realização desse trabalho.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pela estrutura e mão de obra extremamente qualificada disponibilizada, sempre visando e incentivando o sucesso de seus colaboradores.

Aos colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do CPqRR.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos meus queridos avós, que infelizmente não viram a conclusão deste trabalho, por todo amor, carinho e admiração.

Aos meus queridos pais, Flávio e Silvania, por serem maravilhosos, por estarem sempre tão presentes em todos os momentos da minha vida e pelas infinitas orações que tanto me fortalecem. Obrigada por priorizarem meus estudos e me permitirem chegar até aqui.

Às minhas irmãs, Marcela e Nayla, por serem as minhas maiores amigas. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio, incentivo e por todas as orações.

Por fim, agradeço a pessoa que tem uma importância sem medidas na minha vida, meu marido Fábio. Obrigada por compartilhar comigo os momentos de alegria, me dar força nos de tristeza e de ansiedade, pela paciência e compreensão nas horas difíceis e, principalmente, por todo amor e cuidado. Obrigada por ter largado



tudo para me apoiar e para viver comigo meu sonho e a mais rica experiência que já vivi.

## **AGRADECIMENTO ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

Agradeço ao apoio financeiro concedido pelas Instituições financiadoras: CPqRR/FIOCRUZ e CAPES.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XVIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE QUADROS.....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT.....	XX
1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Esquistossomose.....	21
1.2 Ciclo de vida.....	22
1.3 A doença.....	25
1.4 Controle da esquistossomose.....	26
1.5 Praziquantel.....	28
1.6 Resistência ao praziquantel.....	30
1.7 Proteínas envolvidas na resistência a multidrogas ( <i>multidrug resistance</i> - MDR).....	34
2 JUSTIFICATIVA.....	39
3 OBJETIVO.....	41
3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4 METODOLOGIA.....	42
4.1 Tratamento com PZQ de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> cepa LE e LE-PZQ em diferentes fases do parasito no hospedeiro.....	42
4.2 Avaliação da manutenção da resistência da cepa LE-PZQ de <i>S. mansoni</i> ao PZQ.....	44
4.3 Efeito do PZQ em cercárias de <i>S. mansoni</i> da cepa LE e LE-PZQ.....	44
4.4 Obtenção de parasitos para experimentos de qRT-PCR.....	45
4.5 Níveis de RNA dos genes SMDR2 e SmRP1 na cepa LE-PZQ.....	45
4.5.1 Extração de RNA.....	45
4.5.2 Obtenção dos cDNAs.....	47
4.5.3 Iniciadores.....	47

4.5.4 Análise por qRT-PCR.....	49
4.6 Níveis de RNA do gene SmMVP na cepa LE-PZQ.....	50
4.6.1 Extração de RNA.....	50
4.6.2 Síntese de cDNA.....	51
4.6.3 Iniciadores.....	52
4.6.4 Análise por qRT-PCR.....	52
4.7 Análises estatísticas dos dados de qRT-PCR de SMDR2, SmMRP1 e SmMVP.....	53
4.8 Análise do nível de expressão da proteína SmMVP na cepa LE-PZQ.....	53
4.8.1 Obtenção do extrato de proteínas.....	53
4.8.2 Western Blot.....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Tratamento com PZQ de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> cepa LE e LE-PZQ em diferentes fases do parasito no hospedeiro.....	55
5.2 Manutenção e avaliação da resistência da cepa LE-PZQ ao PZQ.....	57
5.3 Efeito do PZQ em cercárias de <i>S. mansoni</i> da cepa LE e LE-PZQ.....	59
5.4 Análise da expressão diferencial de SMDR2 e SmMRP1 na cepa LE-PZQ.....	61
5.4.1 Validação do iniciadores.....	61
5.4.2 Obtenção das amostras para PCR em Tempo Real .....	62
5.4.3 Níveis de RNA dos genes SMDR2 e SMRP1.....	62
5.5 Análise do nível de expressão de SmMVP na cepa LE-PZQ.....	65
5.5.1 Níveis de RNA dos gene SmMVP.....	65
5.5.2 Western Blot.....	67
6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÕES.....	78
8 PERSPECTIVAS.....	79
9 ANEXOS.....	80
9.1 Artigo publicado.....	80
9.2 Aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	81
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	25
<b>Figura 2:</b> Gel de agarose 2%.....	61
<b>Figura 3:</b> Exemplo da quantificação obtida através do NanoDrop de uma das amostras consideradas de boa qualidade para uso neste trabalho.....	62
<b>Figura 4:</b> Nível de expressão da proteína SmMVP na cepa LE e LE-PZQ.....	68

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Número total de vermes vivos recuperados por animal nos grupos controles e experimentais das cepas LE e LE-PZQ com seus respectivos desvios padrões.....	57
<b>Gráfico 2:</b> Número total de vermes vivos recuperados por animal nos grupos controles e experimentais das cepas LE e LE-PZQ com seus respectivos desvios padrões.....	58
<b>Gráfico 3:</b> Média mais o desvio da quantidade de cercárias que perderam a cauda após exposição ao PZQ por 1 hora nas concentrações de 0,5mM, 1mM e 2mM.....	60
<b>Gráfico 4:</b> Média mais o desvio padrão da quantidade de cercárias que perderam a cauda após exposição ao PZQ por 2 horas nas concentrações de 0,5mM, 1mM e 2mM.....	60
<b>Gráfico 5:</b> Níveis de expressão de SMDR2 na cepa LE-PZQ e LE de machos, fêmeas e vermes em pares.....	64
<b>Gráfico 6:</b> Níveis de expressão de SmMRP1 na cepa LE-PZQ e LE de machos, fêmeas e vermes em pares.....	65
<b>Gráfico 7:</b> Níveis de expressão de SmMVP na cepa LE-PZQ e LE de machos, fêmeas e vermes em pares.....	67
<b>Gráfico 8:</b> Análise densitométrica dos níveis de expressão da proteína SmMVP na cepa LE-PZQ e LE de machos, fêmeas e de vermes em pares.....	69

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Média de vermes recuperados e percentual de redução da carga parasitária e relação LE-pZQ/LE após tratamento de camundongos infectados com a cepa LE ou LE-PZQ de *S. mansoni* com 400mg/kg de PZQ em diferentes dias após a infecção (d.p.i.).....56
- Tabela 2:** Média de vermes recuperados e percentual de redução da carga parasitária após tratamento de camundongos infectados com a cepa LE ou LE-PZQ de *S. mansoni* com 400mg/kg de PZQ.....58
- Tabela 3:** Média e percentual de cercárias da cepa LE e LE-PZQ de *S. mansoni* que perderam a cauda após exposição por 1 e 2 horas com o PZQ nas concentrações de 0,5mM, 1mM e 2mM.....59
- Tabela 4:** Eficiência de amplificação dos pares de iniciadores SMDR2, SmMRP1 e GAPDH utilizados nas reações de PCR em tempo real.....63
- Tabela 5:** Eficiência de amplificação dos pares de iniciadores SmMVP e EIF4E utilizados nas reações de PCR em tempo real.....66

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1:** Descrição, sequência e tamanho dos *amplicons* dos iniciadores SMDR2, SmMRP1 e GAPDH utilizados para estudo da expressão gênica por PCR em tempo real.....48

**Quadro 2:** Descrição, sequência e tamanho dos *amplicons* dos iniciadores SmMVP e EIF4E utilizados para estudo da expressão gênica por PCR em tempo real.....52



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg: micrograma

µl: microlitro

ABC: *ATP-binding-cassete*

ABCB1: *ATP-binding cassette*, sub-família B – gene que codifica a Pgp

ATP: trifosfato de adenosina

BCRP: proteína de resistência ao câncer de mama

Ca<sup>++</sup>: íon cálcio

cDNA: DNA complementar

CPqRR: Centro de Pesquisa René Rachou

Ct: *cycle threshold*

d.p.io: dias pós-infecção

DALYs: *disability ajustaded to life year*

DEPC: dietil pirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxirribonucleotídeos trifosfatos

DP: desvio padrão

DTT: Dithiothreitol

ED50: dose efetiva para matar 50% dos vermes

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

g: gramas

GAPDH gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

IFN-γ: interferon gamma

LE: cepa de *Schistosoma mansoni* linhagem susceptível ao PZQ mantida no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ

LE-PZQ: cepa de *Schistosoma mansoni* previamente submetida a 3 tratamentos com praziquantel na fase intramolusco

MDa: megadalton

MDR: resistência multidrogas

mg/kg: miligramas por quilo

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

MDR: resistência a multidrogas  
MRPs: proteínas associadas à resistência multidrogas  
MVP: *major vault protein*  
ng: nanograma  
nM: nanomolar  
OXA: oxaminiquina  
pb: pares de bases  
PBS: *Phosphate-buffered saline* – tampão de fosfato salina  
PCR: reação em cadeia da polimerase  
Pgp: P-glicoproteína  
PZQ: praziquantel  
qRT-PCR: PCR em tempo real quantitativo  
RNA: ácido ribonucleico  
RNAm: ácido ribonucleico mensageiro  
RNA<sub>t</sub>: ácido ribonucleico total  
RPM: rotações por minuto  
RPMI: Roosevelt Park Memorial Institute  
SDS-PAGE: dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida  
SFB: soro fetal bovino  
SMDR2: Proteína de *S. mansoni* homóloga a Pgp  
SmMRP1: proteína de *S. mansoni* homóloga a MRP1 de mamíferos  
SmMVP: MVP predita em *S. mansoni*  
TEP1: proteína telomerase-associada 1  
V: volts  
VPARP: vault (Poly-ADP-Ribose) polimerase  
vRNA: RNA não codificador que compõe a vault  
WHO: *World Health Organization* – Organização Mundial de Saúde

## RESUMO

Atualmente, a droga utilizada no tratamento da esquistossomose é o praziquantel (PZQ). Alguns casos de isolados de *S. mansoni* resistentes ao PZQ no campo e em laboratório já foram relatados. Estes relatos refletem uma parcela ínfima do problema real, devido às dificuldades para a comprovação dessa resistência em condições de laboratório. Recentemente, nosso grupo conseguiu induzir resistência, em laboratório, a uma cepa de *S. mansoni*, utilizando sucessivos tratamentos com PZQ em *B. glabrata* infectadas com o *S. mansoni* (cepa LE-PZQ). Diante disso, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a resistência/ suscetibilidade da cepa LE-PZQ ao longo de seu desenvolvimento no hospedeiro vertebrado bem como avaliar a ação do PZQ em cercárias sensíveis e resistentes ao PZQ a fim obter um teste rápido para detecção de resistência e, por fim, estudar o envolvimento das proteínas SMDR2, SmMRP1 e SmMVP na resistência do *S. mansoni* ao PZQ. Para isso, camundongos infectados com a cepa LE-PZQ ou com a cepa suscetível (LE) foram tratados com PZQ após 2, 6, 16, 23 e 45 dias de infecção. Os resultados mostraram maior recuperação de vermes da cepa resistente tratadas com PZQ após 16 e 23 dias de infecção em comparação com a cepa LE. Outro objetivo do nosso estudo foi avaliar a perda da cauda de cercárias LE e LE-PZQ após 1 e 2 horas de contato com o PZQ em diferentes concentrações. Cercárias LE-PZQ apresentaram uma perda da cauda estatisticamente menor após exposição nas diferentes concentrações de PZQ por 1 ou 2 horas. Artigos sobre resistência à multidrogas (MDR) têm sido importantes para estudo de resistência em diversos organismos. Por isso, investigamos os níveis de RNA de SMDR2 e SMRP1 por qRT-PCR. SMDR2 mostrou níveis maiores em fêmeas quando comparados com machos e vermes em pares na cepa LE. Na cepa LE-PZQ, vermes fêmeas apresentaram níveis maiores quando comparados apenas com vermes machos. Quando comparadas as duas cepas, a resistente apresentou níveis estatisticamente maiores em machos, fêmeas e vermes em pares. SmMRP1 demonstrou expressão significativamente maior em machos e machos e fêmeas nas duas cepas quando comparados com fêmeas. Na comparação entre a cepa sensível e a resistente, a LE-PZQ apresentou maiores níveis de expressão em machos e vermes em pares. Investigamos também os níveis de RNA e proteínas de SmMVP. Foi possível observar que SmMVP está diferencialmente expressa entre machos, fêmeas e vermes em pares quando comparados entre si em cada cepa e quando compara-se cepa sensível e resistente.

## ABSTRACT

Currently, the drug of choice in schistosomiasis treatment is Praziquantel (PZQ). Some cases of *S. mansoni* resistant strains to PZQ in field and laboratory have been already reported. These cases reports reflect a small parcel of the real problem due to the difficulty to prove this resistance in laboratory conditions. Recently, our group induced resistance in a *S. mansoni* strain using successive PZQ treatments in *B. glabrata* infected, under laboratory conditions (LE-PZQ strain). Thus, this work aimed to evaluate the resistance/ susceptibility of the LE-PZQ strain during its development in the vertebrate host as well as to evaluate the PZQ action in susceptible and resistant cercarie in order to obtain a rapid test to detect resistance, and lastly to study the involvement of SMDR, SmMRP1 and SmMVP proteins in the *S. mansoni* resistance to PZQ. For that, mice were infected with LE-PZQ strain or susceptible strain (LE) and treated with PZQ after 2, 6, 16, 23 and 45 days of infection. The results showed a bigger worm recovery when it was treated after 16 and 23 days of the infection when compared with susceptible strain. We also aimed to evaluate tail loss of LE and LE-PZQ cercarie after exposure to PZQ for 1 or 2 hours in different concentrations. LE-PZQ cercarie showed a statistically smaller tail loss after PZQ exposure in all concentrations for 1 or 2 hours. Works about multidrug resistance (MDR) have been important to studies of resistance in several organisms. Therefore, we investigated levels of RNA for SMDR2, SmMRP1 and SmMVP using RT-PCR. Females showed high levels of expression when compared to males and paired worms in the LE strain. In the LE-PZQ strain, female worms showed high levels of expression only when compared to male worms. When compared both strains, the resistant showed high levels of expression in males, females and paired worms. SmMRP1 showed upregulated in males and paired worms in both strains when compared to females. In the susceptible and resistant strain comparison, LE-PZQ strain showed high levels of expression in male and paired worms. We investigated also RNA and proteins levels for SmMVP. It was possible to observe that SmMVP was found differentially expressed in adult males and females from the susceptible strain.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária que ainda representa um dos principais problemas de saúde pública em diversos países tropicais e subtropicais apesar de esforços contínuos para seu controle (Abdul-Ghani *et al.*, 2009). Ao menos 230 milhões de pessoas requerem tratamento todo ano e mais de 779 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair a infecção ao redor do mundo (Steinmann *et al.*, 2006). Além disso, aproximadamente 280 mil mortes por ano são atribuídas às esquistossomoses (Van Der Werf, 2004). Entre as helmintoses, a esquistossomose representa a principal doença em termos de morbidade e mortalidade e causa perdas anuais de até 10,4 milhões em *DALYs* (*disability adjusted to life year*) (PAHO/WHO, 2007). Sua transmissão tem sido documentada em 77 países. Nos últimos 50 anos, houve uma mudança na distribuição geográfica da esquistossomose, no entanto, mesmo com programas de controle bem sucedidos, o número de pessoas infectadas ou sob risco de contrair a doença não foi reduzido (Engels *et al.*, 2002).

As esquistossomoses são causadas por trematódeos digenéticos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Os humanos são hospedeiros de seis espécies, as quais são morfológicamente muito similares. *Schistosoma mansoni* causador da esquistossomose mansoni e presente na África, Arábia e América do Sul; *Schistosoma japonicum* agente etiológico da esquistossomose japônica e presente na China e sudeste da Ásia e o *Schistosoma haematobium* causador da esquistossomose hematóbica e presente na África e Arábia, representam as espécies de maior relevância em termos de saúde pública. Enquanto, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma intercalatum* e *Schistosoma malayaensis* estão limitados a poucos focos e são de menor importância em saúde pública (Gryssels, 2012).

No Brasil, a esquistossomose mansoni continua representando um grave problema de saúde pública abrangendo 19 estados. Amplamente disseminada nas regiões sudeste e nordeste, enquanto nas regiões norte e sul, as áreas endêmicas apresentam-se mais dispersas e isoladas (Teles, 2005). Segundo Katz & Peixoto, mais de 8 milhões de pessoas estavam infectadas no ano de

2000, enquanto 30 milhões estão expostas ao risco de infecção. Dados epidemiológicos da doença são escassos e necessitam ser reavaliados, já que a situação atual é caracterizada pelo decréscimo de altas prevalências, ampliação da área geográfica e de transmissão associada a mudanças sócio-ambientais (Enk *et al.*, 2008). Um levantamento preciso é de extrema importância para que maiores esforços possam ser realizados visando o controle da transmissão. Atualmente, está sendo realizado o Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geohelmintos para estimar com mais precisão a prevalência da doença. Segundo dados parciais deste inquérito apresentados no XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul em outubro de 2013, até o presente momento, estima-se que cerca de 1,5 milhão de pessoas, com prevalência de 4,17%, encontram-se infectadas por *S. mansoni* no Brasil

A distribuição da esquistossomose no Brasil coincide com a distribuição geográfica das espécies de *Biomphalaria* susceptíveis; no entanto, o nível de susceptibilidade em cada espécie ou linhagem do molusco pode influenciar na prevalência da infecção humana.

## 1.2 Ciclo de Vida

O ciclo de vida do *S. mansoni* é complexo com uma fase de reprodução assexuada ocorrendo no hospedeiro intermediário (moluscos) e outra de reprodução sexuada no hospedeiro definitivo (mamíferos, tendo o homem como principal hospedeiro). Os hospedeiros invertebrados do *S. mansoni* são moluscos do gênero *Biomphalaria*, pertencentes à subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora, família Planorbidae. Até o recente estudo de Teodoro *et al.* (2010), existiam no Brasil dez espécies e uma sub-espécie pertencentes a esse gênero. Contudo, este trabalho demonstrou a ocorrência de *Biomphalaria cousini* no Brasil. Com isso, agora existem onze espécies do gênero *Biomphalaria* no Brasil, mas somente três já foram encontradas eliminando cercárias em condições naturais. São elas: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* (Paraense, 1975). Caramujos da espécie *B. glabrata* possuem uma ampla distribuição geográfica

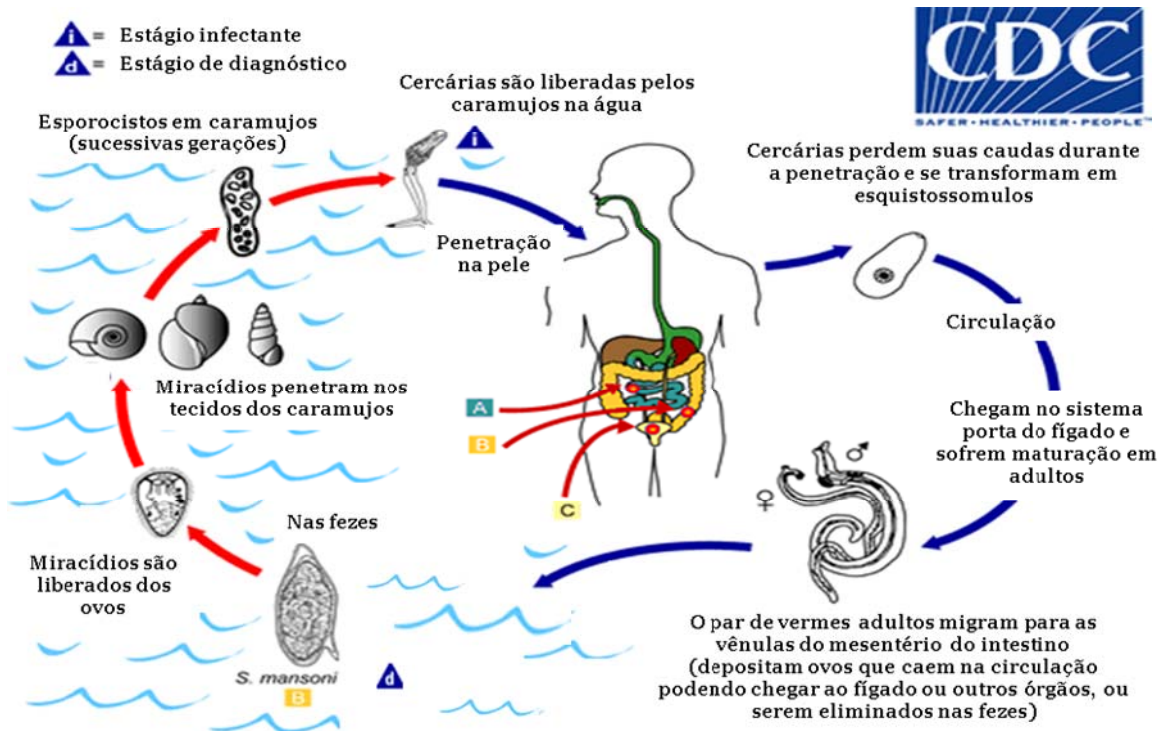
e sua presença está quase sempre associada à transmissão da esquistossomose. De fato, *B. glabrata* já foi notificada em 16 estados brasileiros, além de no Distrito Federal. Caramujos da espécie *B. straminea* apresentam maior importância epidemiológica na Região Nordeste. A espécie *B. tenagophila* é encontrada numa faixa litorânea, de forma quase contínua, a partir do sul do Estado da Bahia até o Estado do Rio Grande do Sul e é a principal transmissora da doença em extensas áreas do estado de São Paulo (Ministério da Saúde, 2008).

A infecção do hospedeiro definitivo se dá pelo contato do mesmo com águas contaminadas com cercárias. As mesmas eliminadas pelo molusco nadam ativamente e, ao encontrar o hospedeiro vertebrado, penetram na pele ou mucosa. Perdem a cauda, transformando-se em esquistossômulos. Após permanecer na pele por 72 horas, os esquistossômulos iniciam a migração através do corpo do seu hospedeiro via sistema sanguíneo. Na pele atingem a vasculatura do sistema sanguíneo e atingem os pulmões a partir do terceiro dia pós-infecção, via coração direito, tornam-se mais longos e delgados, o que facilita a sua migração através da rede vascular-pulmonar (Miller & Wilson, 1980). Posteriormente, migram para o fígado, via circulação sanguínea, onde ocorre a maturação dos vermes no sistema vascular porta-hepático. Quatro semanas após a infecção, a maioria dos vermes encontra-se maduros e prontos para se acasalarem. Os vermes acasalados deslocam-se ativamente contra a corrente circulatória do sistema porta e migram para as veias mesentéricas. As localizações habituais são as vênulas da parede do reto, sigmóide e intestino grosso (Bloch, 1980; Rollinson & Simpsons, 1987). Os vermes encontram-se em constante acasalamento, estando a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho. A postura de ovos se inicia em torno do 35º dia após infecção e levam cerca de seis dias para tornarem-se maduros, ou seja, com o miracídio formado. Parte desses ovos ganha a circulação e depositam-se principalmente nas paredes do intestino e fígado gerando uma reação inflamatória ao redor desses ovos, levando a formação dos granulomas, enquanto outros ovos podem depositar-se em outros órgãos. Parte dos ovos que alcançam a luz intestinal e são eliminados pelas fezes que podem alcançar o meio aquático.

No meio aquático, os ovos, sob influência de temperatura e luminosidade e liberam os miracídios. Estes apresentam geotropismo negativo e fototropismo positivo, comportamentos que auxiliam na localização do hospedeiro intermediário, caramujos do gênero *Biomphalaria*. Existem aspectos comportamentais e químicos que favorecem o encontro do miracídio com o caramujo. Contudo, o mecanismo quimiotático que levaria ao encontro do parasito com seu hospedeiro é um assunto controverso. Estudos demonstram que, na verdade, ocorre uma estimulação dos movimentos do miracídio pela presença de moléculas do caramujo na água e, com isso, um acúmulo de miracídios nas proximidades do molusco favorecendo o processo de infecção (Coelho *et al.*, 2008). O miracídio penetra no hospedeiro intermediário específico por movimentos rotatórios e ação de enzimas proteolíticas (Rollinson & Simpsom, 1987). Após a penetração, ocorre a perda do epitélio ciliar e a degeneração do terebratorium (extremidade anterior do parasito, onde se encontram as terminações das glândulas adesivas e de penetração). Em seguida, ocorre o desaparecimento da musculatura subepitelial e do sistema nervoso. A larva se torna imóvel e passa a ser chamada de esporocisto primário. Na segunda semana após a penetração, observa-se, no interior do esporocisto primário, uma série de ramificações tubulares que preenchem todos os espaços intercelulares do tecido conjuntivo; nestas ramificações, as células germinativas estão em intensa multiplicação. A partir do 14º dia, ocorre o desenvolvimento de um aglomerado de células germinativas nas paredes do esporocisto primário, a formação de vacúolos mais acentuada na parte central da larva. Os aglomerados se reorganizam e dão origem a septos, sendo cada septo considerado um esporocisto secundário. Nessa fase, as paredes apresentam uma camada cuticular e, abaixo, dupla camada muscular com fibras musculares longitudinais e transversais. Essa musculatura é fundamental para locomoção dos esporocistos. Ocorre, a partir do 18º dia, a migração transtecidual dos esporocistos, até alcançarem a glândula digestiva ou hepatopâncreas. Esses esporocistos secundários sofrem modificações anatômicas, dando início à proliferação de células germinativas culminando na formação das cercárias. A formação completa das cercárias, até a sua emergência, ocorre de 27 a 30 dias após a penetração dos miracídios (Pan, 1965). Milhares de cercárias são



produzidas por cada esporocisto que as liberam de forma intermitente nas horas mais claras do dia, já que a liberação das cercárias pelos caramujos é induzida pela luz associada a temperaturas mais altas (Carvalho *et al.*, 2008) e com a infecção do hospedeiro definitivo, reinicia-se o ciclo (Figura 1).



**Figura 1:** Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

### 1.3 A doença

A maioria das pessoas infectadas com *S. mansoni*, geralmente moradores de áreas onde a doença é endêmica, permanece sem sintomas clínicos graves. A sintomatologia clínica corresponde ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro e varia dependendo da carga parasitária e da intensidade de resposta imunológica do indivíduo. Do ponto de vista clínico, a esquistossomose pode ser dividida em duas fases: aguda ou crônica.

A fase aguda ocorre como uma manifestação clínica precoce em indivíduos não-imunes expostos a águas contaminadas com cercárias. Tem início no momento da infecção e pode durar até os 120 dias após a mesma. O

paciente pode apresentar febre, dor de cabeça, calafrios, suores, fraqueza, falta de apetite, dor muscular, tosse, diarreia e uma imunopatologia mais exacerbada (granulomas maiores do tipo necrótico exudativo).

A fase crônica, com início a partir de 120 dias após a infecção, com a reação granulomatosa inflamatória sendo imunomodulada, pode se apresentar de três formas: intestinal, a hepatointestinal, ambas mais brandas, e a hepatoesplênica, mais grave, podendo ser compensada ou descompensada. De acordo com Warren *et al.*, (1972), o evento patogênico mais importante na esquistossomose é a formação do granuloma, provocado pelo ovo do parasito. A formação de granulomas hepáticos leva a alterações hemodinâmicas (hipertensão portal) e, em manifestações ectópicas da doença, os ovos do parasito podem alcançar os pulmões, a medula espinhal ou outros órgãos, devido a isso, estes eventos podem resultar em varizes esofageanas sendo, com alguma frequência, fatais. Os granulomas na medula espinhal caracterizam uma síndrome grave, a radiculo-mielopatia que pode resultar em paralisia dos membros inferiores, às vezes, irreversível.

#### **1.4 Controle da esquistossomose**

A manutenção e/ou propagação dessa doença em determinada região depende de inúmeros fatores como: a existência de clima apropriado, condições socioeconômicas precárias (principalmente a falta de saneamento básico), existência de indivíduos infectados eliminando ovos, existência de hospedeiros intermediários e do contato de pessoas susceptíveis com águas naturais contendo cercárias (Valadares *et al.*, 1981).

Até a década de 70, o combate à esquistossomose mansoni no Brasil tinha como objetivo principal o controle da transmissão, tendo como principal medida a redução das populações dos moluscos, hospedeiros intermediários. De acordo com o Ministério da Saúde (2008), a partir dos anos 80, depois do advento de fármacos mais eficazes, seguros e baratos, o principal objetivo passou a ser o controle da morbidade, com ênfase no tratamento quimioterápico em larga escala. Segundo a WHO (1993), a quimioterapia é a principal alternativa para reduzir a morbidade da doença em áreas endêmicas, bem como tratar casos isolados da doença.

Contudo, o controle de doenças tropicais negligenciadas não pode ser baseado apenas no tratamento, uma vez que a maioria das pessoas infectadas está à mercê de sistemas de saúde e social inadequados que precisam ser melhorados para que benefícios em longo prazo sejam alcançados (Gray *et al.*, 2010). Outro fator que deve ser levado em consideração é que o PZQ atua parcialmente em vermes imaturos e ocorrem casos de reinfecção, com isso, programas de controle baseados apenas na quimioterapia tem apenas efeitos temporários e limitados no processo de transmissão a longo prazo (Doenhoff *et al.*, 2009).

De acordo com Grey e colaboradores (2010) a estratégia mais promissora seria um controle integrado com ênfase na necessidade de conjugar o tratamento com quimioterápicos em larga escala com o uso de moluscidas (em algumas circunstâncias), modificação ambiental, educação e promoção da saúde e melhoria nas condições de saneamento básico. É importante interromper não apenas a transmissão relacionada ao hospedeiro definitivo em relação ao caramujo, mas também vice-versa (Rollinson *et al.*, 2012).

Conforme Coura & Amaral (2004), o controle da doença no Brasil é dificultado por algumas razões, a saber: extensa disseminação dos hospedeiros intermediários no território nacional; custos relativamente altos para a implementação de condições sanitárias ideais e de suprimento de água tratada em todos os focos de transmissão; dificuldades para proteção individual. Assim, verifica-se a continuidade de um intenso contato com águas naturais, propiciando reinfecção. O longo tempo necessário para a educação sanitária funcionar adequadamente e para atingir a adesão das comunidades de maneira efetiva aos programas de controle é outro problema complexo.

Os dois principais medicamentos que foram utilizados extensivamente no tratamento da esquistossomose são a oxamniquina (OXA) (Mansil – Pfizer S.A) e o praziquantel (PZQ) (Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ).

A OXA é uma tetrahydroquinolina semi-sintética e tornou-se disponível para o tratamento da esquistossomose nos anos 70, sendo, em passado recente, muito utilizada no tratamento de populações, com aproximadamente 13 milhões de pessoas tratadas na América do Sul e África (Fenwick *et al.*,

2003). Atualmente, a produção da OXA foi suspensa pelo laboratório Pfizer devido à complexidade, alto preço de produção e a limitação de ser eficiente só na esquistossomose mansoni, com isso, hoje em dia, esse fármaco foi substituído pelo PZQ para o tratamento da esquistossomose, tanto em campanhas de saúde pública como na clínica, tendo em vista sua boa eficiência, baixa toxicidade e baixo custo na produção do medicamento tem sido fabricado por Farmanguinhos/FIOCRUZ.

O PZQ é utilizado para o tratamento da esquistossomose em populações em todo planeta, e a existência de cepas de *Schistosoma* resistentes ao PZQ pode ser considerada potencialmente um problema para o controle dessa doença, uma vez que, de acordo com El-Ansary *et al.* (2006), os métodos de controle da esquistossomose têm sido centralizados no uso da quimioterapia.

## 1.5 Praziquantel

O PZQ é, atualmente, o medicamento de escolha, segundo a OMS, para o tratamento em larga escala da esquistossomose, sendo efetivo contra as cinco espécies de *Schistosoma* (Doenhoff *et al.*, 2002). Foi desenvolvido na metade da década de 70 em estudo conjunto dos pesquisadores dos laboratórios Bayer e Merck. É um derivado sintético da pirazina isoquinolina e sua preparação comercial é uma mistura racêmica composta de partes iguais de levo R (-) e dextro S (+) isômeros. Porém, apenas o enantiômero (-) possui atividade esquistossomicida (Xiao & Catto, 1989; Wu *et al.*, 1991).

A dose recomendada para o tratamento da esquistossomose mansoni e haematobica é de 40-60mg/Kg, sendo utilizadas doses mais elevadas nos casos de esquistossomose japônica, infecções pelo *S. mansoni* em crianças e em alguns países africanos devido à resistência natural de linhagens geográficas do parasito ao fármaco (WHO, 2002). Em geral, o PZQ apresenta baixa toxicidade e sua eliminação ocorre através da urina e fezes após 24 horas (Cioli & Pica-Matocchia, 2003). Os efeitos colaterais são raros, contudo, os mais comuns incluem náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreias. A frequência e a gravidade dos efeitos colaterais estão diretamente relacionadas com a intensidade da infecção (Polderman *et al.* 1984). Contudo, a toxicidade a

longo prazo é desconhecida e, por outro lado, o PZQ é seguro para ser administrado em crianças e mulheres grávidas (Dayan, 2003). É eficaz em pacientes de todas as idades e em diferentes formas clínicas da doença, inclusive na forma hepatoesplênica descompensada (Bassily *et al.*, 1985) e atua mais eficientemente contra os vermes adultos, principalmente fêmeas.

Apesar dos inúmeros trabalhos realizados na tentativa de esclarecer o modo de ação do PZQ, existem ainda muitas perguntas a elucidar. Assim, alguns efeitos desse fármaco sobre o parasito já estão bem estabelecidos, como contração muscular, dano tegumentar, bloqueio do sistema excretor e alterações metabólicas (Pax *et al.*, 1978; Fetterer *et al.*, 1980; Becker *et al.*, 1980; Mehlhorn *et al.*, 1981; Lima *et al.*, 2994a; Ribeiro *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2006).

A contração muscular é um dos primeiros efeitos observados no verme exposto ao fármaco *in vivo* ou *in vitro* (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003). Em decorrência da contração, os vermes perdem a capacidade de fixação, devido ao relaxamento da musculatura da ventosa ventral (acetábulo), e são arrastados para o fígado, onde ocorrem reações imuno-inflamatórias contra os vermes lesado, e, em conjunto com outros agravos ao parasito, culminará com a eliminação dos mesmos (Pax *et al.* 1978).

As alterações causadas no tegumento também são observadas logo após o contato com o fármaco e são devidas à vacuolização na base do tegumento, seguidas de bolhas na superfície (Becker *et al.*, 1980). O PZQ também causa alteração na fluidez da membrana do verme e desestabilização do tegumento (Lima *et al.*, 1994a). Estas alterações causam a morte direta do parasito ou ainda podem levar à exposição de antígenos, que seriam rapidamente reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro e este, em conjunto com o fármaco, eliminaria o parasito (Harnett & Kusel, 1986; Doenhoff *et al.*, 1987; Modha *et al.*, 1990), uma vez que alguns estudos já demonstraram que a eficácia do praziquantel depende do estado imune do hospedeiro (Brindley & Sher 1987; Fallon *et al.*, 1992; Ribeiro *et al.*, 1998).

Acredita-se que a maioria desses mecanismos de ação do PZQ sejam processos dependentes de  $Ca^{++}$  (Cioli *et al.*, 1995), uma vez que foi demonstrado, em experimentos *in vitro*, realizados em meio de cultura livre de  $Ca^{++}$ , o bloqueio dessas respostas (Pax *et al.*, 1978; Wolde-Mussie *et al.*,

1982; Xiao *et al.*, 1984). Sugere-se, ainda, que o PZQ atue inibindo canais de cálcio (Greenberg, 2005), uma vez que, com a interferência na função desses canais do parasita, foi possível obter um significativo nível de inibição da atividade esquistossomicida do PZQ (Pica-Mattoccia *et al.*, 2007).

Em experimentos *in vitro*, após a exposição ao PZQ, foi possível observar uma depleção do conteúdo de glutatona dos parasitas (Ribeiro *et al.*, 1998). A glutatona é um tripeptídeo fundamental para a sobrevivência das células, como a síntese do DNA e proteínas, atividade enzimática, transporte e proteção celular (Meister & Andreson, 1983).

Oliveira *et al.* (2006) e Couto *et al.*, (2011) demonstraram que o PZQ é, também, capaz de inibir a atividade excretora de vermes adultos de *S. mansoni* e esta pode ser recuperada, dependendo da concentração do fármaco, após retirada do medicamento.

Estudos já demonstraram a ação de diferentes medicamentos que atuam em vermes adultos na fase intramolusco do parasito. O cloranfenicol (Warren & Weisberg, 1983), hycanthone (Waren, 1967), OXA e diversos outros compostos esquistossomicidas (Coelho *et al.*, 1988) foram capazes de suprimir a eliminação de cercárias após exposição a esses fármacos. A ação do PZQ frente à miracídios, esporocistos e cercárias também já foi descrita (Andrews, 1978; Coles, 1979; Touassem & Combes, 1986; Yi & Combes, 1987; Coelho *et al.*, 1988; Riley & Chappel, 1990; Liang *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2003; Mattos *et al.*, 2006, Liang *et al.*, 2010). Nestes estudos, foi possível verificar que tanto os miracídios quanto os esporocistos são afetados pelo PZQ. De acordo com Coles (1973), enzimas presentes em esporocistos migram de maneira semelhante às de vermes adultos em eletroforese. Esses dados apontam para uma similaridade entre as vias metabólicas destas duas diferentes fases do ciclo de vida do *Schistosoma* (Coelho *et al.*, 1988).

## **1.6 Resistência ao praziquantel**

Tem-se documentado que programas de tratamentos em massa tendo como objeto populações humanas podem resultar no surgimento de cepas de parasitos resistentes. O argumento principal é que o tratamento mata patógenos sensíveis e reduz a competição intra e inter hospedeiros entre

parasitas sensíveis e resistentes e, por isso, aumenta a chance de transmissão de patógenos resistentes decorrentes de hospedeiros submetidos à pressão quimioterápica. Como resultado, pode-se maximizar e facilitar a presença de parasitas resistentes sobreviventes (Blanton *et al.*, 2011).

Em muitas infecções por helmintos, o uso da quimioterapia para controle é dificultado pela ocorrência de resistência ou tolerância a certos fármacos usados anteriormente. Conforme Fallon *et al.* (1996), a tolerância é uma não suscetibilidade inata do parasita ao fármaco, antes mesmo de ter sido exposto a ela. A tolerância a esquistossomicidas pode se manifestar na diferença de suscetibilidade em função da idade e do sexo do parasita. Estudos em laboratório já demonstraram que a atividade do PZQ e outros fármacos esquistossomicidas são estágio-dependentes. Vermes imaturos (3 a 5 semanas) são menos suscetíveis ao PZQ do que vermes adultos (Gonnert & Andrews, 1977; Xiao *et al.*, 1985; Sabah *et al.*, 1986; Pica-Mattoccia & Cioli, 2004; Vimeiro *et al.*, 2013). Estágios imaturos de desenvolvimento do *S. mansoni* são mais resistentes à formação de vesículas que as formas maduras do parasito, quando tratadas com PZQ (Xiao *et al.* 1985), o que talvez esteja envolvido com a pequena sensibilidade de vermes imaturos a droga. Sugere-se, também, que baixos índices de cura em algumas regiões possam manifestar uma falsa resistência/tolerância, sendo as altas taxas de infecção e reinfecção, além da presença de vermes imaturos, em grandes proporções no momento do tratamento, os principais responsáveis pelo baixo índice de cura do PZQ durante o tratamento (Doenhoff *et al.*, 2002). Devido a esses fatos, a persistência de vermes após o tratamento pode ser atribuída à presença de parasitos imaturos provenientes de contínuas re-infecções (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003). Contudo, é possível que os vermes sobreviventes ou uma porção destes constitua realmente uma população de vermes adultos selecionados resistentes ao medicamento (Blanton, 2011).

Kinoti & Coles (1997) sugeriram que uma população de *Schistosoma* é resistente quando há uma redução significativa na sua resposta a agentes esquistossomicidas em relação a populações suscetíveis. Existem também longas discussões com relação à falha no tratamento com PZQ, principalmente em áreas endêmicas, se esta se deve a altas taxas de transmissão e re-

infecção ou resistência/tolerância do parasita ao fármaco e altas cargas parasitárias (Gryseels *et al.*, 2001; Doenhoff *et al.*, 2002).

Em função da eficiência e baixa toxicidade do PZQ, foi possível o emprego deste em larga escala em áreas endêmicas, bem como em tratamentos repetidos. Porém, o uso da quimioterapia em massa e de tratamentos repetitivos, como principal método de controle da esquistossomose em áreas endêmicas, certamente pode gerar o surgimento de cepas resistentes, através do mecanismo de pressão quimioterápica seletiva (Coelho *et al.*, 1997). O impacto desse tipo de programa na estrutura genética das populações do parasita é pouco conhecido, embora seja bastante provável que a pressão seletiva é/será exercida (French *et al.*, 2012; Coeli *et al.*, 2013).

Várias medidas têm sido sugeridas para se tentar reduzir o impacto da resistência a fármacos esquistossomicidas: educação sanitária para evitar a reinfeção após o tratamento; medidas de saneamento básico; aumento da vigilância pelos órgãos oficiais de saúde pública, para monitorar o aparecimento de resistência; desenvolvimento de técnicas simples e factíveis para a detecção de cepas resistentes no campo; desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas; associação de fármacos (Bennett *et al.*, 1997).

A resistência a esquistossomicidas foi relatada, primeiramente, com o hycanthone e a OXA no Brasil (Katz *et al.*, 1973; Campos *et al.*, 1976; Coelho *et al.*, 1988, Araújo *et al.*, 1996, Coelho *et al.*, 1997). Estudos posteriores no Kenya e no Brasil, onde o tratamento em massa é realizado, demonstraram a resistência de vermes após sucessivos tratamentos quimioterápicos (Coles & Bruce, 1987).

O primeiro relato de resistência ao PZQ foi registrado por Fallon & Doenhoff (1994), em condições de laboratório. A partir deste trabalho, alguns estudos já demonstraram a existência de cepas de *S. mansoni* resistentes ou tolerantes ao PZQ, tanto em isolados produzidos no campo quanto em laboratório (Fallon *et al.*, 1995; Stelma *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 1996; Ismail *et al.*, 1996; Ismail *et al.*, 1999; Bonesso-Sabadini & Dias, 2002; Couto *et al.*, 2011, Coeli *et al.*, 2013).

Vários parâmetros têm sido utilizados para se tentar definir a existência de cepas resistentes. Fallon *et al.* (1996) propuseram considerar que isolados resistentes devem possuir ED<sub>50</sub>, pelo menos cinco vezes maior do que as



cepas sensíveis ao fármaco e são considerados com suscetibilidade reduzida quando a ED<sub>50</sub> for três vezes maior. Por outro lado, Bennet *et al.* (1997), considera para caracterizar suscetibilidade/resistência quando a dose efetiva para matar 50% dos vermes adultos de isolados resistentes é de três a cinco vezes maior que para isolados sensíveis. Cioli *et al.* (2004) avaliaram os valores de ED<sub>50</sub> (dose efetiva para matar 50% dos vermes) considerados para isolados sensíveis e resistentes ao PZQ e observaram que vermes resistentes demonstraram apresentar ED<sub>50</sub> três vezes maior que os isolados controle. Além disso, a taxa de eclosão de miracídios, o tempo necessário para que o PZQ altere a morfologia do miracídio, bem como a taxa de cercárias que perdem a cauda em contato com PZQ, durante um determinado tempo, já foram sugeridos como parâmetros para se definir a presença ou não de resistência em *S. japonicum* (Liang *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2003). Contudo, devido a diferenças na suscetibilidade ao PZQ entre as espécies e linhagens de *Schistosoma*, esses ensaios devem ser melhor avaliados, comparando-se as respostas das várias espécies e cepas (Liang *et al.*, 2001) e o encontro de marcadores moleculares da resistência à drogas esquistossomicidas irá, sem dúvidas, diminuir muito a subjetividade e ambiguidade relacionadas a aspectos morfológicos, biológicos e comportamentais como critérios de resistência.

O processo de pressão quimioterápica para seleção de resistência realizado em laboratório é um processo importante a ser utilizado, uma vez que estes parasitos resistentes podem ser a chave para elucidar os mecanismos de ação de drogas (Ross *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 2003). Além disso, o desenvolvimento de *S. mansoni* resistentes à droga artificialmente selecionados são fundamentais para elaborar métodos de detecção precoce de resistência, bem como testar novas estratégias terapêuticas (Fallon & Doenhoff, 1994).

Um aspecto crítico na evolução de resistência às drogas entre helmintos é que as metodologias usadas para detectar resistência necessitam de aperfeiçoamento e de novas abordagens (Bennett *et al.*, 1997). Por outro lado, devido à falta de novos conhecimentos sobre os mecanismos de ação de PZQ, as hipóteses sobre alguns dos mecanismos de resistência permanecem especulativos (Doenhoff *et al.*, 2008) e de acordo com Coles (1987) só estudos com parasitos resistentes ao PZQ podem ajudar a elucidar os mecanismos

moleculares de ação do fármaco. Coles (1989) sugere que a produção em laboratório de parasitos resistentes ao PZQ torna-se um instrumento valioso para ajudar a elucidar os mecanismos moleculares de ação da droga. Existem amplas discussões se as falhas no tratamento são devidas às altas taxas de transmissão, com constantes reinfecções, ou da diminuição da suscetibilidade do parasito ao PZQ (Gryseels et al., 2001; Doenhoff et al., 2002).

Os principais problemas para o estudo da resistência do *S. mansoni* ao PZQ se devem às dificuldades logísticas para indução de resistência e a posterior manutenção do isolado em laboratório. Os diversos experimentos de indução de resistência já publicados, realizados em laboratório, utilizam sucessivos fechamentos completos do ciclo evolutivos após tratamentos sucessivos em camundongos logo, são demorados e utilizam metodologias distintas, o que dificulta a comparação dos resultados entre eles, impedindo, assim, uma análise estatística confiável (Fallon et al., 1996).

### **1.7 Proteínas envolvidas na resistência a multidrogas (*multidrug resistance* - MDR)**

Um dos mecanismos mais comuns no desenvolvimento de resistência a fármacos é através do aumento do efluxo destes, frequentemente, mediado por transportadores multidrogas. Estes são transportadores celulares de efluxo com amplas especificidades de substratos e que removem ativamente xenobióticos e compostos tóxicos, incluindo drogas de células e tecidos (Pommier *et al.*, 2004). Tais transportadores constituem a base para a resistência multidrogas (MDR), um fenômeno no qual as células que desenvolvem resistência a um determinado medicamento também demonstram inesperada resistência cruzada para vários compostos estruturalmente não relacionados (Kasinathan & Greenberg, 2012). Muitos destes transportadores são membros de uma ampla família de proteínas de membrana denominada *ATP-binding-cassete* (ABC) que inclui a P-glicoproteína (Pgp), proteínas associadas à resistência multidrogas (MRPs), proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP), entre outras (Ambudkar *et al.*, 2003; Gimenez-Bonafe *et al.*, 2008). Como o próprio nome sugere transportadores MDR também regem a resistência à multidrogas. Tal fenômeno foi originalmente caracterizado em

células tumorais de mamíferos que foram selecionados para resistência a uma única droga, mas que demonstraram uma imprevisível e surpreendente resistência cruzada contra vários compostos não relacionados estruturalmente (Messerli *et al.*, 2009).

Esta superfamília de proteínas ABC possui diversas funções em animais, plantas e bactérias, incluindo o transporte de diversos compostos tais como peptídeos, hormônios, colesterol e outras substâncias (James *et al.*, 2007). Membros desta família de proteínas são transportadores que acoplam a translocação do substrato a hidrólise do ATP e que compreendem um dos maiores grupos de proteínas transmembrana encontradas nas células (Dassa & Bouige, 2001; Borst & Elferink, 2002) e estão presentes em organismos de todos os Reinos. Tais proteínas utilizam a energia resultante da hidrólise de ATP para transportar uma variedade de moléculas através de um processo ativo em membranas biológicas, incluindo aminoácidos, açúcares, peptídeos, lipídeos, íons e fármacos (Higgins, 1992). Em uma célula normal, as principais funções fisiológicas desses transportadores estão relacionadas com remoção ou exclusão de xenobióticos e toxinas metabólicas das células, bem como transporte de moléculas sinalizadoras (Kasinathan & Greenberg, 2012) e estão envolvidas na regulação da morte celular (Johnstone *et al.*, 2000) e funções do sistema imune (van der Ven *et al.*, 2009). Estudos das propriedades funcionais destas proteínas transportadas de drogas em *Schistosoma* ainda são limitados.

Todos os transportadores ABC compartilham pelo menos um domínio ATPase altamente conservado contendo os motivos Walker A e Walker B, encontrados em muitas famílias ATPase, e o motivo C ou assinatura ABC, sequência de aminoácidos exclusiva desse tipo de proteínas, que está localizado entre os outros dois motivos Walker, logo acima do Walker B (Greenberg, 2013).

Proteínas envolvidas na metabolização de fármacos já foram identificadas no *S. mansoni*. Bosch *et al.* (1994) identificaram a presença da SMDR2, uma proteína *Pgp-like*, cujo gene codifica 12 regiões transmembrana e 2 domínios ligadores de ATP preditos. A Pgp, como um dos membros dessa família de transportadores ABC, é uma bomba de efluxo ATP-dependente, produto do gene de resistência a multidrogas 1 (MDR1, ABCB1). Sondas fluorescentes que são conhecidos substratos de proteínas transportadoras

ABC em mamíferos foram usadas para examinar a função destes transportadores em vermes adultos de *S. mansoni*. A sonda Resorufim já foi utilizada para demonstrar a atividade da Pgp. Esta sonda é um sal sódico (7-hidroxi 3-fenoxazina) de natureza fluorescente e é um substrato para a Pgp. A Resorufim difunde-se passivamente através do tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* e é excretada por meio de uma suposta Pgp expressa no epitélio excretor. Esta sonda foi concentrada nos túbulos excretores de vermes e a excreção foi impedida pela administração de ciclosporina A e verapamil, inibidores de Pgp, sugerindo que a proteína era expressa e, conseqüentemente, estariam envolvidas na excreção e redistribuição de drogas no parasito (Ambudkar *et al.*, 1999). Em trabalho realizado por Oliveira *et al.* em 2006, utilizando a Resorufim, demonstrou-se que o PZQ é capaz de inibir a atividade excretora de vermes adultos da cepa LE de *S. mansoni* e que esta atividade pode ser recuperada quando o verme é retirado do contato com o fármaco. Em trabalho realizado por Couto *et al.* em 2010, também utilizando esta sonda, foi possível verificar que o PZQ não inibe completamente a atividade do sistema excretor de parasitos resistentes ao PZQ reforçando a hipótese de que esta proteína pode estar relacionada com o mecanismo que o parasito possui para eliminar o PZQ.

Outro membro da superfamília ABC são as proteínas associadas à resistência multidrogas (MRP). A MRP1 (ABCC1) de mamíferos é um dos nove genes da MRP humana e demonstra alguma sobreposição com o espectro de substratos da Pgp. Contudo, diferente da Pgp que possui preferência por compostos neutros e hidrofóbicos catiônicos, MRP1 transporta preferencialmente ânions orgânicos, drogas estruturalmente diversificadas e outros compostos tais como a glutatona e outros bioconjugados transformados e moléculas sinalizadoras (Leslie *et al.*, 2004, Ambudkar *et al.*, 2003; Gimenez-Bonafe *et al.*, 2008). Tem-se relato de poucos estudos da MRP1 em *Schistosoma* ou outros helmintos e estes estão relacionados com a localização de um substrato fluorescente putativo de MRP1 de mamíferos no sistema excretor de *Schistosoma* (Sato *et al.*, 2004) e imunoreatividade anti-MRP1 ao longo da camada de células tegumentar em *Fasciola gigantica* (Kumkate *et al.*, 2008). Recentemente, Kasinathan *et al.* (2010b) confirmaram a existência de uma proteína (SmMPR1), homóloga a MRP1 de mamíferos, e demonstraram

que, assim como a SMDR2 homóloga da Pgp, está mais expressa em vermes após exposição à concentrações subletais de PZQ, contudo, com um padrão um tanto quanto diferente da SMDR2. A SmMRP1 aparenta possuir diferente distribuição entre machos e fêmeas. Diferente de SMDR2, o RNA de SmMRP1 está mais expresso em vermes machos que em fêmeas. Além do mais, o RNA de SmMRP1 e SMDR2 estão mais expressos em vermes juvenis (insensíveis ao PZQ) comparado com vermes adultos (Messerli *et al.*, 2009; Kasinathan *et al.*, 2010b). Estes resultados corroboram a hipótese que transportadores MDR podem ter um papel importante na resposta do parasito ao PZQ.

Embora estudos demonstrem a importância dos transportadores ABC no fenômeno de resistência a multidroga, diversas linhagens celulares MDR tem sido descritas sem ter uma maior expressão de Pgp ou MRP, indicando que mecanismos adicionais devem ser considerados (Futscher *et al.* 1994). A superexpressão de *major vault protein* (MVP) já foi encontrada em algumas linhagens de células tumorais e de leucemia resistentes a uma variedade de compostos citotóxicos que não expressam Pgp (Schefer *et al.*, 1995; Izquierdo *et al.*, 1996; Ikeda *et al.*, 1999). Além do mais, aumento nos níveis de RNAm de MVP já foi associado com o fenótipo MDR em algumas linhagens de células tumorais resistentes (Laurencot *et al.*, 1997).

A MVP de 100kDa representa mais de 70% e é o componente predominante do complexo Vault, uma ribonucleoproteína de 13MDa encontrados no citoplasma de células eucarióticas composta por mais dois componentes proteicos: a vault (Poly-ADP-Ribose) polimerase (VPARP), que corresponde a um membro funcional da família PARP encontrada dentro do complexo e a proteína telomerase-associada 1 (TEP1), ligadora de RNA (Kedersha & Rome, 1986; Van Zon *et al.*, 2003). Além disso, é composto por um pequeno RNA não codificador (vRNA) de aproximadamente 140pb. A notável conservação e ampla distribuição das vaults sugerem que suas funções são essenciais para os eucariotos e que sua estrutura é importante para essas funções (Kickhoefer *et al.*, 1998). Embora as funções destes complexos não tenham sido completamente esclarecidas, sua estrutura em forma de cilindro oco e sua localização sub-celular indicam participação no transporte intracelular (Mossink *et al.*, 2003). Sugere-se também o envolvimento deste complexo em vias de sinalização celular relacionados com sobrevivência e

proliferação, tais como a participação na regulação da expressão gênica induzida por IFN- $\gamma$  e na regulação da via MAPK induzida pelo fator de crescimento epidérmico (Steiner *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2008).

Reis *et al.* (2013) foram capazes de identificar uma MVP predita em *S. mansoni* (SmMVP) bem conservada e que apresenta características semelhantes à de outros organismos, como domínios conservados e peso molecular equivalente além de características específicas do parasito, através de análises de bioinformática utilizando o banco de dados do genoma do parasito de aproximadamente 100kDa.

## 2 JUSTIFICATIVA

Diante da carência de um método rápido e confiável para selecionar linhagens de *Schistosoma* resistentes ao PZQ em laboratório e da dificuldade de manter essa linhagem (fato relatado por todos que trabalham com isolados resistentes de *S. mansoni*), nosso grupo de pesquisa desenvolveu um método para indução de resistência que se mostrou rápido, de simples execução e econômico, utilizando como modelo experimental caramujos *B. glabrata* infectados com *S. mansoni*. Os caramujos infectados foram submetidos a tratamentos sucessivos com uma dose sub curativa de PZQ para selecionar parasitos menos sensíveis à droga por pressão quimioterápica. Este isolado resistente selecionado, denominado LE-PZQ, apresentou em camundongos uma ED<sub>50</sub> (dose efetiva para matar 50% dos vermes) 5,3x maior do que a observada na cepa original, suscetível ao PZQ (Couto *et al.*, 2011). Também foi possível verificar, através de sondas fluorescentes, que estes parasitos selecionados, diferentemente dos controles não selecionados, possuíam danos menos intensos em seu tegumento e que mantinham sua atividade excretora após o contato com o PZQ. Nosso grupo sugere que a permanência da atividade excretora pode estar relacionada com a com uma maior expressão de proteínas SMDR2 e, conseqüentemente, ligada com a resistência desse isolado ao PZQ (Couto *et al.*, 2010).

Ente os membros da superfamília das proteínas ABC, em *S. mansoni* já foram descritos o SMDR2, um ortólogo da PgP (Bosch *et al.*, 1994) e o SmMRP1, um ortólogo da MRP1 (Kasinathan *et al.*, 2010b). Trabalhos recentes sugerem que níveis mais elevados destes transportadores estão associados com suscetibilidade reduzida ao PZQ em *S. mansoni* (Messerli *et al.*, 2009; Kasinathan *et al.*, 2010a). Estas proteínas podem estar envolvidas na resistência aos fármacos em helmintos e em outros organismos (Lage, 2003; James *et al.*, 2009).

Face ao problema em potencial de resistência principalmente ao PZQ em áreas endêmicas, surge a necessidade de marcadores moleculares para resistência através de testes rápidos para que medidas alternativas (outras drogas) sejam tomadas, como o uso de outros medicamentos ou associação de drogas.

Para a detecção de vermes resistentes ao PZQ em pacientes no campo ou em caramujos coletados do campo urge a necessidade de um teste simples que será de grande valia para que a falha no tratamento dos pacientes possa ser esclarecida rapidamente (Liang *et al.*, 2001). Em estudo realizado por Liang *et al.* (2010) foi possível observar, entre outras conclusões, que há uma menor perda de cauda em cercárias de um isolado resistente ao PZQ comparado ao sensível. Diante disso, este poderia ser uma alternativa rápida e fácil para identificar caramujos infectados com isolado resistente ao PZQ. Assim, a elaboração de um método bem padronizado para identificação desses parasitos resistentes é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Diante do exposto, este trabalho estudou o tratamento de camundongos infectados com *S. mansoni* resistentes ao PZQ em diferentes fases do ciclo de vida parasito no hospedeiro vertebrado a fim de avaliar quando a resistência é mais evidente, bem como avaliar a ação do PZQ em cercárias sensíveis e resistentes ao PZQ a fim obter um teste rápido para detecção de resistência. Por fim, avaliar o papel da SMDR2, da SmMRP1 e da SmMVP na resistência do *S. mansoni* ao PZQ em um isolado de laboratório resistente, uma vez que estudos apontam a importância destas para o parasito e por estarem envolvidas nos mecanismos de resistência à fármacos.



### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a resistência/ suscetibilidade da cepa LE-PZQ bem como estudar o envolvimento de proteínas na resistência do *S. mansoni* ao PZQ.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Manter a cepa LE-PZQ e verificar a permanência da resistência da cepa ao PZQ;
- Avaliar o tratamento de camundongos infectados com *S. mansoni* cepa LE e LE-PZQ com PZQ em diferentes fases do ciclo de vida parasito no hospedeiro vertebrado;
- Observar o efeito *in vitro* do PZQ sobre a perda da cauda de cercárias de *S. mansoni* provenientes de isolado sensível ou resistente ao PZQ;
- Comparar os níveis de RNA para SMDR2 e SmMRP1 por qRT-PCR em vermes adultos de *S. mansoni* no isolado LE-PZQ em relação à cepa LE;
- Avaliar os níveis de RNA e proteínas SmMVP por qRT-PCR e Western Blot em vermes adultos da cepa LE-PZQ em comparação com a cepa LE.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tratamento com PZQ de camundongos infectados com *S. mansoni* cepa LE e LE-PZQ em diferentes fases do parasito no hospedeiro

Duzentos caramujos da espécie *B. glabrata*, linhagem Barreiro de Cima, mantidos rotineiramente pelo Moluscário do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, foram utilizados para manutenção da cepa LE-PZQ, cepa resistente ao PZQ obtida após sucessivos tratamentos de caramujos infectados com *S. mansoni* com o fármaco (Couto *et al.*, 2011). Os caramujos foram expostos, segundo a técnica descrita por Souza (1993), a 10 miracídios de *S. mansoni*, da cepa LE-PZQ. Após trinta dias os caramujos foram colocados em beckeres de 10mL contendo 2mL de água sem cloro e expostos à luz artificial por 60 minutos. Logo em seguida, foram examinados individualmente em lupa para verificar a presença ou não de cercárias. As cercárias obtidas foram utilizadas para infectar camundongos.

Para este experimento os camundongos foram tratados com PZQ na dosagem de 400mg/Kg após 2, 6, 16, 23 ou 45 dias depois de realizada a infecção (d.p.i).

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*, fêmeas, com mais ou menos dois meses de idade, pesando entre 18 a 22 gramas, nascidos e criados no Biotério do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR). Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (Licença nº LW 83/12).

Os camundongos foram inoculados no dorso, individualmente, por via subcutânea, segundo a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968) com 100 ( $\pm 10$ ) cercárias da cepa LE (suscetível ao PZQ e mantida rotineiramente no Moluscário do CPqRR) ou LE-PZQ. A infecção foi realizada utilizando uma seringa de aço-inox de 10mL com volume ajustável.

Os animais foram divididos em seis grupos de camundongos infectados com cepa LE e outros seis grupos infectados com LE-PZQ (grupos controle, 2, 6, 16, 23 e 45 d.p.i) cada grupo contendo 12 animais. Anterior aos dias dos tratamentos, conforme os tempos de infecção previamente mencionados, os animais foram pesados e foi realizado o cálculo para tratamento com PZQ na dosagem de 400mg/Kg. Os comprimidos de PZQ (Farmanguinhos - FIOCRUZ)

foram pesados e, posteriormente, realizado o cálculo do fator de correção (considerando-se apenas o princípio ativo, excluindo-se o excipiente). Com ajuda de pistilo, os comprimidos foram macerados e diluídos em água. O fármaco foi administrado com auxílio de seringa de gavagem por via oral, em dose única.

Trinta dias após o tratamento, os grupos tratados foram sacrificados, exceto os grupos controles, que foram sacrificados 45 dias após a infecção, por fratura cervical. A perfusão foi realizada seguindo-se a técnica descrita por Pellegrino & Siqueira (1956), resumidamente: o conteúdo visceral foi exposto; fígado e mesentério separados pela ligadura da veia renal e a veia porta foi seccionada. Com o auxílio de uma agulha, acoplada a um pipetador automático (Brewer), solução salina 0,85% heparinizada foi injetada na aorta descendente, permitindo, assim, a perfusão do sistema porta e das veias mesentéricas, recuperando-se os vermes presentes. Adicionalmente foi realizada a perfusão do fígado através da injeção de salina 0,85%, heparinizada, no hilo hepático. Os vermes foram coletados em placas de petri, contados e separados em macho, fêmea e acasalados com auxílio de lupa.

A porcentagem de redução da carga parasitária em cada grupo tratado foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ redução} = \frac{(\text{média de vermes no grupo controle} - \text{média de vermes no grupo tratado})}{\text{média de vermes no grupo controle}} \times 100$$

Testes estatísticos utilizando o número de vermes vivos recuperados em cada grupo foram utilizados para avaliar uma possível alteração na susceptibilidade ao PZQ da cepa LE-PZQ. Foram realizadas comparações entre a média de vermes vivos recuperados dos camundongos infectados com a cepa LE e o isolado LE-PZQ, tratados com a dosagem de 400mg/Kg de PZQ. No caso de dados paramétricos, o Teste *t* de Student foi usado e, no caso de dados não paramétricos, foi realizado o teste de Mann-Whitney. O teste de análise de variância simples (one way ANOVA), seguido do teste de Tukey foram utilizados para avaliar o efeito da dose de PZQ nos vermes da cepa LE e LE-PZQ, em comparação com os respectivos grupos controles quando os dados foram considerados paramétricos ou o teste de Kruskal-Wallis seguido das comparações múltiplas de Dunns para dados não paramétricos. Todas as

análises deste estudo foram realizadas utilizando-se os programas estatísticos MINITAB 13 e GraphPad Prism 5 e, para resultados significativos, foi considerado  $p \leq 0,05$ .

#### **4.2 Avaliação da manutenção da resistência da cepa LE-PZQ de *S. mansoni* ao PZQ**

A cada três passagens do ciclo de vida do *S. mansoni* a cepa LE-PZQ foi submetida a tratamento do hospedeiro vertebrado para avaliar se a mesma permanecia resistente ao PZQ. Os camundongos foram infectados com 25 ( $\pm 5$ ) cercárias da cepa LE ou LE-PZQ, tratados após 45 dias da infecção com a dose de 400mg/kg de PZQ via oral (gavagem) e perfundidos depois de 30 dias do tratamento conforme protocolo supracitado.

#### **4.3 Efeito do PZQ em cercárias de *S. mansoni* da cepa LE e LE-PZQ**

Cem caramujos infectados com cercárias LE ou LE-PZQ foram distribuídos em dois beakers de 400mL contendo 50mL de água sem cloro e expostos à luz por uma hora. Ao final da uma hora, os caramujos foram retirados restando apenas a solução com cercárias da cepa LE ou LE-PZQ. As cercárias foram contadas com auxílio de microscópio estereoscópio (Zeiss Stemi DV4) e o volume ajustado para obter 200 ( $\pm 10$ ) cercárias em 2mL de água sem cloro. As soluções foram distribuídas em cada poço das placas de seis poços e adicionado PZQ nas concentrações de 0,5mM, 1mM ou 2mM por poço. Após 1 ou 2 horas de exposição à droga, as cercárias foram avaliadas quanto à perda da cauda.

Para comparar os resultados obtidos foram utilizados testes estatísticos. Para avaliar as diferenças de perda da cauda entre as cepas LE e LE-PZQ expostas à mesma dosagem de PZQ foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para avaliar o efeito das diferentes concentrações da droga com seus respectivos controles o teste de Kruskal-Wallis seguido das comparações múltiplas de Dunns foi utilizado.

#### **4.4 Obtenção de parasitos para experimentos de qRT-PCR**

Camundongos infectados com  $100 \pm 10$  cercárias da cepa LE-PZQ ou LE foram perfundidos após 45 dias conforme descrito por Pellegrino e Siqueira (1956). Após a perfusão, os vermes foram lavados três vezes com meio RPMI – 1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) e separados em machos (20 vermes), fêmeas (20 vermes) ou machos e fêmeas colocados juntos em mesma quantidade (10 machos e 10 fêmeas), os quais nos referimos durante todo o trabalho como vermes em pares.

#### **4.5 Níveis de RNA dos genes SMDR2 e SmRP1**

##### **4.5.1 Extração de RNA**

Para extração do RNA total dos parasitos optou-se pelo emprego sequencial dos reagentes: TRIzol® Reagent (Invitrogen™); RNeasy® (Qiagen™); Turbo™ DNase (Ambion™), realizando modificações necessárias sobre os protocolos sugeridos por cada fabricante conforme descrito abaixo. É importante evidenciar que durante todas as etapas da extração e purificação de RNA os utensílios e superfícies empregados eram regularmente aspergidos com solução preservadora, inibidora da ação de RNases (RNaseZAP® RNase Decontamination Solution - Ambion™).

Os vermes recuperados foram resuspensores em 1mL do reagente TRIzol® e homogeneizado imediatamente por pipetagens sucessivas do volume obtido, seguido de agitação mecânica vigorosa em aparelho Virtis, usando tubos de vidro de parede espessa adequados e repetindo-se 3 ciclos de agitação por 15 segundos, seguida de descanso em banho de gelo por 1 minuto. O conteúdo foi transferido de volta a um microtubo de 2,0mL e mantido por 20 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. A este conteúdo foram adicionados 0,2mL de clorofórmio (Merck™), e o tubo foi vigorosamente agitado em Vortex por 10 segundos. O tubo foi novamente mantido em temperatura ambiente por 20 minutos e após este tempo, foi realizada centrifugação a  $12.000 \times g$  4°C por 10 minutos. A fase aquosa superior foi cuidadosamente recolhida com pipetador e

transferida para novo microtubo de 2,0mL. Foi adicionado igual volume (aproximadamente 0,5mL) de isopropanol (Merck™), seguido de suave homogeneização por inversão do tubo, que foi então incubado a -20°C por 1 hora para precipitação do RNA total. Transcorrido o tempo, foi realizada centrifugação a 10000 xg 4°C por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado por inversão do tubo. O precipitado foi lavado pela adição cuidadosa de 0,5mL de etanol (Merck™) 75% preparado em H<sub>2</sub>O tratada com dietil pirocarbonato - DEPC (Merck™), sendo o tubo novamente centrifugado a 10000 xg 4°C por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão do tubo. Esta lavagem foi repetida uma vez e ao final o tubo é mantido invertido sobre lenço de papel para secagem do precipitado e completa evaporação do etanol durante 10 minutos. O precipitado seco é então dissolvido em 100µL de H<sub>2</sub>O tratada com DEPC, sendo o tubo incubado em banho-maria à 50°C por 30 minutos para completar a dissolução.

A purificação do RNA total (*Cleanup*) foi realizada com sistema RNeasy®. Ao RNA total previamente extraído (aproximadamente 100µL) foram adicionados 350µL do tampão RLT, seguida de homogeneização com pipetador. Foram também adicionados 250µL de etanol (Merck Millipore), sendo o volume final (700µL) homogeneizado e transferido para a coluna RNase Mini Spin® já apoiado sobre um tubo de microcentrífuga de 2 ml (tubo coletor). A coluna é então fechada e o conjunto (coluna + tubo) submetido a centrifugação a 10000 xg 4°C por 15 segundos, descartando-se em seguida o filtrado e tomando cuidado de não deixar líquido no tubo coletor. A coluna foi então lavada pela adição de 500µL do tampão RPE, sendo então fechada a tampa e o conjunto novamente centrifugado a 10000 xg 4°C por 15 segundos, descartando-se o filtrado. A lavagem com tampão RPE foi repetida uma vez e a centrifugação ao final foi realizada por 2 minutos, para garantir a eliminação do etanol da coluna. A coluna foi então transferida para um novo microtubo livre de nucleases, sendo a ela adicionados 30µL de H<sub>2</sub>O DEPC. Com a tampa fechada, o conjunto foi submetido à centrifugação a 10000 xg 4°C por 1 minuto para eluição do RNA total purificado, livre principalmente de solventes orgânicos, em especial de fenol.

Para eliminação de traços de DNA genômico o RNA total purificado foi tratado com a enzima Turbo™ DNAse.

Ao tubo contendo o RNA total purificado foram adicionados: 0,35µL do tampão da enzima 10X concentrado; 0.5µL da enzima Turbo DNase® 2U/µL; 1,15 µL H<sub>2</sub>O DPEC. A mistura foi homogeneizada suavemente com auxílio de pipetador e o tubo foi incubado por 60 minutos à 37°C em bloco de aquecimento. A enzima foi finalmente inativada pela adição de 3µL de tampão STOP Buffer, seguida de homogeneização com auxílio de pipetador, incubação a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugação a 10000 xg 4°C por 90 segundos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado em um novo microtubo livre de nucleases, evitando-se ao máximo pipetar o precipitado branco formado. O tubo foi submetido a uma breve centrifugação (spin down), e foi separada uma alíquotas de 2µL para quantificação e análise em espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop® ND1000 Spectrophotometer – Nanodrop Technologies). Os tubos foram então imediatamente identificados e armazenados a -70°C até a utilização.

#### **4.5.2 Obtenção dos cDNAs**

Para síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem) e 1µg de RNA total.

Resumidamente, em um microtubo livre de nucleases foi adicionado 2µL de 10x RT Buffer, 0,8µL de 25x dNTP Mix (100mM), 2µL de 10x RT Random Primers (200nM), 1,0µL de Multiscribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL) e 4,2µL de água livre de nucleases a fim de completar 10µL por reação. Em seguida, foi adicionado 10µL de RNA total na concentração de 1µg. A preparação foi incubada em termociclador (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler) a 25°C por 10 minutos, seguidos de 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

#### **4.5.3 Iniciadores**

Os oligonucleotídeos iniciadores de SMDR2, SmMRP1 e o controle endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *S. mansoni*

foram sintetizados conforme sequências descritas em Messerli *et al.* (2009) e Kasinathan *et al.* (2010a), respectivamente (Quadro 1).

Os iniciadores de interesse foram confeccionados pela empresa Ludwing Biotec e validados por meio de PCR convencional, utilizando como amostras cDNA de vermes adultos de *S. mansoni* da cepa LE. Para a validação, vários protocolos foram testados e o melhor resultado foi obtido utilizando: 25ng/ $\mu$ l de cDNA, 500nMolar de iniciador e 2U de Taq Platinum polimerase em um volume final de reação de 15 $\mu$ l. O programa da PCR convencional que resultou em bandas específicas para os iniciadores de interesse foi: 95°C 3'; 35X (58°C 30" + 72°C 1' + 95°C 30"); 72°C 5'; 4°C  $\infty$ . Uma mistura do produto amplificado e corante blue-green foi corrido em gel de agarose 2% e observado em transluminador (ImageQuant™ LAS 4000).

**Quadro 1:** Descrição, sequência e tamanho dos *amplicons* dos iniciadores SMDR2, SmMRP1 e GAPDH utilizados para estudo da expressão gênica por PCR em tempo real.

Descrição	Sequência		<i>Amplicom</i>
SMDR2	F	5'TGCTCTAGTCGGTTCTAGTGGTTCTG-3'	258pb
	R	5'-GCATTAGCTTTGATGGCAGCTTCG-3'	
SmMRP1	F	5'-GGTCGTA CTGGTTCGGGTAA-3'	180pb
	R	5'-TGAAACGTAACGTGCCAGAG-3'	
SmGAPDH	F	5'-AATTATGGCGAGATGGCCGT-3'	65pb
	R	5'-TTTGGCAGCACCAGTGGAA-3'	



#### 4.5.4 Análise por qRT-PCR

Para análise da expressão de SMDR2 e SmMRP1 foi utilizada a técnica de PCR em tempo real.

Inicialmente foram construídas curvas padrão para determinar a eficiência relativa da amplificação dos alvos e do controle endógeno para cada *amplicom* a partir de uma amostra de cDNA de vermes adultos da cepa LE em cinco diluições seriadas. O ensaio foi realizado em triplicata e a concentração inicial de cDNA utilizada foi 50ng/μl e a de iniciadores foi de 2,5μM. Para avaliar a eficiência (E) da curva padrão foi utilizado o valor do *slope* através da fórmula  $E = [(10^{-1/slope}) - 1] \times 100$  e os oligos foram considerados apropriados quando apresentaram eficiência de reação entre 80 e 120%.

As reações foram realizadas utilizando o kit SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystem) em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems). O corante SYBR GREEN intercala na fita dupla de DNA permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. As reações foram preparadas contendo 0,8μL de cada iniciador (concentração final de 2,5μM), 10μL de SYBR® Green Master Mix 2X e 2μL de cDNA de uma solução com concentração de 25ng/μL e água nuclease *free* para completar 20μL para cada reação. Os componentes da reação foram homogeneizados e os 20 μL foram adicionados em cada poço da placa seladas com adesivo óptico (MicroAmp® Optical Adhesive Film – Applied Biosystems) ao final do procedimento.

Os ensaio de qRT-PCR foram realizados no aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg, e o anelamento/extensão a 60°C por 1 min.

As análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica (Ct comparativo ou ΔCt) que permite analisar diferenças nos níveis de expressão de um alvo específico em relação à outra amostra de referência (Schmittgem, 2008). Os níveis dos genes alvos foram normalizados pelos níveis do controle endógeno e uma amostra referência foi utilizada como base para resultados de expressão comparativa. Os resultados foram alcançados por uma fórmula aritmética que considera a quantidade do alvo,

normalizado pela referência endógena em relação ao calibrador dada por  $2^{-\Delta Ct}$  (Schmittgem, 2008).

Para a utilização deste método, foi necessário realizar um experimento de validação onde foi determinada inicialmente a eficiência de amplificação do gene alvo e do endógeno. Para isso, foram feitas curvas com diluições seriadas do cDNA para cada gene de interesse onde a eficiência da amplificação do alvo e a eficiência da amplificação do endógeno foram aproximadamente iguais. O ensaio foi realizado em triplicata com seis diluições seriadas de cDNA 1:2 de vermes acasalados da cepa LE. Para estimar a eficiência da amplificação foi utilizado o *slope* da curva padrão. Foram considerados apropriados quando apresentaram eficiência de reação acima de 80% e abaixo de 120%.

A curva de dissociação foi analisada para identificar a formação de produtos inespecíficos em cada reação no final de cada corrida. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido a diferença de temperatura de dissociação.

#### **4.6 Níveis de RNA do gene SmMVP na cepa LE-PZQ**

Os ensaios de análise da expressão de SmMVP foram realizados em colaboração com o grupo da Dra. Renata Guerra Sá do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto que caracterizaram a MVP no *S. mansoni*.

##### **4.6.1 Extração de RNA**

Para extração e purificação do RNA total foi utilizada uma combinação entre o reagente Trizol (Sigma) e clorofórmio e o Kit RNA total (SV total RNA Isolation System - Promega™), respectivamente.

Inicialmente foi realizado conforme protocolo descrito em 4.5.1 até o momento de recuperação da fase aquosa após adição de clorofórmio. Após isso, foi adicionado 600µL de etanol (Merck®) 95% e esta solução foi transferida para a coluna do kit SV total RNA Isolation System com tubo coletor

e homogeneizada com a pipeta e centrifugada por 2 minutos a 12000 xg. O etanol do tubo coletor foi descartado e adicionados 600µL de *RNA Wash Solution* que foram centrifugados novamente a 12000 xg por 2 minutos e o conteúdo do tubo coletor novamente descartado.

Para a remoção de eventual DNA genômico contaminante, o RNA total obtido na coluna foi tratado com 50µL de solução contendo DNase I (40µL de Yellow core Buffer, 5µL de MnCl<sub>2</sub> 0,09M e 5µL de DNase I - RQ1 DNase – Promega) por 25 minutos. Em seguida, adicionou-se 200µL de DNA Stop Solution e o conteúdo centrifugado a 12000 xg por 2 minutos. Foi adicionado 600µL de RNA Wash Solution e novamente centrifugado a 12000 xg por 2 minutos. O conteúdo presente no tubo coletor foi descartado e adicionou-se 200µL de RNA Wash Solution e outra vez centrifugado a 12000 xg por 2 minutos. A coluna foi transferida para um eppendorf e foi adicionado 30µL de água nuclease *free* presente no kit e centrifugado a 12000 xg por mais 2 minutos. As amostras foram quantificadas utilizando o aparelho NanoVue® (GE) e armazenadas imediatamente a -70°C até o seu uso.

#### **4.6.2 Síntese de cDNA**

A partir do RNA total extraído foi realizada a síntese de cDNA com o kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen®), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, a reação de síntese iniciou-se com a desnaturação, por 5 minutos a 65°C, de uma mistura contendo 2µL de RNA total (1µg), 2 µL de um mix de dNTPs (10 mM), 1 µL de iniciadores oligo (dT)<sub>20</sub> (50µM) e quantidade suficiente de água DEPC, para um volume final de 12µL. Após a desnaturação a mistura foi colocada em gelo e foi acrescentado 8µL de cDNA Synthesis Mix (4µl de tampão de reação (5x), 1 µL de DTT (100 mM), 1 µL de RNaseOUT (40 U/µL), 1 µL de água tratada com DEPC e 1 µL da enzima ThermoScript™ RT 15 U/µL). A mistura foi incubada por 50 minutos a 50°C. A reação foi finalizada por desnaturação a 80°C por 5 minutos. Quando a temperatura ambiente foi atingida, foi acrescentado 1 µL de RNase H 2U/µL e a reação foi novamente incubada a 37°C por 20 minutos para que houvesse a degradação de qualquer RNA remanescente. Após incubação, o cDNA

sintetizado foi então quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop) e utilizado nas reações de PCR em tempo real.

#### 4.6.3 Iniciadores

Os iniciadores de SmMVP foram idealizados utilizando o software GeneRunner® com base na sequência depositada no banco de dados GeneDB ([www.genedb.org/genedb/smansonii](http://www.genedb.org/genedb/smansonii)). Como controle endógeno foram utilizados os iniciadores de EIF4E, um fator de iniciação de translocação eucariótica 4E, de *S. mansoni* (Reis *et al.*, 2014).

**Quadro 2:** Descrição, sequência e tamanho dos *amplicons* dos iniciadores SmMVP e EIF4E utilizados para estudo da expressão gênica por PCR em tempo real.

SmMVP	F	5'-GAATGGGTGACGAGGAGTAC-3'	95pb
	R	5'-AGTCTGAGTGCCGAGTTTGG-3'	
EIF4E	F	5'-TGTTCCAACCACGGTCTCG-3'	85pb
	R	5'-TCGCCTTCCAATGCT TAGG-3'	

#### 4.6.4 Análise por qRT-PCR

Para análise da expressão de SmMVP foi utilizado protocolo idêntico ao descrito no item 4.5.4, exceto que os ensaios de qRT-PCR foram realizados no aparelho 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

#### **4.7 Análises estatísticas dos dados de qRT-PCR de SMDR2, SmMRP1 e SmMVP**

Os resultados obtidos por qRT-PCR foram analisados pela análise de variância simples (one-way ANOVA) seguido do pós teste de Tukey utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5. Foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ .

#### **4.8 Análise do nível de expressão da proteína SmMVP na cepa LE-PZQ**

##### **4.8.1 Obtenção do extrato de proteínas**

Para obtenção do extrato total protéico de vermes adultos da cepa LE e LE-PZQ, machos, fêmeas e vermes em pares foram submetidos à sonicação por três ciclos de 15 pulsos em banho de gelo em 500 $\mu$ L de tampão de extração (Tris-HCl 25mM pH 7,5; 1mM de DTT; 1mM de EDTA e 10 $\mu$ M dos inibidores de proteases TLCK, TPCK, NEM e PMSF). Em seguida, a suspensão resultante foi centrifugada a 10000 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo eppendorff e congelados em freezer -80°C para quantificação dos extratos. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de BCA utilizando o kit QuantiPro™ BCA Assay (Sigma Aldrich).

##### **4.8.2 Western Blot**

Cerca de 20 $\mu$ g do extrato protéico foram fracionados em gel de SDS-PAGE 10% conforme descrito por Laemmli, 1970. Resumidamente, as alíquotas do extrato total foram diluídas em tampão de amostra de proteínas (0,5 M de TRIS-HCl pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 10%; 2 $\beta$ -mercaptoethanol 5%; Azul de Bromofenol 1%) na proporção de 1:4 e fervidas por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas e a corrida realizada, inicialmente a 80V e depois a 120V, sendo a mesma acompanhada pelo azul de bromofenol presente no tampão de amostra. O gel foi corado com Comassie Blue por 2 horas à temperatura ambiente e, em seguida, descorado com solução

descolorante (metanol 4%, ácido acético 7,5%) até a visualização das bandas de interesse.

A transferência foi realizada em membrana PVDF, previamente tratadas com etanol por 10 minutos e lavada com água mili-Q por 5 minutos. A transferência foi realizada por 2 horas e 30 minutos a 25 V e a 4°C. Ao final da transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau e descorada com água para visualização das proteínas. Em seguida, a membrana foi bloqueada com solução bloqueadora de TBS 1X, Tween-20 0,05% e leite em pó desnatado 5% por 16 horas. A membrana foi lavada com TBS-T (TBS 1X e Tween-20 0,05%) e incubada com o anticorpo primário anti-MVP humana na diluição de 1:500 por 4 horas e novamente lavada com TBS-T. Em seguida, foi incubada por mais 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:2500. Depois de decorrido tempo de 1 hora, a membrana foi novamente lavada com TBS-T e revelada utilizando os reagentes NBT/BCIP para detecção de Western Blot (Amresco) até visualização das bandas. Os níveis de SmMVP foram obtidos por análise densitométrica das bandas usando o *software* Quantity One® (Bio-Rad).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Tratamento com PZQ de camundongos infectados com *S. mansoni* cepa LE e LE-PZQ em diferentes fases do parasito no hospedeiro

Para avaliar a ação do PZQ em diferentes dias após o tratamento sobre vermes LE-PZQ no hospedeiro vertebrado, camundongos foram tratados com 400mg/Kg de PZQ após 2, 6, 16, 23 ou 45 dias após a infecção.

Foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os grupos controles LE e LE-PZQ. Também não houve diferença estatística quando comparados os grupos tratados com seus respectivos controles, exceto quando foram tratados após 45 dias da infecção. Neste caso, na cepa LE foi possível recuperar uma média de 2,11 ( $\pm 1,9$ ) vermes demonstrando redução de 93,5% da carga parasitária enquanto que na LE-PZQ a média de vermes recuperados foi de 11,78 ( $\pm 4,2$ ) com uma redução de 66,5% (Tabela 1, Gráfico 1).

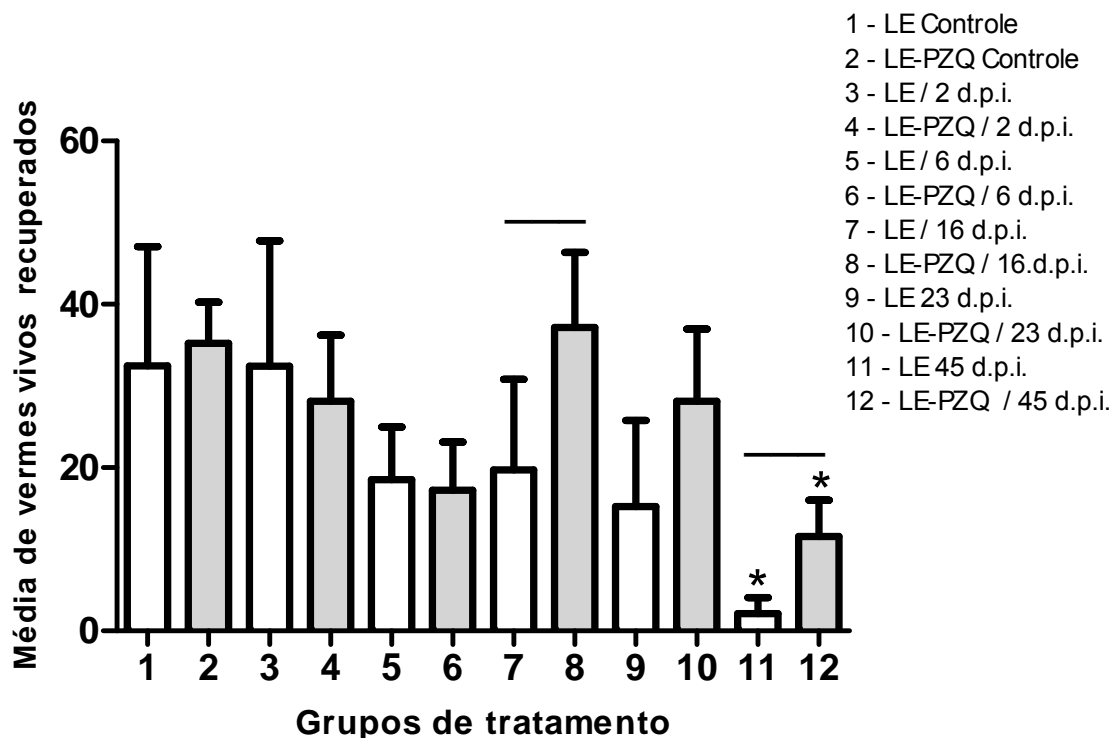
Embora não tenha sido possível observar diferenças entre os dias de tratamento na cepa LE e LE-PZQ com seus respectivos controles, quando comparados LE e LE-PZQ tratados nos mesmos dias, observamos diferença significativa na quantidade de vermes recuperados após 16 e 23 da realização da infecção. Nestes casos, LE apresentou médias de vermes significativamente menores, 19,7 ( $\pm 11,2$ ) com redução 39,3% e 15,22 ( $\pm 10,5$ ) com redução de 53,1% da carga parasitária para 16 e 23 d.p.i, respectivamente, quando comparados com os mesmos dias de tratamento na cepa LE-PZQ, onde a média de vermes recuperados foi de 31,73 ( $\pm 7,0$ ) com redução de 10% da carga parasitária em relação ao controle e 23,90 ( $\pm 5,8$ ) com redução de 31,42% para os dias 16 e 23 após a infecção, respectivamente (Tabela 1, Gráfico 1).

**Tabela 1:** Média de vermes recuperados, percentual de redução da carga parasitária e relação LE-PZQ/LE após tratamento de camundongos (n=12) infectados com a cepa LE ou LE-PZQ de *S. mansoni* com 400mg/kg de PZQ em diferentes dias após a infecção (d.p.i.).

Grupo	Média de vermes vivos ± DP	% de redução da carga parasitária†	Relação LE-PZQ/ LE ‡
LE/ Controle	32,45 ± 14,6	-	
LE-PZQ/Controle	35,22 ± 5,0	-	
LE/ 2 d.p.i.	29,40 ± 10,1	9,4%	0,7x
LE-PZQ/ 2 d.p.i.	28,11 ± 8,1	20,2%	
LE/ 6 d.p.i.	18,50 ± 6,5	42,8%	1x
LE-PZQ/ 6 d.p.i.	19,20 ± 5,0	51,2%	
LE/ 16 d.p.i.	19,70 ± 11,2	39,3%	1,6x
LE-PZQ/ 16 d.p.i.	31,73 ± 7,0 #	10,0%	
LE/ 23 d.p.i.	15,22 ± 10,5	53,1%	1,6x
LE-PZQ/ 23 d.p.i.	23,90 ± 5,8#	31,42%	
LE/ 45 d.p.i.	2,11 ± 1,9*	93,5%	7,3x
LE-PZQ/ 45 d.p.i.	15,33 ± 5,1* #	56,5%	

† percentual encontrado considerando a média de vermes vivos nos animais tratados em relação ao respectivo controle. ‡ relação encontrada pela divisão da média de vermes vivos da cepa LE-PZQ pela média de vermes vivos da cepa LE. DP = desvio padrão. \* P < 0,05 quando comparado ao seu grupo controle e # P < 0,05 quando comparado ao mesmo dia de tratamento entre a cepa LE e LE-PZQ.





**Gráfico 1:** Número total de vermes vivos recuperados por animal nos grupos controles e experimentais das cepas LE e LE-PZQ com seus respectivos desvios padrões. Os grupos foram tratados com PZQ na dosagem de 400mg/Kg após 2, 6, 16, 23 e 45 dias de realizada a infecção com *S. mansoni*. \* $p < 0,05$  em relação aos seus respectivos grupos controles. —  $p < 0,05$  quando comparadas as cepa LE e LE-PZQ submetidas ao tratamento nos mesmos dias.

## 5.2 Manutenção e avaliação da resistência da cepa LE-PZQ ao PZQ

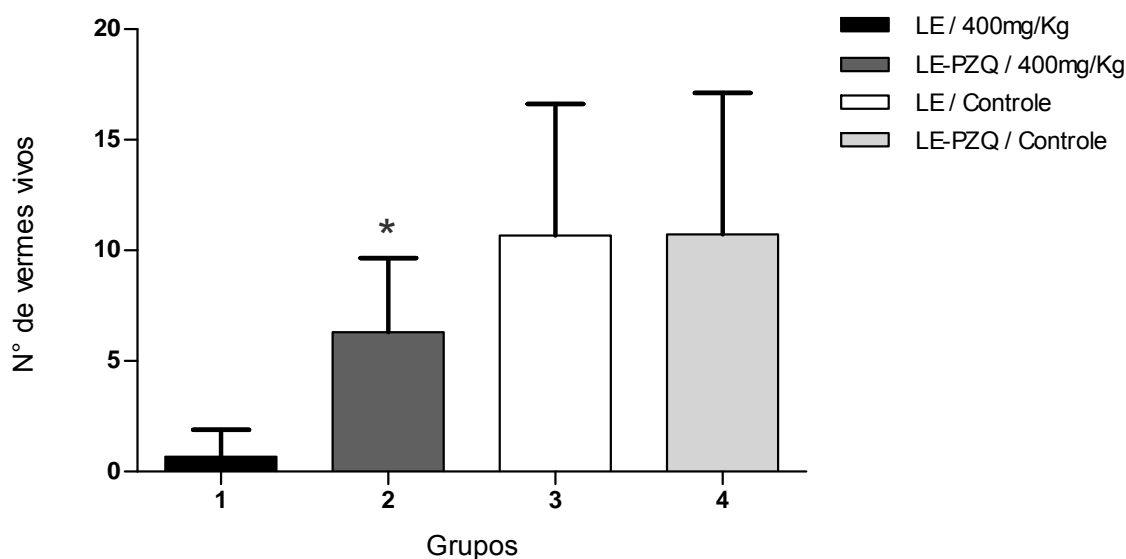
A cepa LE-PZQ continua sendo testada a fim de verificar a manutenção da resistência ao PZQ. Os experimentos vêm sendo realizados a cada três passagens da cepa pelo ciclo completo do *S. mansoni* (infecção de camundongos e caramujos). Diante da semelhança entre os resultados encontrados, optou-se por apresentar os dados do último experimento realizado. A média de vermes recuperados nos grupos LE e LE-PZQ perfundidos após 45 dias da infecção e sem ter recebido tratamento foi de 10,67 ( $\pm 5.9$ ) e 10,73 ( $\pm 6.4$ ), respectivamente, não havendo diferença significativa entre os mesmo. A média de vermes recuperados no grupo LE tratado com 400mg/Kg de PZQ e perfundidos após 30 dias foi de 0,67 ( $\pm 1,2$ ), apresentando uma redução de 93,7% da carga parasitária, enquanto que no grupo LE-PZQ a média de vermes recuperados foi de 5.90 ( $\pm 3.7$ ) com redução

de 45,1%, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Tabela 2, Gráfico 2). Os resultados da avaliação da resistência da cepa LE-PZQ demonstraram que a cepa continua resistente ao PZQ

**Tabela 2:** Média de vermes recuperados e percentual de redução da carga parasitária após tratamento de camundongos infectados com a cepa LE ou LE-PZQ de *S. mansoni* com 400mg/kg de PZQ

Grupo	Média de vermes vivos $\pm$ DP	% de redução da carga parasitária†
LE/ Controle	10,67 $\pm$ 5,9	-
LE-PZQ/Controle	10,73 $\pm$ 6,4	-
LE/ 400mg/Kg	0,67 $\pm$ 1,2	93,7
LE-PZQ/ 400mg/Kg	5,90 $\pm$ 3,7*	45,1

† percentual encontrado considerando a média de vermes vivos nos animais tratados em relação ao respectivo controle. DP = desvio padrão. \* P< 0,05.



**Gráfico 2:** Número total de vermes vivos recuperados por animal nos grupos controles e experimentais das cepas LE e LE-PZQ com seus respectivos desvios padrões. \*p<0,05.

Vale ressaltar que foram realizados dois experimentos com resultados semelhantes. Contudo, no primeiro deles houve uma mortalidade animal maior do que o esperado devido a fatores não relacionados com o desenho experimental, por isso, optou-se por apresentar os resultados do último experimento realizado.

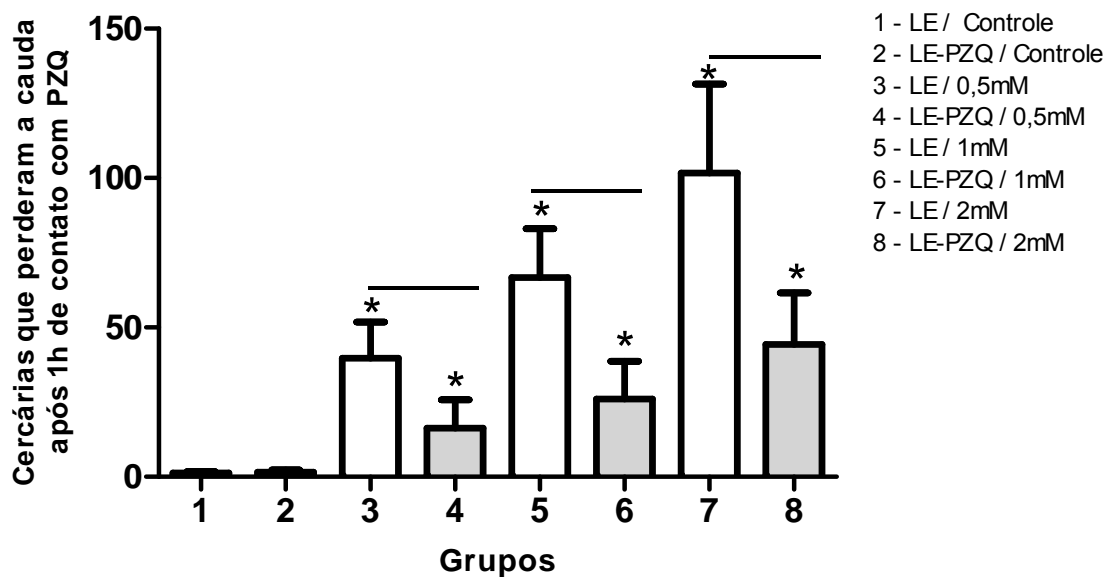
### 5.3 Efeito do PZQ em cercárias de *S. mansoni* da cepa LE e LE-PZQ

Foram realizados seis experimentos independentes a fim de avaliar quantas cercárias perderiam a cauda após a exposição com PZQ nas concentrações de 0,5mM, 1mM e 2mM por 1 e 2 horas. Foi possível observar que após exposição por 1 ou 2 horas, mesmo na menor concentração, as cercárias das duas cepas apresentaram uma perda da cauda significativa em relação ao seus respectivos grupos controles. Contudo, quando a comparação foi realizada entre as cepas LE e LE-PZQ, foi possível observar que a cepa sensível ao PZQ apresentou uma perda significativa da cauda em relação à cepa resistente em todas as concentrações (Tabela 3, Gráficos 3 e 4).

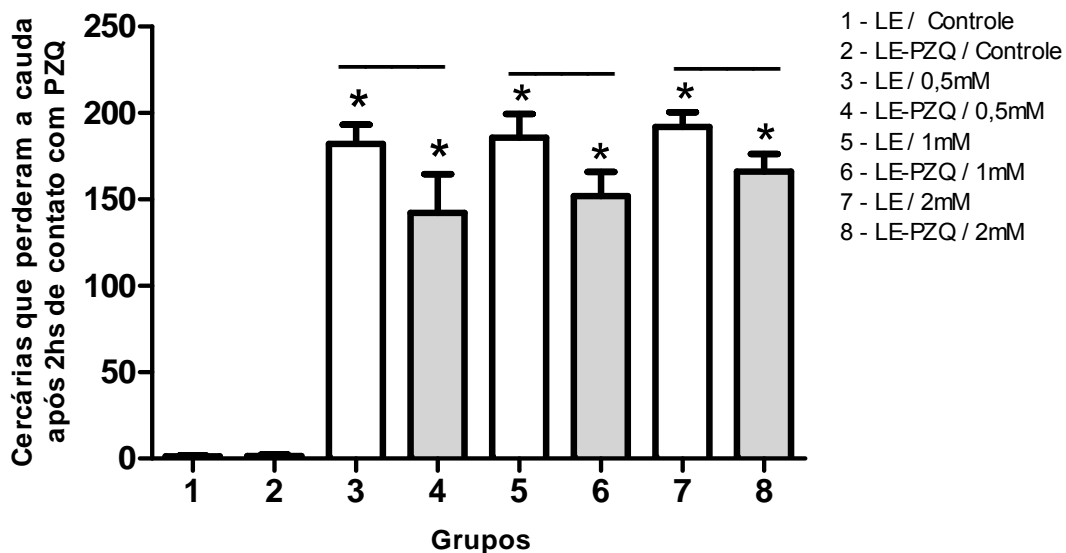
**Tabela 3:** Média e percentual de cercárias da cepa LE e LE-PZQ de *S. mansoni* que perderam a cauda após exposição por 1 e 2 horas com o PZQ nas concentrações de 0,5mM, 1mM e 2mM.

Grupo e concentração de PZQ	% de cercárias		% de cercárias	
	Média de cercárias que perderam a cauda ± DP após 1h	que perderam a cauda† após 1h	Média de cercárias que perderam a cauda ± DP após 2hs	que perderam a cauda† após 2hs
LE/ Controle	1,33±0,5	0,7%	1,33±0,5	0,7%
LE-PZQ/Controle	1,50±0,8	0,7%	1,50±0,8	0,7%
LE/ 0,5Mm	39,67±12,1* **	19,8%	182,2±11,0*	91,1%
LE-PZQ/ 0,5mM	16,33±9,5*	8,2%	142,2±22,5*	71,1%
LE/ 1mM	66,67±16,4* **	33,3%	185,7±13,75*	92,9%
LE-PZQ/ 1mM	26,00±12,6*	13%	152,0±13,87*	76%
LE/ 2mM	101,70±29,7* **	50,8%	192,0 ±8,4*	96%
LE-PZQ/ 2mM	44,33±17,27*	22,2%	166,2±10,3*	83,1%

† percentual encontrado considerando a média de cercárias que perderam a cauda em relação a quantidade inicial de cercárias com cauda de cada poço. DP = desvio padrão. \* P< 0,05 em comparação com o seu grupo controle. \*\* P< 0,05 em comparação entre as cepas LE e LE-PZQ nas mesmas condições.



**Gráfico 3:** Média mais o desvio padrão da quantidade de cercárias que perderam a cauda após exposição ao PZQ por 1 hora nas concentrações de 0,5mM, 1mM e 2mM. \* $p < 0,05$  quando comparado cada concentração de cada grupo em relação aos respectivos grupos controle. ——— indicam  $p < 0,05$  quando comparadas as cepa LE e LE-PZQ submetidas às mesmas concentrações do PZQ.

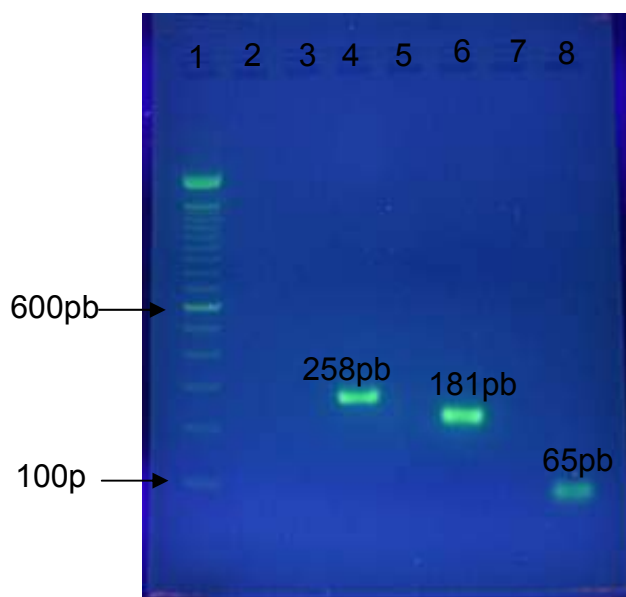


**Gráfico 4:** Média mais o desvio padrão da quantidade de cercárias que perderam a cauda após exposição ao PZQ por 2 horas nas concentrações de 0,5mM, 1mM e 2mM. \* $p < 0,05$  quando comparado cada concentração de cada grupo em relação aos respectivos grupos controle. ———  $p < 0,05$  quando comparadas as cepa LE e LE-PZQ submetidas às mesmas concentrações do PZQ.

## 5.4 Análise da expressão diferencial de SMDR2 e SmMRP1 na cepa LE-PZQ

### 5.4.1 Validação dos iniciadores

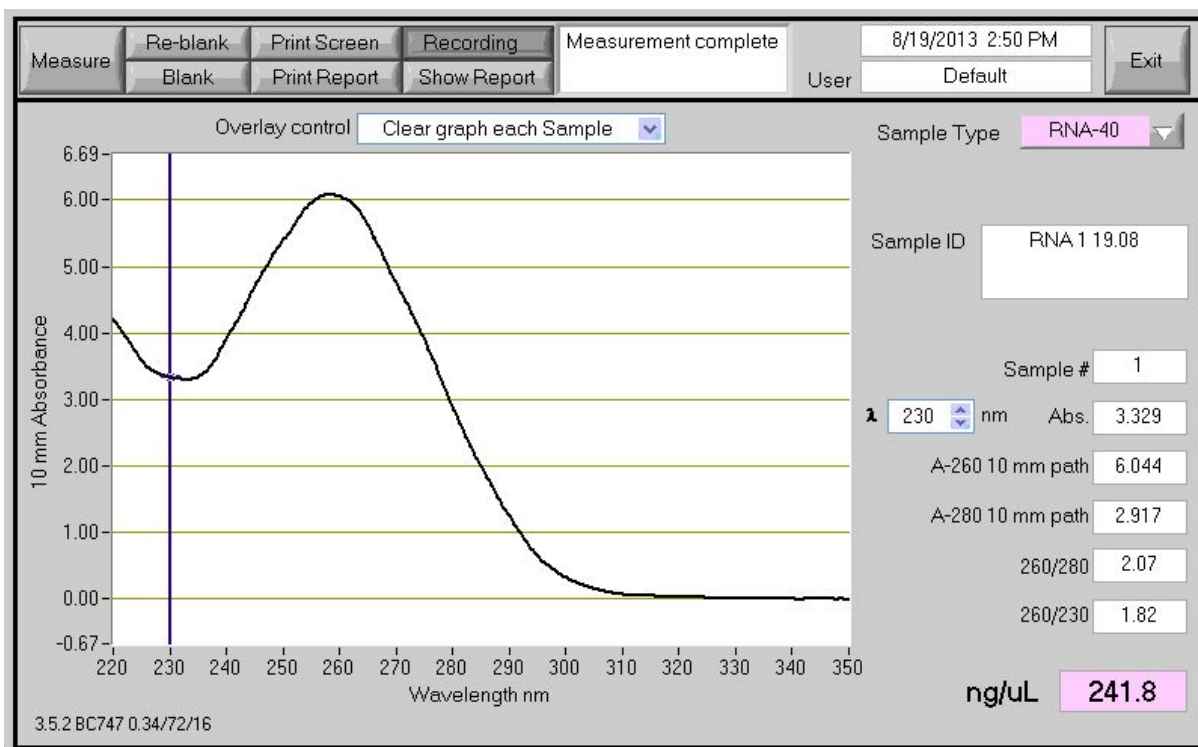
Os iniciadores de interesse foram validados por meio de PCR convencional, utilizando como amostras cDNA de vermes adultos de *S. mansoni* da cepa LE. O programa da PCR usado resultou em bandas específicas para os iniciadores de interesse. Conforme visualizado por transluminador, a PCR gerou produtos de amplificação (banda única) com tamanho semelhantes aos esperados, confirmando a especificidade dos iniciadores. Para SMDR2 – 258pb; SmMRP1 – 181pb e GAPDH – 65pb, como pode ser visualizado na Figura 2.



**Figura 2:** Gel de agarose 2%. Resultado da validação dos iniciadores SMDR2, SmMRP1 e GAPDH. Canaletas 1: Padrão de peso molecular (100pb DNA Ladder Invitrogen); 3: SMDR2 negativo; 4: SMDR2 positivo (cDNA verme adulto) banda de aproximadamente 250pb representativa do produto esperado pela amplificação com o iniciador SMDR2; 5: SmMRP1 negativo; 6: SmMRP1 positivo (cDNA de verme adulto) banda de aproximadamente 200pb; 7: GAPDH negativo; 8: GAPDH positivo (cDNA de verme adulto) banda de aproximadamente 70pb.

#### 5.4.2 Obtenção das amostras para PCR em tempo real

A análise do RNA total foi realizada pelo NanoDrop® (Figura 3) e forneceu não só a quantidade de RNA em cada amostra, como também a qualidade da amostra por meio dos parâmetros de absorbância 260/280 (valor ideal: entre 1.8-2.1) e absorbância 260/230 (valor ideal: entre 1.8-2.1).



**Figura 3:** Exemplo da quantificação obtida através do NanoDrop de uma das amostras consideradas de boa qualidade para uso neste trabalho.

#### 5.4.3 Níveis de RNA dos genes SMDR2 e SmRP1

Para avaliar os níveis de expressão de RNA de SMDR2 e SmMRP1 foram realizadas PCR em Tempo Real. Os ensaios foram obtidos de triplicatas técnicas e biológicas para vermes machos, fêmeas e vermes em pares. Ao final de cada corrida, foi feita a análise da curva de dissociação dos *amplicons* para identificar a formação de produtos inespecíficos.

As curvas padrões apresentaram boa linearidade para os genes analisados ( $r^2=0.999$  para SMDR2,  $r^2=0.998$  para SmMRP1 e  $r^2=0.998$  para GAPDH). Além disso, o *slope* indica a eficiência de amplificação da PCR (um

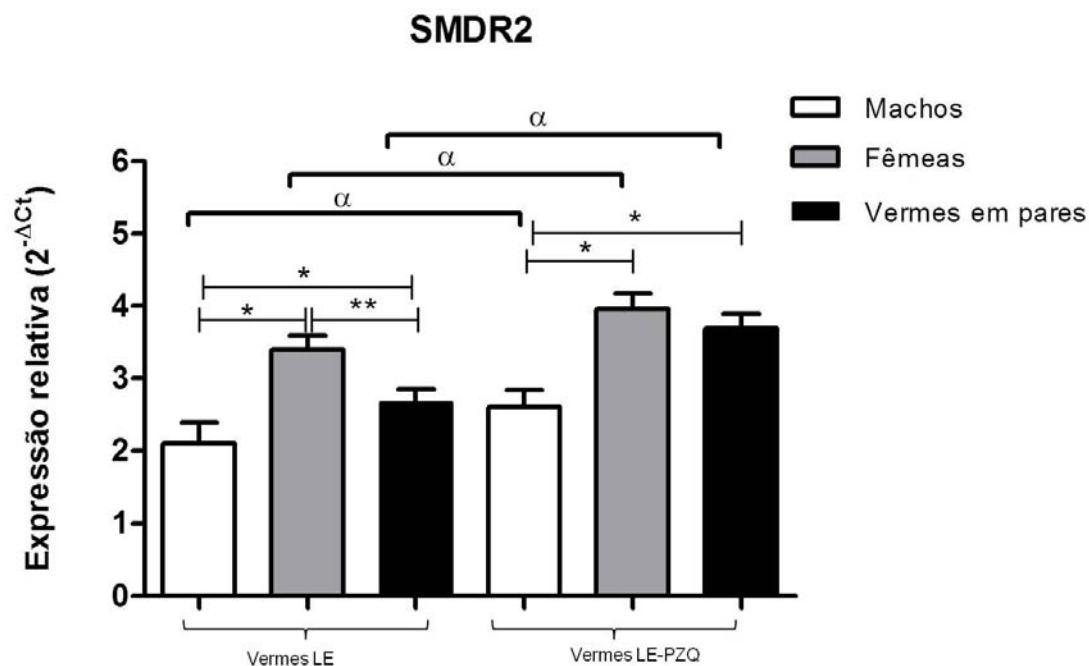
*slope* próximo a -3,32 indica uma eficiência de 100%). Os dados obtidos de *slope* foram de -3,50, -3,53 e -3,45 para os genes SMDR2, SmMRP1 e GAPDH, respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4:** Eficiência de amplificação dos pares de iniciadores SMDR2, SmMRP1 e GAPDH utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Genes	<i>Slope</i>	Intercepto	R <sup>2</sup> *	Eficiência (%)**
SMDR2	-3,503098	33,5779	0,999221	93
SmMRP1	-3,534521	33,9236	0,998634	91
GAPDH	-3,456544	31,5022	0,998365	94

\* R<sup>2</sup>, coeficiente de correlação do *slope* da curva padrão. \*\* Eficiência calculada de acordo com a fórmula  $E = [(10^{-1/slope}) - 1] \times 100$ .

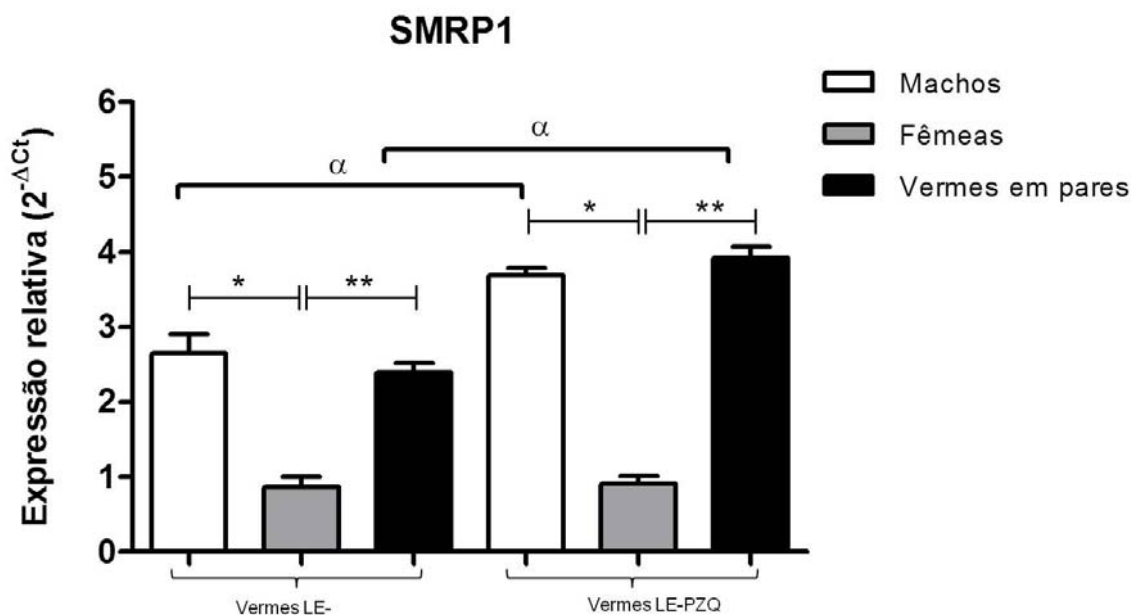
Os resultados apresentados no Gráfico 5 demonstram os níveis de expressão para SMDR2. Na cepa LE é possível observar que estes níveis são significativamente maiores em vermes fêmeas quando comparados com machos ou com vermes em pares, que também possuem níveis estatisticamente maiores em relação aos vermes machos. Em relação à cepa LE-PZQ, SMDR2 está estatisticamente mais expressa em fêmeas quando comparados apenas com machos e não há diferença quando comparados com vermes em pares. Esses, quando comparados com vermes machos, também apresentaram maiores níveis de SMDR2. Quando comparados os níveis de expressão entre as cepas suscetível e resistente, é possível perceber que SMDR2 está mais expresso na cepa LE-PZQ do que na cepa LE tanto nos vermes machos quanto em fêmeas e vermes em pares.



**Gráfico 5:** Níveis de expressão de SMDR2 na cepa LE-PZQ e LE de machos, fêmeas e de vermes em pares. Os níveis de expressão foram calculados de acordo com o método de quantificação relativa  $2^{-\Delta Ct}$  e usando como controle endógeno o gene GAPDH. \*estatisticamente diferente de fêmeas, \*\*estatisticamente diferente de machos,  $\alpha$  estatisticamente diferente da cepa LE.  $p \leq 0,05$ .

No Gráfico 6 são apresentadas as análises dos níveis de expressão de SmMRP1. Os resultados indicam um nível de expressão significativamente maior em vermes machos quando comparados com fêmeas e vermes em pares tanto na cepa LE quanto na LE-PZQ. Contudo, não há diferença entre machos e machos e fêmeas juntos. Também não há diferença significativa entre machos e vermes em pares. Na comparação realizada entre a cepa LE-PZQ e LE, foi possível observar que a cepa resistente apresenta níveis estatisticamente maiores de SmMRP1 em machos e vermes em pares em comparação com os níveis obtidos na cepa sensível. Esta diferença não é significativa entre fêmeas das duas cepas.





**Gráfico 6:** Níveis de expressão de SmMRP1 na cepa LE-PZQ e LE de machos, fêmeas e de vermes em pares. Os níveis de expressão foram calculados de acordo com o método de quantificação relativa  $2^{-\Delta Ct}$  e usando como controle endógeno o gene GAPDH. \*estatisticamente diferente de fêmeas, \*\*estatisticamente diferente de machos,  $\alpha$  estatisticamente diferente da cepa LE. ( $p \leq 0,05$ )

## 5.5 Análise do nível de expressão de SmMVP na cepa LE-PZQ

### 5.5.1 Níveis de RNA dos gene SmMVP

Para avaliar os níveis de expressão de RNA de SmMVP foram realizados ensaios em triplicatas técnicas e biológicas para vermes machos, fêmeas e vermes em pares conforme já descrito para SMDR2 e SmMRP1. Estes dados foram obtidos em colaboração com o grupo da Dr. Roberta Guerra Sá que já padronizaram a metodologia e obtiveram os parâmetros adequados para realização da qRT-PCR. Nossa colaboração foi realizada para avaliar os níveis de SmMVP na cepa LE-PZQ. Por isso, utilizamos o controle endógeno já utilizado pelo grupo em outros ensaios.

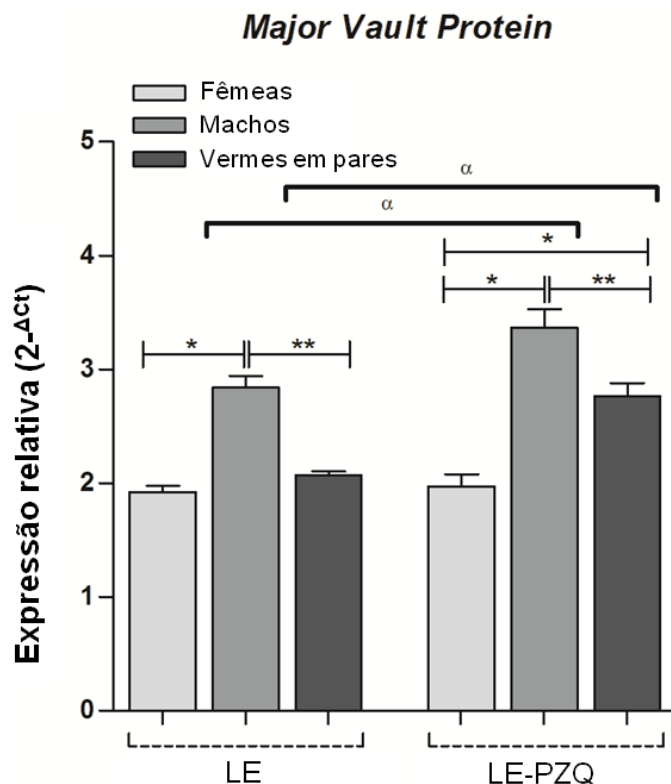
As curvas padrões apresentaram boa linearidade para os genes analisados ( $r^2=0,961$  para SmMVP,  $r^2= 0,992$  para EIF4E). Os dados obtidos de *slope* foram de -3,23 e -3,42 para os genes SmVP e EIF4E, respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5:** Eficiência de amplificação dos pares de iniciadores SmMVP e EIF4E utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Genes	Slope	Intercepto	R <sup>2</sup>	Eficiência (%)
SmMVP	-3,238318	33,441608	0,961142	103
EIF4E	-3,428734	32,148592	0,992340	96

\* R<sup>2</sup>, coeficiente de correlação do *slope* da curva padrão. \*\* Eficiência calculada de acordo com a fórmula  $E = [(10^{-1/slope}) - 1] \times 100$ .

Os resultados apresentados no Gráfico 7 demonstram os níveis de expressão para SmMVP. Na cepa LE é possível observar que estes níveis são significativamente maiores em vermes machos quando comparados apenas com fêmeas ou com vermes em pares. Em relação à cepa LE-PZQ, SmMVP está estatisticamente mais expressa em machos quando comparados com fêmeas e com vermes em pares e também mais expresso em vermes em pares comparados com vermes fêmeas. Quando comparados os níveis de expressão entre as cepas suscetível e resistente, é possível perceber que SmMVP está mais expresso na cepa LE-PZQ do que na cepa LE tanto nos vermes machos quanto vermes em pares. Não há diferença estatística em relação às fêmeas.



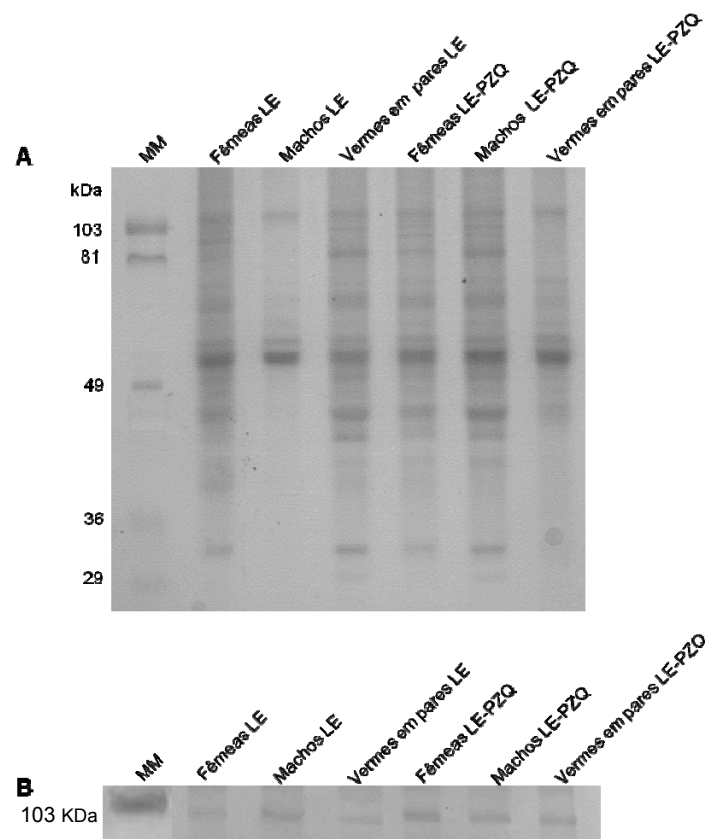
**Gráfico 7:** Níveis de expressão de SmMVP na cepa LE-PZQ e LE de machos, fêmeas e de vermes em pares. Os níveis de expressão foram calculados de acordo com o método de quantificação relativa  $2^{-\Delta Ct}$  e usando como controle endógeno o gene EIF4E. \*estatisticamente diferente de fêmeas, \*\*estatisticamente diferente de vermes em pares,  $\alpha$  estatisticamente diferente da cepa LE. ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.5.2 Western Blot

Para avaliar os níveis protéicos de SmMVP na cepa LE-PZQ e na cepa LE foram realizados experimentos de Western Blot utilizando como anticorpo primário anti-MVP humano.

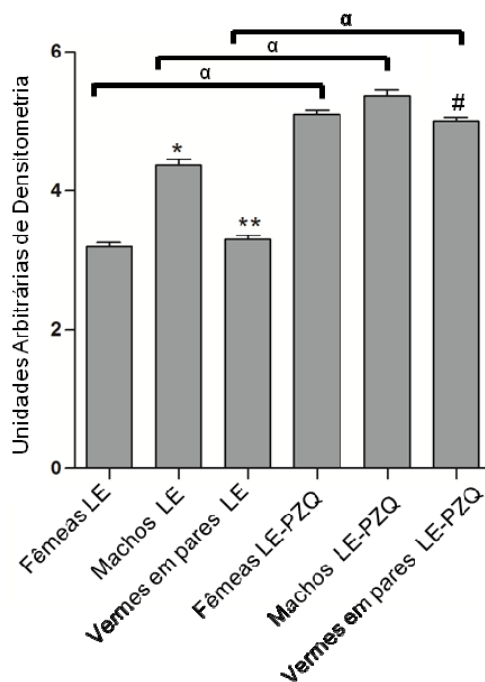
O perfil eletroforético obtido demonstrou presença de proteínas com massa molecular variando de 30 a 103 kDa (Figura 4A). Os resultados obtidos após a revelação da membrana mostram que o anticorpo anti-MVP reconheceu um polipeptídeo de aproximadamente 100 kDa, o que corresponde ao tamanho esperado para a proteína SmMVP (Figura 4B). As análises densitométricas foram realizadas após captura das imagens e os cálculos realizados utilizando o programa Quantity One<sup>®</sup> (Bio-Rad), que é capaz de quantificar a intensidade das bandas não necessitando de utilizar um controle normatizador. Foi possível

observar quantidades estatisticamente maiores de SmMVP em machos quando comparados com fêmeas e vermes em pares da cepa LE. Contudo, na cepa LE-PZQ observa-se níveis significativamente maiores apenas em machos quando comparados com vermes em pares. Quando as cepas LE e LE-PZQ foram comparadas, observou-se níveis de expressão estatisticamente maiores da proteína na cepa resistente em machos, fêmeas e vermes em pares (Gráfico 8).



**Figura 4:** Nível de expressão da proteína SmMVP na cepa LE e LE-PZQ. (A) Perfil eletroforético das proteínas totais machos, fêmeas e vermes em pares da cepa LE e LE-PZQ. Proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE 10% e coradas com azul de Coomassie. (B) Análise de Western Blot utilizando o anticorpo anti-MVP. MM representa o padrão de peso molecular utilizado.

### Major Vault Protein



**Gráfico 8:** Análise densitométrica dos níveis de expressão da proteína SmMVP na cepa LE-PZQ e LE de machos, fêmeas e de vermes em pares. As análises foram realizadas utilizando o software Quantity One® (Biorad). \* diferente de fêmeas LE, \*\*diferente de machos LE, #diferente de fêmeas LE-PZQ, — diferença entre LE e LE-PZQ. ( $p \leq 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

As falhas no tratamento observadas em uma doença aparecem quando fatores inerentes ao hospedeiro ou ao parasito influenciam a resposta à terapêutica. Entre esses fatores podem ser citados: absorção e metabolização do fármaco, idade, sexo e sistema imune do hospedeiro, associações mórbidas, diferença em relação ao parasito e entre cepas, estágio evolutivo, equilíbrio entre vermes machos e fêmeas ou suscetibilidade diferente ao fármaco (Katz 2005).

O termo resistência está relacionado com a pressão seletiva de um fármaco sobre um organismo. Coles (2002) define resistência no *Schistosoma* quando um isolado previamente submetido à ação de uma droga tem uma taxa de cura significativamente mais baixa do que a maioria dos isolados sensíveis. Por outro lado, a tolerância aos fármacos é um assunto recorrente nas discussões que envolvem resistência a determinado fármaco. A tolerância ocorre quando um parasito apresenta diminuição na resposta à terapêutica específica sem nunca ter sido exposto ao contato com o fármaco (Coles *et al.* 1986). Dentre os principais fatores que podem levar ao desenvolvimento de resistência estão o tratamentos em intervalos de tempo prolongados, mudanças da dosagem do fármaco utilizada por um programa de controle e resultando em tratamentos com doses subcurativas (Silva & Andrade 1997).

Nosso grupo foi capaz de induzir resistência em uma cepa de *S. mansoni* sensível ao PZQ (LE) utilizando sucessivos tratamentos com doses sub curativas do fármaco. Uma vez que o genoma do parasito é o mesmo, independente do estágio que este se encontra, e o que irá variar é a expressão dos genes, a grande vantagem desta abordagem se fundamenta na pressão seletiva por ação do fármaco sobre milhares de formas evolutivas que ocorrem nos caramujos em nítido contraste com o que acontece com a indução de resistência em camundongos que só alberga poucos vermes.

Por outro lado, a dificuldade de manutenção de uma cepa resistente desenvolvida em laboratório é um problema bem conhecido pela comunidade científica que estuda os mecanismos de resistência a fármacos, uma vez que em alguns casos, após várias passagens do ciclo, geralmente, a cepa perde a resistência. Diante disso, um dos objetivos do nosso trabalho foi avaliar a

permanência da resistência após fechamentos do ciclo. Para isso, a cepa LE-PZQ foi submetida a tratamento com PZQ a cada três passagens do parasito pelo hospedeiro vertebrado e invertebrado. Nossos resultados demonstraram que, até o momento, a cepa vem mantendo uma porcentagem de redução da carga parasitária entre 40 e 50% em relação ao controle não tratado. Enquanto que na cepa suscetível usada nas comparações, a redução da carga parasitária é em torno de 90%. Neste caso, a permanência da resistência pode estar relacionada ao método de seleção da nossa cepa que ocorre nas fases de esporocistos e cercárias (no hospedeiro invertebrado) e não em vermes imaturos/ adultos (no hospedeiro vertebrado). A cepa continuará sendo testada a fim de garantir que a mesma continua resistente ao PZQ e, caso observado que há uma redução ou perda da resistência, será submetida à nova pressão quimioterápica, uma vez que o método de indução utilizando hospedeiro invertebrado é fácil, rápido e possui baixo custo.

O praziquantel é o fármaco eleito pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento das esquistossomoses, por apresentar atividade contra todas as espécies de *Schistosoma* que afetam o homem (Gönnert & Andrews 1977, Andrews *et al.* 1983), apresentar alto percentual de cura, ser administrado oralmente em dose única, ser de baixo custo, possuir baixa toxicidade e não apresentar risco genotóxico. Contudo, é pouco efetivo contra vermes juvenis de 1 a 4 semanas, mas é efetivo contra parasitos de cinco semanas ou mais (Gönnert & Andrews, 1977). Estudos *in vitro* realizados por Pica-Mattocchia & Cioli (2004) demonstraram que vermes de *S. mansoni* aos 28 dias foram claramente refratários a altas concentrações de PZQ.

Durante o desenvolvimento de esquistossômulo até verme adulto, o *S. mansoni* passa por processos evolutivos, onde há alterações morfológicas e grande crescimento corporal. Faust *et al.* (1934) utilizando infecção experimental em ratos, coelhos e macacos observou que este desenvolvimento ocorre de forma assincrônica. Estudo realizado por Vimeiro *et al.* (2013) e semelhante ao de Barbosa *et al.* (1978) demonstraram este assincronismo no desenvolvimento do parasito em período pré-patente e criaram um padrão morfológico para estudar a evolução dos parasitos no sistema porta hepático denominado schistograma. Após a penetração da cercária, esta passa por mudanças bioquímicas e fisiológicas, iniciando o processo de transformação

em esquistossômulos (Barbosa *et al.*, 1978; Rollinson *et al.*, 1987). Estes permanecerão na pele por 72 horas para depois penetrarem nos vasos sanguíneos e migrarem passivamente até o coração em quatro dias, serem bombeados aos pulmões e retornando novamente ao coração onde serão lançados na circulação sistêmica (Lenzi *et al.*, 2008). A partir do oitavo dia é possível encontrar esquistossômulos no sistema porta hepático (Rollinson *et al.*, 1987). A partir da terceira semana inicia a migração do parasito dos vasos hepáticos para as veias mesentéricas. Quatro semanas após a infecção, a maioria dos vermes encontra-se maduros e prontos para se acasalarem.

Neste trabalho, avaliamos o comportamento da cepa LE-PZQ submetida ao tratamento com 400mg/Kg de PZQ após 2, 6, 16, 23 e 45 dias após a infecção de *S. mansoni* a fim de avaliar a ocorrência de alguma diferença quando comparada a cepa sensível ao PZQ. Utilizamos testes estatísticos para avaliar a média de vermes recuperados após os tratamentos. Não houve diferença significativa entre os grupos controles, que não foram tratados com o fármaco, o que indica que a infecção foi homogênea e foi possível fazer as comparações diretamente entre um grupo e outro. Até este estudo não existiam dados referentes ao comportamento de cepas resistentes ao PZQ em diferentes fases do parasito no hospedeiro vertebrado. Também não houve diferença estatística na recuperação de vermes LE e LE-PZQ, após tratamento nos diferentes dias, exceto nos grupos tratados com 45 d.p.i. Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura que demonstram que o PZQ é pouco ativo contra vermes jovens (Gönnert & Andrews, 1977, Xiao *et al.*, 1985, Sabah *et al.*, 1986, Pica-Mattoccia & Cioli 2004, Ribeiro *et al.*, 2004). Recentemente, Vimeiro *et al.* (2013) demonstraram que camundongos tratados com 400mg/Kg de PZQ 15 ou 23 dias após a infecção tiveram uma redução de 43,3% e 20,6% quando comparados com seu grupo controle. Em relação aos grupos tratados com 45 depois de infectados, os resultados continuam semelhantes às avaliações da manutenção da resistência da cepa LE-PZQ. Também comparamos a ação do PZQ entre a cepa LE e LE-PZQ nos mesmos dias e foi possível verificar que, apesar de não serem estatisticamente diferentes em relação aos seus controles, quando comparados entre as cepas, houve uma recuperação de vermes estatisticamente maior na cepa resistente em relação à cepa controle quando estes foram tratados com 16 e 23 dias. Tais resultados



indicariam que a partir deste período os possíveis mecanismos envolvidos na resistência desta cepa estariam mais evidentes ou sendo mais expressos. Estes achados são importantes para que mais estudos envolvendo estas fases do parasito no hospedeiro vertebrados sejam conduzidos e comparados com as fases que não apresentam tal comportamento. Contudo, é na fase adulta que os vermes apresentam maior resistência ao PZQ.

Apesar de ser pouco eficaz em vermes imaturos, estudos já demonstraram que do PZQ atua em outras fases do ciclo de vida do parasito. Estudos já demonstraram o efeito da separação da cauda e do corpo de cercárias após exposição ao PZQ (Andrews 1978; Coles, 1979; Xiao *et al.*, 1985; Xiao *et al.*, 1987; Yi & Combes, 1987). Contudo, o mecanismo exato desta perda de cauda de cercárias não é completamente compreendido. Acredita-se que este processo esteja relacionado com uma estrutura especial entre o corpo e cauda da cercária, pois a extremidade posterior do corpo da cercária é afunilada formando uma estrutura que forma uma articulação entre o corpo e a cauda. Esta peça conectora é delicada e pode ser quebrada facilmente (Howells *et al.*, 1975; Liang *et al.*, 2010).

No presente estudo também foi investigada esta perda da cauda como parâmetro para avaliar a resistência da cepa LE-PZQ ao PZQ. Assim, demonstrou-se que a cepa resistente após uma e duas horas de contato com PZQ em diferentes concentrações, apresenta perda de cauda estatisticamente menor que a cepa suscetível. As cercárias LE-PZQ apresentaram uma maior perda da cauda após duas horas de exposição, contudo esta ainda é estatisticamente menor que a observada em cercárias sensíveis. As cercárias que não foram expostas ao PZQ, mesmo após as duas horas na água sem cloro, permaneceram sem perda da cauda e com movimentos normais. Os resultados permitem especular que cercárias resistentes seriam mais viáveis para infecção ativa (pela pele) por mais tempo que as suscetíveis uma vez que, permanecem se movimentando ativamente por mais tempo. Estes resultados corroboram com os achados de Liang *et al.* (2010) que utilizou uma cepa resistente obtida após tratamentos de camundongos.

As razões que causam esta diferença não estão elucidadas. Contudo, acredita-se que o mecanismo de perda da cauda induzida pelo PZQ seja diferente do mecanismo de perda da cauda causada pelo estresse físico com

repetidas passagens da cercária em uma agulha (Colley & Wikel, 1974) ou do causado pela centrifugação seguida de incubação em volume de água residual (Ramalho-Pinto *et al.*, 1974; Howells *et al.*, 1975). A perda da cauda induzida pelo PZQ é muito rápida e ocorre antes que o conteúdo das glândulas acetabulares seja secretado (Liang *et al.*, 2010).

O fenômeno MDR é comumente associado com a resistência de parasitos às drogas. O PZQ pode interagir com as MRPs (proteínas associadas à resistência multidrogas) de uma série de formas, seja como um substrato ou como um inibidor de transporte mediado pelas proteínas transportadoras ABC. Então, seria perfeitamente possível que estas proteínas estivessem envolvidas na resistência do *Schistosoma* ao PZQ (James *et al.*, 2009). Embora proteínas transportadoras possam estar envolvidas na resistência a drogas de parasitos, pouco é conhecido sobre seu real papel nesta resistência.

Trabalhos sobre Pgp em *Schistosoma* e outros transportadores multidrogas começaram em 1994, quando cDNAs de SMDR2 e SMDR1 foram clonados e sequenciados (Bosch *et al.*, 1994). Após a publicação do genoma de *S. mansoni* (Berriman *et al.*, 2009), inúmeros outros genes preditos que codificam transportadores ABC estão disponíveis. O gene MRP1/ABCC1 que codifica outro transportador, o MRP1, também relacionado com o fenômeno MDR também já foi estudado em *S. mansoni* (Kasinathan *et al.*, 2010b)

Este trabalho também investigou o papel da SMDR2 e SmMRP1 em vermes adultos da cepa resistente ao PZQ a fim de verificar se estes podem estar relacionados com a resistência desta cepa desenvolvida em laboratório.

Os resultados de qRT-PCR de SMDR2 obtidos neste trabalho corroboram com os achados de Bosch *et al.* (1994) e Messerli *et al.* (2009) onde vermes fêmeas apresentam maiores níveis de RNA que em vermes machos independente da cepa avaliada. Em relação à comparação entre cepa resistente e suscetível, nossos resultados mostraram que SMDR2 está mais expresso em machos, fêmeas e em vermes em pares na cepa LE-PZQ em comparação com a LE. Nossos resultados são inéditos na literatura em relação a fêmeas e machos resistentes separados, uma vez que não existem dados publicados para os níveis de SMDR2 nestes. Em relação aos vermes em pares, nossos resultados estão de acordo com os achados de Messerli *et al.* (2009) que utilizaram apenas casais de vermes sensíveis ao PZQ ou com

suscetibilidade reduzida mesmo para comparação. Os parasitos com suscetibilidade reduzida (cepa EE2) foram provenientes de uma cepa isolada de pacientes do Egito que não foram curados após três doses sucessivas de PZQ. Contudo, este isolado não vem sendo monitorado quanto à permanência da resistência.

É interessante observar que os níveis de SMDR2 em fêmeas são maiores quando comparados com os de vermes em pares apenas na cepa suscetível ao PZQ. Na cepa resistente, os níveis de SMDR2 de vermes em pares não são estatisticamente diferentes dos níveis encontrados em fêmeas, embora, estes níveis ainda sejam maiores em relação a machos isolados nas duas cepas. Esta diferença poderia se dar por um aumento da expressão de SMDR2 em machos resistentes a ponto de não ser possível perceber diferença entre fêmeas resistentes e vermes em pares também resistentes.

Embora nossos dados reforcem a hipótese de que SMDR2 esteja relacionado com o mecanismo de resistência do *S. mansoni* ao PZQ, ainda não podemos determinar se este mecanismo está diretamente envolvido ao desenvolvimento de resistência ao PZQ ou se está apenas correlacionado. Estudos recentes indicam que SMDR2 apresenta maior expressão após exposição ao PZQ (Messerli *et al.*, 2009); que o PZQ é um inibidor da Pgp (Hayeshi *et al.*, 2006) e outros trabalhos utilizando uma sonda fluorescente substrato para a Pgp que demonstraram que o PZQ é capaz de inibir a atividade excretora de *S. mansoni* (Oliveira *et al.*, 2006; Couto *et al.*, 2010) indicam que o PZQ pode interagir de importantes maneiras com transportadores SMDR (Pgp de *Schistosoma*).

Em relação a SmMRP1, encontramos que este transportador apresentou-se mais expresso em vermes machos que em fêmeas. Este resultado corrobora com os achados Kasinathan *et al.* (2010a). Contudo, em nosso estudo, não houve diferença significativa quando comparamos estes níveis entre machos e vermes em pares, até o presente não se tem relato na literatura deste tipo de comparação. Estes resultados correspondem tanto à cepa suscetível quanto à resistente. Quando comparados os resultados de SmMRP1 entre a cepa LE-PZQ e LE, observamos que SmMRP1 está mais expresso em machos e em vermes em pares resistentes ao PZQ. Estes achados não estão de acordo com os resultados encontrados por Kasinathan

*et al.* (2010b) que utilizaram a cepa EE2 isolada de pacientes do Egito que não foram curados. Embora esta cepa apresente indícios de resistência, como maiores níveis de SMDR2, conforme já mencionado, esta cepa não vem sendo monitorada quanto à permanência ou diminuição da sua resistência ao PZQ. Neste mesmo estudo de Kasinathan e colaboradores, foi possível verificar que SmMRP1 apresenta maiores níveis após exposição ao PZQ e assim como em SMDR2, SmMRP1 também estava mais expressa em vermes juvenis, considerados por apresentar uma suscetibilidade reduzida natural ao PZQ. Diante disso, temos forte indícios que SmMRP1 pode estar relacionada com a resistência do *S. mansoni* ao PZQ.

De acordo com nossos resultados, com os de Messerli *et al.* (2009) e Kasinathan *et al.* (2010a), machos e fêmeas apresentaram diferença de expressão para SMDR2 e SmMRP1. Embora pertençam à mesma superfamília ABC de transportadores e compartilhem alguns substratos, esta diferença de expressão de gênero do *S. mansoni* pode estar relacionada com o fato de que estes transportadores possuem papéis diferentes nestes parasitos. Enquanto SMDR2 mostra preferência para compostos hidrofóbicos neutros e catiônicos, SmMRP1 transporta preferencialmente ânions orgânicos, incluindo compostos que são conjugados à glutationa e glucoronato (Leslie *et al.*, 2001; Ambudkar *et al.*, 2003; Gimenez-Bonafe *et al.*, 2008).

O PZQ pode tanto ser um inibidor ou, atuando como um substrato, sobrecarregar estes transportadores MDR que então, servirá como um sinal para que as células aumentem a expressão de SMDR2 e SmMRP1 (Kasinathan *et al.*, 2010b). Diante disso, aumento dos níveis de SMDR2 e SmMRP1 pode ser um dos mecanismos que o parasito utiliza para excretar a droga e se livrar ou minimizar os efeitos da mesma.

Por fim, estudamos o papel da MVP de *S. mansoni* na resistência do parasito ao PZQ (Reis *et al.*, 2013). Embora, SmMVP não seja um transportador pertencente à superfamília ABC, seu aumento já foi identificado em tumores bem como em alguns modelos de resistência a múltiplas drogas. Nosso estudo demonstrou que SmMVP possui maiores níveis de RNA em machos de ambas cepas do que em fêmeas e vermes em pares. Contudo, é possível observar que na cepa resistente, SmMVP está estatisticamente mais expresso em vermes em pares quando comparado apenas com fêmeas. O

mesmo não é observado na cepa sensível ao PZQ. Talvez, esta diferença esteja relacionada com um aumento ainda mais expressivo nos vermes resistentes capaz de aumentar os níveis em vermes que estão em pares. Os níveis de proteínas investigados por Western Blot foram semelhantes para a cepa suscetível ao PZQ. Na cepa resistente, os níveis de proteínas só estavam maiores para machos em comparação com vermes em pares. Este resultado não corrobora com os dados encontrados para o RNA indicando um possível atraso entre a transcrição do RNA e a tradução e o processamento da proteína.

Quando comparadas as cepas suscetível e resistente, observamos maiores níveis de RNA e proteínas na cepa LE-PZQ. O papel destas proteínas não está completamente elucidado e, muito menos, o mecanismo que relaciona a maior expressão de Vaults com a resistência a multidrogas. Porém diante dos indícios de função no transporte intracelular bem como seu manejo e distribuição celular de drogas em algumas linhagens, já foi proposto que Vaults possam agir no transporte de drogas para longe de seus alvos intracelulares mediando a expulsão destas drogas do núcleo e/ou o sequestro destas para vesículas exocíticas. Em tal caso, as Vaults poderiam operar como membranas associadas a transportadores de drogas, tais como os ABC, presentes em várias membranas intracelulares (Mossink *et al.*, 2003). Contudo, tais mecanismos são especulativos e carecem de maiores estudos.

Embora os estudos até o momento sejam consistentes, experimentos farmacológicos e genéticos são de grande importância para que se possa confirmar e afirmar, sem sombra de dúvidas, a real relação entre estes transportadores e a resistência do *S. mansoni* ao PZQ.

## **7 CONCLUSÕES**

- Apesar de não estar sendo submetida à pressão quimioterápica, a cepa LE-PZQ tem se mantido resistente ao tratamento com PZQ.
- A recuperação de vermes LE-PZQ demonstra que esta cepa é mais resistente a partir do tratamento de 16 dias após a infecção.
- A perda da cauda se mostrou um bom parâmetro para avaliar a resistência dos parasitos ao PZQ.
- Os transportadores SMDR2 e SmMRP1 e a proteína SmMVP apresentaram maiores níveis de expressão na cepa LE-PZQ, o que sugere que podem estar envolvidos no mecanismo de resistência do parasito ao PZQ.

## 8 PERSPECTIVAS

O desenvolvimento e a manutenção da cepa LE-PZQ em nosso laboratório tem gerado diversas colaborações internacionais e diversos estudos estão em andamento. Uma bolsa de Pós-Doutorado Júnior do CNPq já foi aprovada e deve ter início em Maio deste ano com a finalidade de dar continuidade aos estudos de resistência desta cepa. Atualmente, temos um estudo do transcriptoma de vermes adultos da cepa LE-PZQ recuperados de camundongos tratados com PZQ após 1, 3, 12 e 24 horas. Este estudo está na fase de análise dos dados e é realizado em colaboração com o Dr. Matt Berriman, da Dra. Nancy Holroyd do Wellcome Trust Sanger Institute no Reino Unido e com o Dr. Robert Greenberg da University of Pennsylvania nos Estados Unidos. Outra colaboração em andamento é com o Dr. John Robert Kusel da University of Glasgow, também no Reino Unido, para o uso de sondas fluorescentes em diversas fases do ciclo de vida do parasito resistente. Por fim, um trabalho visando a identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), regiões do DNA que contem pelo menos um gene que contribua para a variação fenotípica de um organismo no genoma dos parasitos, está sendo desenvolvido no laboratório do Dr. Philip LoVerde na University of Texas pela Dra. Ana Carolina Alves de Mattos, participante ativa da criação e do desenvolvimento dos trabalhos que envolvem a cepa LE-PZQ.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Artigo Publicado

Parasitology International 63 (2014) 120–126



Contents lists available at ScienceDirect

Parasitology International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/parint](http://www.elsevier.com/locate/parint)



#### Characterisation of major vault protein during the life cycle of the human parasite *Schistosoma mansoni*

Eneida V. Reis <sup>a</sup>, Roberta V. Pereira <sup>a</sup>, Matheus Gomes <sup>b</sup>, Liana K. Jannotti-Passos <sup>c</sup>, Elio H. Baba <sup>c</sup>, Paulo Marcos Zech Coelho <sup>c</sup>, Ana C.A. Mattos <sup>c</sup>, Flávia F.B. Couto <sup>c</sup>, William Castro-Borges <sup>a</sup>, Renata Guerra-Sá <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, MG, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Avançado Patos de Minas, MG, Brazil

<sup>c</sup> Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brazil



## 9.2. Aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais

 <p>Ministério da Saúde FiOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência</p>	 <p>Comissão de Ética no Uso de Animais</p>
<b>LICENÇA</b>	
<b>LW-83/12</b>	
<p>Certificamos que o protocolo (P-25/12-5), intitulado "Estudo da resistência do <i>Schistosoma mansoni</i> ao praziquantel nas diferentes fases evolutivas no hospedeiro vertebrado", sob a responsabilidade de PAULO MARCOS ZECH COELHO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.</p> <p>Esta licença tem validade até 03/12/2015 e inclui o uso total de :</p>	
<p><i>Mus musculus</i> - 400 Fêmeas de Swiss webster, Peso: 20,0000 Grama(s).</p>	
<p>Rio de Janeiro, 3 de dezembro de 2012</p>	
<p>Octavio Augusto França Presgrave Coordenador da CEUA</p>	
<p><small>Comissão de Ética no Uso de Animais Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4026 - Prédio da Esperança - sala 200 - Mangueiras - Rio de Janeiro / RJ Telefone: (21) 3662.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br</small></p>	

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdul-Ghani RA, Loutfy N, Hassan A. Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol Research*, 2009; 105(4): 899-906.

Ambudkar SV, Dei S, Hrycyma CA, Ramachandr M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999; 39: 361–98.

Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM Pglycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 2003; 22: 7468–85.

Andrews P. Effect of praziquantel on the free-living stages of *Schistosoma mansoni*. *Z Parasitenkunde*, 1978; 56: 99-06.

Andrews P, Thomas H, Pohlke R, Seubert J. Praziquantel. *Med Res Reviews*, 1983; 3: 147-200.

Araujo N, Mattos ACA, Coelho PM, Katz N. Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental *Schistosomiasis mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2008; 103: 781-5.

Araújo NP, Souza SP, Passos LKJ, Simpson AJG, Dias Neto E, Pereira TR, Cerutti JRC, Alencar FEC, Dietze R, Katz N. Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquina e praziquantel e não curados. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1996; 29: 467 – 76.

Barbosa MA, Pellegrino J, Coelho PMZ, Sampaio IBM. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1978; 20(3): 121-32.

Bassily S, Farid Z, Dunn M, el-Masry NA, Stek M Jr. Praziquantel for treatment of schistosomiasis in patients with advanced hepatosplenomegaly. *Ann Trop Med Parasitol*, 1985; 79(6): 629-34.

Becker B, Mehlhorn H, Andrews P, Thomas H, Eckert J. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) *in vitro*. *Z Parasitenkd*, 1980; 63: 113-28.

Bennett JL, Day T, Feng-Tao L, Ismail M, Farghaly A. The development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. *Exp Parasitol*, 1997; 87: 260-7.

Berger W, Steine ER, Grusch M, Elbling L, Micksche M. Vaults and the major vault protein: Novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci*, 2008; 66(1): 43-6.

Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Perteua M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell BG, El-Sayed NM. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, 2009; 460:352–358.

Blanton RE, Blank WA, Costa JM, Carmo TM, Reis EA, Silva LK, Barbosa LM, Test MR, Reis MG. *Schistosoma mansoni* population structure and persistence after praziquantel treatment in two villages of Bahia, Brazil. *Int J Parasitol*, 2011; 15; 41(10): 1093-9.

Bloch EH. *In vivo* microscopy of schistosomiasis, II-migration of *Schistosoma mansoni* in the lungs, liver and intestine. *Am J Trop Med Hyg*, 1980; 29: 62-70.

Bonesso-Sabadini PIP, Dias LCS. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002; 97 (3): 381 – 5.

Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev of Biochem*, 2002; 71: 537–92.

Bosch IB, Wang ZX, Tao LCS, Schoemaker CB, Two *Schistosoma mansoni* cDNA encoding ATP-binding cassette (ABC) family proteins. *Mol Biochem Parasitol*, 1994; 65: 351 – 6.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 178 p. Brochura, 26 cm, il, color. (Série A: Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-52-334-1438-9. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_controle\\_moluscos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_controle_moluscos.pdf). Acesso 15 dez. 2013.

Brindley PJ, Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J Immunol*, 1987; 139(1): 215-20.

Campos R, Moreira AAB, Sette Jr H, Chamone DAF, da Silva LC. Hycanthon resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1976; 70: 261-2.

Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008.

Cioli D, Botros SS, Francklow KW, Mbaye A, Southgate V, Tchuenta TLA, Pica-Mattoccia L, Troiani AR, Seif el Din SH, Sabra AA, Albin J, Engels D, Doenhoff MJ. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *Int J Parasitol*, 2004; 34: 979 – 87

Cioli D, Pica-Mattoccia L, Archer S. Antischistosomal drugs: past, present and future. *Pharmacol Ther* 1995; 68 (1): 35-85.

Cioli D, Pica-Mattoccia L. Praziquantel. *Parasitol Res*, 2003; 90 (Supp 1): S3-9.

Coeli R, Baba EH, Araujo N, Coelho PM, Oliveira G. Praziquantel treatment decreases *Schistosoma mansoni* genetic diversity in experimental infections. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013; 7(12): 1-6.

Coelho PMZ, Katz N, Rocha MO, Souza CP, Mello RT. *Schistosoma mansoni*: infected snails as a tool to screen antischistosomal drugs. *Inter Parasitol*, 1988; 18 (2): 167-70.

Coelho PMZ, Lima FCS, Nogueira JAM. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* isolate from a patient submitted to repeated treatments. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1997; 39, 101-6.

Coelho PMZ, Andrade ZA, Borges CMC, Ribeiro F, Barbosa L. Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL (Org.). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz 2008: 149-60.

Coelho PMZ, Lima FCS, Nogueira JAM. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolate from a patient submitted to repeated treatments. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1997; 39: 101-6.

Coles CG. The metabolism of Schistosomes: a review. *Int J Biochem*, 1973; 4: 319 – 37.

Coles GC, Bruce JI. In vitro selection of drug resistant *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol*, 1987; 17(3): 767-71.

Coles GC. The effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. *J Helminthol*, 1979; 53: 31-3.

Coles GC. The molecular biology of drug resistance in parasitic helminths. *Comp Biochem of Paras Helm*, 1989; 125-144

Coles GC. Drug resistance or tolerance in schistosomes? *Trends Parasitol. News & Comment*, 2002; 18(7): 294.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004; 99 Suppl 1: 13-9.

Couto FFB, Coelho PMZ, Araújo N, Katz N, Kusel, JR, Janotti-Passos, LK, Mattos, ACA. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011; 106 (2): 153-7.

Couto FFB, Coelho PMZ, Araújo N, Kusel JR, Katz N, Mattos ACA. Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel. Parasitol, 2010; 137: 1-7.

Dassa E, Bouige P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. Res Microb, 2001; 152: 211–29.

Dayan AD. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. Acta Trop, 2003; 86 (2-3): 141-59.

Delgado VS, Suárez DP, Cesari IM, Incani RN. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and both sexes of the parasite. Parasitol Res, 1992; 78: 648–54.

Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. Curr Opin Infect Dis, 2008; 21(6): 659-67.

Doenhoff MJ, Hagan P, Cioli D, *et al.* Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. Parasitol, 2009; 136: 1825–35.

Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002; 96: 465-9.

Doenhoff MJ, Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Bain J. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1987; 81: 947-51.

Durães FV, Carvalho NB, Melo TT, Oliveira SC, Fonseca CT. IL-12 and TNF-  $\alpha$  production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. Immunol Lett, 2009; 125(1): 72-77.

El-Ansary A, Al-Daihan S. Important aspects of *Biomphalaria* snail-schistosome interactions as targets for antischistosome drug. Med Sci Monit, 2006; 12(12): 282-92.

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. Acta Trop, 2002; 82: 139-46.

Enk MJ, Lustosa Lima AC, Drummond SC, Schall VT, Coelho PMZ. The impact of the number of stool samples on the prevalence, the infection intensity and the distribution of the infection with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. Acta Trop, 2008; 108: 222–228.

Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. Am J Trop Med Hyg, 1994; 51 (1): 83 – 8.

Fallon PG, Sturrock RF, Capron A, Niang M, Doenhoff MJ. Short report: Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg, 1995; 53 (1): 61 – 2.

Fallon PG, Tao LF, Ismail MM, Bennett JL. Schistosome resistance to praziquantel: Fact or Artifact? Parasitol Today, 1996; 12(8): 316-20.

Fallon PG, Cooper RO, Probert AJ, Doenhoff MJ. Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. Parasitol, 1992; 105 Suppl: S41-8.

Faust EC, Jones CA, Hoffmam WA. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico . III- Biological studies. 2. The mammalian phase of the life cycle. Puerto Rico Journ Publ Healt Trop Med, 1934; 10: 133-96.

Fenwick A, Savioli L, Engels D, Robert Bergquist N, Todd MH. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol.* 2003; 19(11): 509-15.

Fetterer RH, Pax RA, Bennett JL. Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. *Eur J Pharmacol* 1980; 64(1): 31- 8.

French MD, Churcher TS, Basáñez MG, Norton AJ, Lwambo NJ, Webster JP. Reduction in genetic diversity of *Schistosoma mansoni* populations under chemotherapeutic pressure: The effect of sampling approach and parasite population definition. *Acta Trop*, 2013; 128 (2): 195-205.

Futscher BW, Abbaszadegan MR, Domann F, Dalton WS. *Biochem Pharmacol*, 1994; 47: 1601–06.

Gimenez-Bonafe P, Guillen Canovas A, Ambrosio S, Tortosa A, Perez-Tomas R Drugs modulating MDR. In: Colabufo NA, 2008, ed. Kerala, India: Research Signpost. pp 63–99.

Gonnert R, Andrews P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Z Parasitenkd*, 1977; 52: 129 – 50.

Gray DJ, McManus DP, Li Y, Williams GM, Bergquist R, Ross AG. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. *Lancet Infect Dis*, 2010; 10(10): 733-6.

Greenberg RM. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? *Int J Parasitol*, 2005; 35: 1–9.

Greenberg, RM. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. *Parasitol*, 2013; 140(12): 1534–1546.



Gryseels B, Mbaye A, De Vlas SJ, Stelma FF, Guisse F, Van Lieshout L, Faye D, Diop M, Ly A, Tchuem Tchuente LA, Engels D, Polman K. 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*, 2001; 6: 864–73.

Gryssels B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am*, 2012; 26(2): 383-97.

Harnett W, Kusel JR. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol*, 1986; 7: 417-28.

Hayeshi R, Masimirembwa C, Mukanganyama S, Ungell ALB. The potential inhibitory effect of antiparasitic drugs and natural products on P-glycoprotein mediated efflux. *Eur J Pharmaceut Sci*, 2006; 29 : 70–81.

Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 1992; 8: 67-113.

Howells RE, Gerken SE, Ramalho-Pinto F, Kawazoe U, Gazzinelli G, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: tail loss in relation to permeability changes during cercaria-schistosomulum transformation. *Parasitol*, 1975; 71: 26-35.

Ikeda K, Oka M, Yamada Y, Soda H, Fukuda M, Kinoshita A, *et al.* Adult T-cell leukemia cells over-express the multidrug-resistance protein (MRP) and lung-resistance protein (LRP) genes. *Int J Cancer*, 1999; 82: 599–604.

Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao LF, Day TA, Bennett JL. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg*, 1999; 60 (6): 932 – 5.

Ismail M, Metwally A, Farghaly A, Bruce J, Tao LF, Bennett JL. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high dose of praziquantel. *Am J Trop Med Hyg*, 1996; 55 (2): 214 – 8.

Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, *et al.* Broad distribution of the multidrug resistance–related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol*, 1996; 148: 877–87.

James CE, Hudson AL, Davey MW. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol*, 2009; 25: 328–35.

James CE, Hudson LA, Davey MW. An update on P-glycoprotein and drug resistance in *Schistosoma mansoni*. *Trends Parasitol*, 2007; 25 (12): 538-9.

Johnstone RW, Ruefli AA, Tainton KM, Smyth MJ. A role for Pglycoprotein in regulating cell death. *Leuk Lymphoma*, 2000; 38: 1–11.

Kasinathan RS, Greenberg RM. Pharmacology and potential physiological significance of schistosome multidrug resistance transporters. *Exp Parasitol*, 2012; 132(1):2-6.

Kasinathan RS, Morgan WM, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel. *Mol Biochem Parasitol*, 2010a; 173(1): 25-31.

Kasinathan RS, Goronga T, Messeerli SM, Webb TR, Greenberg RM. Modulation of a *Schistosoma mansoni* multidrug transporter by the antischistosomal drug praziquantel. *Faseb J*, 2010b; 24(1): 128-35.

Katz N, Dias EP, Araújo N, Souza CP. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1973; 7 (6): 381 – 7

Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2000; 33 (3): 303-8.

Katz N. Terapêutica Experimental e clínica na esquistossomose. [Tese] Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz; 2005.

Kedersha NL, Rome LH. Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structure contain a single species of small RNA. *J Cell Biol*, 1986; 103: 699–709.

Kickhoefer VA, Rejavel KS, Scheffer GL, Dalton WS, Schepers RJ, Rome LH. Vaults are up-regulated in multidrug-resistance cancer cell lines. *J Bio Chem*, 1998; 273: 8971-4.

Kinoti GK, Coles GC. Defining resistance in *Schistosoma*. *Parasitol Today*, 1997; 13: 157-8.

Kumkate S, Chunchob S, Janvilisri T. Expression of ATP-binding cassette multidrug transporters in the giant liver fluke *Fasciola gigantica* and their possible involvement in the transport of bile salts and anthelmintics. *Mol Cell Biochem*, 2008; 317: 77–84.

Kusel JK, Oliveira FA, Todd M, Ronketti F, Lima SF, Mattos ACA, Rreis KT, Coelho PMZ, Thornhill JÁ, Ribeiro F. The effects of drugs, ions, and poly-lysine on the excretory system of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006; 101 Suppl. 1: 293-8.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680-685.

Lage, H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents*, 2003; 22: 188– 99.

Laurencot CM, Scheffer GL, Scheper RJ, Shoemaker RH. Increased LRP mRNA expression is associated with the MDR phenotype in intrinsically resistant human cancer cell lines. *Int J Cancer*, 1997; 72: 1021–6.

Lenzi LH, Jurberg AD, Coelho PMZ, Lenzi JA. Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL (Orgs.). *Schistosoma mansoni e Esquistosomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. p. 85-145.

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005; 204: 216–37.

Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ, Southgate VR. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *Int J Parasitol*, 2001; 31(11): 1227-35.

Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ. Detection of praziquantel resistance in schistosomes. *Trop Med Int Health*, 2000; 5(1): 72.

Liang YS, Dai JR, Zhu YC, Coles GC, Doenhoff MJ. Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2003; 34 (2): 274-80.

Liang YS, Wang W, Dai JR, Li HJ, Tao YH, Zhang JF, Zhu YC, Coles GC, Doenhoff MJ. Susceptibility to praziquantel of male and female cercariae of praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. *J Heminthol*, 2010, 84: 202-7.

Lima SF, Vieira LQ, Harder A, Kusel JR. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitol*, 1994a; 109: 57 – 64.

Mattos, A. C., Kusel, J. R., Pimenta, P. F. and Coelho, P. M. Z. Activity of praziquantel on in vitro transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006; 1 Suppl: S283-S87.

Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H, Frenkel JK. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. *Arzneimittelforschung*, 1981; 31: 544 – 54.

Meister A & Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 1983; 52: 711-60.

Messerli SM, Kasinathan RS, Morgan W, Spranger S, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. *Mol Biochem Parasitol*, 2009; 167: 54-9.

Miller P, Wilson RA. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to the lungs. *Parasitol*, 1980; 77: 281-302.

Modha J, Lambertucci JR, Doenhoff MJ, McLaren DJ. Immune dependence of schistosomicidal chemotherapy: an ultrastructural study of *Schistosoma mansoni* adult worms exposed to praziquantel and immune serum in vivo. *Parasite Immunol*, 1990; 12: 321-34.

Mossink MH, Van Zon A, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EAC. Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? *Nature*, 2003; 22: 7458-67.

Oliveira FA, Kusel JR, Ribeiro F, Coelho PMZ. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. *Parasitol*, 2006; 132: 321-30.

Pan American Health Organization. Regional Office of the World Health Organization. Report: PAHO/WHO Preparatory Meeting on Epidemiological Data Needed to Plan Elimination of Schistosomiasis in the Caribbean. St. George: PAHO/WHO, 2007 Dec. 13-14. Disponível em: [http://www.who.int/schistosomiasis/resources/PAHO\\_report\\_schistosomiasis\\_caribbean.pdf](http://www.who.int/schistosomiasis/resources/PAHO_report_schistosomiasis_caribbean.pdf). Acesso em: fevereiro 2014.

Pan CT. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am J Trop Med Hyg*, 1965; 14(6): 931-76.

Paraense WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arq Mus Nac*, 1975. 55: 105-28.

Pax RA, Bennett JL, Fetterer R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1978; 304: 309 – 15.

Pelegrino. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomule *in vitro*. Exp Parasitol, 1974; 36 (3): 360-72.

Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni*. Adv Parasitol, 1968; 6: 233-91.

Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. Rev Bras Malariol Doenças Trop, 1956; 8: 589 – 97.

Pica-Mattoccia L, Cioli D. Sex and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. Int J Parasitol, 2004; 34: 527-533.

Pica-Mattoccia L, Valle C, Basso A, Troiani AR, Vigorosi F, Liberti P, *et al.* Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel. Exp Parasitol, 2007; 115:344–51.

Polderman AM, Gryseels B, Gerold JL, Mpamila K, Manshande JP. Side effects of praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* in Maniema, Zaire. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1984; 78 (6): 752-4.

Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. Oncogene, 2004; 23: 2934–59.

Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*. a defined system for the step-wise transformation of the cercaria to schistosomule *in vitro*. Exp Parasitol, 1974; 36: 360-372.

Reis EV, Pereira RV, Gomes M, Jannoti-Passos LK, Baba EH, Coelho PMZ, Mattos ACA, Couto FFB, Castro-Borges W, Guerra-Sá R. Characterisation of major vault protein during the life cycle of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Int* 2013; 63: 120-6.

Ribeiro F, Coelho PMZ, Vieira LQ, Watson DG, Kusel JR. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol* 1998; 116: 229-36.

Ribeiro, F Mello RT, Tavares CA, Kusel JR, Coelho PM. Synergistic action of Praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 2004; 46, 231-3

Riley EM, Chappell LH. Praziquantel treatment of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* - influence on snail fecundity. *Parasitol*. 1990; 101: 211-17.

Rollinson D, Simptom AJ. The biology of Schistosomes - from genes to latrines, Harcourt Brace Jovanovich, London 1987.

Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stothard JR, Tchuente LA, Garba A, Mohammed KA, Schur N, Person B, Colley DG, Utzinger J. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop*. 2012 May 10.

Ross MH, Kwa MSG, Veenstra JG, Kooyman FNJ, Boersema JH. Molecular aspects of drug resistance in parasitic helminthes. *Pharmac Ther*. 1993; 60: 331-336.

Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Exp Parasitol* 1986; 61: 294 – 303.

Sato H, Kusel JR, Thornhill J. Excretion of fluorescent substrates of mammalian multidrug resistance-associated protein (MRP) in the *Schistosoma mansoni* excretory system. *Parasitol* 2004; 128: 43–52.

Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, et al. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* 1995; 1: 578–82.

Schmittgen TD. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature Protocols* 3 2008; 110108.

Silva LM, Andrade ZA. Immunostimulation as adjuvant for the chemotherapy of experimental schistosomiasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1997;39:11-4.

Smithers SR, Terry RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitol* 1965, 55: 695-00.

Souza CP. *Schistosoma mansoni*: aspectos quantitativos da interação hospedeiro-parasito e desenvolvimento em *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*. [Tese de Doutorado]. Minas Gerais: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; 1993.

Steiner E, Holzmann K, Pirker C, Elbling L, Micksche M, Sutterluty H, Berger W. The major vault protein is responsive to and interferes with interferon-mediated STAT1 signals. *J Cell Sci* 2006; 119: 459-69.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resource development: systematic review, meta analysis, and estimates of people risk. *Lancet Inf Dis* 2006; 6(7): 411-25.

Stelma FF, Talla A, Sow S, Kongs A, Nang M, Polman K, Delder AM, Gryseels B. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53 (2): 167-70.

Teles HM. Geographic distribution of *Schistosoma mansoni* transmitter snail species in State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(5): 426-32.



Teodoro TM, Janotti-Passos LK, Carvalho O do S, Caldeira RL. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). *Mol Phylogenet Evol.* 2010; 57(1): 144-51

Touassem R, Combes C. Comparative analysis of the *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma bovis* production under influence praziquantel. *Z Parasitenkunde.* 1986; 72 (3): 345-51.

Valadares TE, Coelho PMZ, Pellegrino J, Sampaio IBM. *Schistosoma mansoni*: aspectos da oviposição da cepa LE em camundongos infectados com um casal de vermes. *Rev Inst Med Trop. de São Paulo.* 1981; 23: 6-11.

van de Ven R, Oerlemans R, van der Heijden JW, Scheffer GL, de Gruijl TD. ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer. *J Leukocyte Biol* 2009; 86: 1075–87.

Van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 2003; 86(2-3): 125-39.

Van Zon A, Mossink MH, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA. The vault complex. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60(9): 1828-37.

Vimeiro AC, Araújo N, Katz NKusel JR, Coelho PM. Schistogram changes after administration of antischistosomal drugs in mice at the early phase of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108(7): 881-6.

Warren KS, Weisberger AS. The treatment of molluscan schistosomiasis mansoni with chloramphenicol. *Am J Trop Med Hyg.* 1966; 15 (3): 342- 50.

Warren KS. The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972; 64: 432.

Warren, KS. Studies on the treatment of molluscan *Schistosomiasis mansoni* with antibiotics, non-antibiotic, metabolic inhibitors, molluscicides and anti-schistosomal agents. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1967; 61(3): 368-72.

Wolde Mussie E, Vande Waa J, Pax RA, Fetterer R, Bennett JL. *Schistosoma mansoni*: calcium efflux and effects of calcium-free media on responses of the adult male musculature to praziquantel and other agents inducing contraction. *Exp Parasitol* 1982; 53(2): 270-8.

World Health Organization. Prevention and control of schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis. World Health Organ Tech Rep Ser 2002; 912 (i-vi): 1-57.

World Health Organization. The control of schistosomiasis. Second report of WHO expert committee. Geneva: World Health Organization; 1993. WHO Technical Report Series, No. 830.

Xiao SH, Catto BA, Webster LT. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*. *J Infect Dis* 1985; 151: 1130 – 37.

Xiao SH, Friedman PA, Catto BA, Webster LT Jr. Praziquantel-induced vesicle formation in the tegument of male *Schistosoma mansoni* is calcium dependent. *J Parasitol* 1984; 70(1): 177-9.

Xiao, S.H., Yue, W.J., Mei, J.Y. & Zhang, R.Q. Effect of praziquantel on *Schistosoma japonicum* cercariae. *Acta Pharmacol Sinica* 1987 8, 358–362.

Yi XM, Combes C. Effect of praziquantel on larval stages of *Schistosoma japonicum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81(4): 645-50.