

Análise genética de estirpes de *Schistosoma mansoni* sensíveis e resistentes a praziquantel por *RAPD-PCR*

Genetic analysis of *Schistosoma mansoni* sensitive and resistant strains to praziquantel using *RAPD-PCR*

Tiago Mendes

Mestrando de Parasitologia Médica,
Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica (UEIPM),
Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas (HMM),
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
tiago.mendes@ihmt.unl.pt

Manuela Calado

Professora auxiliar, UEIPM, HMM, IHMT

Isabel Clemente

Técnica especialista, UEIPM, HMM, IHMT

Silvana Belo

Professora auxiliar, UEIPM, HMM, IHMT

Ana Afonso

Investigadora auxiliar, UEIPM, HMM, IHMT

Resumo

O praziquantel (PZQ) é o fármaco de eleição no tratamento da schistosomose, devido à sua alta taxa de cura e por não demonstrar efeitos secundários significativos mas recentemente têm sido reportados cada vez mais casos de resistência ou de aumento de tolerância a este fármaco. Devido a estas observações, a OMS recomenda a monitorização contínua de *Schistosoma* spp potencialmente resistentes ao fármaco.

No laboratório de Helminologia foi seleccionada uma linha de *Schistosoma mansoni*, resistente a PZQ na dose de 120 mg/Kg, após pressão de fármaco constante ao longo de vários ciclos. Foram recolhidos parasitas adultos de *S. mansoni* da estirpe resistente e de uma estirpe sensível e procedeu-se à análise do DNA dos vermes por *Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)*.

Foi possível observar polimorfismos em 7 dos 10 *primers*. Uma vez observadas as diferenças polimórficas entre parasitas sensíveis e resistentes, calculou-se o coeficiente de similaridade (*Dice's coefficient*).

A compreensão de polimorfismos genéticos associados à resistência poderão contribuir para a identificação futura de sequências relacionadas com a resistência/tolerância de *S. mansoni* ao tratamento por PZQ e para a identificação de parasitas resistentes no campo, assim como para o desenvolvimento de novas estratégias de controlo para a schistosomose.

Palavras Chave:

Schistosoma mansoni, *RAPD-PCR*, resistência ao Praziquantel.

Abstract

Praziquantel (PZQ) is the drug of choice in the treatment of schistosomiasis due to its high cure rates and no significant side effects. Currently, more and more cases of resistance or increased tolerance to PZQ have been reported, consequently, there were recommendations for continuous monitoring of drug resistance.

In our laboratory, we selected a parasitic line of *Schistosoma mansoni*, through constant drug pressure over several cycles, which was resistant to 120 mg/kg PZQ.

Adult parasites of *S. mansoni* from the resistant and from a sensible strain were collected; the DNA was extracted and analyzed through Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (*RAPD-PCR*).

We observed genetic polymorphism in 7 of 10 *primers* tested. Once observed the polymorphic differences between susceptible and resistant parasites, we calculated the similarity coefficient (*Dice's coefficient*).

Understanding the genetic polymorphism associated with resistance may contribute to the future identification of related sequences with the resistance/tolerance of *S. mansoni* to PZQ treatment and for identification of resistant parasites in the field as well as for the development of new strategies to schistosomiasis control.

Key Words:

Schistosoma mansoni, *RAPD-PCR*, Praziquantel resistance.

Introdução

A schistosomose é uma doença crónica causada por parasitas do género *Schistosoma*, sendo actualmente considerada a segunda doença parasitária mais importante, cujo impacto socio-económico nas regiões tropicais e sub-tropicais é apenas ultrapassado pela malária [1, 2, 3].

O fármaco de eleição no tratamento e controlo da morbidade da schistosomose é o praziquantel (PZQ) que, quando utilizado nas dosagens recomendadas pela OMS (*Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*: 40 mg/kg; *S. japonicum*, *S. mekongi*: 60 mg/kg), tem revelado taxas de cura elevadas (75-85% para *S. haematobium*, 60-90% para *S. mansoni*, e 60-80% para infecções mistas de *S. mansoni* e *S. haematobium*) [4, 5, 6]. A sua eficácia contra todas as cinco espécies que afectam os seres humanos, a sua fácil administração, boa tolerabilidade e baixo custo são as características responsáveis pelo sucesso deste fármaco [7, 8]. Desde meados de 1970 (séc. XX) que o PZQ tem substituído outros fármacos antes utilizados no controlo da schistosomose, sendo um elemento crucial na estratégia global de controlo da doença, reduzindo bastante a prevalência e intensidade das infecções [9]. Em virtude da sua utilização intensa, há mais de três décadas, no controlo da morbidade em áreas endémicas, têm surgido algumas preocupações relacionadas com o desenvolvimento de tolerância ou resistência do *Schistosoma* spp ao PZQ [8, 9, 10]. Com efeito, têm sido reportadas taxas de cura cada vez mais baixas após o uso de PZQ na região norte do Senegal. No Egipto, após o tratamento de 1607 pacientes com duas doses de 40 mg/kg e uma terceira dose de 60 mg/kg, verificou-se que 2,4% dos pacientes inicialmente tratados continuaram a eliminar ovos nas fezes [6, 11, 12, 13, 14]. Estudos experimentais sobre fármaco-resistência demonstraram ser possível seleccionar estirpes resistentes de *S. japonicum* e de *S. mansoni* bastante tolerantes ao PZQ, administrando doses subterapêuticas a murganhos [7, 8, 10].

Vários estudos reportam a existência de diversidade genética em *S. mansoni* de diferentes regiões geográficas, podendo esta ser determinada por diferenças no genótipo de cada estirpe de indivíduo [15, 16]. Alguns estudos mostram ainda que *S. mansoni* apresenta diversidade genética não só entre diferentes regiões geográficas, e intra-regionais, mas também entre estirpes provenientes de diferentes hospedeiros intermediários ou de diferentes hospedeiros definitivos [17]. Estes estudos utilizam várias técnicas de PCR para detectar esta diversidade genética incluindo a técnica de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD). Embora alguma desta variação possa estar associada a divergências temporais, alguns polimorfismos genéticos podem estar associados ou ser marcadores de adaptação do parasita às pressões do ambiente que o rodeia, como a pressão farmacológica [7, 8, 15, 16, 17].

Este trabalho teve como objectivo realizar uma análise genética de estirpes de *Schistosoma mansoni* susceptíveis e resistentes a PZQ por RAPD-PCR.

Materiais e métodos

Para este estudo foi utilizada uma estirpe de *S. mansoni* de Belo Horizonte (estirpe BH) sensível ao PZQ (ES), cujo ciclo de vida tem sido mantido no laboratório de Helminologia há vários anos, utilizando murganhos da estirpe CD1 como hospedeiro definitivo e *Biomphalaria glabrata* como hospedeiros intermediários. A partir desta estirpe foi desenvolvida a estirpe resistente (ER) a doses de 120 mg/kg de PZQ, através da administração inicial de doses subterapêuticas de PZQ, sendo a dosagem aumentada ao longo de vários ciclos.

Para análise de eventuais alterações genéticas, recolheram-se parasitas adultos de *S. mansoni* por perfusão do fígado dos murganhos infectados. Os parasitas foram separados por sexo e realizou-se a extracção de DNA tanto da estirpe resistente (ER) como da estirpe normal (sensível a PZQ). O DNA foi extraído utilizando o protocolo CTAB modificado [18]. Os parasitas foram macerados em tubos com 600 µl de tampão de extração CTAB pré aquecido a 55°C e com 10 µl Proteinase K (10 mg/ml). Os tubos foram incubados a 55°C durante 90 minutos com agitação frequente. Após a incubação foram adicionados 600 µl de *clorofórmio:álcool isoamílico* (24:1), foi misturado por inversão durante 2 minutos e submetido a uma centrifugação rápida. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo que continha 800 µl de etanol absoluto gelado. As amostras foram centrifugadas a 8,000 g durante 20 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol a 70% e centrifugado a 8,000 g durante 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco e dissolvido em 50 µl de tampão TE. O DNA extraído foi guardado a -20°C até utilização.

A análise molecular foi feita por *random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction* (RAPD-PCR). Foram seleccionados 10 *primers* (Tabela 1), com sequências de 10 nucleótidos (Eurofins MWG Operon) uma vez que estes tinham mostrado ser úteis na detecção de polimorfismos entre *S. mansoni*. [19]. As reacções de amplificação foram realizadas utilizando GoTaq® Flexi DNA Polymerase, onde, por cada reacção de amplificação foram adicionados 10 µl de 5x Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 0,2 mM de nucleotidos (cada), 10 pmol de *primer*, 2,5 u de Gotaq® DNA Polymerase e 10 µg de DNA para um volume final de 25 µl. A amplificação foi a seguinte: um passo inicial de desnaturação de 92°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos cada com desnaturação a 92°C durante 1 minuto, emparelhamento a 34°C durante 4 minutos e fase de alongamento a 72°C durante 2 minutos, após os ciclos realizou-se uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. A electroforese foi realizada em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (EtBr). Todas as amostras amplificadas com o mesmo *primer* foram incluídas no mesmo gel.

Uma vez observadas as diferenças polimórficas entre pa-

Tabela 1 - Lista de *primers* utilizados para RAPD-PCR

| <i>Primer</i> | Sequência |
|---------------|----------------------|
| OPI-3 | 5'- CAGAAGCCCA - 3' |
| OPI-5 | 5' - TGTTCCACGG - 3' |
| OPI-6 | 5' - AAGGCGGCAG - 3' |
| OPI-7 | 5' - CAGCGACAAG - 3' |
| OPI-8 | 5' - TTTGCCCGGT - 3' |
| OPI-9 | 5' - TGGAGAGCAG - 3' |
| OPI-12 | 5' - AGAGGGCACA - 3' |
| OPI-16 | 5' - TCTCCGCCCT - 3' |
| OPI-17 | 5' - GGTGGTGATG - 3' |
| OPI-18 | 5' - TGCCAGCCT - 3' |

rasitas sensíveis e resistentes, calculou-se o coeficiente de similaridade (S), (*Dice's coefficient*) [20, 21] de acordo com a fórmula:

$$S = \frac{2 * a}{2 * a + b + c}$$

Onde a corresponde ao número de bandas partilhadas por ambas as estirpes, b corresponde ao número de bandas presentes na estirpe susceptível e ausentes na estirpe resistente e c corresponde ao número de bandas presentes na estirpe resistente e ausentes na estirpe susceptível.

Todos os procedimentos técnicos foram realizados de acordo com a legislação nacional e Europeia (DL 276/2001 e DL 314/2003), no que respeita à protecção e bem-estar animal.

Resultados

Dos 10 *primers* utilizados para o *RAPD-PCR*, dois (OPI-16 e OPI-17) não apresentaram qualquer padrão passível de comparação, tendo os restantes oito *primers* apresentados padrões de bandas comparáveis. Destes oito *primers* com padrões de bandas bem definidos, sete (OPI-3, OPI-5, OPI-6, OPI-8, OPI-9, OPI-12 e OPI-18) apresentaram diferenças polimórficas. Estes *primers* produziram um total de 54 fragmentos bem definidos (5 a 12 fragmentos, média de 8 fragmentos) entre 200 pb e 1200 pb. Do total de fragmentos gerados 23 foram polimórficos (43%), com o *primer* OPI-5 a gerar mais polimorfismos, seguido dos *primers* OPI-6 e OPI-9 (Tabela 2). A identificação de bandas polimórficas foi feita com base na comparação de padrões de bandas no mesmo gel para ambas as estirpes, sendo apenas consideradas polimórficas as bandas detectadas em todos os indivíduos da mesma estirpe.

Uma vez observadas as diferenças polimórficas entre parasitas sensíveis e resistentes, calculou-se o coeficiente de similaridade (*Dice's coefficient*) (Tabela 2). O *primer* OPI-5 foi o que obteve um coeficiente de similaridade mais baixo (0,25) apenas havendo partilha de uma banda entre ambas as estirpes e 3 bandas polimórficas para cada *primer*. O *primer* OPI-7 não apresentou diferenças polimórficas entre ambas as estirpes e o *primer* OPI-3, (de entre os *primers* que apresentaram diferenças polimórficas) foi, dos *primers* que apresentaram polimorfismos, o que teve coeficiente de similaridade mais elevado (0,83), com 5 bandas comuns para ambas as estirpes e duas bandas polimórficas apenas presentes na estirpe resistente.

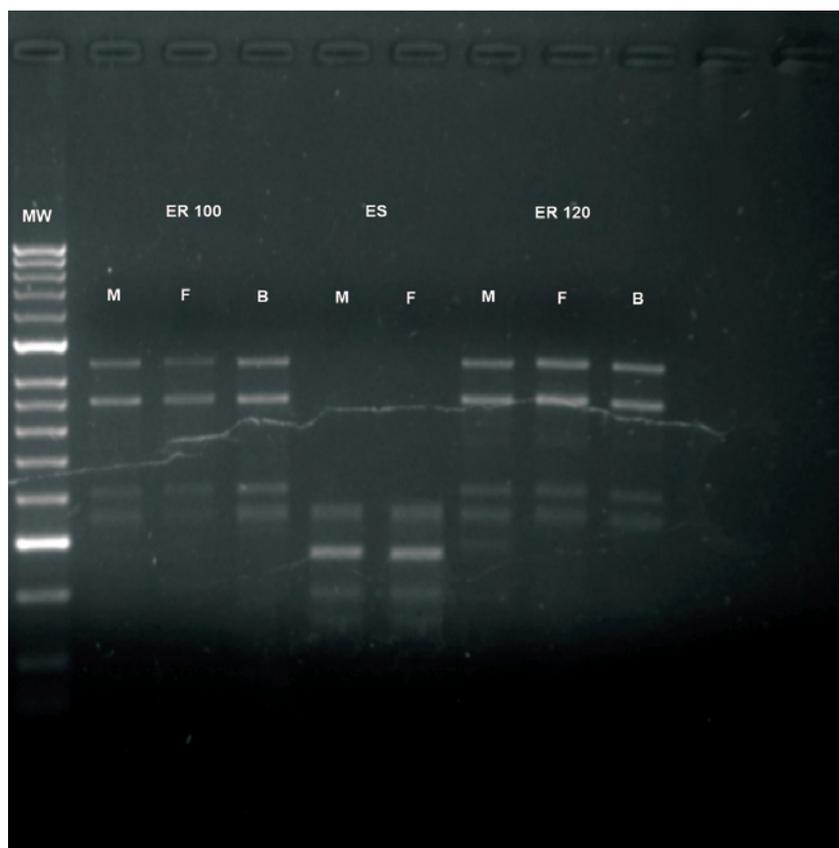


Figura 1 - RAPD-PCR, OPI-5. MW – marcador molecular 2000 bp; ER 100 - Estirpe resistente a 100 mg/kg de Paziquantel; ES - Estirpe sensível a PZQ; ER 120 - Estirpe resistente a 120 mg/kg de Paziquantel. M – Macho; F – Fêmea; B – Macho+Fêmea.

| | OPI-3 | OPI-5 | OPI-6 | OPI-7 | OPI-8 | OPI-9 | OPI-12 | OPI-18 |
|---|-------------|-------------|-------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Nº de bandas partilhadas | 5 | 1 | 5 | 5 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| Nº de bandas presentes na ES e ausentes na ER | 0 | 3 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Nº de bandas presentes na ER e ausentes na ES | 2 | 3 | 3 | 0 | 1 | 2 | 2 | 3 |
| Coefficiente de similaridade (S) | 0,83 | 0,25 | 0,67 | 1 | 0,75 | 0,67 | 0,75 | 0,73 |

Tabela 2 -
Coeficiente de similaridade (S)

Discussão

A análise genética por *RAPD-PCR* foi desenvolvida de forma a estudar a variabilidade genética entre diferentes estirpes geográficas ou isolados de *Schistosoma* [15, 16, 22]. Num estudo realizado por Tsai *et al.* (2000) esta técnica foi capaz de identificar diferenças genéticas entre estirpes de *S. mansoni* de diferentes áreas geográficas que tinham sido referidas como sensíveis ou tolerantes ao praziquantel [17]. Para a realização deste estudo seleccionámos 10 dos 20 *primers* utilizados por Tsai *et al.* (2000) verificando que esta metodologia não só é válida para estirpes de diferentes localizações geográficas, mas também para estirpes laboratoriais, sendo possível obter um padrão de bandas com diferenças polimórficas entre estirpes.

Dos 10 *primers* testados, 7 (sete) deles deram um padrão polimórfico específico para cada estirpe. No trabalho realizado por Tsai *et al.* (2000) os 10 *primers* demonstraram um bom nível de amplificação, sendo úteis para estudos de diversidade genética de *S. mansoni* de murganhos com diferente *background* genético e imunológico. Com este estudo verificámos que sete destes *primers* também são úteis para distinguir estirpes com diferente sensibilidade ao PZQ [15, 16, 17].

Dos *primers* utilizados, o OPI-5 mostrou ser aquele que melhor diferencia a estirpe sensível da resistente, seguindo-se os *primers* Opi-6 e OPI-9. Estes resultados levam-nos a sugerir que estes três *primers* poderão ser bons marcadores para estudos de populações de *S. mansoni* laboratoriais ou de campo.

Era esperado que os valores do coeficiente de similaridade estivessem próximos de 1, pois a estirpe ER é uma estirpe que deriva da estirpe sensível, com a qual foi comparada, sendo por isso esperado que o perfil de ambas fosse muito próximo [20, 21]. Surpreendente, para sete dos oito *primers* com perfil de bandas, o coeficiente de similaridade variou entre 0,87 e 0,25, com um valor médio de 0,67. Estes va-

lores são extremamente baixos e sugerem que o parasita consegue adaptar-se ao fármaco, desenvolvendo resistência/tolerância ao PZQ, o que poderá explicar o crescente número de casos humanos reportados de insucesso terapêutico.

Conclusões

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que *S. mansoni* consegue criar uma tolerância/resistência ao PZQ e que a técnica de *RAPD-PCR* permite, efectivamente identificar a diversidade genética associada a esta adaptação. A compreensão destes polimorfismos genéticos associados à resistência poderão contribuir para a identificação de futuras sequências específicas relacionadas com a resistência/tolerância de *S. mansoni* ao tratamento por PZQ, o que permitiria a identificação no campo de parasitas tolerantes/resistentes e distinguir entre casos de fármaco-resistência e casos de reinfeção, possibilitando o tratamento adequado para os doentes de cada um destes casos.

A Organização Mundial de Saúde alerta para o aparecimento de populações de *Schistosoma spp* resistentes ao PZQ e recomenda uma constante vigilância [9], pelo que este e outros estudos são de extrema importância para a identificação de sequências associadas à tolerância/resistência para melhor compreensão do(s) potenciais mecanismo(s) de tolerância ao PZQ, contribuindo para o desenvolvimento de novos schistosomicidas e para novas estratégias de controlo da schistosomose.

Agradecimentos

Ao Doutor Pedro Ferreira por todos os conselhos, críticas e sugestões.

Bibliografia

1. Xiao Sh., Utzinger, J., Chollet, J., & Tanner, M. (2006). Effect Of Artemether Administered Alone Or In Combination With Praziquantel To Mice Infected With *Plasmodium berghei* Or *Schistosoma mansoni* Or Both. *International Journal For Parasitology* , 36: 957-964
2. Reimert, C. M., Tukahebwa, E. M., Kabatereine, N. B., Dunne, D. W., & Vennervald, B. J. (2008). Assessment Of *Schistosoma mansoni* Induced Intestinal Inflammation By Means Of Eosinophil Cationic Protein, Eosinophil Protein X And Myeloperoxidase Before And After Treatment With Praziquantel. *Acta Tropica* , 105, 253-259.
3. Aly, I. R., Hendawy, M. A., Ali, E., Hassan, E., & Nosseir, M. M. (2010). Immunological And Parasitological Parameters After Treatment With Dexamethasone In Murine *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* , 105(6): 729-735.
4. Ernould, J.-C., Ba, K., & Sellin, B. (1999). Increase Of Intestinal Schistosomiasis After Praziquantel Treatment In A *Schistosoma haematobium* And *Schistosoma mansoni* Mixed Focus. *Acta Tropica* , 73: 143-152
5. Pica-Mattoccia, L., & Donato, C. (2004). Sex- And Stage-Related Sensitivity Of *Schistosoma mansoni* To In Vivo And In Vitro Praziquantel Treatment. *International Journal For Parasitology* , 34: 527-533.
6. Raso, G., N'goran, E. K., Toty, A., Luginbühl, A., Adjoua, C. A., Tian-Bi, N. T., *Et Al.* (2004). Efficacy And Side Effects Of Praziquantel Against *Schistosoma mansoni* In A Community Of Western Côte D'ivoire. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* , 98: 18-27.
7. Hines-Kay J, Cupit P, Sanchez M, Rosenberg G, Hanelt B, Cunningham C (2012). Transcriptional Analysis Of *Schistosoma mansoni* Treated With Praziquantel In Vitro. *Molecular & Biochemical Parasitology* 186: 87– 94
8. Pica-Mattoccia L, Doenhoff M, Valle C, Basso A, Troiani Ar, Liberti P, Festucci A, Guidi A, Cioli D (2009). Genetic Analysis Of Decreased Praziquantel Sensitivity In A Laboratory Strain Of *Schistosoma mansoni* . *Acta Tropica* 111: 82–85
9. Wang W, Wang L, Liang Ys (2012). Susceptibility Or Resistance Of Praziquantel In Human Schistosomiasis: A Review. *Parasitol Res* 111: 1871–1877
10. Couto F, Coelho P, Araújo N, Kusel J, Katz N, Jannotti-Passos L, Mattos A (2011). *Schistosoma mansoni*: A Method For Inducing Resistance To Praziquantel Using Infected *Biomphalaria glabrata* Snails. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 153-157
11. Doenhoff, M. J., Kusel, J. R., Coles, G. C., & Cioli, D. (2002). Resistance Of *Schistosoma mansoni* To Praziquantel: Is There A Problem? *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* , 96: 465-469.
12. Ferrari, T. C., Moreira, P. R., & Cunha, A. S. (2008). Clinical Characterization Of Neuroschistosomiasis Due To *Schistosoma mansoni* And Its Treatment. *Acta Tropica*, 108: 89-97.
13. Lambertson, P. H., Hogan, S. C., Kabatereine, N. B., Fenwick, A., & Webster, J. P. (2010). In Vitro Praziquantel Test Capable Of Detecting Reduced *In Vivo* Efficacy In *Schistosoma mansoni* Human Infections. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* , 83: 1340-1347
14. Midzi, N., Sangweme, D., Zinyowera, S., Mapingure, M., Brouwer, K., Kumar, N., *Et Al.* (2008). Efficacy And Side Effects Of Praziquantel Treatment Against *Schistosoma haematobium* Infection Among Primary School Children In Zimbabwe. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* , 102: 759-766.
15. Dajem S, Ibrahim E, Al-Quraishy S, Mostafa O (2011). Fingerprint Of *Biomphalaria arabica*, The Intermediate Host Of *Schistosoma mansoni* In Saudi Arabia, Using Rapid-PCR. *Gene* 485: 69–72
16. Shalaby L., Gherbawy, Y, Banaja A (2011). Genetic Diversity Among *Schistosoma mansoni* Population In The Western Region Of Saudi Arabia. *Tropical Biomedicine* 28: 90–101
17. Sire C, Durand P, Pointier J-P, Theron A (2001). Genetic Diversity Of *Schistosoma mansoni* Within And Among Individual Hosts (*Rattus Rattus*): Intrapopulation Differentiation At Microspatial Scale. *International Journal For Parasitology* 31: 1609–1616
18. Stothard, J. R., Hughes, S., & Rollinson, D. (1996). Variation Within The Internal Transcribed Spacer (Its) Of Ribosomal Dna Genes Of Intermediate Snail Hosts Within The Genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Acta Tropica*, 61(1):19-29
19. Tsai, M.-H., Marx, K. A., Ismail, M. M., & Tao, L.-F. (2000). Randomly Amplified Polymorphic Dna (Rapid) Polymerase Chain Reaction Assay For Identification Of *Schistosoma mansoni* Strains Sensitive Or Tolerant To Anti-Schistosomal Drugs. *Journal Of Parasitology*, 86(1): 146-149.
20. Oliveira A, Silva D, Zanotti-Magalhaes E, Abdel-Hamid A, Ribeiro-Paes J (2008). Schistosome/Mollusk: Genetic Compatibility. *Genet. Mol. Res.* 7: 518-526
21. Spada Rgm, Silva D, Abdel-Hamid A-Z, Sobral-Hamaguchi Ss, Zuim Nrb, Zanotti-Magalhaes Em, Magalhães La, Ribeiro-Paes Jt (2002). Genetic Markers Between *Biomphalaria glabrata* Snails Susceptible And Resistant To *Schistosoma mansoni* Infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 53-58
22. Barral, V., This P, Imbert-Estabelt D., Combes C., & Delseny M. (1993). Genetic Variability And Evolution Of The *Schistosoma* Genome Analysed By Using Random Amplified Polymorphic Dna Markers. *Mol Biochem Parasitol.*, 59(2):211-21

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não houve conflito de interesses na realização deste trabalho.