



**Análise da Variação Intra-específica em Linhagens Brasileiras
de Schistosoma mansoni (Sambon, 1907) através de RAPD-PCR
e RAP-PCR**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Claudia Moura de Melo</i> e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>Vanderlei Rodrigues</i>

Cláudia Moura de Melo

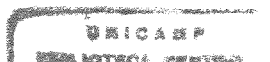
Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias

Tese apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Biologia
Da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Doutora
em Parasitologia.

Campinas
- 2001-

I



00201401

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	M491a
V.	Es.
TOMBO BC/	47186
PROC.	16-837/02
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	15-01-2002
N.º CPD	

CM00162579-7

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M491a

Melo, Cláudia Moura de

Análise da variação infra-específica em linhagens brasileiras de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) através de RAPD e RAP-PCR / Cláudia Moura de Melo. –Campinas, SP:[s.n.], 2001. 139f.:ilus

Orientador: Vanderlei Rodrigues

Co-orientador: Luiz Cândido de Souza Dias

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

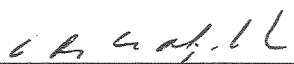
1. *Schistosoma mansoni*. 2. Polimorfismo 3.

I. Rodrigues, Vanderlei. II. Dias, Luiz Cândido de Souza.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
IV. Título.

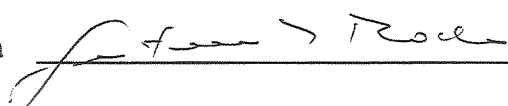
DATA DA DEFESA: 31 de agosto de 2001

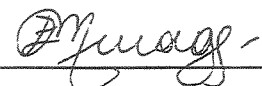
BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues 

Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães 

Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes 

Prof. Dr. Gutemberg Melo Rocha 

Prof. Dr. Eliana Maria Zanotti Magalhães 

Prof. Dr. Luiz Jacintho da Silva _____

Prof. Dra. Marlene Tiduko Ueta _____

RESUMO

Variações fenotípicas intra e inter-populacionais de *Schistosoma mansoni* ocorrem em várias áreas geográficas. A heterogeneidade genética do parasita contribui para a observada variação fenotípica na interação parasita-hospedeiro, desempenhando um importante papel na epidemiologia da doença. A diferença fenotípica mais estudada, no entanto, é a resposta a quimioterapia, visto que ela é bastante relevante para o controle da esquistossomose. Com o objetivo de observar e avaliar a variabilidade genética entre linhagens brasileiras com características distintas e inferir relações filogenéticas entre elas, o DNA foi isolado de um “pool” de vermes das linhagens BH, SJ1, SJ2, Ouh, LE e MAP. O RAPD foi processado com 5 iniciadores com seqüências de nucleotídeos aleatórias. O RAP-PCR, por sua vez, foi realizado com o intuito de observar a variabilidade em regiões codificadoras do genoma. Os dois métodos se mostraram capazes de distinguir linhagens gerando marcadores moleculares intra-específicos. Um desses marcadores foi seqüenciado e mostrou alta homologia de nucleotídeo (99%) com uma seqüência humana e 89% com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humana, proteína já correlacionada com a indução de resistência a reinfecção com *S. mansoni* e *S. haematobium*. O marcador G400-9 mostrou alta homologia de nucleotídeo, confirmada pela alta homologia de aminoácido com transposase de TN10. Outro marcador sequenciado foi o CBH300-10 que apresentou alta homologia de nucleotídeo com o gene do ribossomo 28S. Outros marcadores interessantes foram observados na linhagem tolerante Ouh: Ouh250-10 e Ouh200-11, com os iniciadores Rd10 (GGGTAACGCC) e Rd11 (GTGACTGCAG). Não detectamos marcadores específicos para a linhagem MAP, resistente ao oxamniquine, e sim um perfil eletroforético distinto com o iniciador Rd7 (TGCCGAGCTG). Na construção de árvores filogenéticas Neighbor-joining, quando foram inferidas as áreas geográficas das linhagens, obteve-se um dendograma formado por dois grupos distintos, um de linhagens paulistas e outro de mineiras. O dendograma obtido quando inferiu-se o tipo de hospedeiro intermediário revelou a formação de 3 grupos. A linhagem LE, mantida em laboratório sem retro-alimentação, pertence a um grupo externo bastante diferente dos demais. As linhagens BH, SJ1 e SJ2 foram agrupadas entre si, possivelmente em função do fluxo gênico existente entre elas, e a linhagem Ouh foi estabelecida em um terceiro grupo. Estes dois últimos grupos (um formado pelas linhagens BH, SJ1 e SJ2, e

outro pela linhagem Ouh), com linhagens de manutenção recente em laboratório ou com retro-alimentação, são mais relacionadas entre si que com a LE. Acreditamos que a maior distância genética desta linhagem em relação as outras se deva a sua longa manutenção em laboratório com fixação de determinados alelos. As relações filogenéticas observadas nas árvores Neighbor-joining corroboram as características fenotípicas distintas das linhagens e estas podem ser distinguidas e diagnosticadas por marcadores moleculares obtidos por RAPD e RAP-PCR.

ABSTRACT

Phenotypical variation intra and inter-population of *Schistosoma mansoni* occurred in several geographic areas. The genetic heterogeneity of the parasite contributes for phenotypic variation in the parasite-host interaction, representing an important role in the disease epidemiology. The more studied phenotypic difference, however, is the response to chemotherapy, so that is very relevant in the schistosomiasis control. The DNA was isolated from a pool of worms of the strains: BH, SJ1, SJ2, Ouh, LE and MAP, with the finality to observe and evaluate the genetic variability among Brazilian strains, with different characteristics, and infer phylogenetic relations among them. The RAPD was processed with 5 random primers. The RAPD-PCR was realized with the finality to observe the variability in codifying regions of genome. The two methods showed to be able to distinguish, generating molecular markers of strains. One of these markers was sequenced and showed high homology of nucleotides (99%) comparing to a human sequence and 89% with human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, protein already related to the induction of resistance to the reinfection with *S. mansoni* and *S. haematobium*. The marker G400-9 showed high homology of nucleotides confirmed for high homology of amino acid with transposase of TN10. Other marker (CBH300-10) was sequenced and presented high homology with ribosomal 28 S gene. Other interesting markers were observed in tolerant strain Ouh: Ouh250-10 and Ouh200-11, with the primers Rd10 (GGGTAACGCC) and Rd11 (GTGACTGCAG). Specific markers were not detected by us for MAP strain, resistant to oxamniquine, and a distinct PCR product profile with the primer Rd7 (TGCCGAGCTG). In the construction of phylogenetic trees Neighbor-joining, after the geographic areas of strains were inferred, a dendrogram was obtained formed by two different groups, one of paulista strains and another of mineiras. When the type of intermediate host was inferred the obtained dendrogram revealed the formation of three groups. The LE strain kept in laboratory without retro-feed, belongs to an external group very different from the others. The BH, SJ1 and SJ2 strains were grouped among them, possibly, in function of the genetic flux existent among them, and the strain Ouh was established in another group. These last two groups, with recent laboratory maintenance strains or with retro-feed, are more related among them, than to LE strain. We believed that the major genetic distance from this strain in relation to the others

should be because the long maintenance in laboratory with the establishment of the alleles. The phylogenetic relations observed in trees Neighbor-joining corroborate the different phenotypic characteristics of strains and this should be distinguished and diagnosed by molecular markers obtained by RAPD and RAP-PCR.

Um carinho para Basileu e Zerilda,

meus pais.

Meus sinceros agradecimentos...

À Universidade de Campinas (UNICAMP), pela estrutura física e operacional que permitiu a realização dessa dissertação.

À Universidade de São Paulo (USP), principalmente ao Depto. de Bioquímica e Imunologia, seus docentes e alunos, pela receptividade e facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues, pela orientação, compreensão e disponibilidade de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias, pela co-orientação, amizade e oportunidade de compartilhar valiosos ensinamentos.

Aos docentes do Departamento de Parasitologia (UNICAMP), pelos conhecimentos compartilhados. Em especial aos professores Luiz Augusto Magalhães, Marlene Tiduko Ueta e Nelson Cordeiro, pela revisão e leitura crítica do texto.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas: Arlete, Duarte, Elisândra, Fabiana, Fernanda, Márcia, Olavo, Paula, Rafael, Renata, Valéria e Wilian pelo alegre convívio diário.

Aos funcionários da UNICAMP e USP-RP: Geraldo, Ivo, João, Mara, Ronaldo e Vânia que, de uma forma ou de outra, me auxiliaram na concretização deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos Angélica, Antônio Carlos, Jeanne, Luciene, Lucinda, Rubens, Vânia e Verônica.
“Ser irmão é entrelaçar os destinos e ouvir a voz do semelhante que chama, que pede, que reclama e que chora. Ser irmão é ser feliz com a felicidade do outro, é rir com as alegrias do próximo e ser solidário nas boas e nas más horas da vida.” A vocês, meus irmãos/amigos, minha gratidão de coração.

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

Abreviaturas

I. INTRODUÇÃO

1. <u>Histórico/Evolução da doença</u>	13
2. <u>O parasita</u>	17
3. <u>Ciclo de vida</u>	17
4. <u>Genética do <i>Schistosoma</i></u>	19
5. <u>Quimioterapia</u>	21
6. <u>Resistência a drogas</u>	23
7. <u>Polimorfismo molecular</u>	27

II. MATERIAL E MÉTODOS

33

1. <u>Parasitas</u>	33
2. <u>Infecção experimental dos moluscos</u>	34
3. <u>Infecção experimental dos camundongos</u>	34
4. <u>Coleta dos parasitas</u>	35
5. <u>Extração de DNA genômico</u>	35
6. <u>Quantificação espectrofotométrica e análise de pureza dos ácidos nucleicos</u>	36
7. <u>Reações de RAPD</u>	36
8. <u>Iniciadores aleatórios (Primers)</u>	38
9. <u>Eletroforese em gel de agarose</u>	38
10. <u>Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes e coloração com nitrato de prata</u>	38
11. <u>Análise dos produtos de RAPD</u>	39
12. <u>Extração de RNA</u>	40
13. <u>Gel de agarose para RNA</u>	40
14. <u>RAP-PCR</u>	41
15. <u>Recuperação dos fragmentos de DNA amplificado</u>	42
16. <u>Reação de ligação dos fragmentos de DNA no vetor pGEM-T</u>	42

17. <u>Preparação de células componentes</u>	43
18. <u>Transformação de células componentes</u>	43
19. <u>Mini-preparações plasmidiais</u>	44
20. <u>Digestão com as enzimas de restrição <i>Eco</i> RI para avaliação do tamanho do Inseto</u>	45
21. <u>Sequenciamento automático</u>	45
22. <u>Análises computacionais</u>	45
23. <u>Outros coeficientes de similaridade usados</u>	46
III. RESULTADOS	47
1. <u>Obtenção do DNA genômico</u>	47
2. <u>Análise da diversidade genética utilizando RAPD-PCR</u>	47
3. <u>Análise filogenéticas</u>	55
4. <u>RAP-PCR</u>	61
5. <u>Caracterização da expressão sexo-específica</u>	62
6. <u>Sequenciamento e análise computacional das seqüências</u>	70
IV. DISCUSSÃO	74
1. <u>Aspectos gerais da variabilidade</u>	74
2. <u>A variabilidade do <i>Schistosoma mansoni</i></u>	75
3. <u>A variabilidade no hospedeiro intermediário</u>	79
4. <u>A variabilidade na esquistossomose humana</u>	82
5. <u>Análise do polimorfismo genético através do RAPD-PCR</u>	84
6. <u>Análises filogenéticas</u>	87
7. <u>Análise da variabilidade intra-específica através do RAP-PCR</u>	94
8. <u>Marcadores sexo-específicos</u>	95
9. <u>Sequenciamento de fragmentos polimórficos</u>	96
V. CONCLUSÕES	99
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
APÊNDICE	129

ABREVIATURAS

µg: Micrograma(s)

µl: Microlitro(s)

cDNA: DNA complementar

dNTP: Deoxinucleotídeo trifosfato

CTAB: Brometo de hexadeciltrimetilamônio

DEPC: Dietilpirocarbonato

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

Kb: Quilobase – 1 Kb equivale a 1000 pares de bases

NJ: Vizinho mais próximo

OD: Densidade ótica

OTU: Unidade taxonômica operacional

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

RAP: RNA amplificado aleatoriamente

RAPD: amplificação aleatória de fragmentos de DNA polimórficos

I. INTRODUÇÃO

1. Histórico/Evolução da doença

Sabe-se hoje, sem a menor dúvida, que as esquistossomoses são doenças humanas antigas. Este fato foi comprovado por achados de ovos de *Schistosoma* em múmias egípcias e chinesas do ano 3.500 a.C. (AMARAL & PORTO, 1994) e por hieróglifos representando a hematúria no papiro de Kahun (FAROOQ, 1973).

O reconhecimento das diferentes espécies de agentes etiológicos das esquistossomoses começa com a descoberta de Theodore Bilharz, médico e biólogo alemão, que migrou para o Egito em 1850 onde posteriormente foi contratado como professor de anatomia na Cidade do Cairo. Durante a realização de uma autópsia de um indivíduo do sexo masculino, Bilharz isolou, em 1851, um parasita do sistema porta-hepático. Tratava-se de um trematódeo ainda não descrito e que por apresentar um nítido dimorfismo sexual e habitat intravascular, foi denominado *Distomum haematobium*. O relato desse estudo foi publicado em uma revista de zoologia alemã no ano seguinte (JARCHO, 1968). Alguns anos depois (1858), Weiland sugeriu a denominação *Schistosoma*, em função da fenda corporal característica apresentada pelos machos (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987). No ano seguinte, Cobbold, pretendendo homenagear Bilharz, propôs a denominação *Bilharzia* para o gênero; todavia acabou por prevalecer a denominação *Schistosoma*, sobretudo em respeito às regras de nomenclatura científica (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987). Em 1907, SAMBON descreveu o *Schistosoma mansoni*, cujos ovos têm espículo lateral, como uma espécie distinta do *Schistosoma haematobium*, cujos ovos têm espículo terminal. As observações desse autor foram independentemente vistas por Pirajá da Silva, na Bahia, mas a denominação da espécie coube a Sambon. As descobertas que se seguiram a esses achados permitiram a identificação das diferentes espécies do gênero *Schistosoma*, a compreensão dos seus ciclos de transmissão e o papel de hospedeiro intermediário desempenhado pelas diferentes espécies de moluscos (AMARAL & PORTO, 1994).

A antiga relação *Schistosoma*-homem atingiu um nível de desequilíbrio tão favorável ao parasita que o homem proporciona aos vermes adultos proteção física e nutrientes suficientes

para que eles sobrevivam por até mais de vinte anos, inclusive produzindo ovos. Ao lançar os ovos do *Schistosoma* no meio ambiente, o homem funciona, durante todo o tempo de vida do verme, como agente favorecedor da sua perpetuação e como fonte disseminadora da doença. Estabelecidas essas relações é fácil compreender porque a esquistossomose é uma das doenças mais difundidas no mundo. As correntes migratórias que se processam, na maioria das vezes, de maneira caótica e sem os devidos cuidados sanitários, promovem a dispersão das populações humanas, fazendo com que os portadores da parasitose disseminem a doença (AMARAL & PORTO, 1994). Atualmente, a esquistossomose é endêmica em 76 países, sendo a segunda endemia parasitária do mundo, depois da malária (WHO, 1991).

Acredita-se que a esquistossomose foi introduzida no Brasil, a partir dos portos de Salvador e Recife, com o estabelecimento do modo de produção escravagista na cultura da cana, em meados do século XVI. Algumas décadas depois do descobrimento, já havia referência à chegada de navios com escravos africanos, oriundos de região endêmica. Estabelecidos os primeiros focos, a doença dispersou-se inicialmente por contiguidade. Posteriormente, propagou-se à distância devido as migrações internas, impulsionadas pelos ciclos econômicos da borracha, café e ouro, e a distribuição dos moluscos suscetíveis (LOUREIRO, 1989; AMARAL & PORTO, 1994).

Durante anos a esquistossomose permaneceu incógnita no Brasil, até que o médico baiano Pirajá da Silva reconheceu sua existência no país, em 1907, e descreveu, em 1908, o verme adulto do *S. mansoni*. Esta é a única espécie que encontrou condições de adaptação nas Américas (AMARAL & PORTO, 1994). Em nosso país, estima-se que existam 30 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção (WHO, 1993) e 6-7 milhões de portadores (KATZ & PEIXOTO, 2000), sendo esta a terceira causa de óbito entre as grandes endemias rurais brasileiras. Ela é popularmente conhecida como “xistose”, “barriga d’ água” e “mal do caramujo”.

Nos anos que antecederam ao aparecimento de medicamentos que pudessem ser usados em larga escala no tratamento da esquistossomose, o controle dessa endemia se baseava quase que exclusivamente no combate aos moluscos, o que restringia bastante o tratamento dos portadores (AMARAL & PORTO, 1994). Este combate ficou limitado praticamente aos métodos químicos (sulfato de cobre, pentaclorofenato de sódio e niclosamida) e, em menor escala, aos métodos

físicos (aterro de coleções hídricas inúteis, limpeza e retirada da vegetação aquática etc) (FARIAS, 1968), uma vez que as técnicas de controle biológico testadas experimentalmente não puderam, até hoje, ser utilizadas eficazmente em condições de campo (AMARAL & PORTO, 1994). De qualquer modo, o controle do molusco é um meio rápido e efetivo reduzir a transmissão da doença, uma vez que embora o miracídio penetre em várias espécies de molusco, existe um alto nível de especificidade do *Schistosoma* aos seus hospedeiros intermediários.

As migrações humanas no sentido rural-urbano, como vem acontecendo no Brasil, na medida em que dissemina e aumenta o número de portadores, pode estar favorecendo o aumento de outras manifestações clínicas relacionadas à esquistossomose, como o agravamento da hepatite B, salmonelose e neuroesquistossomose. Por outro lado a migração rural-urbana contribui para a diminuição do número das formas graves hepato-intestinais e hepato-esplênicas e consequente mortalidade, ocasionado pela diminuição da frequência de exposição à doença e pela possibilidade de maior acesso ao tratamento da população urbana (AMARAL & PORTO, 1994).

Considerando o poder de mobilidade da população brasileira nos tempos atuais e a melhoria das condições sanitárias, em menor ou maior grau, a extensão da endemia fica dependendo da distribuição dos hospedeiros invertebrados e, principalmente, da variação da suscetibilidade ao *S. mansoni* de diferentes linhagens de planorbídeos capazes de atuar como hospedeiro intermediário. As três espécies de importância epidemiológica, no Brasil, são: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*. A *B. glabrata* é o hospedeiro mais eficiente, presença sempre associada à esquistossomose, seja nas extensas áreas endêmicas ou em pequenos focos de transmissão. A *B. straminea* embora considerada hospedeiro intermediário menos eficiente, em condições de laboratório em comparação com linhagens suscetíveis de *B. glabrata* (CNPq, 1978), é considerada muito importante no nordeste, do ponto de vista epidemiológico, devido a sua ampla distribuição e por estar associada a elevados índices de infecção humana e formas graves da doença (CNPq, 1978; PARAENSE, 1992). A *B. tenagophila*, a menos eficiente das três espécies, é própria do sul do país, principalmente São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Santa Catarina.

O desenvolvimento bem sucedido de *S. mansoni* em *B. glabrata* é influenciado pelas características genéticas do parasita (BASCH, 1975) e do molusco (PARAENSE & CORRÊA, 1963a). Ainda de acordo com BASCH (1975), o sucesso deste desenvolvimento está associado principalmente à conformação molecular do esporocisto que governa a capacidade do hospedeiro em detectá-lo como corpo estranho, apresentando uma reação amebocitária ao seu redor. A compreensão da genética envolvida nesta complexa relação parasito-hospedeiro tem levado frequentemente a discussões sobre métodos de introdução de *B. glabrata* resistente no campo como um meio de controle biológico do parasita. Para o molusco, sua suscetibilidade juvenil ao parasita é controlada pelo menos por quatro genes, considerando que um gene parece ser responsável pela suscetibilidade do adulto.

McCUTCHAN et al. (1984) distinguiram linhagens de *S. mansoni* que exibiam diferentes índices de infectividade para o molusco, baseando-se no padrão de bandas gerado pela hibridização de primers de rRNA no Southern blot.

Obtendo DNA da progênie F2 de moluscos oriundos de cruzamentos parentais entre caramujos resistentes e suscetíveis ao parasito, LEWIS (1995) tem pesquisado marcadores moleculares para fenótipos resistentes ou suscetíveis. Utilizando RFLP, ele não tem encontrado marcadores, entretanto, com RAPD, muitos resultados promissores têm sido observados, como um marcador de 1,3 Kb que aparece em todas as progênies resistentes e outro de 1,1 Kb que aparece em todas as progênies suscetíveis.

Devemos levar em conta, também, que a pressão seletiva do hospedeiro (LOVERDE et al., 1985) e a diminuição da variabilidade genética são aspectos importantes no estudo das linhagens recém-isoladas e daquelas mantidas rotineiramente em laboratório. A variabilidade genética, em termos de rRNA foi observada entre linhagens brasileiras de *Schistosoma* derivadas de um hospedeiro definitivo infectado ou de pequenas amostras de cercárias coletadas no campo (efeito fundador) (VIEIRA et al., 1991). Esses autores sugerem que exista maior heterogeneidade em populações naturais que naquelas mantidas em laboratório. Isto pode resultar, pelo menos em parte, de seleção induzida pelo hospedeiro vertebrado, levando a uma diminuição da variabilidade genética do parasita, devido à fixação de um ou outro alelo envolvido na manifestação de determinado caráter. Uma linhagem recém-isolada ou mantida há

pouco tempo em laboratório retrataria mais fielmente o que ocorre no campo (VIEIRA et al., 1991).

2. O parasita

O parasita é um trematódeo (“ corpo com orifícios “) do gênero *Schistosoma*, família Schistosomatidae, sub-classe Digenea e classe Trematoda, de habitat intravascular no homem ou em outros hospedeiros vertebrados. A característica principal da família é o acentuado dimorfismo sexual. Doze gêneros são descritos na família Schistosomatidae, dos quais cinco infectam mamíferos e apenas o gênero *Schistosoma* está associado ao homem. No gênero *Schistosoma*, cinco espécies podem infectar o homem: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mekongi*. A distinção entre elas está baseada em critérios morfológicos, bioquímicos, parasitológicos e patológicos.

O verme macho apresenta estrutura anatômica adaptada para conter e manter uma estreita relação com a fêmea. A parte anterior do seu corpo é curta e cilíndrica, na qual encontra-se um par de ventosas que permite a fixação do parasita no interior das veias mesentéricas do intestino. A parte posterior é larga e dobrada no sentido do eixo longitudinal, formando uma fenda denominada canal ginecóforo. O tegumento do macho apresenta tubérculos e espículas que facilitam a sua fixação na luz das veias mesentéricas. Ele funciona como uma interface entre o parasita e o hospedeiro, constituindo-se na principal linha de defesa contra os mecanismos imunitários. As fêmeas são estrutural e fisiologicamente bastante diferentes dos machos, estando sua anatomia envolvida na produção de ovos. Elas são filiformes, mais longas que o macho e exibem também ventosas oral e ventral.

3. Ciclo de vida

O *S. mansoni* possui um ciclo biológico (Esquema 01) do tipo heteroxênico com alternância de gerações, diferentes estágios de desenvolvimento e duas formas aquáticas livres. Estas características refletem a existência de dispositivos adaptativos finamente regulados e que ilustram a versatilidade metabólica do esquistossoma.

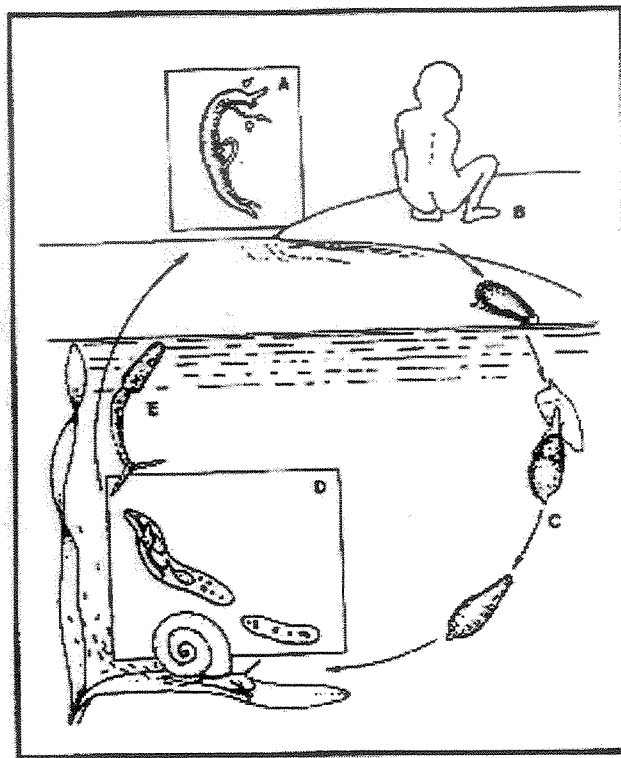
Os vermes atingem o estágio adulto no hospedeiro definitivo (homem, principalmente), onde produzem ovos. Estes, uma vez em contato com água doce, e sob uma série de fatores tais como a baixa pressão osmótica, presença de luz e temperatura entre 25°C e 30°C, eclodem liberando a primeira forma livre do parasita, o miracídio. Esta forma embrionária nada livremente até encontrar o hospedeiro intermediário, onde iniciará um estágio multiplicativo assexuado (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987). A penetração ocorre via pés e antenas do caramujo em 70% de casos, entretanto pouco se sabe sobre os mecanismos que permitem a localização e penetração ativa do miracídio no hospedeiro intermediário. Dois dias após a penetração, o miracídio desenvolve-se em esporocisto primário, uma estrutura composta por células germinativas limitadas por um tegumento. Após a exposição do caramujo, o esporocisto primário rompe-se liberando até 500 esporocistos secundários, cada qual contendo uma nova geração de aproximadamente 100 células germinativas. Estes esporocistos secundários migram através do sistema hemolinfático do hospedeiro intermediário até atingirem o hepatopâncreas ou o ovotestis, onde darão origem às cercárias, cerca de trinta dias após a infecção.

A cercária é a segunda forma larvar livre do ciclo e também aquela que infecta o homem. Elas abandonam o caramujo, provavelmente em resposta à um estímulo termo-fotoquímico, e nadam ativamente até encontrarem o hospedeiro definitivo. São atraídas pelos lipídios da pele deste e liberam várias enzimas hidrolíticas armazenadas nas glândulas preacetabulares, o que permite sua invasão através do tecido. Durante a penetração a cercária perde a cauda e o glicocálix que reveste seu tegumento, dando origem ao esquistossômulo. Após três a quatro dias na camada subcutânea, ele realiza uma complexa migração até se alojar nos vasos do sistema porta-hepático. Durante a migração pelos pulmões, sofrem modificações em sua superfície externa que eventualmente o tornam resistente à ação do sistema imune do hospedeiro (BASCH & SAMUELSON, 1990).

Após a passagem pelos pulmões, o esquistossômulo migra para o sistema porta-hepático 6-7 dias após a infecção, etapa na qual ocorre o pareamento entre parasitas imaturos de sexos opostos. O casal de parasitas migra para as veias mesentéricas onde completa o amadurecimento e ocorre a postura dos primeiros ovos, cerca de 5 semanas após a infecção. A fêmea madura é capaz de produzir um ovo a cada cinco minutos, que podem atingir a corrente sanguínea alojando-se em diversos órgãos, ou então atravessar a mucosa intestinal sendo eliminados com as fezes. A

produção de ovos pelo casal de vermes é o principal evento responsável pela maior parte do processo patológico na esquistossomose. A deposição de ovos pelos parasitas provoca a formação de granuloma no fígado e em outros órgãos que culminam, em vários casos, em hepatoesplenomegalia e hipertensão portal (DIAS NETO et al., 1993b).

A presença de fezes contaminadas na água doce na vizinhança de uma comunidade, juntamente com a ocorrência local de um caramujo permissivo, completa o ciclo vital do esquistossoma.

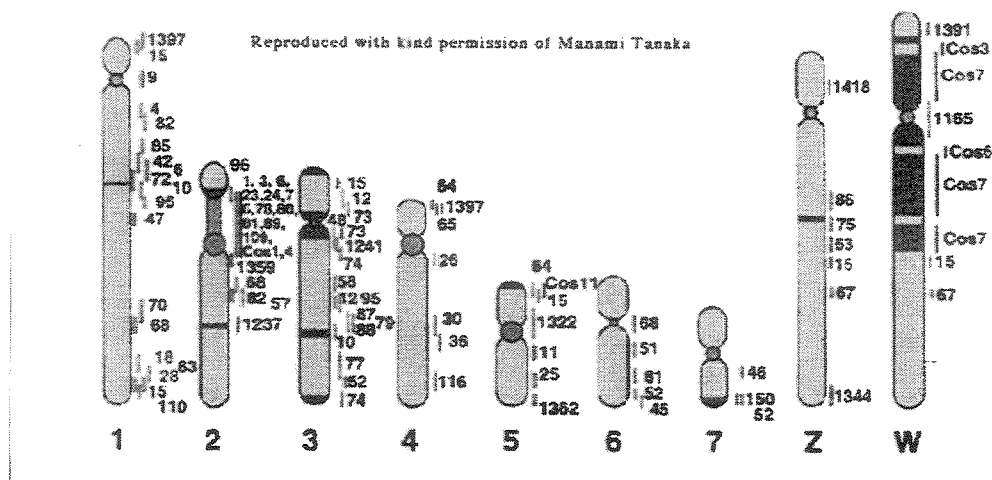


Esquema 01. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*
A) Vermes adultos acasalados, B) Ovos eliminados com as fezes,
C) Miracídio, D) Esporocisto primário e esporocistos secundários
E) Cercárias (REY, 1991)

4. Genética do *Schistosoma*

O *Schistosoma mansoni* é um trematódeo digenético dióico cujo genoma nuclear compreende $2,7 \times 10^8$ pares de bases (SIMPSON et al., 1982). Ele possui poucos introns e é composto de 4-8%

de sequências altamente repetitivas e de 60% de sequências presente em uma única cópia, e é particularmente rico em A e T (66%). O gênero *Schistosoma* possui 7 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais (macho homogamético ZZ e fêmea heterogamética ZW) (SHORT et al., 1980; GROSSMAN et al., 1981) (Esquema 02).



Esquema 02. Mapa cromossômico do *Schistosoma mansoni*
(TANAKA et al, 1995)

Os vermes do gênero *Schistosoma* são considerados modelos ideais para o desenvolvimento de estratégias de mapeamento genético porque eles têm um tamanho pequeno de genoma (270 Mb) comparável a modelos bem caracterizados tais como *Caenorhabditis elegans* (100 Mb) e *Drosophila* (165 Mb), e contêm genes funcionais com alta homologia aos genes de hospedeiros mamíferos (CAPRON et al., 1992; MAIZELS et al., 1993).

O complexo ciclo de vida do parasita implica em numerosas mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, sendo seu genoma regulado por uma expressão diferencial de genes. Além dos genes constitutivos, pode-se esperar a existência de dois grupos: um primeiro grupo regulado pelo stress (térmico, osmótico ou oxidativo) e o segundo regulado ao longo do desenvolvimento do parasita (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987).

Foi descrito em *S. mansoni* a presença de introns muito pequenos (30-50 pb) (DUVAUX-MIRET et al., 1991; ROCHE et al., 1994), genes com introns de tamanho superior a 3 Kb, como é o caso da glutathione peroxidase (ROCHE et al., 1994) e da glutathione S-transferase 28 KDa (Sm

28GST), (McNAIR et al., 1993) e genes que não possuem introns, por exemplo aqueles que codificam as proteínas da casca do ovo (BOBEK et al., 1988, 1989). Devido a seu potencial como alvo para imunoterapia e quimioterapia, as enzimas GSTs têm sido muito estudadas. A Sm28GST é a mais abundante, representa 2-4% das proteínas totais do verme adulto, e mostrou ser o principal antígeno do parasita. A imunização com a enzima purificada ou recombinante induziu proteção contra a infecção em diferentes modelos experimentais (BALLOUL et al., 1987a, 1987b; BOULANGER et al., 1991).

5. Quimioterapia

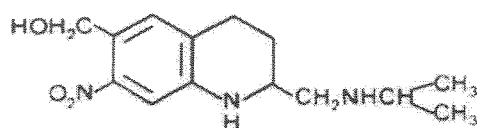
O tártaro emético, droga usada anteriormente, causava elevada toxicidade e tinha que ser administrada por via parenteral, sob supervisão médica (CHRISTOPHERSON, 1918). As pesquisas empíricas avançaram, portanto, no sentido de sintetizar drogas ativas, administradas por via oral e livres de metal. Várias drogas foram utilizadas e atualmente a Organização Mundial da Saúde sugere o metrifonato, oxamniquine e praziquantel (Esquema 03) como as principais drogas para o tratamento das esquistossomoses humanas (WHO, 1993), sendo as duas últimas as drogas de escolha na terapêutica da esquistossomose mansônica. Principalmente depois de 1970, com o surgimento do oxamniquine, o tratamento dos portadores ganhou relevância como medida de controle da esquistossomose porque essa droga é mais eficaz, mais segura e de fácil administração (AMARAL & PORTO, 1994). O praziquantel, por sua vez, possui menor custo de produção (LI et al., 2001).

Após mais de 20 anos de programas de controle da esquistossomose em nosso país, a quimioterapia tem se mostrado uma importante ferramenta para o controle da morbidade e diminuição da prevalência e incidência em áreas endêmicas (KATZ, 1998). Todavia, a médio e longo prazos, sanitização, abastecimento de água, drenagem de esgotos e educação sanitária parecem ser as verdadeiras ferramentas quando o objetivo é o controle persistente e definitivo da esquistossomose (KATZ, 1998).

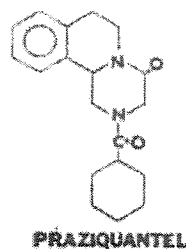
O largo uso dos quimioterápicos no tratamento e controle de doenças infecciosas ao longo deste século pode ser apontado como fator principal no desenvolvimento da resistência a drogas. O controle das esquistossomoses humanas poderia ser mais bem sucedido, se realizado por meio

de ações conjugadas, sendo as drogas apenas uma das medidas auxiliares na profilaxia da doença juntamente, por exemplo, com controle de moluscos e educação em escolas e hospitais como na China (LI et al., 2001). Em 1971, ROGERS & BUEDING – para quem a resistência é geneticamente transferida – relataram pela primeira vez a ocorrência, em laboratório, de esquistossomos resistentes a drogas. Em 1973, no Brasil (DIAS et al, 1978b, KATZ et al., 1973), e em 1987, no Quênia, apareceram os primeiros relatos de resistência de linhagens de *S. mansoni* isoladas de pacientes que, apesar de tratados, não lograram cura parasitológica.

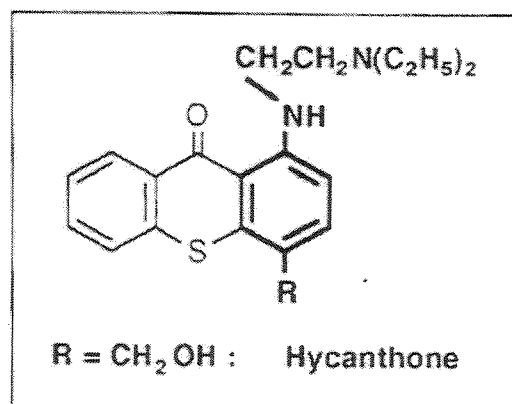
As pesquisas atuais de procura de novas drogas devem, portanto, levar em consideração o fenômeno da resistência aos esquistossomicidas.



Oxamniquine (Pfizer Inc.). Principal activity: *S. mansoni*.



PRAZIQUANTEL



Esquema 03. Drogas esquistossomicidas

6. Resistência a drogas

Espécie, sexo e estágio de desenvolvimento são fatores importantes na suscetibilidade do parasita aos esquistossomicidas. O oxamniquine, por exemplo, mata preferencialmente parasitas machos e o praziquantel, vermes fêmeos (DELGADO et al., 1992). Todavia, deve-se ressaltar que essas características não podem ser confundidas com resistência, que implica na redução da sensibilidade à droga (MARSHALL, 1987). A resistência ocorre quando uma população infectada, previamente suscetível, não responde bem à dose terapêutica usual de uma droga. Esta perda de sensibilidade é geneticamente transferida. A alteração no gene pode levar a uma resistência parcial (tolerância) ou total (resistência). Em termos evolutivos, mutação e seleção também são fenômenos decisivos na produção de resistência a drogas. Já a tolerância está presente em uma população de organismos que nunca respondeu adequadamente à terapêutica (DAVIS, 1993). Tais diferenças são teóricas, pois, do ponto de vista prático, tolerância e resistência têm o mesmo valor clínico.

Teoricamente, a resistência à droga pode ser classificada como intrínseca (natural) ou adquirida. Do ponto de vista prático, a distinção pode ser feita determinando se o organismo ou célula em questão era resistente na época que o tratamento começou (resistência intrínseca) ou se inicialmente era sensível e se tornou resistente após o tratamento (resistência adquirida).

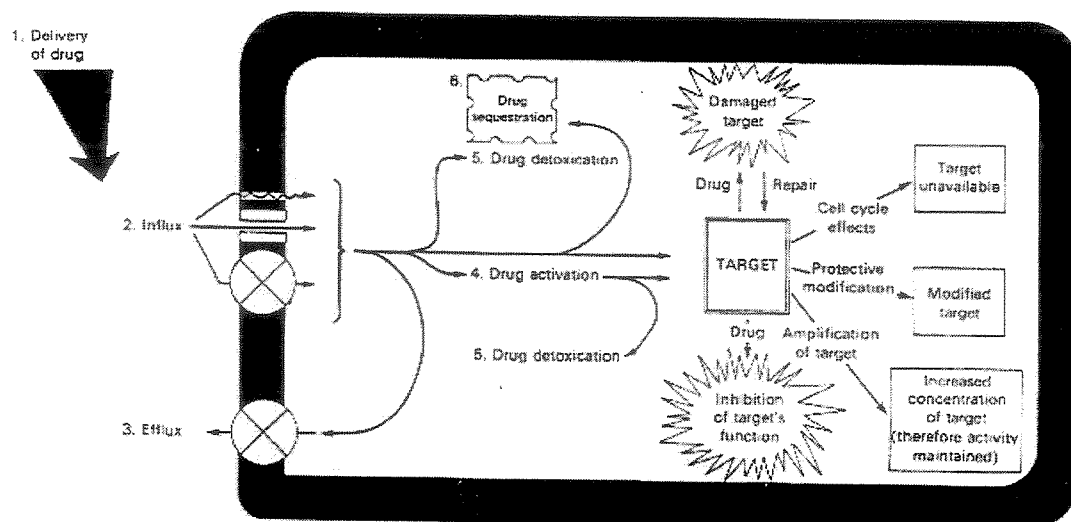
A resistência intrínseca descreve uma situação onde um organismo, ou célula, possui uma característica que permite a todos os membros da espécie tolerar uma determinada droga ou ambiente químico. Neste caso, a característica responsável pela resistência é inerente, própria da espécie que surgiu através de processos evolutivos. Os seres vivos habitam um ambiente adverso no qual todos os organismos têm que se proteger para assegurar a continuidade da existência. Assim sendo, todos os organismos vivos vão exibir graus variados de resistência intrínseca aos componentes aos quais estão normalmente expostos. Já o termo resistência adquirida é usado para descrever os casos onde um organismo resistente pertence a uma população anteriormente sensível à droga. A característica biológica responsável pela resistência pode não estar expressa na maior parte da população ou mesmo estar ausente.

A distinção entre resistência adquirida por meio de seleção natural e resistência intrínseca a droga é baseada na frequência com a qual o gene mutado é observado na população em questão.

Estas mudanças ocorrem independentemente da exposição à droga e fazem parte da variação biológica. Em muitos casos de resistência adquirida, a seleção natural, juntamente com a mutação e variação biológica, é o processo mais provável para explicar o fenótipo resistente.

Os principais tipos de alterações genéticas que podem estar envolvidos no mecanismo da resistência adquirida são: mutações e amplificações de genes específicos diretamente envolvidos no padrão de proteção; mutações em genes que regulam processos de resposta ao stress e levam à expressão alterada de várias proteínas; e transferência de genes (HAYES & WOLF, 1990). Consequentemente, estes mecanismos genéticos podem gerar vários mecanismos bioquímicos (Esquema 04): redução e absorção da droga, diminuição do transporte da droga, aumento da desativação da droga, sequestro da droga para evitar interação com o sítio alvo e; aumento intracelular, alterações estruturais, duplicação das funções e aumento de reparo dos sítios alvo (HAYES & WOLF, 1990).

A resistência a drogas resulta da variabilidade genética. Podemos considerar quatro aspectos dessa variabilidade que estão relacionados à resistência a drogas: ela é grande na população e se expressa fenotipicamente por meio de alterações fisiológicas, morfológicas, de comportamento etc; possibilita que os indivíduos de uma população enfrentem alterações ambientais, permitindo sua sobrevivência, reprodução e adaptação a novas circunstâncias; é a matéria-prima sobre a qual a seleção age e produz novas populações e eventualmente novas formas; é resultante de mutações que ocorrem espontaneamente (DIAS & GONÇALVES, 1992).



Esquema 04: Mecanismos bioquímicos da resistência a drogas
(HAYES & WOLF, 1990)

Quando uma substância estranha, um agente esquistossomicida por exemplo, é introduzida em uma população, um ou mais genes pode possibilitar que os indivíduos resistam aos efeitos da droga e se reproduzam. Se a frequência gênica for alta e a pressão seletiva se mantiver, a população – por ausência de fatores diluidores, tais como migração e mutação reversa – pode apresentar grande número de indivíduos resistentes à droga. Se a frequência gênica e a pressão da droga forem pequenas, uma discreta resistência pode lentamente aparecer. Não havendo gene para a resistência quando a substância for introduzida, principalmente mutagênica, há ainda a possibilidade de incorporar mutações espontâneas no decorrer da seleção. Desse modo, mais cedo ou mais tarde, poderá surgir uma população resistente (DIAS & GONÇALVES, 1992).

O isolamento de linhagens de *S. mansoni* que são geneticamente resistentes ao hycanthone (droga empregada até 1976) e ao oxamniquine tem sido reportado tanto no campo, quanto em laboratório (ROGERS & BUEDING, 1971; KATZ et al., 1973; CAMPOS et al., 1976; DIAS et al., 1982; GUIMARÃES et al., 1979; COLES et al., 1987).

BRINDLEY et al. (1989) usaram seqüências de rRNA como iniciadores para investigar a base genética da resistência ao hycanthone induzida pela exposição de vermes imaturos à droga. Como ocorre resistência cruzada entre hycanthone e oxamniquine, é possível que as alterações genéticas associadas à expressão de resistência ao oxamniquine podem ser semelhantes àquelas

descritas para o hycanthone. Marcadores genéticos para resistência à esquistossomicidas foram estudados por BRINDLEY et al. (1991) que demonstraram alterações no gene 18S de rRNA relacionadas com a indução experimental desta resistência ao tratamento com hycanthone. Este dado parece correlacionar alterações ao nível do DNA e a resistência à drogas em determinadas linhagens de *S. mansoni*.

CIOLI et al. (1992) analisaram geneticamente duas linhagens (BRR e MAP) do parasita resistentes ao oxamniquine/hycanthone e observaram que ambas sofreram mutações no mesmo gene. Essa mutação causa a falta de um fator (ou fatores) necessário para que a droga aja (CIOLI et al., 1993). Um destes fatores, já determinado, é uma enzima capaz de catalizar ligações covalentes entre a droga e macromoléculas do parasita (PICA-MATTOCCIA et al., 1992). Como o mecanismo bioquímico da ação da droga ainda não é bem conhecido, seria interessante determinar se diferentes linhagens resistentes são afetadas na mesma função do gene (indicação que a droga age em uma única etapa) ou se elas são afetadas em diferentes funções (indicação que a droga age em várias etapas). Essa questão só poderá ser respondida quando for determinada a sequência completa dos genes envolvidos na síntese dessas enzimas. Além disso, a suscetibilidade de diferentes linhagens a drogas esquistossomicidas deve ser avaliada em diferentes áreas endêmicas, não somente para determinar possível resistência de linhagens locais, mas também para avaliar a época e dosagem mais conveniente para aplicação da droga (DELGADO et al., 1992). A ocorrência de linhagens de *S. mansoni* resistentes ou com baixa sensibilidade a droga usual representa um grande problema de saúde pública, especialmente se a droga é considerada para tratamento de massa (DIAS et al., 1982).

O praziquantel, amplamente considerada a mais efetiva droga para o tratamento da esquistossomose, tem produzido um surpreendente baixo nível de cura e um grande número de efeitos colaterais severos (cólica, vômito, urticária e edema) em uma comunidade do norte do Senegal. Os efeitos colaterais, encontrados em 3/4 dos pacientes tratados, normalmente são suaves e raramente ocorrem em mais que 20% dos pacientes. A incidência e severidade dos efeitos colaterais, neste caso, estão correlacionados com a intensidade da infecção pelo *S. mansoni*. Os epidemiologistas acreditam que os poucos resultados do tratamento com praziquantel não são provavelmente devido a resistência do *Schistosoma* à droga, que é de introdução recente na área, e sim à infecção extremamente rápida - uma possibilidade favorecida pela intensidade da

epidemia na área - ou a perda da imunidade nesta população (o praziquantel é conhecido por agir sinergisticamente com imunidade anti-Schistosoma) (TDR news, 1992). FALLON et al. (1997), no entanto, confirmaram que a linhagem de Senegal é completamente suscetível ao oxamniquine e que sua tolerância ao praziquantel poderia ser atribuída ao estágio de maturação do parasita na época da administração da droga.

7. Polimorfismo molecular

Até os anos 50, as análises morfológicas representaram a mais importante fonte de dados nas pesquisas taxonômicas, filogenéticas e evolutivas. O grande salto qualitativo nas técnicas eletroforéticas, determinado pela produção do gel de amido (SMITHIES, 1955) associado aos métodos histoquímicos para coloração de enzimas levaram, segundo MURPHY et al. (1990), a uma verdadeira revolução nos processos micro e macroevolutivos.

As análises eletroforéticas de isoenzimas trouxeram grande contribuição e representaram, durante anos, a mais eficiente abordagem para o conhecimento da variabilidade genética a nível molecular, tanto em animais quanto em vegetais (BUTH, 1984; MURPHY et al., 1990). Deve-se a FLETCHER et al. (1981) o primeiro estudo detalhado sobre polimorfismos enzimáticos em *S. mansoni*. Analisando 14 sistemas izoenzimáticos, os autores concluíram que as diferenças genéticas entre parasitas provenientes de várias regiões geográficas (África, sudeste asiático, América do Sul e Índia) era pequena.

Polimorfismos de DNA detectados por iniciadores aleatórios através da reação em cadeia de polimerase (PCR) têm se mostrado marcadores genéticos úteis no estudo de uma grande variedade de organismos procariontes e eucariontes (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990). O RAPD-PCR envolve amplificação de fragmentos de DNA genômico com iniciadores curtos e únicos de sequências arbitrárias (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990). Espera-se que a maior parte dos produtos dessa amplificação sejam idênticos em indivíduos de espécies únicas. Uma pequena proporção é polimórfica, sendo as formas variantes mostradas pela presença ou ausência de bandas amplificadas em diferentes linhagens de parasitas, ou por variações em seu tamanho ou intensidade devido a diferenças nos sítios de ligação do iniciador causadas por mutações, deleções ou inserções de sequências de

DNA (CARLTON et al., 1995). O método RAPD (WILLIAMS et al., 1990) tem grande importância em epidemiologia, ecologia, saúde e agricultura por identificar o grau de similaridade existente entre as amostras, além de ser rápido, de baixo custo e aplicável a qualquer amostra em que o DNA possa ser extraído. O RAPD é produzido usando o PCR com iniciadores escolhidos arbitrariamente que são anelados ao “ template “ (derivado do parasita) a baixas temperaturas (STEINDEL et al., 1994). Esta técnica permite exame de grande número de loci genéticos independentes não correspondentes a sequências particulares e podem, então, ser tomadas como representativas do genoma (STEINDEL et al., 1994).

A capacidade do RAPD-PCR em produzir marcadores genéticos específicos tem sido utilizada para diferenciar diversos parasitas, como tripanosomatídeos (TIBAYRENC et al., 1993; WAITUMBI & MURPHY, 1993), coccídeos (PROCUNIER et al., 1993; SHIRLEY & BUMSTEAD, 1994) e *Schistosoma* (BARRAL et al., 1993; DIAS NETO et al., 1993a). A técnica, denominada RAPD-PCR, foi usada pela primeira vez em *S. mansoni* por DIAS NETO e cols. (1993a) que constataram variabilidade genética limitada em diferentes linhagens desta espécie. Outros autores, usando a mesma metodologia, conseguiram detectar diferenças entre as espécies de *Schistosoma* (DIAS NETO et al., 1993a; DIAS NETO et al., 1993b; KAUKAS et al., 1994) e demonstrar a pequena variabilidade intra-específica do *S. mansoni* (BARRAL et al., 1993).

WALKER et al. (1989), ROLLINSON et al. (1990) e GASSER et al. (1991), utilizando o mesmo método, conseguiram identificar cercárias de *Schistosoma mansoni* e determinar o sexo destas no campo de maneira rápida e sensível, quando comparada com outros métodos moleculares.

BARRAL et al. (1993) usaram o RAPD-PCR como ferramenta na determinação de linhagens de *S. mansoni* de áreas geográficas diferentes: Brasil (Recife), Guadalupe e Venezuela. PENSCHOW et al., no mesmo ano, utilizaram tal método na identificação, em cortes histológicos do fígado de camundongos infectados com a linhagem de Porto Rico, de ovos que se desenvolveram em esquistossomos fêmeos, realizando uma hibridização histoquímica. O método de hibridização histoquímica poderia ser usado, também, na determinação das proporções fêmea/macho no fígado e dos sexos das larvas nos moluscos. DIAS NETO et al. (1993b) encontraram, em estudos com RAPD, baixo nível de polimorfismo

(10% das bandas) quando compararam linhagens de *S. mansoni* de diferentes regiões do Brasil. Eles concluíram também que o número de polimorfismos intra-linhagens foi maior que os inter-linhagens porque quando um organismo individual de uma única linhagem foi analisado, notaram polimorfismos não detectáveis quando da comparação entre linhagens. Trabalho semelhante foi realizado por STEINDEL et al. (1993) com linhagens de *Trypanosoma cruzi* usando 4 iniciadores arbitrários. A análise do dendograma mostrou que suas inter-relações refletiam sua origem geográfica. Estudos anteriores usando marcadores de isoenzimas (TIBAYRENC & AYALA, 1988), análise de restrição de kDNA (MOREL et al., 1980; AVILA et al., 1991) e padrão eletroforético de DNA (MACEDO et al., 1992) já sugeriam a existência de um grande número de formas genéticas continuamente variáveis.

Os dados de RAPD de MORGAN et al. (1993) forneceram uma classificação de 14 linhagens de *Giardia duodenalis* em 10 grupos, enquanto os dados de isoenzima as dividiram em 10 zimodemas similares.

Estudo com dezesseis linhagens de *Trypanosoma rangeli* utilizando análises de isoenzimas e RAPD, revelou a existência de dois grupos distintos: um formado pelas linhagens de Santa Catarina e outro, pelas linhagens de Honduras, Colômbia e Venezuela. A importância de estudos com este parasita não patogênico advém da alta reatividade cruzada com o *Trypanosoma cruzi* (patogênico), o que dificulta o diagnóstico da doença de Chagas crônica quando ambas as espécies estão presentes (STEINDEL et al., 1994).

POGUE et al. (1995) distinguiram, utilizando diversas linhagens de *Leishmania donovani* e espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, uma da outra por padrões de produtos de DNA amplificado. Estes resultados demonstram que o RAPD-PCR pode ser usado para gerar produtos de genes particulares em genomas de baixa complexidade.

Análise de RAPD representada graficamente em dendograma revelou a existência de dois grupos de linhagens de *Toxoplasma gondii*, um formado por 6 linhagens virulentas e outro por 5 linhagens avirulentas (GUO & JOHNSON, 1995).

De acordo com os trabalhos citados acima e com os dados sobre morfologia, biologia e quimioterapia das diversas linhagens de *S. mansoni* já descritos na literatura especializada, observamos uma diversidade intraespecífica relacionada a dimensões e ao comportamento dos parasitas de regiões geográficas diferentes (PARAENSE & CORRÊA, 1963a, 1963b, 1978,

1981; SAOUD, 1966; WARREN, 1967; MAGALHÃES, 1969; KATZ et al., 1973; ANDERSON & CHEEVER, 1972; POWERS & CHEEVER, 1972; MAGALHÃES & CARVALHO, 1969, 1973a, 1973b, 1976; MAGALHÃES & DIAS, 1973; MAGALHÃES et al., 1975, CHIEFFI, 1975; CAMPOS et al., 1976; DIAS et al., 1978, 1983, 1987, 1988; SANTANA et al., 1978; CARVALHO et al., 1979; ARAÚJO et al., 1980; ZANOTTI et al., 1983; FREITAS et al., 1985; COLES et al., 1986; BRUCE et al., 1987; KINOTTI, 1987; ZANOTTI-MAGALHÃES, 1987; COELHO et al., 1989; FIGUEIREDO, 1991; MELO, 1994; GOMES, 1996; MAGALHÃES, 1996). Esta diversidade gera parâmetros importantes na avaliação da relação hospedeiro-parasita, da epidemiologia e da variedade de formas clínicas da doença. A variação intra-específica no gênero *Schistosoma* pode ser atribuída a diferenças nas características morfológicas secundárias, na suscetibilidade do molusco, na periodicidade da eliminação de cercárias, na suscetibilidade a drogas esquistossomicidas, na capacidade de desenvolvimento em diferentes hospedeiros, na taxa de crescimento, na produção de ovos, nos períodos pré-patentes, na patogenicidade e na imunogenicidade (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987). Estes aspectos são hoje complementados por estudos sobre enzimas, cromossomos e DNA, com objetivo de encontrar marcadores moleculares para identificar espécies e linhagens e para reavaliar as caracterizações e relações inter e intra-específicas estabelecidas por meio de estudos a níveis morfológicos e biológicos.

Seria interessante, portanto, fazer mapeamentos genéticos comparativos com linhagens de áreas epidemiologicamente importantes e com características diversas, tais como áreas rurais e urbanas, endêmicas ou não, com e sem pressão de drogas esquistossomicidas etc. Projetos de mapeamento do genoma físico e de linkage têm sido iniciados para as espécies de parasitas *Plasmodium falciparum*, *S. mansoni* e *Brugia malayi* (CRAIG & LANGSLEY, 1993; UNNASCH, 1994; TANAKA et al., 1995) e para os mosquitos vetores *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (SEVERSON, 1994). Com os avanços na área de Biologia Molecular, tornou-se possível o uso de marcadores moleculares ao nível do DNA como ferramenta poderosa em diversas áreas da pesquisa. RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) e RAPD (random amplified polymorphic DNA) são exemplos de técnicas potenciais a serem usadas no caso de *S. mansoni*, capazes de detectar variações na sequência do DNA (PENA et al., 1994). A tecnologia de marcadores moleculares constitui uma poderosa ferramenta para auxiliar na

caracterização genotípica de espécies e linhagens, no mapeamento de características morfológicas e biológicas, na identificação dos genes responsáveis pela suscetibilidade e resistência dos caramujos ao parasita, e no esclarecimento dos mecanismos de resistência e tolerância do parasita às drogas esquistossomicidas. O conhecimento de um completo mapa genômico de ligação é fundamental para a aplicação dessa tecnologia, pois este fornecerá informações básicas sobre a estrutura do genoma do *S. mansoni*, como por exemplo, a intensidade de duplicação do DNA que é relevante na clonagem e manipulação de genes e em estudos de evolução da espécie.

A distinção das linhagens feita através da identificação e caracterização de possíveis marcadores genéticos proporcionariam um método rápido e sensível para a identificação de espécies e linhagens por epidemiologistas e clínicos (McMANUS & BOWLES, 1996). Estes marcadores podem ser fenotípicos (indiretos), quando detectam polimorfismo do gene através do produto de sua expressão; ou genotípicos (diretos), quando detectam polimorfismo do DNA. O estudo evolutivo, por sua vez, forneceria uma estimativa do grau de divergência genética entre as linhagens de *S. mansoni* a partir dos dados de distância genética.

Espera-se que este trabalho, assim como todos os outros de áreas correlacionadas sobre a esquistossomose, venham realmente servir como base de reflexões para reformulações dos programas de controle, no tocante às estratégias utilizadas. A exemplo do que já ocorreu no passado, quando os caramujos deixaram de ser os indicadores das ações, passando-se a uma fase com ênfase nas avaliações epidemiológicas, incluindo os níveis de prevalência e autoctonia, bem como potencial de risco das coleções hídricas. Estes conhecimentos poderiam ser utilizados para iniciar uma fase de controle baseado em avaliações genéticas.

Diversas linhagens de *S. mansoni* com características bastante diversas são encontradas hoje na natureza e em laboratórios e uma melhor caracterização molecular destas se faz necessário. Com este intuito, o presente trabalho se propôs a:

- 1) Caracterizar a variabilidade genética de seis linhagens brasileiras de *S. mansoni* com características biológicas e morfológicas distintas.
- 2) Estabelecer marcadores moleculares que possam distinguir e diagnosticar determinada linhagem através dos dados do RAPD.
- 3) Estimar a variabilidade em nível de RNA através da técnica de RAP-PCR para algumas linhagens de *S. mansoni*.
- 4) Estimar e analisar a variabilidade intra-específica entre as linhagens de *S. mansoni* BH, SJ1, SJ2, Ouh, LE e MAP e construir árvores filogenéticas através dos programa RAPDistance.
- 5) Estabelecer as prováveis relações genéticas e filogenéticas entre a variação polimórfica e as características próprias de cada linhagem, por meio de análise por comparação dos dados obtidos por RAPD e RAP-PCR com as informações sobre a morfologia, biologia e resposta à droga correntes na literatura especializada.
- 6) Sequenciar os possíveis marcadores moleculares selecionados.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido de maneira inter-institucional envolvendo UNICAMP (Instituto de Biologia – Depto. de Parasitologia) e USP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Depto. de Bioquímica e Imunologia).

1. Parasitas

Seis linhagens diferentes de *S. mansoni* foram utilizadas neste estudo: BH, MAP, Ouh, SJ1, SJ2 e LE; mantidas no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, no modelo experimental hospedeiro intermediário simpátrico-camundongo Swiss fêmea (hospedeiro definitivo):

Linhagem	Localização geográfica	Hospedeiro intermediário	Oxamniquine	Praziquantel
BH	Belo Horizonte	<i>B. glabrata</i> albina	Suscetível	Suscetível
MAP	Paciente Mineiro	<i>B. glabrata</i>	Resistente	Suscetível
Ouh	Ourinhos	<i>B. glabrata</i>	Tolerante	Tolerante
SJ1	São José dos Campos	<i>B. tenagophila</i>	Suscetível	Suscetível
SJ2	Unicamp	<i>B. tenagophila</i>	Suscetível	Suscetível
LE	Paciente mineiro	<i>B. glabrata</i> melânica	Suscetível	Suscetível

A) BH / *B. glabrata* albina

A linhagem foi isolada de paciente mineiro não tratado, em 1967, sendo suscetível ao oxamniquine e ao praziquantel (PELLEGRINO & KATZ, 1968).

B) MAP / *B. glabrata*

Linhagem resistente isolada das fezes de paciente mineiro tratado e não curado com hycanthone e oxamniquine (DIAS et al., 1978b). É interessante mencionar que esta linhagem é

mantida em laboratório sem pressão de droga e que suas progênies mantêm a resistência ao oxamniquine, sendo que, no momento, encontra-se na 48ª geração.

C) Ouh / *B. glabrata* melânica

A linhagem foi isolada de portador autóctone de Ourinhos, no Vale do rio Paranapanema (SP). É tolerante ao oxamniquine e praziquantel (8ª geração).

D) SJ1 / *B. tenagophila*

Linhagem paulista isolada em São José dos Campos a partir de moluscos do campo. É mantida em laboratório desde 1968, sendo suscetível ao oxamniquine e ao praziquantel.

E) SJ2 / *B. tenagophila*

Linhagem resultante de seleção genética desenvolvida em laboratório para o caráter suscetibilidade ao hospedeiro intermediário (ZANOTTI-MAGALHÃES et al., 1997).

F) LE / *B. glabrata* melânica

Linhagem isolada de fezes humanas e mantida em laboratório há muitos anos (PELLEGRINO & KATZ, 1968).

2. Infecção experimental dos moluscos

Fezes de camundongos infectados com 70 cercárias foram coletadas aos 45-50 dias de infecção e homogeneizadas com salina 0,85% e filtradas em gaze. Esse filtrado foi passado em uma sequência de quatro peneiras de malhas metálicas de 125, 105, 88 e 37 µm. Durante esta operação o material foi lavado com salina 0,85% a 10°C. O sedimento obtido na peneira de malha mais fina foi ressuspenso em água deionizada e exposto à luz artificial de lâmpadas incandescentes de 60 W para a eclosão dos miracídeos (STANDEN, 1952). Os miracídeos recém-eclodidos foram utilizados na exposição de moluscos (5-8 mm de diâmetro) a luz durante 2 horas a temperatura de 28°C (PELLEGRINO & MACEDO, 1955).

3. Infecção experimental dos camundongos

Os moluscos do item anterior, após 30 dias de infecção, foram expostos a luz artificial durante duas horas para estimular a emissão cercarial. As cercárias serviram para infectar camundongos Swiss, por imersão da cauda do animal em uma suspensão contendo 70 cercárias /

roedor, durante 2 horas de exposição à luz e temperatura de 28°C (OLIVIER & STIREWALT, 1952). Os animais foram imobilizados segundo a técnica descrita por BROOME & RADKE (1971) e adaptada por FIGUEIREDO (1991).

4. Coleta dos parasitas

Aos 45-50 dias de infecção, os camundongos foram sacrificados por fratura cervical e os parasitas adultos perfundidos do fígado e veias mesentéricas (YOLES et al., 1947). Após a coleta, os vermes foram mantidos em meio RPMI gelado para subsequente preparação do DNA.

5. Extração de DNA genômico

Os vermes adultos recém-perfundidos foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados em Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, N-Laurilsarcosine a 1% em pH 8,0 (SIMPSON et al., 1982). A seguir, a suspensão contendo DNA foi tratada com 100 µg/ml de proteinase K por 1 hora a 37°C/agitação moderada e constante. Posteriormente, foi adicionada RNase (20 mg/ml) e o tubo foi incubado a 37°C/30 min. Após a incubação, adicionou-se NaCl 5M e incubou-se a 65°C/10 min. Uma primeira extração foi realizada utilizando-se uma solução de CTAB/NaCl (CTAB 10% m/v; NaCl 4,1% m/v em água milli-Q), sob incubação de 20 min a 65°C. O CTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio) possui a habilidade de se ligar a proteínas e polissacarídeos em relação ao DNA em altas concentrações de sais (SMITH et al., 1989). A seguir foi feita uma extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) volume a volume. O DNA foi precipitado com 2/3 do volume de isopropanol a - 20°C/ 30 min. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e seco rapidamente a vácuo em um sistema “ Integrated Speedevac™ System “, ISS 100 (Savant Instruments, Inc, Farmingdale, NY) sendo, posteriormente, dissolvido em 50 µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM) sob banho-maria a 37°C e mantido a 4°C até o momento de uso.

6. Quantificação espectrofotométrica e análise de pureza dos ácidos nucleicos

A concentração dos ácidos nucleicos e seu grau de pureza foram estimados através da medida da absorvância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm no aparelho Genequant II (Amersham-Pharmacia). A leitura a 260 nm permite calcular a concentração de ácido nucleico na amostra: um valor unitário de absorvância a 260 nm corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de DNA dupla fita, 40 µg/ml para DNA simples fita ou RNA. Por outro lado, a razão entre as leituras a 260 e 280 nm fornece uma estimativa da pureza da preparação:

$OD_{260}/OD_{280} = 1,8$ indica preparação de DNA pura

$OD_{260}/OD_{280} = 2,0$ indica preparação de RNA pura

$OD_{260}/OD_{280} > 1,8$ indica preparação de DNA contaminada com RNA

$OD_{260}/OD_{280} < 1,8$ ou $2,0$ indica preparação contaminada com fenol ou polipeptídeos

Nos dois últimos casos não será possível se obter uma quantificação precisa.

A pureza do material extraído foi também demonstrada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. A confecção do gel foi iniciada pela prévia fusão da agarose na concentração desejada em tampão TAE 1X (tris-acetato 0,04 M pH 8,0; EDTA 0,001 M).

Para cada amostra de DNA, foram adicionados 1/6 de volume de tampão da amostra (azul de bromofenol 25% e sacarose 40%). No tampão de corrida (TAE 1X) foi adicionado o corante fluorescente brometo de etídio (10 mg/ml) para uma concentração final de 0,5 µg/ml (MANIATIS et al., 1989).

A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente com 50 mA durante 2-3 horas. Ao seu final, o DNA corado com brometo de etídio foi visualizado sob luz ultravioleta no transiluminador (Hoefer).

7. Reações de RAPD

De acordo com o descrito por DIAS NETO et al. (1993a), 5-10 ng de DNA template foram amplificados em um volume final de 25 µl contendo 2,5 unidades de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada dNTP, tampão da enzima 10X concentrado (MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM, Tris-HCl

200 mM pH 8,4) e 1 μ L do iniciador (11 pmol/ μ l). Foram usados 11 iniciadores aleatórios com 10 mers (Gibco BRL). Após uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos adicionou-se a Taq DNA polimerase, durante uma etapa de 80°C por 3 minutos. Esta desnaturação é processada antes da adição da enzima Taq DNA polimerase, proporcionando, deste modo, alta especificidade do produto amplificado. Após a adição da Taq, processou-se dois ciclos em termociclador GENE ATAQ controller (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) com as seguintes condições:

Desnaturação - 95°C / 30s

Anelamento do iniciador - 30°C / 2 minutos

Extensão - 72°C / 1 minuto

À seguir, a reação foi submetida a 33 ciclos de amplificação onde a etapa de anelamento foi alterada para 40°C. No ciclo final, a etapa de extensão durou 6 minutos, após a qual, a reação foi mantida a 4°C.

Como controles, reações de PCR foram processadas sem o DNA do parasita (controle negativo).

8. Iniciadores aleatórios (Primers) (Gibco BRL)

<u>PRIMER</u>	<u>SEQUÊNCIA 5'- 3'</u>
Rd1	TGCGCCCTTC
Rd2	TGCTCTGCCC
Rd3	CTGCTGGGAC
Rd4	AGGGAACGAG
Rd5	GTGAGGCGTC
Rd6	GTTGCCAGCC
Rd7	TGCCGAGCTG
Rd8	GAAACGGGTG
Rd9	GTGACGTAGG
Rd10	GGGTAACGCC
Rd11	GTGATCGCAG

9. Eletroforese em gel de agarose

Posteriormente, 5 µl do produto da amplificação misturados com 4 µl de tampão da amostra e 15 µl de água foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml), visualizado em transiluminador de UV e fotografado com uma Polaroid Fotodyne usando filme Polaroid 667. O brometo de etídio é fluorescente e permite a revelação de pequenas quantidades de ácidos nucleicos. O restante das amostras amplificadas foi mantido à 4°C.

10. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes e coloração com nitrato de prata

Após a amplificação do DNA, 5µl da reação de amplificação foi misturado com tampão de amostra 4X (azul de bromofenol 0,125%, xileno cianol 0,125% e glicerol 15%) e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida-bisacrilamida 29:1) em tampão TBE 1X (EDTA 2mM e tris-borato 10mM pH 8,0) utilizando o sistema Mini-PROTEAN® II com espaçadores de 1,5mm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Os géis foram fixados em etanol 10% e ácido acético 0,5% por 15 minutos, a seguir submetidos a duas lavagens de 5 min. (pré e pós-coloração) com água milli-Q (Millipore, Belford, MA, USA), corados com nitrato de prata 0,2% (0,3g de nitrato de prata em 100ml de água e 50 ml de solução fixadora) por 10 min. e revelados com NaOH 0,75 M / formaldeído 0,1M por 15 minutos (SANTOS et al., 1993). Posteriormente, os géis foram secos a temperatura ambiente utilizando-se papel celofane e fotografados através do programa " Kodak Digital Science 1D " versão 2.0. O padrão de peso molecular usado para estimar o tamanho dos fragmentos foi o de 100 pb (Gibco BRL). Para a análise dos dados, os produtos de amplificação obtidos com cada iniciador em cada linhagem foram fracionados no mesmo gel.

11. Análise dos produtos de RAPD

A base exata da variação revelada pelo RAPD não é totalmente compreendida. Ela pode ser devida a uma variação nas sequências ou por inserções ou deleções que causam perdas de bandas (HENDRICK, 1992). Consequentemente, foi registrada a contagem de todas as bandas visíveis, sendo as bandas individuais registradas como presença ou ausência (1 ou 0) para cada linhagem e o inverso do coeficiente de similaridade de Dice (DICE, 1945) foi usado, como segue-se:

$$2a/2(a + b + c)$$

onde:

a é o número de bandas comuns entre dois organismos x e y

b é o número de bandas presente somente no organismo x

c é o número de bandas presente somente no organismo y

De acordo com o potencial discriminatório dos produtos de amplificação, cinco iniciadores foram utilizados para esta análise: Rd7, Rd8, Rd9, Rd10 e Rd11. Os padrões derivados dos iniciadores remanescentes, embora úteis para confirmar os resultados de estimativa de similaridade genética, não foram usados nas análises computacionais.

Quando uma banda de DNA foi detectada em uma linhagem e não em outras foi considerado como um polimorfismo do DNA.

12. Extração de RNA

Aproximadamente 50mg de casais, 50mg de machos e 50mg de fêmeas de *S. mansoni* foram homogeneizados em 1,0 ml do reagente Trizol® (Gibco BRL), até completa solubilização. Em seguida, a mistura foi incubada por 15 min. à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. O RNA foi extraído com 0,2 ml de clorofórmio (isento de álcool isoamílico ou qualquer outro aditivo). Agitou-se vigorosamente em vortex por 1 minuto e incubou-se à 4°C por 2 horas, sendo posteriormente centrifugadas a 12000 g por 15 min. a 4°C. Após a etapa de centrifugação, a mistura foi separada em uma fase orgânica inferior vermelha (fase fenol-clorofórmio), interfase e fase aquosa superior incolor. O DNA fica na interfase e as proteínas na fase orgânica, enquanto o RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. A fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 ml estéril, e o RNA precipitado com 0,5 ml de isopropanol / ml de Trizol utilizado na homogeneização inicial e incubado a -20°C por 15 min. O RNA foi então recuperado por centrifugação a 12000 g por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1,0 ml de etanol 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e centrifugado a 12000 g por 5 min. a 4°C. O precipitado final foi seco e ressuscitado em água tratada com DEPC (40-120 µl) e estocado a -20°C. O RNA total extraído foi digerido com DNaseI Amplification Grade para remover DNA residual. A cada µg de amostra de RNA suspenso em água tratada com DEPC foi adicionado um "mix" contendo 1 µl de tampão de reação 10 X da DNaseI, 1 µl de DNaseI (1U/µl) e água tratada com DEPC para um volume final de 10 µl. Após a homogeneização, estas amostras foram incubadas a 25°C por 15 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de 1 µl de EDTA 25 mM a 65°C/10 minutos. O RNA foi estocado a -70°C.

13. Gel de agarose para RNA

O RNA total dos vermes foi submetido à eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes. A concentração final do gel foi de 1% em tampão MOPS 10X (MOPS 0,1 M; acetato de sódio 0,1 M; EDTA 0,01 M), formaldeído e água tratada com DEPC. Inicialmente a agarose foi dissolvida em 40 ml de água tratada com DEPC e, após o resfriamento parcial

(aproximadamente 60°C), foi adicionada uma solução contendo 1,2 ml de formaldeído, 6 ml de MOPS 10X e 12,8 ml de água tratada com DEPC. O gel preparado foi vertido em suporte apropriado até completa solidificação.

Em cada amostra previamente quantificada espectrofotometricamente foi adicionado tampão da amostra (62,5% de formamida, 9,2% de formaldeído, 12,8% de tampão MOPS10X, 0,5% de azul de bromofenol, 15% de água tratada com DEPC e 0,5% de brometo de etídio) na proporção de 2:1 (volume de tampão: volume da amostra). A corrida eletroforética foi realizada com voltagem constante (40V) por aproximadamente 3 horas.

14. RAP-PCR

As amostras de RNA foram transcritas reversamente usando hexâmeros aleatórios como iniciadores da reação. Resumidamente, 2 µg do RNA total em um volume final de 22 µl foi desnaturado a 65°C por 5 min. e colocados em gelo. Uma mistura de reação foi preparada contendo ditioneitol (DTT) 10 mM, 500 µM de cada dNTP, 100 ng de hexâmeros aleatórios, tampão de primeira fita 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 3,75 mM; MgCl₂ 15 mM) e 400U de Transcriptase reversa (M-MLV; Gibco BRL). Assim, 18 µl da mistura de reação foram adicionados à solução de RNA total e incubados usando o seguinte programa: 22°C por 10 min.; 37°C por 50 min.; e 70°C por 15 min.. O cDNA resultante foi amplificado usando iniciadores aleatórios com 10 mers. Cada 30 µl da reação contendo 2 µl de cDNA, tampão apropriado (tampão de PCR 10X), 100 µM de cada dNTP, 500 nM do primer, MgCl₂ 1,5 mM e 1U da Taq DNA polimerase recombinante. As reações foram incubadas a 94°C por 2 minutos, então amplificadas em 40 ciclos usando o seguinte programa: 94°C por 2 min., 38°C por 2 min., e 72°C por 1,25 min.. Estas condições foram seguidas por uma etapa de extensão de 15 min. a 72°C. Foram preparadas duplicatas das reações para cada par cDNA-iniciador, posteriormente estocadas a -20°C.

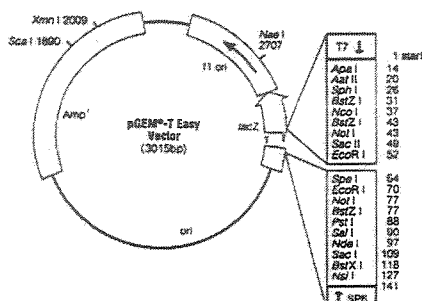
Como controle do RT, foi feita a amplificação diretamente das amostras de RNA. Além disso, também foi controlada a qualidade do cDNA pela amplificação deste com iniciadores da Sm 21,6 de *S. mansoni*, uma proteína de membrana (Iniciador 1: CAATCAGAATGTTGGAAG; Iniciador 2: CTTTTTGGTGTGCGCC).

15. Recuperação dos fragmentos de DNA amplificado

Este método é conhecido como " Freeze Squeeze " (TAUTZ & RENZ, 1983) e consiste no seguinte protocolo: as bandas desejadas foram excisadas com a mínima quantidade de gel possível e colocadas em um béquer contendo 10 ml de uma solução de acetato de sódio 300 mM e EDTA 1 mM pH 7,0 e incubadas no escuro sob agitação por 30 min. Em seguida, as bandas foram transferidas para um tubo de microcentrífuga contendo uma coluna com fibra de nylon e mantidas a -70°C por 30 min. ou durante toda a noite. O DNA livre de agarose foi obtido por centrifugação a 12000g por 15 min. e recuperado por precipitação com 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M e 2,5 volumes de etanol absoluto. Posteriormente, foi mantido a - 70°C por 15 min, centrifugado a 12000g / 10 min. e lavado com etanol 70 %. Esse DNA seco sob vácuo e ressuspenso foi reamplificado utilizando as mesmas condições para obtenção das bandas polimórficas.

16. Reação de ligação dos fragmentos de DNA no vetor pGEM-T

O DNA vetor (20-50 ng de plasmídeo pGEM-T da PROMEGA) (Esquema 05) foi misturado com o DNA (inserto) a ser ligado em uma reação molar de vetor/inserto de 1\5. O meio de ligação continha uma unidade da enzima T4 DNA ligase, tampão da enzima ligase e ATP 1 mM. A ligação se realizou a 16°C por uma noite (SAMBROOK et al., 1989).



Esquema 05. Mapa do vetor pGEM-T (PROMEGA)

17. Preparação de células competentes

As ligações anteriormente realizadas foram transformadas em *E. coli* DH5 α , tornadas competentes segundo SAMBROOK et al. (1989). Utilizou-se a técnica do cálcio, onde 125 μ l de uma cultura de bactérias DH5 α , cultivada durante toda a noite, foi adicionada a 12,5 ml de meio LB caldo e incubadas a 37°C. Decorrido aproximadamente 2 horas de incubação a suspensão bacteriana atingiu uma densidade óptica a 600 nm em torno de 0,4. Neste ponto, a cultura foi incubada no gelo durante 15 a 30 min. e em seguida foi centrifugada a 1000 x g durante 10 min. O precipitado bacteriano foi ressuspensão em 5 ml de CaCl₂ 100 mM e novamente colocados no gelo por mais 10 min. Após uma nova centrifugação nas mesmas condições, as células foram ressuspensas em 700 μ l de CaCl₂ e novamente colocadas no gelo.

18. Transformação de células competentes

O processo de transformação foi realizado com 10 μ l da solução contendo o plasmídeo ou a ligação de interesse adicionados a 200 μ l de célula competente. O tubo permaneceu em banho de gelo durante 30 min., em seguida foi submetido a um choque térmico a 42°C por 90 seg., seguido de um novo banho de gelo por 2 min. Posteriormente, 800 μ l de LB caldo foram adicionados ao

tubo e este foi incubado por 1 h a 37°C, sob agitação constante. Após esse período, os tubos contendo a cultura de bactéria transformada foram centrifugados por 5 min a 2000 rpm, o precipitado foi ressuspenso em 200 ml de caldo LB, plaqueados em placa de LB/Ágar ampicilina (100 µg/ml) e incubados a 37°C durante uma noite. Durante este período se verificou a transformação analisando-se as colônias brancas crescidas.

19. Mini-preparações plasmidiais

Uma colônia bacteriana foi incubada em 5 ml de meio de cultura (LB) com 100 µg/ml de ampicilina por 17 horas a 37°C e 200 rpm. Após a incubação as células foram recuperadas por duas centrifugações a 12000 rpm, por 1min. à temperatura de 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 300 µl de solução I (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10mM e RNase 100 µg/ml). Após 15 min de incubação a temperatura ambiente, adicionou-se 300 µl de solução II (NaOH 200mM e SDS 1%) misturando, cuidadosamente, por inversões. Os tubos foram incubados por mais 5 minutos e posteriormente adicionou-se 300 µl da solução III (acetato de potássio 3M pH 4,8), misturando-se por inversões, e incubando-se no gelo por 5 minutos. Posteriormente, centrifugou-se por 10 min. a 4°C e 12.000 rpm, o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo onde foi adicionado 1/2 do volume de isopropanol. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 12.000 rpm a 25°C. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco sob vácuo por 10 min e ressuspenso em 23 µl de TE (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 1mM).

Com o objetivo de melhorar a qualidade da purificação do DNA, utilizou-se um kit de purificação (In Concert-Gibco-BRL ou Promega) seguindo as especificações estipuladas do boletim técnico. As amostras do DNA foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose 1%. Aproximadamente 5 µl do DNA plasmidial foi misturado com 15µl de água e 4µl do tampão de amostra 6X (40% de sacarose, 0,25% de bromofenol em água). O gel foi confeccionado com 1% de agarose em tampão TAE (Tris acetato 0,04M e EDTA 0,001 M pH 8,0), a corrida foi realizada a 8 V/cm durante 1 hora. Após o tempo de corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml, e visualizado em um transiluminador sob luz U.V.

20. Digestão com as enzimas de restrição *Eco* RI para avaliação do tamanho do inserto

Para cada amostra de DNA a ser digerido, foram adicionadas: 1/20 de volume de albumina bovina (1 mg/ml); 1/10 de volume do tampão requerido pela enzima utilizada e uma quantidade apropriada (unidades) da enzima de restrição. Para determinação da quantidade de enzima de restrição necessária para a digestão, partiu-se do conceito de que uma unidade de enzima de restrição é a quantidade de enzima requerida para digerir 1 µg de DNA durante 1 hora em condições ideais de tampão e temperatura (SAMBROOK et al., 1989). A digestão foi visualizada em gel de agarose como descrito anteriormente.

21. Sequenciamento automático

Para este procedimento foi utilizado o sistema "Cycle sequencing", que consiste em uma associação do método do término do crescimento da cadeia com a reação em cadeia da polimerase - PCR ("Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit"- ARMERSHAM-PHARMACIA BIOTHECH). Em cada tubo de reação foram adicionados 5 µl do DNA molde (0,3 µg/µl), 1,5 µl do iniciador fluorescente (universal do M13: 5'GTAAAACGACGGCCAGT^{3'}; reverso do M13: 5'CAGGAAACAGCTATGAC^{3'}) e 2 µl dos reagentes A, C, G, ou T. Cada um destes reagentes contém um ddNTP, os 4 dNTPs e a enzima Thermo sequenase. Após homogeneização por pipetagem, os tubos foram posicionados no termociclador PTC-100 (MJ RESERCH) e submetidos a uma pré-desnaturação a 95°C por 5 min., seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min., anelamento a 60°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1 min. O produto da reação foi analisado no sequenciador automático ALFexpress^R (ARMERSHAM-PHARMACIA BIOTHECH).

22. Análises computacionais

A sequência completa dos fragmentos de DNA amplificados foi caracterizada através de algumas análises computacionais. A busca de homologia foi realizada com a ferramenta de alinhamento BLAST (Ferramenta para pesquisa de alinhamento local básico), para comparar as

seqüências de nucleotídeos foi utilizado o programa Blastn e a seqüência de aminoácidos o programa Blastx (<http://www.nccbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast>).

As imagens dos géis digitalizadas foram analisadas com o uso do programa Kodak Digital Science 1D versão 2.0 para determinar e comparar os tamanhos dos fragmentos das linhagens estudadas. Uma matriz de similaridade (ausência ou presença de bandas) foi construída pelo programa RAPDistance versão 1.03 (ARMSTRONG et al., 1994) para calcular as distâncias genéticas entre as linhagens comparadas, usando o coeficiente de Dice. A representação gráfica (dendograma) foi construída com o método Neighbor.

23. Outros coeficientes de similaridade usados

Cálculo da distância genética (LINK et al., 1995)

$$DG = (N_x + N_y) / N_x + N_y + N_{XY}$$

Onde:

N_X é o número de bandas na linhagem X e não na Y

N_Y é o número de bandas na linhagem Y e não na X

N_{XY} é o número de bandas compartilhadas por X e Y

Coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1908)

$$S_j = a / a + b + c$$

Onde:

a = número de bandas compartilhadas

b = presença de banda

c = ausência de banda

III. RESULTADOS

1. Obtenção de DNA genômico

As amostras de DNA genômico dos vermes adultos de *S. mansoni* das linhagens utilizadas neste estudo foram obtidas e quantificadas como descrito na metodologia. As concentrações obtidas foram em torno de 1,25 µg/µl. As figuras 01 e 02 mostram o DNA genômico íntegro de vermes adultos (“ pool “ de casais) extraído pela técnica do CTAB.

2. Análise da diversidade genética utilizando RAPD-PCR (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente)

Com a finalidade de examinar a variabilidade genética em diferentes linhagens de *S. mansoni* e avaliar a diversidade dentro da espécie, pool de vermes machos e fêmeas das linhagens BH, SJ1, SJ2, Ouh, LE e MAP foram utilizados para a extração do DNA (figuras 01 e 02). Cada iniciador usado gerou produtos de amplificação com um perfil eletroforético característico, compreendendo bandas monomórficas comuns entre as linhagens e bandas polimórficas (figuras 03, 05, 07, 09 e 11). Paralelamente a cada reação de RAPD, foram feitos controles negativos que comprovaram a origem dos produtos de amplificação, não mostrando amplificação na ausência do DNA do parasita.

Os padrões de RAPD frequentemente demonstram diferenças entre as linhagens pela ausência ou presença de um único produto. O RAPD revelou que o genoma das linhagens de *S. mansoni* geograficamente distintas exibem grau de polimorfismo intra-específico, com identificação de loci polimórficos. Este nível de variabilidade genética foi visualizado pela amplificação das seis linhagens estudadas usando os iniciadores Rd7 (figura 03), Rd8 (figura 05), Rd9 (figura 07), Rd10 (figura 09) e Rd11 (figura 11). O perfil de cada amplificação também pode ser observado pelas curvas densiométricas de cada linha de gel, comparando com a curva do padrão de 100 pb (figuras 04, 06, 08, 10 e 12).

O número de fragmentos amplificados reproduzíveis produzidos por cada iniciador variou de 9-20 fragmentos (média de 15 fragmentos; Tabela 01), sendo a maioria dos fragmentos com 100

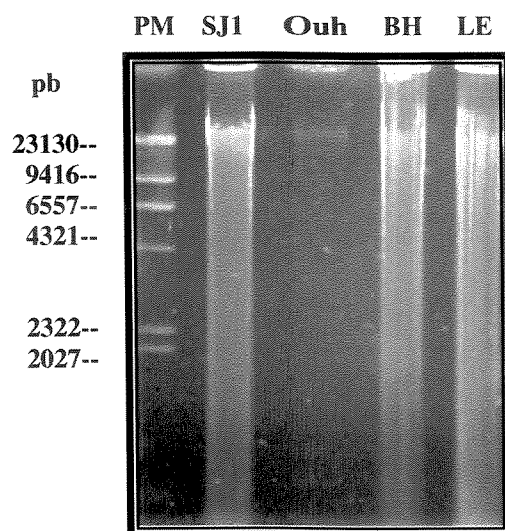


Figura 01: Amostras de gDNA de linhagens de *S. mansoni* após extração com CTAB em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. PM – Marcador λ HindIII (GIBCO-BRL).

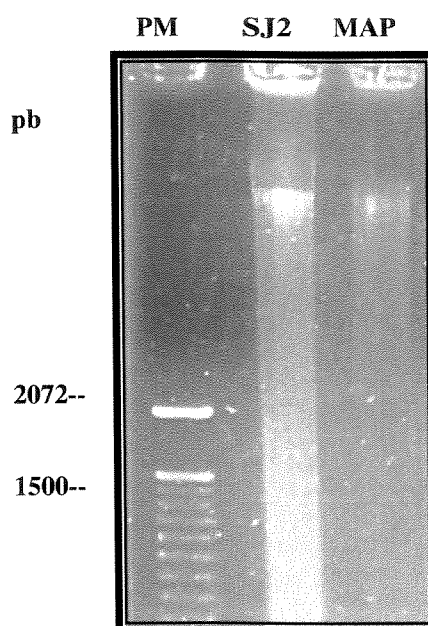


Figura 02: Amostras de gDNA de linhagens de *S. mansoni* após extração com CTAB em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. PM – Marcador de 100 pb (GIBCO-BRL).

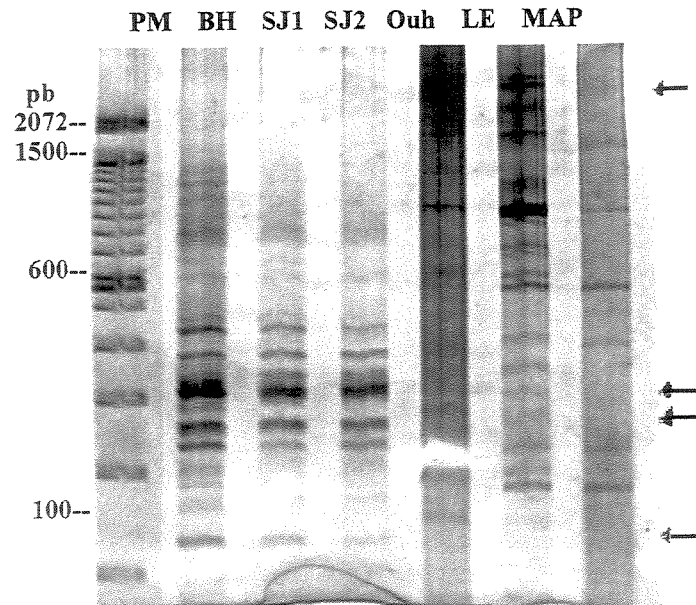


Figura3: Produtos de RAPD-PCR de linhagens brasileiras de *S. mansoni* usando o iniciador Rd7 (TGCCGAGCTG). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e visualizadas por coloração com prata. PM – Marcador de 100 pb (GIBCO-BRL).

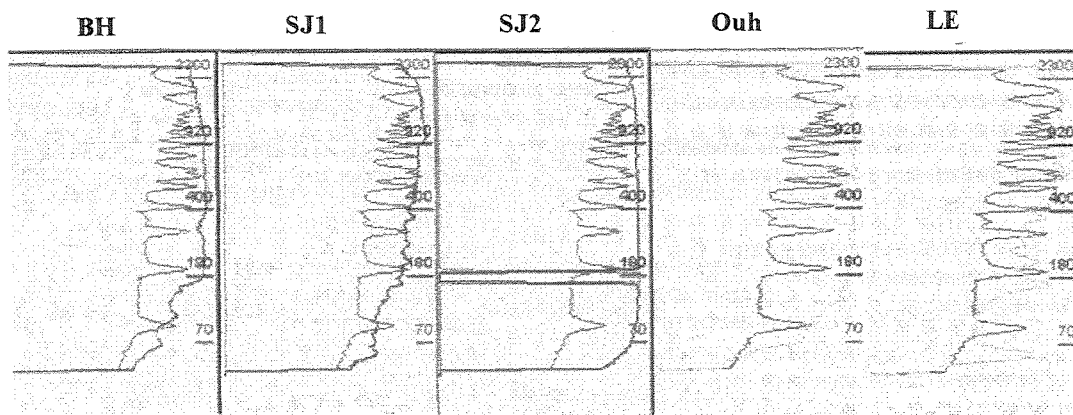


Figura 04: Curvas densiométricas das linhagens de *S. mansoni* comparadas com o padrão de 100 pb, correspondentes ao perfis eletroforéticos da figura 02. Rosa – Padrão de 100 pb; Azul e preto – Linhagens de *S. mansoni*.

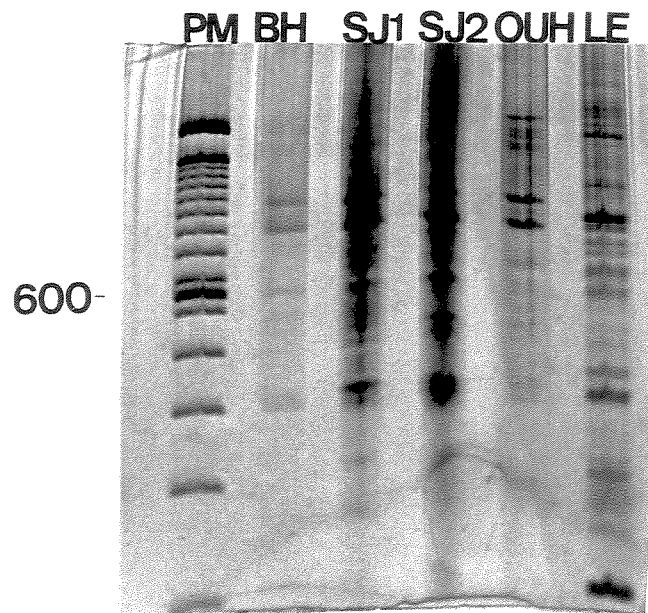


Figura 05: Produtos de RAPD-PCR de linhagens brasileiras de *S. mansoni* usando o iniciador Rd8 (GAAACGGGTG). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e visualizadas por coloração com prata. PM- Marcador de peso molecular de 100 pb (GIBCO-BRL).

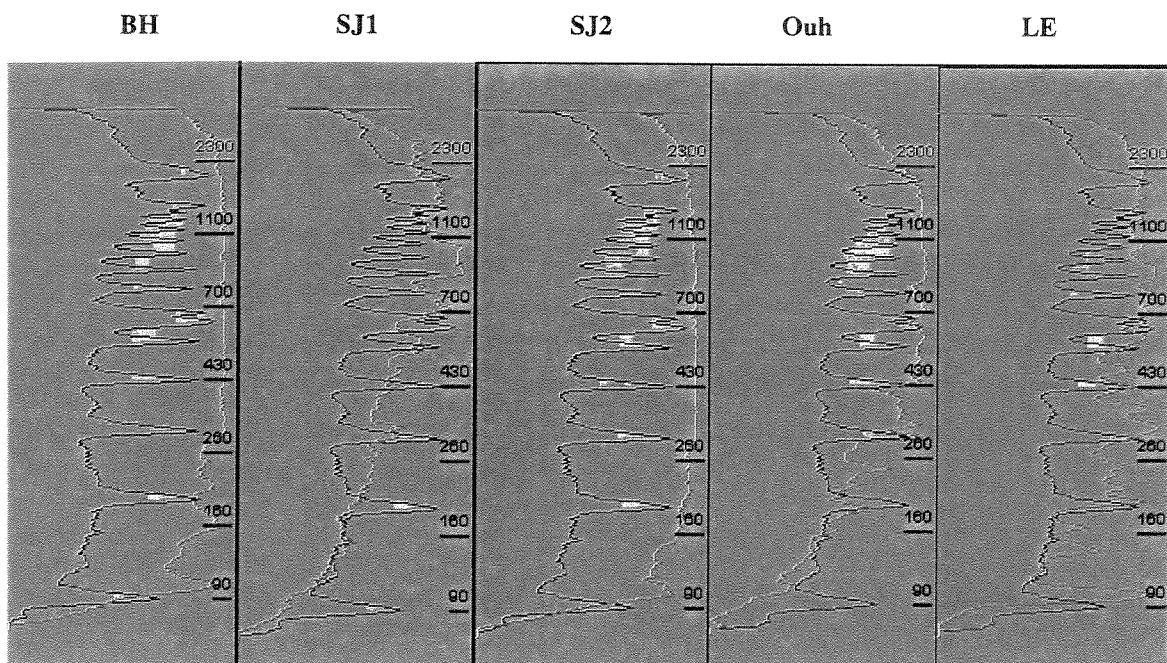


Figura 06: Curvas densiométricas das linhagens de *S. mansoni* comparadas com o padrão de 100 pb, correspondentes ao perfis eletroforéticos da figura 05. Rosa- Padrão de 100 pb; Azul- Linhagens de *S. mansoni*.

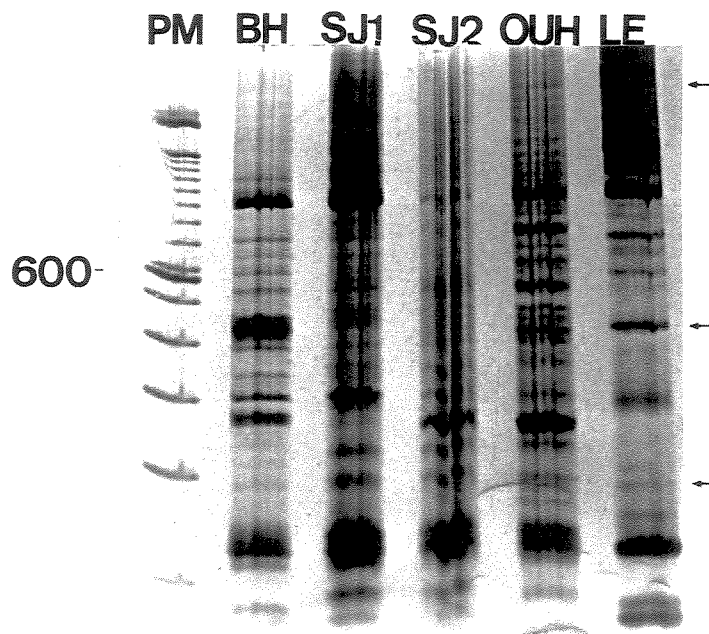


Figura 07: Produtos de RAPD-PCR de linhagens brasileiras de *S. mansoni* usando o iniciador Rd9 (GTGACGTAGG). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e visualizadas por coloração com prata. As setas indicam as posições das principais bandas polimórficas. PM- Marcador de peso molecular de 100 pb (GIBCO-BRL).

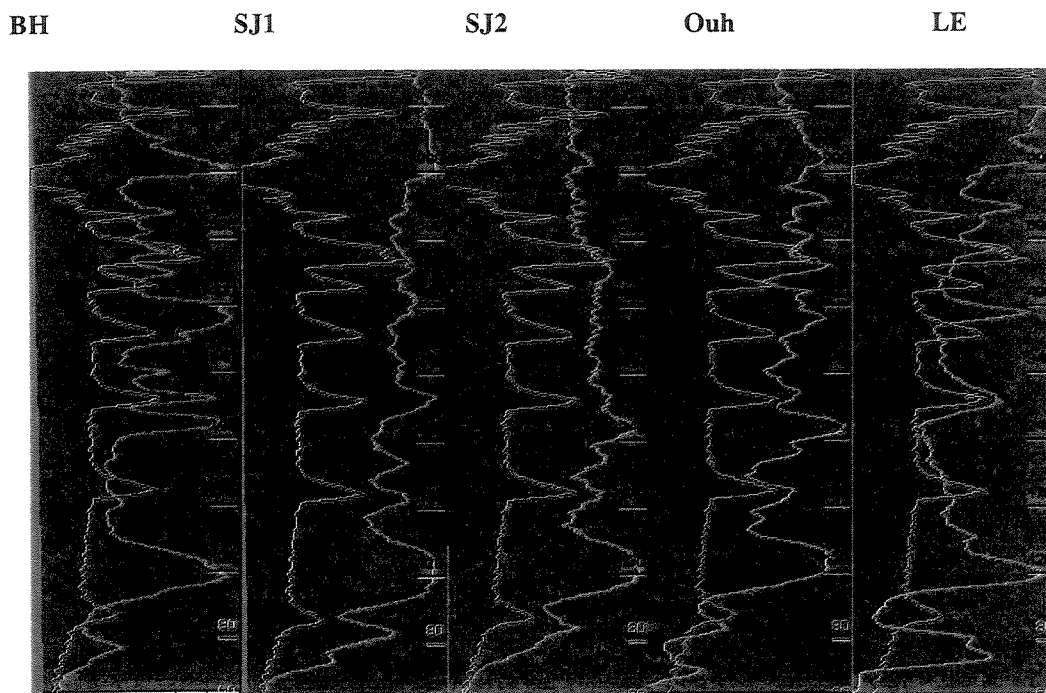


Figura 08: Curvas densiométricas das linhagens de *S. mansoni* comparadas com o padrão de 100 pb, correspondentes aos perfis eletroforéticos da figura 07. Rosa- Padrão de 100 pb; Azul- Linhagens de *S. mansoni*.

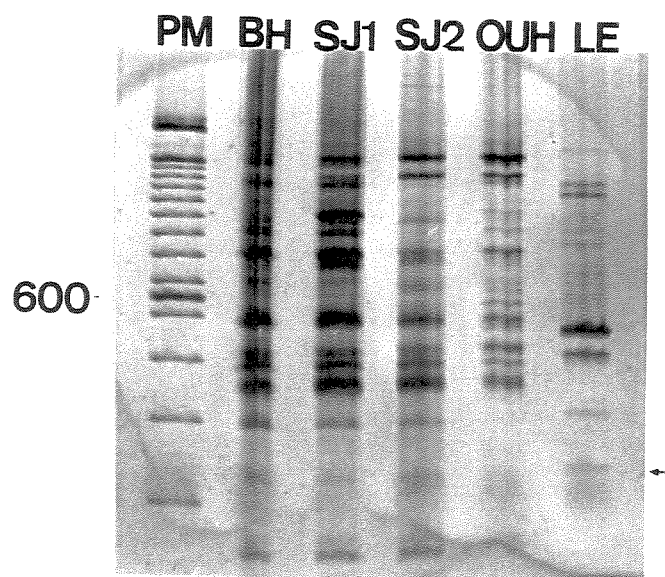


Figura 09: Produtos de RAPD-PCR de linhagens brasileiras de *S. mansoni* usando o iniciador Rd10 (GGGTAACGCC). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e visualizadas por coloração com prata. As setas indicam as posições das principais bandas polimórficas. PM- Marcador de peso molecular de 100 pb (GIBCO-BRL).

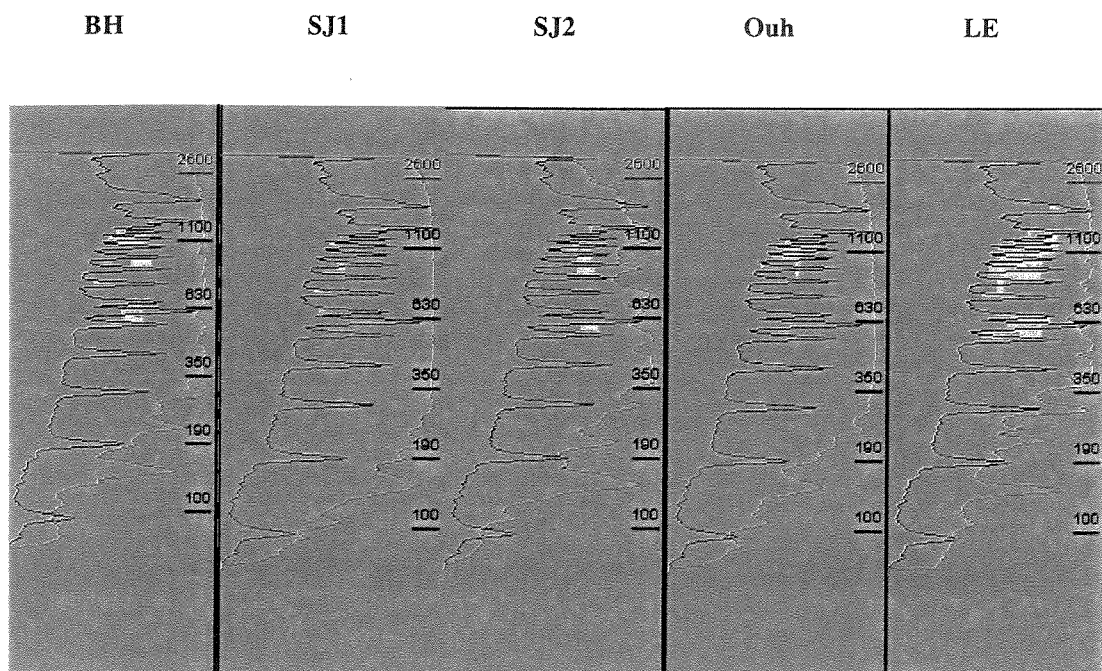


Figura 10: Curvas densiométricas das linhagens de *S. mansoni* comparadas com o padrão de 100 pb, correspondentes ao perfis eletroforéticos da figura 09. Rosa- Padrão de 100 pb; Verde- Linhagens de *S. mansoni*.

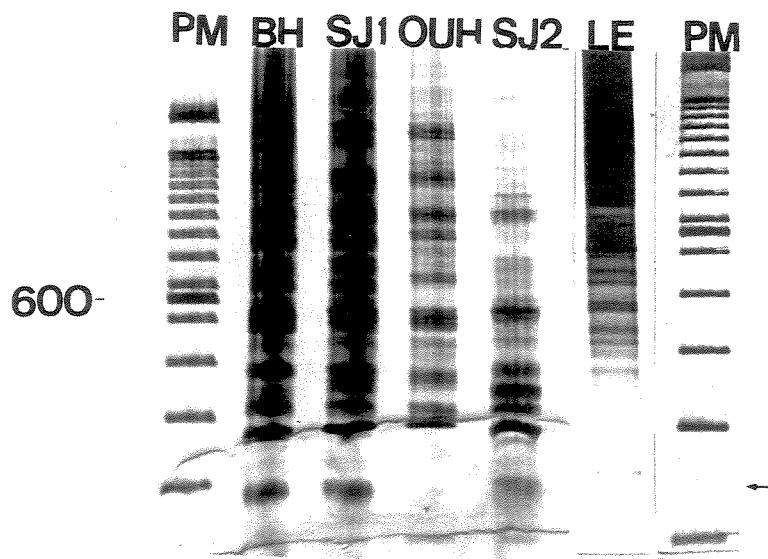


Figura 11: Produtos de RAPD-PCR de linhagens brasileiras de *S. mansoni* usando o iniciador Rd11 (GTGATCGCAG). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e visualizadas por coloração com prata. As setas indicam as posições das principais bandas polimórficas. PM – Marcador de 100 pb (GIBCO-BRL).

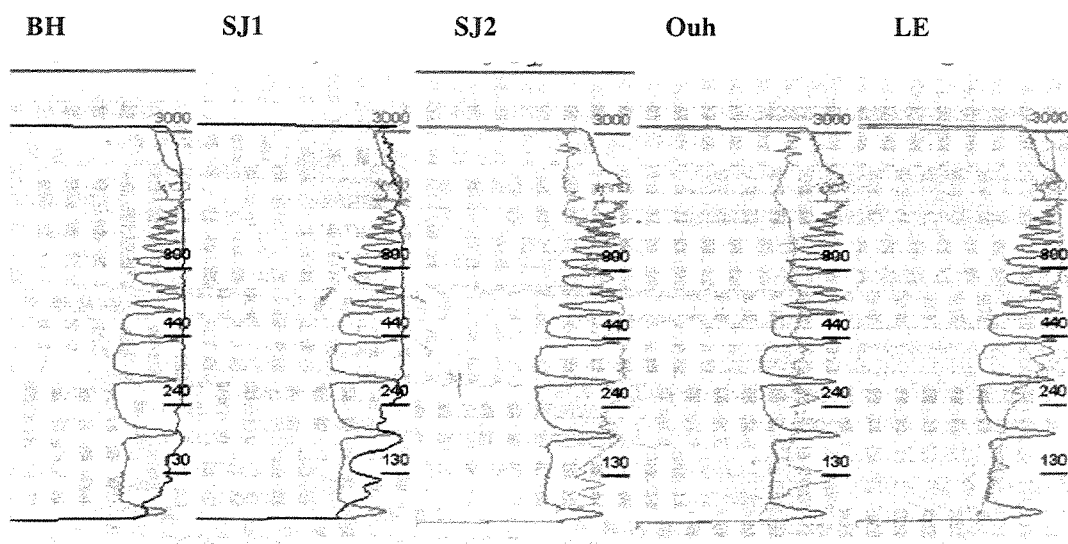


Figura 12: Curvas densiométricas das linhagens de *S. mansoni* comparadas com o padrão de 100 pb, correspondentes aos perfis eletroforéticos da figura 11. Rosa- Padrão de 100 pb; Azul e Preto- Linhagens de *S. mansoni*.

pb (figura 13).

A contagem total das bandas obtidas com estes iniciadores foi de 144, das quais somente 24,3% eram comuns a todas as linhagens. As bandas amplificadas variaram em seu tamanho de 60 a 2500 pb (figura 13). Os controles não produziram bandas e as triplicatas exibiram produtos de amplificação semelhantes àqueles observados previamente.

Os níveis de divergência (=distância) e parentesco genético entre as linhagens estudadas foram calculados usando o método de LINK et al. (1995) e estão representados na Tabela 03. A Tabela 02 mostra o nível de parentesco entre cada duas linhagens e serve como banco de dados para o cálculo das distâncias genéticas e da matriz, comparando as linhagens duas a duas.

O iniciador Rd7 (TGCCGAGCTG) produziu padrões de perfis eletroforéticos bastante semelhantes em todas as linhagens estudadas. Apenas a linhagem resistente MAP apresentou um padrão distinguível das outras pela ausência de 3 bandas de 120, 300 e 320 pb (marcadores MAP120-7, MAP300-7, MAP320-7; figura 03). Interessantemente, somente este iniciador, dentre os usados neste trabalho, conseguiu amplificar fragmentos desta linhagem. A figura 03 mostra também uma única diferença por RAPD-PCR na linhagem LE. Nela podemos observar uma banda claramente diferente de cerca de 2100 pb (marcador LE2100-7).

O iniciador Rd8 (GAAACGGGTG; figura 05) não detectou regiões diferenciadas quando foram analisadas todas as triplicatas de reações de RAPD., somente bandas minoritárias que não são consideradas bons marcadores, apenas medem a variabilidade intrínseca.

O iniciador Rd9 produziu uma banda óbvia diferente de 400 pb (marcador G400-9; figura 07) para as linhagens BH, Ouh e LE, cujo hospedeiro intermediário é a *B. glabrata* mas não para as adaptadas a *B. tenagophila* SJ1 e SJ2. Este mesmo iniciador diferencia linhagens de áreas endêmicas mais próximas. As linhagens SJ1, SJ2 e Ouh (paulistas) exibem uma banda claramente diferente de cerca de 200 pb (marcador SP200-9) quando comparadas com as linhagens mineiras (figura 07). A sequência do iniciador Rd9 é 5' GTGACGTAGG 3', significando que em todos os pontos do DNA genômico onde esta sequência aparece, ocorrerá um pareamento entre bases correspondentes. Após o pareamento, as seções entre dois pareamentos serão replicadas e amplificadas durante o PCR. São estas seções que são visualizadas no gel (figuras 03, 05, 07, 09 e 11). O iniciador revelou, ainda, a presença de uma banda única com mais de 2000 pb (marcador LE2000-9) presente somente na linhagem LE.

A seta da figura 09 indica a posição da principal banda diferencial entre Ouh, com

aproximadamente 250 pb (marcador Ouh250-10), e BH, SJ1, SJ2 e LE, quando foi utilizado o iniciador GGGTAACGCC (Rd10).

Um polimorfismo significativo foi detectado entre a linhagem tolerante (Ouh) e as demais sensíveis a drogas esquistossomicidas quando foi utilizado o iniciador Rd11 (GTGATCGCAG) (figura 11). A banda (marcador Ouh200-11) estava presente nas linhagens suscetíveis a droga e não na tolerante.

Os demais iniciadores utilizados ou não propiciaram uma boa amplificação, ou não apresentaram um perfil eletroforético homogêneo entre as linhagens para ser considerado um dado confiável de nossas análises. A quantidade de bandas amplificadas com estes cinco iniciadores foi significativamente suficiente para ser usado como banco de dados do RAPDistance que só suporta análises com o máximo de 200 bandas. É comum o uso de poucos iniciadores neste tipo de análises e estatisticamente confiável as conclusões que inferimos a partir deles (MORGAN et al., 1993).

3. Análises filogenéticas

O programa KODAK Digital Science 1D Versão 2.0 normalizou os perfis eletroforéticos de acordo com o padrão de peso molecular de 100pb. A grande complexidade dos perfis eletroforéticos do RAPD-PCR pôde ser visualizada e avaliada pelos padrões obtidos pelas curvas densiométricas (figuras 04, 06, 08, 10 e 12).

Os resultados das análises do RAPD com os cinco primers foram combinados e usados para calcular uma matriz de pareamento de similaridades (figura 14). Esta foi usada para a construção de uma árvore filogenética (dendograma), que fornece uma idéia gráfica da similaridade entre as linhagens.

A análise filogenética baseada no compartilhamento de bandas, indicou que as inter-relações das linhagens refletiu a origem geográfica, dividindo as linhagens de *S. mansoni* estudadas em dois grupos: “ parasitas paulistas “ (Ouh, SJ1 e SJ2) e “ parasitas mineiros “ (BH e LE) (Figura 15). O alinhamento produzido pela árvore Neighbor-joining mostra as linhagens mineiras BH e LE formando um único ramo, enquanto as paulistas formam outros dois. Os dois ramos são monofiléticos. Os comprimentos dos braços (números expressos nos dendogramas) refletem o número de mudanças evolucionárias sofridas pelas linhagens. A distância genética entre duas

linhagens (OTUs – unidades taxonômicas operacionais) é igual a soma de todos os comprimentos de braços conectados a eles, então, classificando a árvore como aditiva.

Os dendogramas foram compostos usando todos os dados dos primers utilizados, ou seja as bandas mais proeminentes de 1,5Kb ou menos. Cada reação de RAPD foi repetida pelo menos três vezes e as bandas mais estáveis foram consideradas e computadas em matrizes.

Dados empíricos têm dado suporte a noção que o grau de concordância entre diferentes métodos de estimativa filogenética é um bom indicador da confiança das estimativas filogenéticas. Com base nesta filosofia, foram construídos dois dendogramas comparando linhagens quanto ao parâmetro espécie do hospedeiro intermediário usando os coeficientes de similaridade de Jaccard (figura 16) e de Dice (figura 17). Os dois dendogramas apresentaram topologias similares.

Tabela 01: Número absoluto de fragmentos obtidos da amplificação de RAPD do gDNA de linhagens brasileiras de *S. mansoni* com 5 iniciadores de seqüências aleatórias (10 mers)

Número de fragmentos amplificados	Rd7	Rd8	Rd9	Rd10	Rd11
BH	12	11	18	18	19
SJ1	11	11	15	15	19
SJ2	9	11	11	13	20
Ouh	13	16	15	14	14
LE	18	18	12	14	15

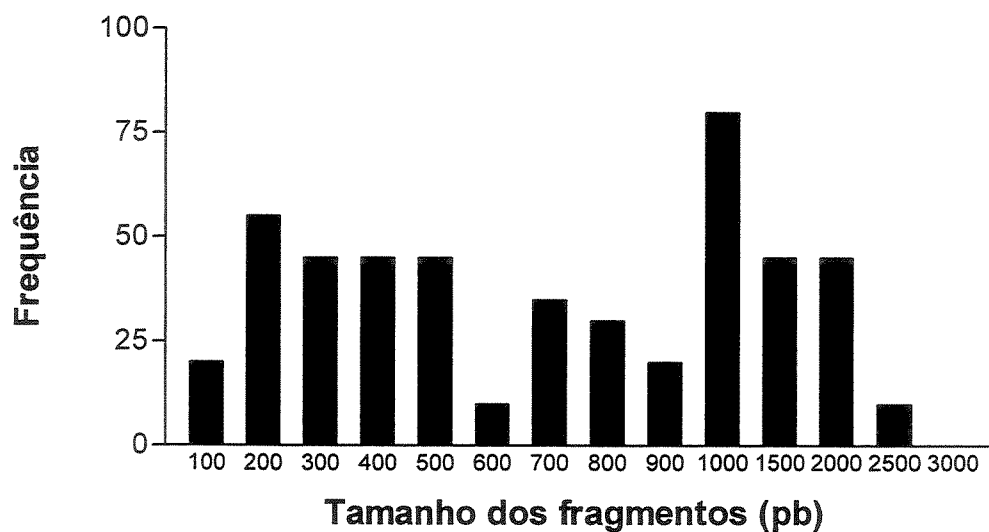


Figura 13: Distribuição observada dos tamanhos dos fragmentos obtidos da amplificação de RAPD do gDNA de linhagens brasileiras de *S. mansoni* com 5 diferentes iniciadores de 10 mers.

Tabela 02: Frequência de fragmentos comuns a duas linhagens a *S. mansoni*

Número de fragmentos amplificados	BH	SJ1	SJ2	Ouh	LE
BH	78	(70,0)	(80,0)	(53,4)	(56,8)
SJ1	52	71	(77,2)	(60,1)	(58,2)
SJ2	52	52	64	(69,4)	(55,8)
Ouh	40	43	47	72	(52,4)
LE	44	43	39	39	77

O número total de fragmentos amplificados em cada linhagem é dado diagonalmente (números em negrito). O número de fragmentos comuns entre duas linhagens (números sob a diagonal) e a proporção dos fragmentos comuns entre duas linhagens (números entre parênteses) foram quantificados.

Tabela 03: Distância genética entre linhagens brasileiras de *S. mansoni*

Linhagem	BH	SJ1	SJ2	Ouh	LE
BH	0,000				
SJ1	0,446	0,000			
SJ2	0,422	0,358	0,000		
Ouh	0,611	0,561	0,477	0,000	
LE	0,566	0,57	0,610	0,642	0,000

Baseado em Link et al.(1995).

SJ1	0,3986			
SJ2	0,2877	0,3566		
Ouh	0,3566	0,3571	0,3566	
LE	0,4228	0,4110	0,3557	0,3699
	BH	SJ1	SJ2	Ouh

Figura 14: Matriz triangular mostrando os coeficientes de similaridade de Dice calculados a partir dos perfis eletroforéticos obtidos com os iniciadores Rd7, Rd8, Rd9, Rd10 e Rd11.

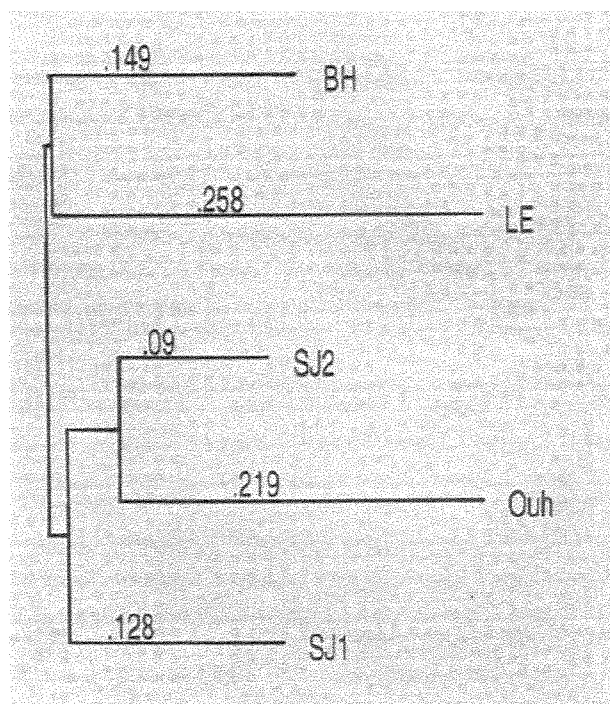


Figura 15: Relações filogenéticas entre linhagens brasileiras de *S. mansoni*. O dendograma foi construído usando o método Neighbor Joining (NJTree) baseado no coeficiente de similaridade de Dice.

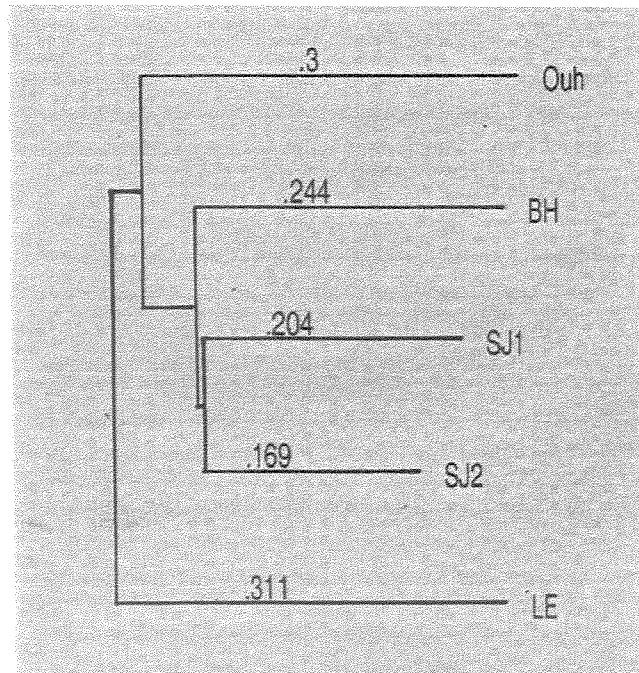


Figura 16: Relações filogenéticas entre linhagens brasileiras de *S. mansoni* pertencentes a clados diferentes quanto ao hospedeiro intermediário. O dendograma foi construído usando o método Neighbor Joining (NJTree) baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.

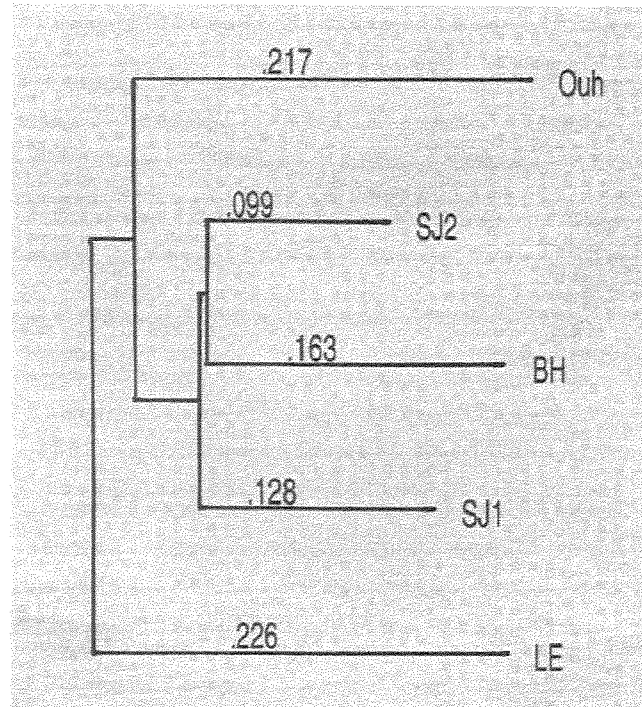


Figura 17: Relações filogenéticas entre linhagens brasileiras de *S. mansoni* pertencentes a clados diferentes quanto ao hospedeiro intermediário. O dendograma foi construído usando o método Neighbor Joining (NJTree) baseado no coeficiente de similaridade de Dice.

4. RAP-PCR

O RNA total de casal das linhagens BH, SJ1 e LE foi extraído de parasitas recém-perfundidos (figura 18 e 19). As linhagens BH e SJ1 também foram utilizadas para extração de RNA de machos e fêmeas (figura 19). A técnica de extração do RNA com Trizol minimiza a quantidade de DNA genômico contaminante. Por este motivo foi a metodologia de escolha para este trabalho, já que queremos avaliar a variabilidade somente da região codificadora do genoma das linhagens estudadas. A DNase I é uma enzima, purificada de pâncreas bovino, apropriada para eliminar DNA durante o procedimento de purificação do RNA que será usado no RT-PCR. Este deve ser puro o suficiente para garantir que a amplificação final seja somente da parte codificante do DNA. O EDTA e a alta temperatura (65°C) são utilizadas para inativar a DNaseI. Deve-se tomar o cuidado de inativá-la totalmente para que esta não degrade o cDNA. As figuras 18 e 19 mostram a qualidade dos RNAs obtidos evidenciando-se bandas de 18S e 28S correspondentes ao RNA ribossomal. Em preparações de RNA total, somente as espécies mais abundantes, os rRNA e os tRNA, são identificáveis, sendo estes os marcadores mais comumente usados. No entanto, o tRNA só é visualizado em géis de agarose em condições especiais. Estas não foram usadas aqui. A visualização do rRNA, principalmente a subunidade 18S, já garantiu a eficiência da extração do RNA.

A razão entre as leituras em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm das preparações de RNA das linhagens BH, SJ1 e LE foi de aproximadamente 1,9 e 1,8, respectivamente, demonstrando que a metodologia utilizada na extração está sendo eficiente. A concentração estimada de RNA em nossas amostras é de 0,2-2 µg/µl. Esta se mostrou variável devido ao número de parasitas (casais, machos e fêmeas) usados na extração. O RAP-PCR foi usado com o objetivo comparar o perfil eletroforético do cDNA das linhagens BH, SJ1 e LE que determinem mudanças na expressão gênica ao nível de transcrição de mRNA. Os cDNAs das linhagens BH, SJ1 e LE foram diferenciados quando foram usados como moldes em PCR com os iniciadores Rd7 (figura 24) e Rd3 (figura 25). O primeiro iniciador permitiu a identificação de 3 bandas diferentes nas linhagens BH e LE, ausentes nas linhagens SJ1. Produto expresso preferencialmente na linhagem BH também foram gerados pelo iniciador Rd3, este com aproximadamente 100 pb (figura 25). O iniciador Rd7, por sua vez, gerou uma banda específica de aproximadamente 250 pb nas linhagens BH e LE. A presença destas bandas foi confirmada por repetição dos PCRs e géis.

As figuras 24 e 25 mostram uma comparação entre as três linhagens utilizando os iniciadores Rd3 e Rd7. Podemos observar uma maior correspondência entre os produtos transcritos entre as linhagens BH e LE, que entre estas e a SJ1.

A figura mostra um fragmento grande (> 2000 pb) presente na linhagem BH e ausente na LE, condizente ao padrão obtido quando foi amplificado cDNA de cercárias (figura 31).

As figuras 20 e 21 mostram os controles feitos para os experimentos. A figura 20 mostra a amplificação do cDNA com iniciadores específicos de *S. mansoni*, confirmando a qualidade deste. Interessantemente, o macho da linhagem LE (amostra 4) gerou duas bandas como produto da amplificação, ao invés da banda única específica. A amostra 1 não foi usada nos experimentos de RAP-PCR, servindo apenas como controle de qualidade dos cDNAs usados para análise. A figura 21 mostra a amplificação usando o RNA não transcrito reversamente, para testar a presença de DNA genômico contaminante.

5. Caracterização da expressão sexo-específico

Com o objetivo de localizar se a expressão gênica diferencial da banda de 250 pb (figura 24) entre as três linhagens está ocorrendo nos machos ou nas fêmeas, foi feita a amplificação dos cDNAs de machos e fêmeas com o iniciador Rd7. Provavelmente o fragmento é específico de fêmeas (dados não mostrados), estando ausente nos machos da figura 28, linhas 7 e 8. Na mesma figura observamos, nas linhas 5 e 6 (cDNA de casais), a presença do marcador.

Marcadores sexo-específicos foram encontrados com os iniciadores Rd2 (TGCTCTGCCC) (figura 22), Rd3 (CTGCTGGGAC) (figura 23), Rd8 (GAAACGGGTG) (figura 26), Rd9 (GTAGACGTAGG) (figura 27) e Rd10 (GGGTAACGCC) (figura 29) em um pool de amostras. Um fragmento polimórfico com aproximadamente 400 pb foi gerado aparentemente somente nos padrões de amplificação com o iniciador Rd3 das fêmeas (figura 23). Na figura 22 observamos que cDNA de machos amplificados com Rd2 apresentam uma banda de 700pb; e as fêmeas apresentam bandas com aproximadamente 120, 150, 210, 220pb, todas com expressão sexo-diferencial. Essa variabilidade entre machos e fêmeas já era esperada devido a existência de diferenças metabólicas e estruturais. Os marcadores de RAP-PCR são ideais para serem seqüenciados porque são prováveis produtos de seqüências que codificam alguma proteína. Estes marcadores foram reamplificados, purificados e ligados no vetor pGEM-T para posterior

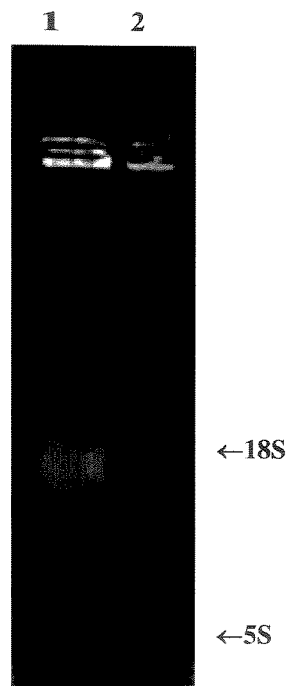


Figura 18: Gel de agarose em condições desnaturantes onde 1 e 2 são um pool de RNA total de casais da linhagem SJ1. Seus coeficientes de sedimentação (S) estão apontados.

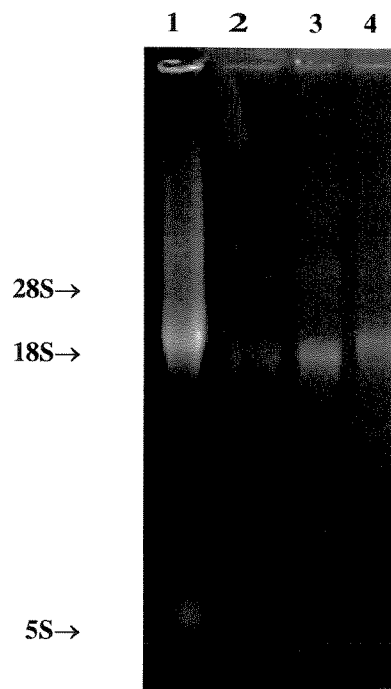


Figura 19: Gel de agarose em condições desnaturantes de RNA total da linhagem BH. Seus coeficientes de sedimentação (S) estão apontados. (1) e (2) Casais; (3) Machos; (4) Fêmeas.

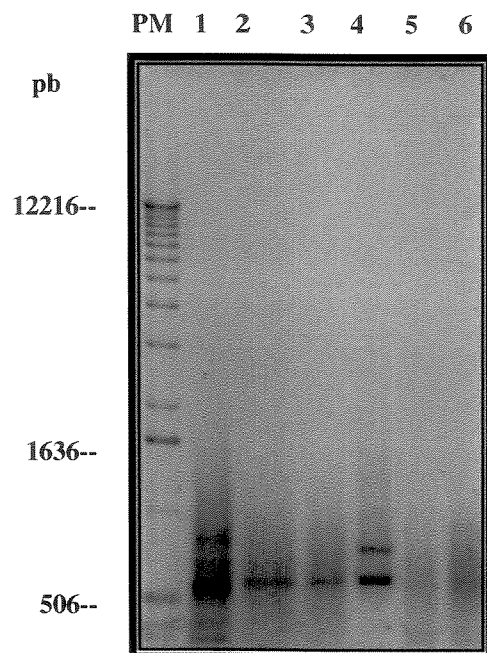


Figura 20: Gel de agarose 1% mostrando os controles do cDNA amplificado com os iniciadores específicos 8a1 (CAATCAGAATCTTGGAAG) e 8a2 (CCTTTTGGTGTGCGCC). PM – Marcador de 1 Kb. (1) Casal LE; (2) Casal BH; (3) Macho BH; (4) Macho LE; (5) Fêmea BH; (6) Fêmea LE.

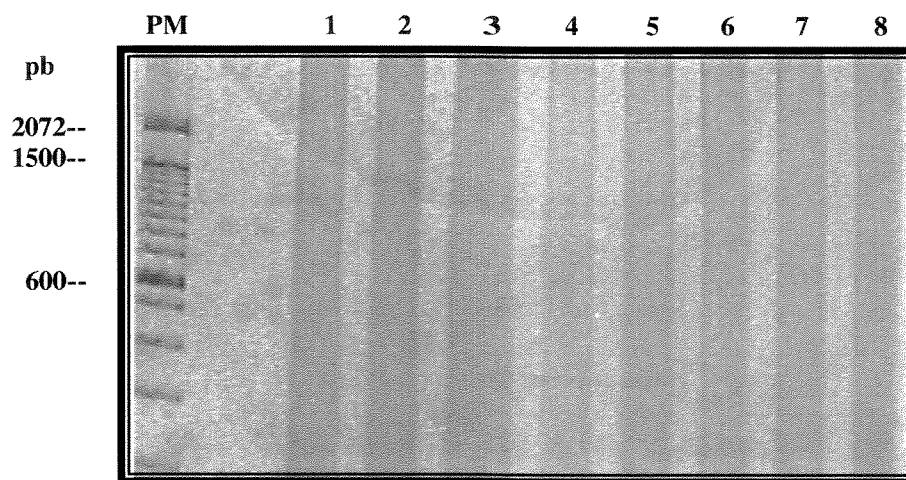


Figura 21: Gel de poliacrilamida 6% corado com prata mostrando o controle da amplificação sem RT. Neste gel está representando um dos controles realizado com o iniciador Rd2. PM – Marcador de 100 pb. (1) Casal BH; (2) Macho BH; (3) Fêmea BH; (4) Casal LE; (5) Macho LE; (6) Fêmea LE; (7) Casal SJ1; (8) Casal SJ1.

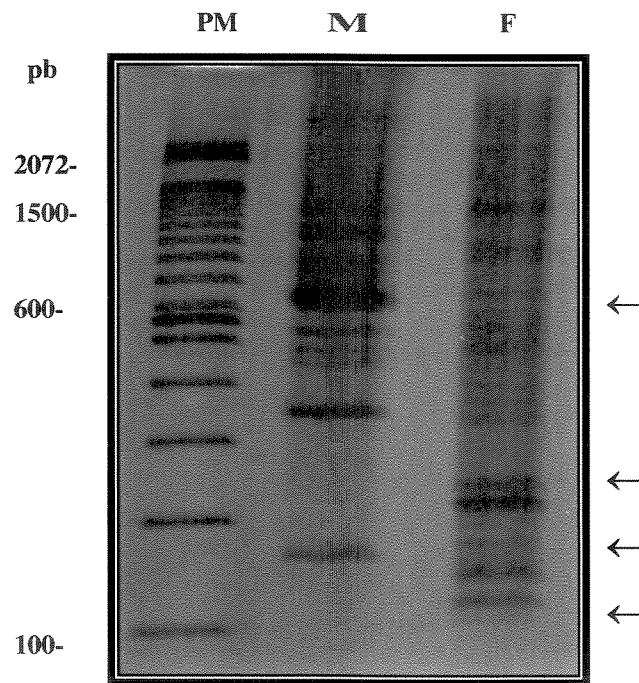


Figura 22: Amplificação de cDNA isolado de machos (**M**) e fêmeas (F) da linhagem BH usando o iniciador Rd2 (TGCTCTGCCC). Os marcadores sexo-específicos estão indicados por setas. PM – Marcador de 100 pb.

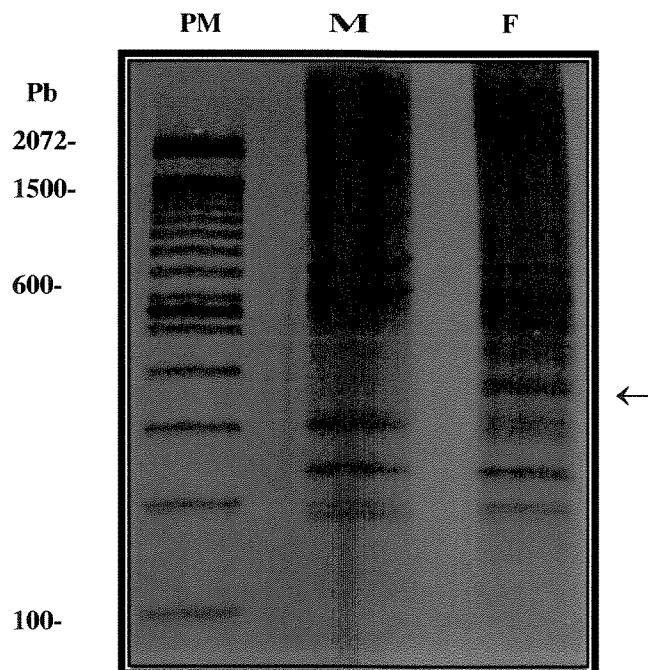


Figura 23: Amplificação do cDNA isolado de machos (M) e fêmeas (F) da linhagem Ouh usando o iniciador Rd3 (CTGCTGGGAC). O marcador sexo-específicos está indicado pela seta. PM – Marcador de 100pb.

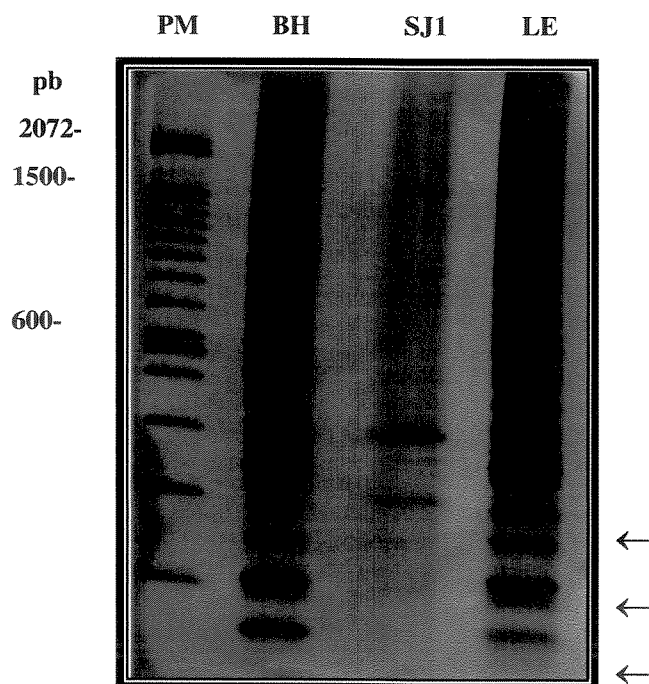


Figura 24: Amplificação do cDNA isolado de casais das linhagens BH, SJ1 e LE usando o iniciador Rd7 (TGCCGAGCTG). Os marcadores moleculares estão indicados por setas. PM – Marcador de 100 pb.

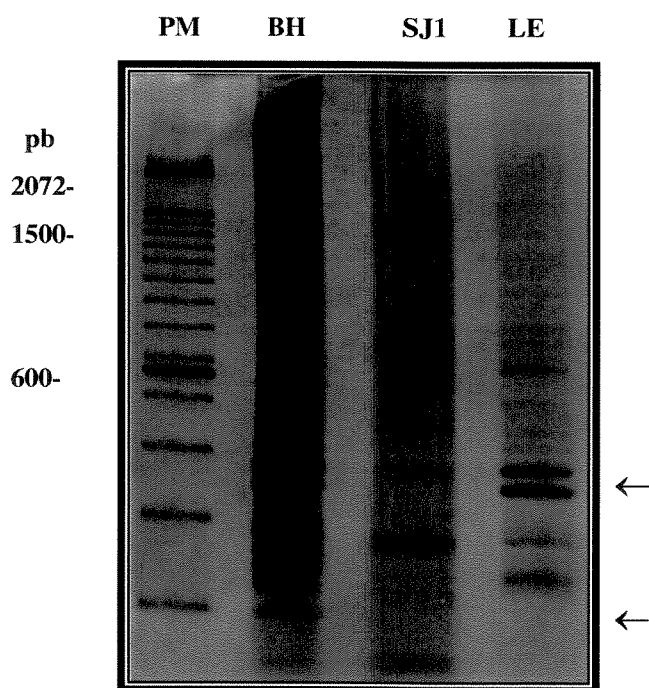


Figura 25: Amplificação de cDNA isolado de casais das linhagens BH, SJ1 e LE usando o iniciador Rd3 (CTGCTGGGAC). Os marcadores moleculares estão indicados por setas. PM – marcador de 100 pb.

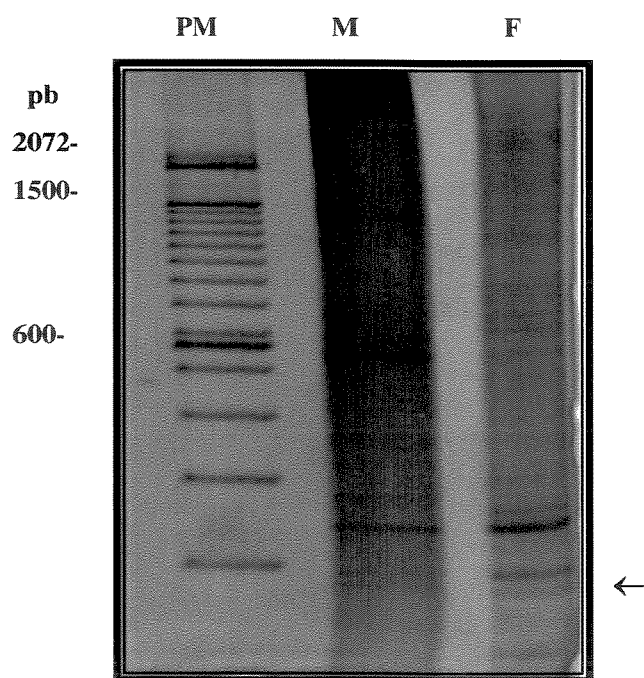


Figura 26: Amplificação do cDNA isolado de macho (M) e fêmea (F) da linhagem BH usando o iniciador Rd8 (GAAACGGGTG). O marcador sexo-específico está indicado por seta. PM – Marcador de 100 pb.

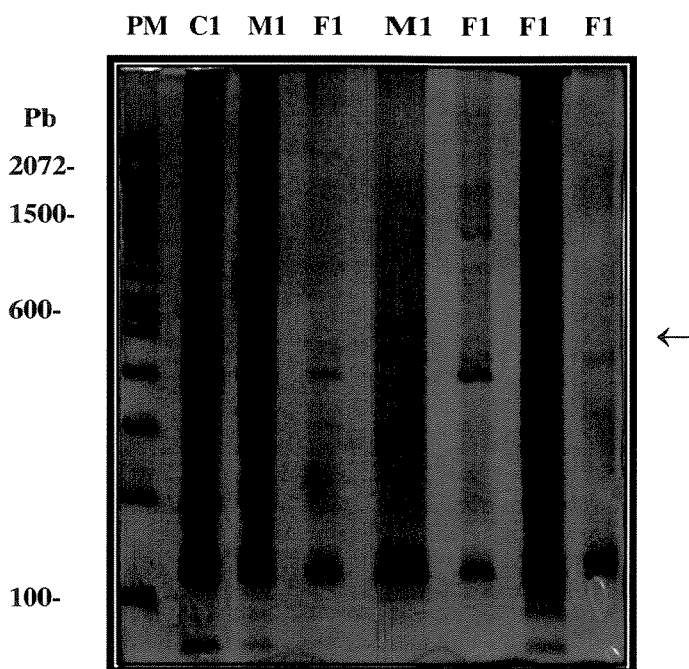


Figura 27: Amplificação de cDNA isolado de casais (C1), machos (M1) e fêmeas (F1) da linhagem BH usando o iniciador Rd9 (GTGACGTAGG). O marcador sexo-específico está indicado por seta. PM – Marcador de 100 pb.

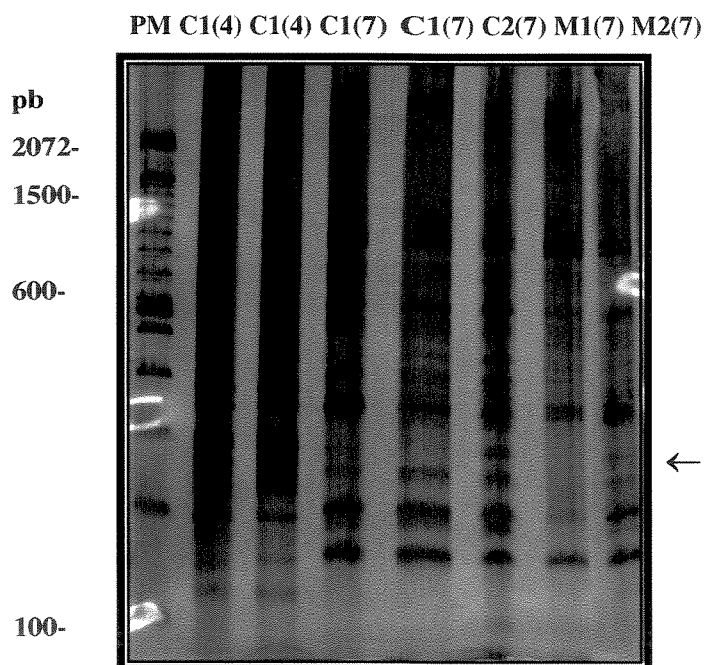


Figura 28: Amplificação de cDNA isolado de casais (C1) e machos (M1) da linhagem BH e de casais (C2) e machos (M2) da linhagem Ouh usando os iniciadores Rd4 (AGGGAACGAG) e Rd7 (TGCCGAGCTG). O marcador molecular está indicado por seta. PM – Marcador de 100 pb.

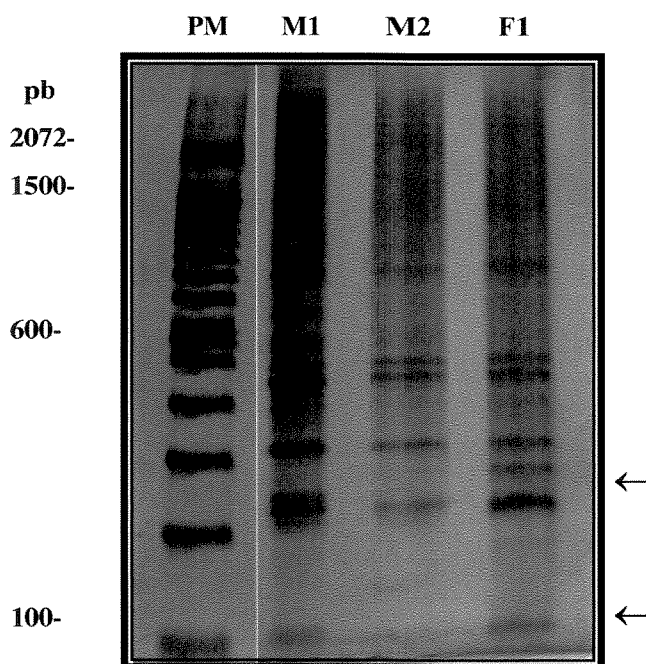


Figura 29: Amplificação de cDNA isolado de machos da linhagem BH (M1) e da linhagem Ouh (M2), e fêmeas da linhagem BH (F1) usando o iniciador Rd10 (GGGTAACGCC). Os marcadores moleculares estão indicados por setas. PM – Marcador de 100 pb.

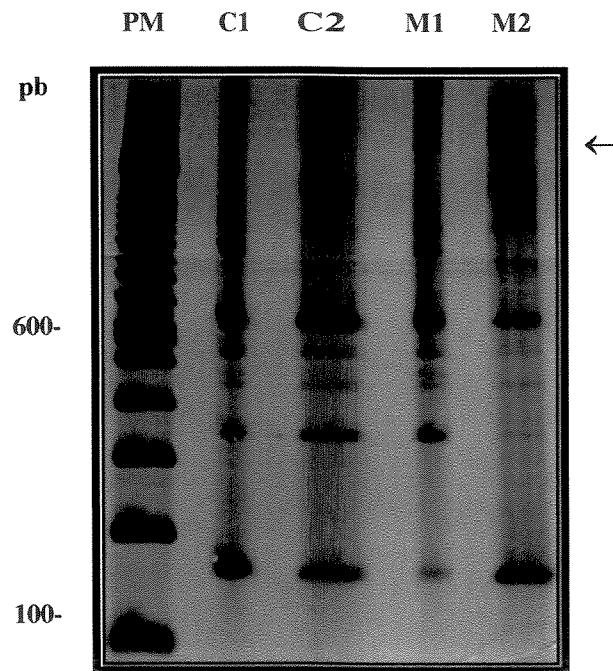
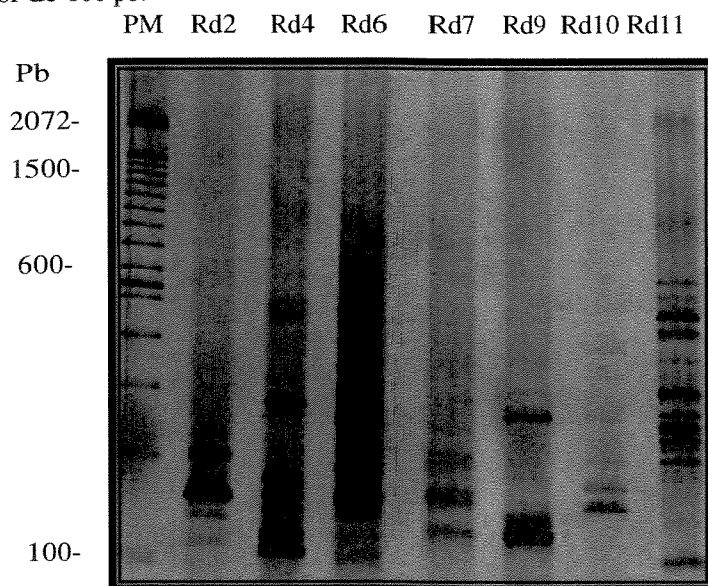


Figura 30: Amplificação de cDNA isolado de casais e machos (M1 e C1) da linhagem BH e de casais e machos (C2 e M2) da linhagem Ouh usando o iniciador Rd2 (TGCTCTGCCC). Marcador linhagem-específico está indicado por seta. PM – Marcador de 100 pb.



Figurra 31: Amplificação de cDNA isolado de cercárias da linhagem LE usando os iniciadores citados na legenda acima. PM - Marcador de 100pb

sequenciamento.

6. Sequenciamento e análise computacional das seqüências

A digestão dupla do plasmídeo recombinante com a enzima *EcoR* I mostra a presença de insertos com 400 pb nas amostras 2 e 7 (fragmento G400-9), 300 pb nas amostras 3 e 5 (CBH300-4), 600 pb na amostra 8 (fragmento MBH600-10) e aproximadamente 500 pb na amostra 9 (figura 31), confirmando a clonagem das respectivas bandas polimórficas (Tabela 05). Os marcadores mais significativos estão resumidos na Tabela 08.

A seqüência completa dos nucleotídeos foi obtida em sequenciador automático (ALF-Express-PHARMACIA-BIOTECH), utilizando o iniciador universal bacteriófago M13 fluoresceinado. As seqüências foram submetidas a busca de homologia com outras seqüências de nucleotídeos (“ blatsn “) e aminoácidos (“ blastx “) depositados no GenBank (NCBI-NIH, Bettesda, USA) utilizando-se o Basic Aligment Search Tool (BLAST). O princípio fundamental deste programa consiste no alinhamento máximo entre duas seqüências (High-Scoring Segment Pair-HSSP).

Três clones da banda polimórfica MBH600-10 (aproximadamente 600pb) foram seqüenciados. As análises desta seqüência mostraram que esta não tem homologia de aminoácido significativa. Observamos alta homologia de nucleotídeo (99%) com uma seqüência do genoma humano. Outra observação interessante é uma homologia de 89% com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase . Os alinhamentos que apresentaram maior identidade podem ser vistos no Apêndice 1-2. Na Tabela 04, podemos observar as seqüências de nucleotídeos que produziram “ score “ no pareamento com a seqüência da banda polimórfica.

O marcador G400-9 foi seqüenciado e apresentou uma interessante homologia de nucleotídeo com vetor TN10 (99%, Tabela 05), comprovada pela homologia de aminoácidos de 96% com transposase de *Salmonela* e TN10 (Tabela 06).

Os clones da banda polimórfica CBH300-4 foram seqüenciados e mostraram alta homologia (98%) de nucleotídeo com gene ribossomal 28S de *S. mansonii*, *S. spindale* e *S. haematobium* (Tabela 07). Maiores detalhes sobre os alinhamentos encontram-se no apêndice.

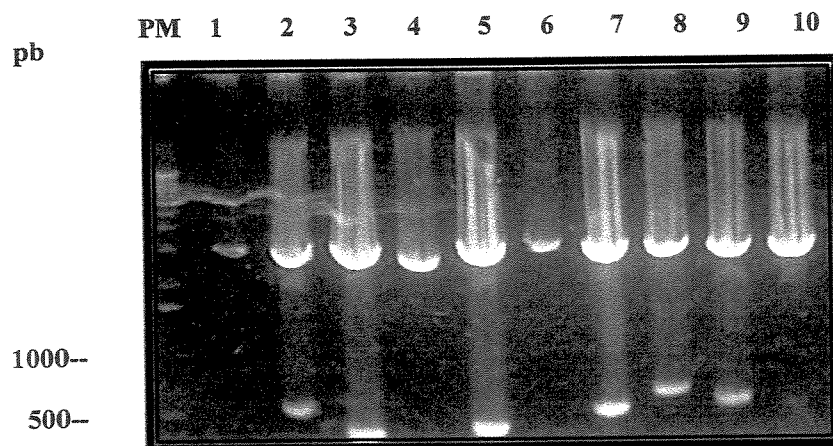


Figura 31: Análise da clonagem das bandas polimórficas no vetor PGEM-T após digestão dupla com as enzimas *EcoR* I. A reação foi analisada em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Como marcador de peso molecular foi utilizado padrão de 1 Kb (GIBCO-BRL). Na parte inferior do gel observamos os fragmentos polimórficos liberados após a digestão.

Tabela 04: Sequência de nucleotídeos que produziram score no pareamento com a sequência da banda polimórfica

Acesso GenBank	Homologia	Identidade (%)	Valor de E
AC008179	NH0576F01 (Homo sapiens)	99	0,0
AC003658	Xp22 BAC GS-607H18 (Homo sapiens)	85	e^{-116}
HJS585I14	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Homo sapiens)	89	e^{-107}
HSL25A3	Proteína like tetraciclina(Homo sapiens)	89	e^{-110}
AC008716	Cromossomo 5 (Homo sapiens)	89	e^{-107}
HSDJ335E1	Homo sapiens	88	e^{-105}
CNS01DWR	Cromossomo 14 (Homo sapiens)	88	e^{-100}
HS1044017	Homo sapiens	88	e^{-102}
AL158841	Homo sapiens	85	e^{-104}

A identidade indica a porcentagem de resíduos idênticos observados na região de alinhamento.

Tabela 05: Sequência de nucleotídeos que produziram “score” no pareamento com a sequência da banda polimórfica G400-9 de 400 pb proveniente do RAPD com o iniciador Rd9 presente nas linhagens adaptadas a *B. glabrata*.

Acesso GenBank	Homologia	Identidade (%)	Valor de E
Gi 14626270 gb AC092386.1 AC092386	<i>Homo sapiens</i>	99	e^{-154}
Gi 14196363 gb AC009142.10 AC009142	<i>Homo sapiens</i>	99	e^{-154}
Gi 14141752 gb AC009161.12 AC009161	<i>Homo sapiens</i>	99	e^{-154}
Gi 13873314 gb AF332859.1 AF332859S1	<i>Mus musculus</i>	99	e^{-154}
Gi 13786337 gb AC010548.8 AC010548	<i>Homo sapiens</i>	99	e^{-154}
Gi 13470146 gb AC022414.6 AC022414	<i>Homo sapiens</i>	99	e^{-154}
Gi 13447423 gb AC007470.11 AC007470	<i>Drosophila melanogaster</i>	99	e^{-154}
Gi 13162509 gb AC010591.8 AC010591	<i>Homo sapiens</i>	99	e^{-154}
Gi 12321708 gb AC068901.8 AC068901	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99	e^{-154}
Gi 11545515 gb AF307748.1 AF307748	vetor Tn 10	99	e^{-154}

Tabela 06: Sequência de proteínas que produziram “score” no pareamento com a sequência de aminácidos da banda polimórfica de 400 pb G400-9 proveniente do RAPD com o iniciador Rd9 presente em todas as linhagens adaptadas a *B. glabrata*.

Acesso GenBank	Homologia	Identidade de (%)	Valor de E
Gi 10957265 ref NP_058289.1	Putative IS10 Transposase- <i>Salmonella</i>	96	$2e^{-11}$
Gi 11545516 gb AAG37886.1	Transposase doTN10	96	$2e^{-11}$
Gi 418604 sp Q03226 YTDK_BACS	Hipotética proteína de 35,6 kDa	96	$4e^{-49}$
Gi 10957274 ref NP_058298.1	Transposase doTN10	95	$7e^{-48}$
Gi 2060934 gb AAG48301.1 AF310136_1	Transposase doTN10 Pseudomonas	72	$3e^{-36}$
Gi 4138699 emb CAA97957.1	Transposase doTN10- <i>Xantomonas</i>	38	$6e^{-10}$

Tabela 07: Sequência de nucleotídeos que produziram “score” no pareamento com a sequência da banda polimórfica de 300 pb proveniente do RAP com o iniciador Rd4 em casais da linhagem BH.

Acesso GenBank	Homologia	Identidade (%)	Valor de E
Gi 695740 emb Z46503.1 SMPR28SRR	Gene do ribossomo28S de <i>S. mansoni</i>	98	e^{-143}
Gi 695747 emb Z46505.1 SSSL28SRR	Gene do ribossomo28S de <i>S. spindale</i>	98	e^{-141}
Gi 695738 emb Z46521.1 SHM28SRR	Gene do ribossomo28S de <i>S. haematobium</i>	98	e^{-138}
Gi 695739 emb Z46504.1 SJP28SRR	Gene do ribossomo28S de <i>S. japonicum</i>	95	e^{-120}
Gi 11055089 gb AF184265.1 AF184265 _1	Gene do ribossomo28S de <i>B. polonica</i>	92	e^{-103}

Tabela 08: Candidatos a marcadores moleculares intra-específicos para *Schistosoma mansoni* identificados por RAPD-PCR e RAP-PCR

Marcadores moleculares	Iniciadores aleatórios	Método de identificação	Tamanho
MAP120-7	TGCCGAGCTG	RAPD	120 pb
MAP300-7	TGCCGAGCTG	RAPD	300 pb
MAP320-7	TGCCGAGCTG	RAPD	320 pb
LE2100-7	TGCCGAGCTG	RAPD	100 pb
G400-9	GTGACGTAGG	RAPD	400 pb
SP200-9	GTGACGTAGG	RAPD	200 pb
LE2000-9	GTGACGTAGG	RAPD	2000 pb
Ouh250-10	GGGTAACGCC	RAPD	250 pb
Ouh200-11	GTGATCGCAG	RAPD	200 pb
CBH100-10	GGGTAACGCC	RAP	100 pb
CBH250-10	GGGTAACGCC	RAP	250 pb
CLE250-7	TGCCGAGCTG	RAP	250 pb
FLE400-3	CTGCTGGGAC	RAP	400 pb
M700-2	TGCTCTGCCC	RAP	700 pb
MBH600-10	GGGTAACGCC	RAP	600 pb
FBH320-2	TGCTCTGCCC	RAP	320 pb

IV. DISCUSSÃO

1. Aspectos gerais da variabilidade

A evolução dos organismos depende de sua variabilidade inerente. Se suas variações não se adaptam a uma mudança ambiental eles são usualmente eliminados; isto é verdade para organismos simples e complexos. Os helmintos, anteriormente, eram freqüentemente considerados estáticos em seu estágio de evolução por serem primitivos e bem adaptados aos seus hospedeiros (SAOUD, 1966). Estudos comparativos com linhagens geográficas de parasitas, inclusive *S. mansoni*, têm demonstrado que essa afirmação não é verdadeira (SAOUD, 1966). Os dados apresentados aqui corroboram essa afirmação.

A premissa fundamental do Darwinismo é que a evolução ocorre pela conversão da variação intra-populacional em variação inter-populacional no tempo e espaço (LEWONTIN, 1974). Cem anos após a publicação da *Origem da Espécies* (DARWIN, 1859), a técnica de eletroforese de enzimas forneceu a primeira medida precisa da variação genética em populações naturais de organismos (HARRIS, 1966; LEWONTIN & HUBBY, 1966), sendo o grau de variação inesperadamente alto. A aplicação de técnicas de biologia molecular em estudos com ácidos nucléicos já sugeria que a extensão da variação em regiões de DNA não codificadoras pudesse ser maior que a encontrada em loci enzimáticos (AYALA, 1982; NEI, 1987). As moléculas ou frações moleculares sujeitas a mínima diferença funcional evoluem mais rápido (em termos de substituição de mutantes) que aquelas sujeitas a diferenças mais acentuadas (KIMURA, 1968). Neste trabalho, observamos polimorfismo de DNA da ordem de 0,75 ou 75,7%, sugerindo uma grande variabilidade inter-populacional uma vez que esses vermes estão sujeitos a pressões evolutivas. Essa variabilidade aumenta a valência biológica do parasita, tornando-o mais capaz de se adaptar a condições ambientais diversas.

Nas últimas duas décadas, teorias evolucionistas surgiram para explicar a variação genética encontrada em populações naturais de organismos. A **teoria neutralista** explica a maioria da variação genética por meio de mutações neutras seletivas e subsequente deriva genética (KIMURA, 1968), enquanto a **teoria selecionista** defende que muitos alelos são funcionalmente diferentes e mantidos por algum tipo de seleção balanceada (NEVO, 1978; SELANDER & KAUFMAN, 1973). A primeira teoria, portanto, afirma que a grande maioria das mudanças evolucionárias em nível molecular não são causadas pela seleção de Darwin mas, pela fixação

aleatória de mutantes seletivamente neutras. Ela também afirma que muito da variabilidade genética intra-específica em nível molecular é essencialmente neutralista. Deste modo, muitos alelos polimórficos são mantidos nas espécies pelo balanço entre o grau mutacional e a extinção (ou fixação) aleatória. Em outras palavras, o polimorfismo de DNA e proteínas é considerado uma fase transitória da evolução molecular, rejeitando a noção de que a maioria dos polimorfismos são adaptativos e ativamente mantidos por algum tipo de seleção balanceada. Os métodos moleculares utilizados neste estudo (RAPD-PCR e RAP-PCR) são centrados na teoria da evolução neutralista (KIMURA, 1968) e consideram uma correlação geral entre a quantidade de divergência molecular e o tempo decorrido desde esta divergência.

O DNA, para ser objeto de análises confiáveis, deve estar o mais íntegro possível e de boa qualidade. Quelantes de íons divalentes como o EDTA (etilenodiaminotetracetato) nos tampões foram usados em nossas amostras bloqueando a atividade das DNases I e II para preservar a estrutura do DNA (figuras 01 e 02). Como o RAPD envolve anelamento com iniciadores aleatórios (seqüências de nucleotídeos aleatórias) sob condições de baixa estringência, devem ser tomados cuidados adicionais para evitar amplificação de DNA contaminante. Os controles negativos, feitos paralelamente a todas as reações de RAPD, garantem a fidelidade dos nossos resultados. O uso de diferentes iniciadores permite que o genoma total possa ser analisado quanto a variação genética porque os iniciadores anelam nas posições de alta homologia naquelas condições de amplificação usadas. Esta variação observada pelo procedimento de RAPD-PCR é, portanto, confiável devido a sensibilidade do método, uma vez que as posições de nucleotídeos também podem ser comparadas (McMANUS & BOWLES, 1996). A capacidade do PCR de amplificar segmentos a partir de pequenas quantidades de DNA também permitiria a adaptação do método para ser usado em investigações epidemiológicas de estágios larvais (BARRAL et al., 1993).

2. Variabilidade do *Schistosoma mansoni*

Para os parasitologistas, uma linhagem pode ser considerada não sendo somente geneticamente diferenciada de outra população mas, também diferindo em uma ou mais características de importância epidemiológica. Nesse caso, o termo “linhagem” é valioso, não como unidade evolucionária ou categoria taxonômica mas, como um descritor prático no controle

e tratamento de doenças parasitárias (THOMPSON & LYMBERY, 1990). JONES & KUSEL (1989) afirmavam que a variação no caso de *S. mansoni* não parecia ter base genética. Nossos dados indicam que essa afirmação não procede. Torna-se interessante, portanto, correlacionar estes dados com fatores epidemiológicos importantes para que estes tenham um valor real.

A variabilidade genética entre populações distintas de uma espécie pode ter um padrão diferente daquela entre espécies distintas. Considerando um “pool” gênico que contenha uma alta variabilidade genética, as linhagens tendem a preservar ou eliminar alelos nos loci polimórficos dependendo da heterogeneidade do ambiente local. Se o meio-ambiente for homogêneo em relação a alguns parâmetros, a seleção balanceada não poderia ocorrer para muitos alelos. Isto poderia explicar a perda da variabilidade genética observada em experimentos cujo ambiente é homogêneo e artificial (VALENTINE, 1976), como no caso das linhagens mantidas durante muito tempo em laboratório. Em nosso estudo, notamos a diminuição na variabilidade genética na linhagem LE pelo menos na relação parasita-hospedeiro intermediário (figuras 16 e 17), confirmando que vermes infectando hospedeiros intermediários e definitivos em condições padronizadas, tendem a se diferenciar das “linhagens de campo” (BH, SJ1, SJ2 e Ouh).

Diferenças fenotípicas significantes existem dentro e entre populações geográficas de *S. mansoni* (MINCHELLA et al., 1997). A variabilidade intra-específica observada em estudos de ecologia e epidemiologia de *S. mansoni* tem se mostrado um fenômeno importante, gerando conseqüências tais como diferenças quanto a preferência ao hospedeiro intermediário, cronobiologia da emergência cercarial, a infectividade, morfologia, virulência, manifestações clínicas, suscetibilidade a quimioterapia e resistência a imunidade induzida por vacina entre populações da mesma espécie (ROLLINSON et al., 1986; BRYANT & FLOCKHART, 1986; McMANUS & HOPE, 1993). Dentro deste contexto, escolhemos trabalhar com linhagens de áreas geográficas diferentes, adaptadas a *B. glabrata* (BH, MAP, Ouh e LE), adaptadas a *B. tenagophila* (SJ1 e SJ2), patogênica (BH), tolerante (Ouh) e resistente (MAP) a drogas esquistossomicidas. Devido a possível influência de fatores ambientais e/ou do hospedeiro sobre estes fenótipos, a variabilidade pode não refletir diferenças genéticas entre as populações de parasitas (THOMPSON & LYMBERY, 1990). Para o diagnóstico, tratamento e controle efetivo das doenças parasitárias, é essencial que as linhagens de parasitas possam ser acuradamente caracterizadas. Uma tentativa de definição de linhagens é baseada na distribuição geográfica ou

na espécie de hospedeiro mas, diferenças genéticas freqüentemente cruzam estes limites (THOMPSON & LYMBERY, 1990).

A morfologia externa geral do parasita fornece a mais primária e evidente fonte de características comparativas, embora comumente espécies próximas sejam morfologicamente indistinguíveis, mesmo quando têm relevantes características epidemiológicas distintas (THOMPSON, 1988). No Brasil, existem alguns trabalhos que descrevem as características fenotípicas dos vermes adultos de diferentes linhagens (MAGALHÃES & CARVALHO, 1973b; PARAENSE & CORRÊA, 1981; MACHADO-SILVA et al., 1995). Os vermes machos adultos da linhagem BH são maiores que os da SJ (MAGALHÃES & CARVALHO, 1973b). Os vermes da linhagem Ouh são os maiores já observados entre linhagens brasileiras (GOMES, 1996). É interessante frisar que nos animais pequenos, a área da superfície é suficientemente grande em relação ao volume do corpo, de modo que as trocas de gases e resíduos e o transporte interno podem ser executadas por difusão através da superfície corpórea geral. O tamanho maior do corpo implica também em aumento das superfícies externas e internas, facilitando funções tais como secreção, absorção e trocas gasosas (BARNES, 1984). O tamanho do verme adulto, assim como a produção cercarial, são características relacionadas com a infectividade da linhagem (JOHNSTON et al., 1993).

Um dos estudos precursores sobre a variação intra-específica em *S. mansoni* foi realizado por PARAENSE & CORRÊA, em 1981, comparando as linhagens BH e SJ. Os resultados deste estudo já apontavam um melhor ajustamento fisiológico da linhagem BH-*B. glabrata* que o binômio SJ-*B. tenagophila*, sendo ambos simpátricos. Para estudar detalhadamente o parasita, é necessário estabelecer isolados em laboratório e, obviamente, estes isolados representam uma pequena parte do pool gênico das populações naturais de *Schistosoma*. Além disso, existe a possibilidade da seleção de genótipos particulares devido a passagem sucessiva em hospedeiros de laboratório (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987).

Deve-se ter em mente, portanto, que o desenvolvimento de uma população de *S. mansoni* a partir de poucos clones de cercárias (efeito fundador) poderia explicar a baixa variabilidade intra-populacional em linhagens mantidas em laboratório por longo tempo sem que haja uma retro-alimentação com parasitas do campo, como ocorre com a LE. Este fenômeno poderia favorecer um limitado fluxo gênico e a fixação ou perda de determinados alelos. De acordo com FLETCHER et al. (1981), a “passagem” contínua dos esquistossomos por camundongos

diminui a variabilidade genética pela seleção induzida do hospedeiro de determinados alelos de isoenzimas (as linhagens existem geneticamente em condições adaptativas únicas em determinado laboratório). Nestas gerações repetidas, somente uma fração dos genótipos disponíveis amadureceriam, acasaliariam, contribuindo, assim, para a geração subsequente (SLATKIN, 1987). A variabilidade genotípica (diferenças no DNA) gera, em última análise, uma variabilidade fenotípica, caracterizada pelo parâmetros distintos de cada linhagem estudada. O fluxo gênico (modificações de frequências de alelos devido ao movimento de gametas ou indivíduos) é um pré-requisito para a especiação alopátrica clássica (NADLER, 1995). As linhagens BH e SJ1,2 por manterem altos níveis de fluxo gênico entre elas, podem estar se comportando como unidades evolucionárias únicas, enquanto as linhagens Ouh e LE, com baixos níveis de fluxo gênico, podem estar evoluindo independentemente (figuras 15 e 16). Embora os estudos devam continuar sendo feitos com linhagens de laboratório, deve-se reconhecer que é impossível garantir que estas populações sejam representativas daquelas do campo (CURTIS & MINCHELLA, 2000), portanto, é necessário ressalvas com as extrapolações de nossos resultados. Dentre as linhagens utilizadas neste estudo, a BH (PARAENSE & CORREA, 1963b), utilizada há 38 anos como referência para outras linhagens, e SJ têm seu material genético periodicamente re-alimentado com parasitas e moluscos colhidos no campo. A linhagem LE, por sua vez, devido sua longa manutenção em laboratório apresentaria baixa heterozigose, fenômeno observado quando sua estrutura populacional foi determinada por microsátélites de DNA (RODRIGUES et al., 2001). Segundo NEI et al. (1972), o efeito fundador reduz a heterozigose em média 65%.

O isolamento da linhagem Ouh é relativamente recente, sendo utilizada neste trabalho a geração F17. Segundo GOMES (1996), a linhagem Ouh, apresenta períodos pré-patente e patente de 35 e 28 dias, respectivamente. É interessante ressaltar que todos os moluscos que eliminaram cercárias morreram no final do período de 28 dias, sugerindo que, possivelmente, a relação parasita-hospedeiro intermediário seja recente na história natural do parasita na região de Ourinhos. O fenômeno de co-evolução parasita-hospedeiro é bem documentado e deve ser levado em consideração (THOMPSON, 1994). De um modo geral, esta associação tende para o equilíbrio pois a morte do hospedeiro é prejudicial para o parasita. Análises comparativas feitas com o DNA de linhagens de laboratório e do campo feitas por PINTO et al. (1997) mostraram que o fenômeno da heterogeneidade em *S. mansoni* estava erroneamente sendo sub-estimado.

Na década de noventa, estudos genotípicos moleculares realizados com *S. mansoni* têm revelado um surpreendente grau de diversidade intra-específica (BARRAL et al., 1993; DIAS NETO et al., 1993a; McMANUS & HOPE, 1993; PILLAY & PILLAY, 1994). Corroborando com estes dados, os perfis eletroforéticos obtidos neste trabalho com os cinco iniciadores utilizados indicaram variabilidade genética entre as nossas linhagens (figuras 02, 04, 06, 08 e 10). Tais observações estão de acordo com estudos morfológicos e biológicos anteriores (SAOUD, 1965; MAGALHÃES & CARVALHO, 1973b; FRANDSEN, 1979; PARAENSE & CORRÊA, 1981).

3. Variabilidade no hospedeiro intermediário

Nas áreas endêmicas, normalmente habitadas por *B. glabrata*, encontram-se indivíduos com a forma hepatoesplênica descompensada da esquistossomose, enquanto nas áreas onde o homem se infecta através de cercárias oriundas da *B. tenagophila*, a maioria dos portadores são assintomáticos (DIAS et al., 1988). Estudos sobre a compatibilidade entre diferentes linhagens de *S. mansoni* e seus hospedeiros invertebrados, indicam uma maior compatibilidade entre eles quando o tempo requerido para o completo desenvolvimento do parasita no molusco é mais curto (FRANDSEN, 1979; PARAENSE & CORRÊA, 1981) ou quando a produção cercarial indica maior capacidade infectante (ZANOTTI-MAGALHÃES et al., 1991). Um miracídio pode penetrar em várias espécies de molusco, mas seu desenvolvimento ou não nos tecidos é determinado pela adaptação bioquímica e genética ao hospedeiro intermediário. NEWTON (1952) considerava que essa suscetibilidade ou resistência do molusco como uma característica hereditária. O desenvolvimento dos miracídios e consequente produção cercarial seria resultado de uma intensa reação de defesa celular (MALEK, 1967). Os trabalhos de RICHARDS (1970), RICHARDS & MERRITT (1972) e NABIH & ELANSARY (1980) confirmaram em extensivos estudos da genética dos moluscos *B. glabrata* e *B. alexandrina* que a relação de especificidade parasita-hospedeiro intermediário é realmente de caráter genético. Além disso, RICHARDS (1977) mostrou que a resistência à infecção em moluscos adultos é governada por um único gene de acordo com a genética mendeliana. Esta sugestão teve suporte a partir das descobertas de KNIGHT et al. (1991) e LARSON et al. (1996), que descreveram a ocorrência de polimorfismos genéticos em moluscos resistentes e suscetíveis através do uso de fragmentos de restrição de

comprimentos polimórficos (RFLPs) no gene de rRNA e ensaios de RAPD. Em *B. glabrata*, no entanto, a resistência ao *S. mansoni* é conhecida como uma característica multigênica (ROLLINSON et al., 1997). Estas considerações tornam-se relevantes na medida em que a transmissão da parasitose depende do grau de compatibilidade entre o molusco e a linhagem local do parasita. A infectividade do *Schistosoma* também parece ser determinada geneticamente, mas é uma característica multigênica (KASSIM & RICHARDS, 1979).

Principalmente duas características epidemiológicas do *S. mansoni* dariam suporte a uma subdivisão mantendo genótipos agrupados. A pressão imune aplicada por grupos de hospedeiros relacionados (intermediários ou definitivos) poderia selecionar uma agregação particular de parasitas locais. Além disso, os genótipos dos parasitas mostram uma tendência a supradispersão nos hospedeiros intermediários *B. glabrata* (MINCHELLA et al., 1995). De qualquer modo, estes dois fatores poderiam ser afetados pela recombinação que ocorre quando o casal de vermes no homem gera novos genótipos.

O grau de infectividade destes hospedeiros determinaria, portanto, a patogenicidade dos esquistossomos (SAOUD, 1966) e é regulado por mecanismos celulares e humorais próprios (BAYNE et al., 1980; GRANATH & YOSHINO, 1984) desencadeando ou não uma reação amebocitária em torno dos esporocistos (GUARALDO et al., 1981). Em outros casos, a suscetibilidade de uma linhagem de moluscos a um trematódeo particular pode ser causada pela capacidade do parasita de esquivar-se do sistema de defesa do hospedeiro por mimetismo molecular, ou pela supressão ou alteração da resposta do hospedeiro (BAYNE & YOSHINO, 1989; LOKER, 1994). Sendo o parasita bem-sucedido, a expectativa de vida do molusco diminui (STURROCK, 1966). Analisando os padrões eletroforéticos obtidos com os cinco iniciadores usados no RAPD-PCR, observamos que somente aquela obtida com o iniciador Rd9 (GTGACGTAGG) (figura 07) demonstra alguma variabilidade entre as linhagens com relação a adaptabilidade ao molusco. As linhagens que parasitam *B. glabrata* (BH, Ouh e LE) apresentam um fragmento de aproximadamente 400 pb (marcador G400-9), ausente nas linhagens que parasitam *B. tenagophila*. Este fragmento polimórfico poderia ser responsável por uma variabilidade neutra, regulatória ou funcional ocasionando que a ausência do alelo poderia proporcionar a capacidade de infectar a *B. tenagophila*. É interessante lembrar que a linhagem SJ2 consegue infectar *B. glabrata*. Essa adaptabilidade, poderia ser em termos de produção cercarial, a qual ocasionaria ou não uma maior patogenicidade. De qualquer modo, funcional ou

não, o fragmento G400-9 é um marcador interessante para linhagens que parasitam *B. glabrata*, mais patogênicas, o qual direcionaria uma quimioterapia mais racional. A adaptabilidade medida pela produção cercarial também poderia ser interpretada em termos de eficácia epidemiológica, superior nas linhagens adaptadas a *B. glabrata*.

A distribuição do *Schistosoma*, albergados em diferentes espécies de *Biomphalaria*, têm consequências epidemiológicas para sua dinâmica nos hospedeiros vertebrados. Portanto, a supra-dispersão genotípica serve para manter a diversidade genética do parasita através da transmissão de múltiplos genótipos (MINCHELLA et al., 1995). Outros processos que também poderiam auxiliar a heterogeneidade genética são a mobilidade dos hospedeiros definitivos, a agregação espacial dos moluscos infectados com cercárias de diferentes genótipos e a rápida alteração nos índices de mortalidade do hospedeiro durante o período patente (ANDERSON & MAY, 1979).

A produção de uma descendência variável em ambientes variáveis é presumida como uma vantagem da reprodução sexual (BELL, 1982). Esta ocorre nos hospedeiros vertebrados, os quais adquirem formas infectantes que são produtos assexuais do parasita (cercárias). As cercárias oriundas de um único hospedeiro intermediário através do processo de expansão clonal, não diferem geneticamente. Se cada hospedeiro intermediário carrega somente um único genótipo parasita, e estes são distribuídos ao acaso entre os hospedeiros intermediários, então a mobilidade dos hospedeiros vertebrados é essencial na aquisição de um arranjo diverso de genótipos parasitas no hospedeiro vertebrado. Como eles são expostos a formas infectantes de múltiplos hospedeiros intermediários, os hospedeiros vertebrados servem como ponto de fusão da diversidade genética parasita (MINCHELLA et al, 1995). Uma vez que somente a mobilidade dos vertebrados pode não ser suficiente para manter a diversidade genética no *Schistosoma*, onde pelo menos dois genótipos (macho e fêmea) são necessários para a infecção, a grande dispersão dos diferentes genótipos parasitas entre os hospedeiros intermediários auxilia também a manutenção desta heterogeneidade. Visto que uma proporção substancial da variabilidade genética na população do parasita pode ser encontrada dentro de um único hospedeiro intermediário infectado por vários miracídios, a transmissão de múltiplos genótipos parasitas não requer exposição a estágio infectantes de vários hospedeiros intermediários. Se a redução na sobrevivência dos hospedeiros intermediários infectados com múltiplos genótipos não diferir significativamente daqueles hospedeiros infectados com um parasita, então uma distribuição agregada dos genótipos parasitas

seria esperada nos hospedeiros intermediários. Entretanto, diferenças na produção cercarial entre moluscos expostos a um ou vários miracídios pode ser significativamente dependente do tamanho do hospedeiro e do tempo de exposição (GERARD et al., 1993). Os parasitas oriundos de hospedeiros intermediários infectados por vários miracídios poderiam sofrer uma redução na produção cercarial, mas este custo pode ser balanceado por um aumento na probabilidade de infecções dos hospedeiros vertebrados bem sucedidas quando os moluscos abrigam infecções sexo-balanceadas. Pelo lado dos parasitas, supra-dispersão dos genótipos facilita a transmissão de genótipos múltiplos e a manutenção da heterogeneidade genética. A co-infecção de hospedeiros com populações de parasitas geneticamente heterogêneos, fenômeno passível de ocorrência na natureza, influenciaria não somente a dinâmica de transmissão do parasita mas, também a evolução da virulência do parasita (GUPTA et al., 1994; NOVAK & MAY, 1994).

4. Variabilidade na esquistossomose humana

A diversidade intra-específica pode ser a base da variação regional observada na aparência clínica da esquistossomose (McCUTCHAN et al., 1984; COELHO et al., 1989). O grau de morbidade da esquistossomose mansônica humana varia nas diferentes regiões, possivelmente porque a infectividade e a fecundidade do parasita é variável (HIGGINS-OPITIZ & DETTMAN, 1991). A patogenia da doença pode estar relacionada com a infectividade da linhagem aos hospedeiros intermediário e definitivo, a distribuição dos ovos nos tecidos e o tamanho das reações granulomatosas, tendo como consequência um quadro de hepato-esplenomegalia (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987). A linhagem Ouh demonstrou estas relações em condições experimentais (GOMES, 1996), apresentando índices de recuperação de vermes adultos de 52%. Conseqüentemente, haveria maior número de fêmeas ovipondo, aumentando a patogenicidade da linhagem. As outras linhagens estudadas por MAGALHÃES & CARVALHO (1973a) apresentaram índices de recuperação de 17% (BH) e 15,6% (SJ).

Os parasitas penetram rapidamente via cutânea ou mucosa (2-15 minutos) (BARBOSA, 1970) mas MILLER & WILSON (1978) observaram que a pele do camundongo constitui uma barreira intransponível para 60-70% das cercárias de *S. mansoni*. Segundo dados da WHO (1993), padrões geográficos na patologia da esquistossomose é um fenômeno bastante comum. Embora sejam freqüentemente explicados por meio de diferenças na intensidade de transmissão

entre focos ou genótipos de hospedeiro, devemos considerar que algumas manifestações da doença são relacionadas diretamente a genética do parasita (CURTIS & MINCHELLA, 2000). Embora estas características possam ter alguma base genética, fatores externos também influenciam os padrões epidemiológicos. A duração do período pré-patente no hospedeiro definitivo é característico da espécie e varia entre as linhagens, entretanto o período pré-patente no hospedeiro intermediário é mais dependente de influências ambientais e do próprio molusco (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987; McMANUS & HOPE, 1993). Como os testes de vacinas estão cada vez mais iminentes (BERGQUIST & COLLEY, 1998), seria prudente examinar também a variação genética em epítomos relevantes no âmbito de ação do *S. mansoni*, para determinar quanto efetiva uma vacina poderia ser em cada região geográfica pois os dados deste trabalho mostram uma considerável variabilidade intra-linhagens.

Por outro lado, o *S. mansoni* pode sobreviver por vários anos exposto aos mecanismos imunitários do hospedeiro sem aparente dano, O que pode estar ocorrendo na linhagem SJ1, adaptada a *B. tenagophila*, considerada menos patogênica. O polimorfismo do comportamento de linhagens do parasita frente ao sistema imune do hospedeiro definitivo pode ser atribuído em parte a expressão diferencial de antígenos que ocorre durante a maturação do verme (SNARY et al., 1980), bem como ao desenvolvimento de uma membrana mais externa multilaminar constantemente renovada (HOCKLEY, 1973; WILSON & BARNES, 1974).

O Vale do Paranapanema é uma região endêmica controlada pela SUCEN onde os portadores vêm sendo submetidos ao tratamento pelo oxamniquine desde 1973, evidenciando uma área de pressão de droga de cerca de 30 anos (GOMES, 1996) com possível contaminação do ambiente com ovos provenientes de pacientes tratados e não curados, e seleção de parasitas menos suscetíveis a droga (COLES et al., 1987). Desta região foi isolada a linhagem Ouh que difere das outras linhagens estudadas devido sua tolerância ao oxamniquine e praziquantel, não respondendo adequadamente ao tratamento. Esta tolerância foi induzida por seleção em laboratório (GOMES, 1996). BONESSO et al. (1994) observaram que a dosagem de 100 mg/Kg/5 dias foi capaz de matar apenas 80% dos vermes machos e que parte dos vermes que sobreviveram continuaram acasalados e, em alguns casos, com recuperação da oviposição. Os fragmentos Ouh250-10 e Ouh200-11 (figuras 09 e 11; Tabela 05) são possíveis marcadores moleculares da linhagem Ouh que facilitariam o tratamento através de uma escolha coerente da droga e dosagem a ser utilizada.

5- Análise do polimorfismo genético através do RAPD-PCR

O genoma possui um enorme conteúdo informativo. A homogeneidade observada nos padrões de amplificação do gDNA é consistente com a baixa variabilidade em linhagens de laboratório previamente reportadas (DIAS NETO et al., 1993a), mesmo em um organismo de reprodução sexuada. No entanto, em oposição a alta taxa de polimorfismo observada neste estudo (somente 24,3% das bandas amplificadas eram compartilhadas por todas as linhagens), BARRAL et al. (1993) e DIAS NETO et al. (1993b) observaram 5% e 7% de polimorfismo entre diferentes linhagens de *S. mansoni*, respectivamente. Nossos dados parecem mais condizentes com de KAUkas et al. (1994) que observou 25% de bandas compartilhadas entre diferentes linhagens de *S. intercalatum*. A eletroforese em gel de agarose utilizada no primeiro trabalho, no entanto, é considerada menos sensível que a eletroforese em gel de poliacrilamida corada com prata, explicando os resultados discrepantes. No segundo trabalho, o autor já salientava a necessidade do uso de iniciadores que amplificassem bandas suficientes para permitir uma análise quantitativa. O segundo método (BEIDLER et al., 1982; BASSAM et al., 1991) é cerca de 100 vezes mais sensível (3 pg / mm em géis de 1,5 mm) e possui maior resolução. O grau de variação nos produtos de PCR obtidos pela análise de RAPD reflete a variação da sequência dos sítios de anelamento dos iniciadores entre as linhagens do parasita (PILLAY & PILLAY, 1994). Algumas bandas são mais intensas que outras, como observado em nossos perfis eletroforéticos (figuras 02, 04, 06, 08 e 10), o que implica ou em um maior acesso da sequência a Taq polimerase ou que a sequência amplificada corresponde a DNA repetitivo (DNA satélite sexo-específico, DNA satélite compartilhado entre os sexos, genes de RNA ribossomal e sequências retrotransposons-like) ou na presença de mais de uma cópia do gene (BARRAL et al., 1993). Os fragmentos coimigrantes eletroforicamente entre duas linhagens são considerados indicativos de uma sequência comum, devido a baixa probabilidade de que dois fragmentos distintos amplificados migrem juntos. Portanto, a determinação do número de fragmentos que são comuns a duas amostras é uma estimativa de sua distância genética (BARRAL et al., 1993). A disponibilidade de um número significativo de fragmentos (144 fragmentos, Tabela 01) obtidos neste trabalho, possibilitou o cálculo das distâncias genéticas entre as linhagens BH, SJ1, SJ2, Ouh e LE (Tabela 03).

A maior ou menor intensidade das bandas também poderia estar relacionada com a variação individual dentro de cada “ pool “ de linhagem estudada porque os perfis eletroforéticos de uma amostra são uma combinação do padrão de seus membros individuais. BARRAL et al. (1993), no entanto, encontrou basicamente padrões individuais e de amostras idênticos quanto a discriminação dentro do gênero *Schistosoma*. Mesmo assim, seria interessante fazer, futuramente, este experimento com nossas linhagens para avaliar a real origem da variabilidade e viabilizar estudos mais acurados de genética de populações.

Os iniciadores utilizados neste estudo foram previamente utilizados na amplificação do DNA de três linhagens de *S. mansoni* (BARRAL et al., 1993) do Brasil, Guadalupe e Venezuela que observaram, do mesmo modo que em nosso trabalho, polimorfismo intra-específico em 46% dos iniciadores. Em nosso trabalho, a percentagem de iniciadores que detectaram polimorfismo intra-específico foi de 45,5%. Os iniciadores RD7, Rd8, Rd9, Rd10 e Rd11 (figuras 03, 05, 07, 09 e 11) também detectaram marcante polimorfismo no trabalho citado acima, assim como em nosso estudo. Uma observação bastante interessante deve ser levada em conta aqui. As linhagens estudadas por BARRAL et al (1993) são mais distantes geograficamente, oriundas de países diferentes, quando comparadas com as deste estudo, todas brasileiras. No entanto, o grau de polimorfismo encontrado em nosso estudo (75,7%) é bastante superior, em parte devido a metodologia utilizada, em parte devido ao próprio polimorfismo intra-específico que parece condizer com características fenotípicas tão distintas.

Os produtos das análises de RAPD podem ser classificados em três grupos: (1) aqueles que aparecem em todas as amostras (não polimórficos); (2) aqueles que aparecem claramente em algumas amostras mas, não em outras (polimórficos); e (3) aqueles de intensidade variável (quantitativamente polimórficos) (HEUN & HELENTJARIS, 1993). Neste estudo, apenas os dois primeiros tipos foram considerados para análise, ou seja, aqueles mais estáveis.

Usando a técnica de RAPD, obtivemos marcadores que podem ser usados para discriminar linhagens de *S. mansoni*. (figuras 02, 03, 04, 05 e 06), com a vantagem adicional da não necessidade da informação da sequência ou do uso de radioatividade e de se detectar diversidade no genoma total (BARRAL et al., 1993). Isto possibilita o uso destes marcadores como ferramentas diagnósticas em áreas endêmicas onde a identificação tem se mostrado difícil por meio de características morfológicas ou biológicas.

No RAPD, hipoteticamente assumimos que um fragmento é amplificado em todos os casos nos quais dois sítios de iniciadores sucessivos estão localizados em fitas complementares em orientação oposta. O polimorfismo é detectado como presença ou ausência de banda, podendo ser causado pela alteração no sítio de ligação do iniciador em alguns indivíduos ou grupo de indivíduos (no nosso caso, linhagens). As diferenças na seqüência de nucleotídeos podem ser causadas por mutações, inserções ou deleções, inversões ou translocações, ou variação no número de seqüências repetitivas nestes sítios (CLARK & LANIGAN, 1993). No exame do polimorfismo de DNA em nosso estudo, observamos uma média de 15 bandas / linhagem. A estimativa da divergência deve basear-se não somente na contagem absoluta das bandas (Tabela 01) mas, também, na proporção de bandas que compartilhadas por duas ou mais amostras (Tabela 02). Se considerarmos os dados do RAPD como análogos a fragmentos de restrição, podemos estimar a divergência nucleotídica (número de substituições por sítio) entre nossas linhagens. O RAPD, por sua vez, tem a característica de ser mais abrangente que o RFLP, uma vez que este não pode identificar diferenças entre alelos se estas forem causadas por substituições de bases ocorridas fora dos sítios de restrição. Seguindo este raciocínio, as linhagens mais distantes geneticamente, LE e Ouh, apresentariam maior número médio de nucleotídeos diferentes por sítio de iniciador (NEI & LI, 1979), que as linhagens SJ1 e SJ2 (Tabela 03). Para tanto, devemos assumir que a amplificação dos fragmentos depende unicamente do anelamento entre iniciador e um sítio genômico. A baixa distância genética e divergência nucleotídica entre as linhagens SJ1 e SJ2 já era esperada, uma vez que o tempo de seleção desta última é pequeno para provocar muitas alterações em nível de DNA que a diferencie da primeira. Além disso, a maior proximidade entre BH e SJ2 que entre BH e SJ1 (Tabela 03), sugere que na linhagem que está sendo selecionada (SJ2) a evolução esteja atuando no sentido de aproximá-las, uma vez que a linhagem SJ2 infecta *B. glabrata* tão bem quanto BH, sendo mais patogênica.

Análises usando marcadores de RAPD têm demonstrado a diversidade genética de *Schistosoma* infectando ratos em Guadalupe (BARRAL et al., 1996) e o método tem permitido um exame recente da diversidade parasita entre os moluscos (SIRE et al., 1999). A descrição desta diversidade dentro do hospedeiro é uma etapa crucial para entender a estrutura da população, mas estimativas similares da diversidade genética do parasita são necessárias para uma amostragem simultânea maior dos hospedeiros intermediário e definitivo em uma área grande. Outras questões complexas sobre a estrutura da população de *Schistosoma*, no entanto,

permanecem obscuras. Qual seria a proporção de genótipos de parasitas que, liberados no ambiente como ovos nas fezes humanas, se estabelecem nos moluscos? Para respondê-la é necessário o desenvolvimento de marcadores efetivos para medir a frequência dos alelos na população, como por exemplo marcadores de microsátélites ou de RAPD individual.

Muitas substituições de ácidos nucleicos podem ocorrer em regiões não-transcritas do DNA e portanto não conservadas durante a evolução (LI et al., 1973; ROBERTSON & JEPPESEN, 1972). São conhecidas linhagens com diferentes taxas de mutações em vários organismos (COSTA, 1987). O mesmo pode ocorrer em *S. mansoni*, gerando linhagens com características fenotípicas tão diversas como as estudadas neste trabalho. Esperávamos, portanto, que existissem mais diferenças em nível de DNA que em nível de proteínas em genomas relacionados, o que foi comprovado em nosso estudo com o número maior de possíveis marcadores de RAPD em comparação com os de RAP-PCR (Tabela 05) (KING & WILSON, 1975). Deve-se levar em conta o número de fragmentos totais e não apenas os mais marcantes. Para cada proteína, o raio de evolução em termos de substituições de aminoácidos é aproximadamente constante por sítio de aminoácidos por ano para várias linhagens (KIMURA, 1968). Estas discrepâncias podem ocorrer devido a redundância dos códons e consequentemente a existência de mudanças de nucleotídeos de terceira posição as quais não levarão a substituições de aminoácidos. Pelo RAP-PCR, então, descartamos as mutações que ocorreram em regiões não-transcritas e avaliamos somente as mutações em regiões codificadoras ou expressão diferencial, levando-se em conta, no entanto, que as mutações em regiões codificadoras nem sempre levam a alterações importantes na proteína final.

6. Análises filogenéticas

A análise do dendograma construído com o método Neighbor do programa RADistance (figura 15) forneceu uma demonstração direta da variação intra-específica de *S. mansoni* oriundos de áreas geográficas diversas, indicando a similaridade entre as diferentes OTU's; no nosso caso, linhagens. Este método objetiva refletir distâncias evolucionárias. Assim como PILLAY & PILLAY (1994), nossos resultados sugerem que, pelo menos com os iniciadores utilizados, o RAPD pode ter amplificado regiões neutras do DNA das amostras que em sua forma filogeneticamente conservada não sofreu pressões ou manipulação prolongada em laboratório. O

dendograma mostrou dois ramos, um abrigando as linhagens mineiras e outro as paulistas. A maior proximidade genética entre as linhagens mineiras, ambas oriundas da região de Belo Horizonte, pode ser devida a uma maior proximidade geográfica espacial em comparação com as paulistas já que a diversidade genética helmíntica aumenta em função do aumento da barreira geográfica entre populações (isolamento geográfico) (PILLAY & PILLAY, 1994). Geralmente, quanto mais distanciadas estão as populações, mais diferentes elas são em frequências alélicas e nas características fenotípicas de base genética, embora não haja, freqüentemente, uma correlação estrita. As distâncias genéticas puderam ser calculadas devido a disponibilidade de um número significativo de fragmentos (144 fragmentos) (Tabela 02) e são definidas como o número médio de substituições de bases por locus (NEI, 1972) ou número médio de substituições de nucleotídeos por sítio (NEI & LI, 1979). Quando observamos fragmentos polimórficos no perfil eletroforético de RAPD em linhagens do mesmo ramo, podemos sugerir que esta variabilidade poderia estar associada a alguma característica adaptativa relacionada com sua distribuição geográfica. O conhecimento das relações simpátricas e alopátricas das populações de *S. mansoni* podem também auxiliar a resolver questões taxonômicas ou se duas populações representam ou não espécies distintas.

Uma limitação geral de nossa técnica é sua incapacidade de inferir relações filogenéticas porque as distâncias genéticas calculadas a partir do RAPD poderiam ser afetadas por paralogia, o que faria com que os padrões de RAPD fossem inconsistentes com eventos de especiação (GUSMÃO et al., 2000).

A idéia que a variação genética está relacionada com a variação ambiental (amplitude ambiental) data de DOBZHANSKY (1951), LEVENE (1953) e outros autores. Eles sugerem que a quantidade de variação genética pode ser considerada como uma estratégia adaptativa para aumentar a aptidão da população em um ambiente incerto e heterogêneo espaço-temporalmente. Esta heterogeneidade ambiental é o principal fator na manutenção e estruturação da variação genética nas populações naturais

Uma maneira de entendimento dos padrões de variação geográfica é a análise dos valores de distância genética entre populações. A menor distância (Tabela 02) corresponde a linhagens bastante semelhantes (SJ1 e SJ2, $DG = 0,358$) sugerindo que a seleção feita em laboratório não afetou muito o patrimônio genético da população de SJ2 em decorrência de pressões seletivas ou que a duração deste processo é pequena para causar modificações a nível genético. Essa seleção

foi desenvolvida em um esquema de autofecundação de *B. tenagophila* suscetível à infecção pela linhagem SJ, obtendo-se deste modo progênes de moluscos com taxas crescentes de infectividade (ZANOTTI-MAGALHÃES et al, 1991). No decorrer deste experimento foi isolada paralelamente, uma população de *S. mansoni* (linhagem SJ2) resultante dessas passagens sucessivas. ZANOTTI-MAGALHÃES et al. (1997) haviam observado que a passagem sucessiva desta linhagem em *B. tenagophila* selecionada para o caráter suscetibilidade ajustou-a fisiologicamente a esta espécie de hospedeiro intermediário. Por outro lado, as linhagens LE e Ouh apresentaram a maior distância genética, confirmando que a distância geográfica está relacionada com a distância genética devido aos baixos níveis de fluxo gênico existentes entre elas. Nem todas as linhagens, entretanto, correrão o risco de sofrer especiação porque o processo de diferenciação geográfica pode ser reversível.

LYDEARD et al. (1989) e MULVEY et al. (1991) estudaram a estrutura genética da *Fascioloides magna* parasitando cervos de cauda branca. Populações oriundas da região do rio Savannah mostraram baixa média de diferenciação ($F_{ST} = 0,016$), e os padrões de distância genética entre as populações não eram relacionados aos padrões de diferenciação de hospedeiros ou à distância geográfica entre unidades de caça da região. O F_{ST} mede a redução da heterozigose de uma população devido a deriva gênica aleatória. Contrastando com os resultados acima, populações do parasita coletados de diferentes estados (Carolina do Sul e Tennessee) mostraram grandes níveis de diferenciação ($F_{ST} = 0,176$) e efeitos causados pelo isolamento geográfico (MULVEY et al, 1991). Como é característico em muitos sistemas parasita-hospedeiro, a distribuição de *F. magna* entre os cervos era altamente agregada, e isto pareceu influenciar a estrutura genética da população. A reprodução assexuada no hospedeiro intermediário resulta em distribuições localizadas de metacercárias do mesmo clone, e este acúmulo de metacercárias idênticas aumenta a probabilidade que os cervos sejam infectados com adultos representando um único clone. O estudo de MULVEY et al (1991) revelou que os cervos tendem a ser infectados com parasitas do mesmo genótipo e mostra, através de simulações, que aproximadamente metade dos valores de F_{ST} podem ser explicados pela distribuição não aleatória dos genótipos dos parasitas entre os hospedeiros definitivos. Esta mesma situação poderia estar ocorrendo com as linhagens de regiões geográficas diferentes utilizadas neste trabalho.

Estudos experimentais já têm mostrado que linhagens de *S. mansoni* de diferentes áreas geográficas podem exibir diferenças em suas características biológicas e em sua infectividade ou

patogenicidade. FLETCHER et al. (1981) analisaram 14 enzimas de vermes individuais de 22 linhagens da África, Arábia Saudita, América do Sul e Índia e estimou que sete dos 8 loci eram polimórficos e que a distância genética entre as linhagens era baixa (raio de 0-0,27), indicando uma pequena diferenciação intra-específica entre populações do Velho e Novo Mundo. As linhagens de nosso estudo, apresentaram raios de distância genética maiores da ordem de 0,3-0,6, correspondendo ao número de diferenças de nucleotídeos ocorridas entre elas. Estas linhagens, exaustivamente estudadas, além de serem oriundas de áreas geográficas diferentes apresentam características bastante distintas.

Outro recente exame de genes do rRNA através de RFLP em linhagens de *S. mansoni* do campo e de laboratório da América do Sul e Central detectou variação inter e intra-linhagens e a perda da diversidade genética no parasita mantido em laboratório (VIEIRA et al., 1991).

O conhecimento do mecanismo de suscetibilidade do molusco a linhagens locais de *S. mansoni* (BASCH, 1975) e dos padrões de liberação de cercárias (MELHORN, 1988) são de grande interesse teórico e prático para o controle eficiente da esquistossomose. Em populações naturais, esse genótipo varia quantitativa e qualitativamente, ocasionando variações locais nas relações parasita-hospedeiro intermediário (RICHARDS, 1977). Analisamos, por este motivo, as linhagens estudadas em dois grupos principais baseados na espécie do hospedeiro intermediário, observamos um padrão semelhante de dendogramas utilizando dois tipos de coeficientes diferentes: coeficiente de Dice (DICE, 1945) e coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1908). A comparação usando o coeficiente de similaridade de Jaccard é baseada na presença de uma banda e sua posição como uma variável binária, enquanto o coeficiente de Dice usa a posição da banda valorizando, por sua vez, as bandas compartilhadas. A aplicação de mais de um coeficiente de similaridade e comparação dos resultados de classificação pode auxiliar no processo de escolha da representação dos dados mais apropriada para ser de importância confirmatória. Os dendogramas apresentados nas figuras 16 e 17 mostram topologia e, conseqüentemente, relações filogenéticas muito similares.

Ambas análises revelaram que, independente do coeficiente de similaridade usado, as linhagens são agrupadas em três grupos principais: (1) um grupo composto pela linhagem ouh; (2) um grupo composto pelas linhagens BH, SJ1 e SJ2 e (3) um grupo composto pela linhagem LE. As árvores não têm raiz e a linhagem LE foi colocada em um grupo externo, haja visto, nossos conhecimentos prévios que sugerem que ela é mais divergente geneticamente; quando

comparada com as outras deste estudo, e principalmente com a Ouh (DG = 0,642), como pode ser observada nas figuras 16 e 17. O braço da árvore que une a linhagem LE e as outras linhagens é longo, separando-as bastante. Por outro lado, o braço que une as linhagens SJ1 e SJ2 (principalmente na árvore da figura 16) é bem menor quando comparado com o comprimento dos outros braços. O fato das linhagens adaptadas a *B. tenagophila* serem agrupadas juntamente com a linhagem BH, adaptada a *B. glabrata* corrobora os dados obtidos por MAGALHÃES & DIAS (1973) que observaram que as linhagens SJ e BH eram altamente infectantes a *B. glabrata* de Ourinhos. SLATKIN (1987) afirmou que para certos parasitas, a colonização de novos hospedeiros é um tipo de fluxo gênico que poderia contrabalancear o desaparecimento local. A seleção favoreceria a evolução de características que aumentariam a capacidade de dispersão (NADLER, 1995). Esta dispersão, no caso, seria feita pelo homem, aumentando o fluxo gênico via dispersão dos ovos entre as regiões. Interessantemente, ainda, a linhagem de Ourinhos parece estar mais próxima filogeneticamente destas que a linhagem LE. Os autores acima citados explicavam seus resultados por meio de um possível intercâmbio genético entre as linhagens mineira e paulista do trematódeo. Este fenômeno é epidemiologicamente importante levando-se em conta a intensa migração interna que sabidamente ocorre entre estas regiões. Cerca de 88% dos casos de esquistossomose mansônica detectados em São Paulo são oriundos de outros estados, incluindo Minas Gerais, estado fronteiriço (SUCEN, 1982). Nota-se, portanto, que os moluscos paulistas, em condições naturais, além de estarem se infectando com miracídios simpátricos, podem ser hospedeiros intermediários de linhagens provenientes de outras áreas brasileiras. Este fato também já havia sido observado por MORAND et al. (1996) utilizando moluscos do campo. Estas são exceções a regra de EBERT (1994) que propõe que os parasitas são mais infectantes a hospedeiros simpátricos que a alopátricos. Podemos observar, ainda, que as linhagens Ouh e LE desenvolvem relações invariáveis nos dois tipos de árvores, enquanto que as relações das linhagens pertencentes ao grupo 2 são mais variáveis ou transitórias em termos de suas posições nas árvores. Essa transitoriedade seria, então, a representação do intenso fluxo gênico entre elas. Mesmo com as similaridades observadas entre as linhagens BH, SJ1 e SJ2, ainda se pode observar marcadores distintos nestas linhagens (SP200-9: fragmento de 200pb, figura 07).

Segundo TAKAHAKA (1983), a quantidade de tempo necessário para alterar o equilíbrio genético de populações é dependente do tamanho efetivo desta (número de indivíduos que

contribuem com genes para a próxima geração) e do raio de imigração, podendo ser um grande número de gerações. Quando o tamanho efetivo da população e os raios de migração são pequenos, a deriva genética tem maiores chances de ocorrer (ação de seleção natural), podendo selecionar e fixar genes ou grupos de genes que alcançariam o máximo da eficiência biológica nos organismos. O fluxo gênico, por sua vez, espalharia este genótipo mais adaptado (NADLER, 1995). Se a migração ocorre entre duas populações, elas sempre compartilham alguns alelos comuns e a diferenciação, deste modo, é impedida (NEI, 1972).

A fecundidade e a sobrevivência de linhagens resistentes e suscetíveis de *B. glabrata* são afetadas pela infecção pelo parasita (MINCHELLA & LoVERDE, 1983). GOMES et al. (1993) observaram que a suscetibilidade dos caramujos *B. glabrata* simpátrica à infecção (37%) pela linhagem de Ourinhos, a taxa de mortalidade (90%) e uma sobrevida em torno de 80 dias, demonstram pouca adaptação do parasita a este hospedeiro intermediário. Linhagens de *S. mansoni* consideradas como bem adaptadas ao seu hospedeiro intermediário sobrevivem em torno de 160 dias, no caso de *B. tenagophila*, (FIGUEIREDO et al. (1992) e 200 dias, no caso de *B. glabrata* (ZANOTTI-MAGALHÃES, 1987). A partir dos dados de RAPD (figuras 16 e 17), podemos inferir que a linhagem Ouh é menos relacionada com as linhagens BH, SJ1 e SJ2 (grupo 2), estas sabidamente bem adaptadas aos seus hospedeiros intermediários, talvez porque a relação parasita-hospedeiro intermediário seja um evento mais recente na história evolutiva. Uma maior sobrevida do hospedeiro intermediário significaria uma vantagem adaptativa para o parasita porque, então, este teria maiores chances de completar seu ciclo de vida no hospedeiro definitivo (ANDERSON & MAY, 1979). As diferenças de suscetibilidade do hospedeiro intermediário seriam então determinadas, pelo menos em parte, pelo genótipo do parasita.

Além do fenômeno de migrações internas, é importante salientar que as linhagens adaptadas a *B. tenagophila* constituem-se em linhagens epidemiologicamente importantes. Anteriormente considerada uma má hospedeira de *S. mansoni* no campo e no laboratório (PARAENSE & CORRÊA, 1963b; SUCEN, 1982; MAGALHÃES et al., 1991), ela tem sido, nas últimas décadas, responsável por focos ativos em determinadas regiões do estado de São Paulo (vales do rio Paraíba e Ribeira) mesmo com baixos índices de infecção natural (PIZA et al, 1960; RAMOS et al., 1969; SUCEN, 1982). É bem conhecido, também, que em áreas de baixa endemicidade há uma desproporção entre o número de portadores (10-15 %) e as baixas taxas de infecção de

moluscos (DIAS et al., 1988). Deve-se considerar ainda, que existe uma estreita relação entre a existência de áreas de média e alta endemicidade e a presença de *B. glabrata*.

A estrutura populacional é a representação de como uma grande população é subdividida em populações distintas menores. Nesta pode ocorrer variações desde panmíxia, onde os acasalamentos ocorrem ao acaso, aos isolamentos completos de sub-populações, onde indivíduos devem escolher um companheiro entre seus coespecíficos locais. A estrutura populacional depende da interação de várias forças microevolutivas. A mutação cria novos alelos em sub-populações, a seleção pode aumentar a frequência de alguns alelos favoráveis ao ambiente local e a deriva gênica altera a frequência destes devido a flutuações estocásticas; sendo que cada uma destas forças tende a diminuir a similaridade da sub-população. O fluxo gênico, movimento dos gametas ou migrantes individuais entre sub-populações, tende a destruir as fronteiras entre sub-populações, como pode ter ocorrido entre as linhagens BH e Ouh. Interessantemente, sob certas circunstâncias o fluxo gênico é uma força criativa na evolução, possivelmente distribuindo alelos por toda uma população. Por outro lado, o fluxo gênico pode evitar a diferenciação genética por seleção local, prevenindo um grupo de indivíduos da adaptação específica as condições locais (CURTIS & MINCHELLA, 2000).

A estrutura genética da população de *Schistosoma* tem um papel importante na epidemiologia do parasita. Se a variação for distribuída como em uma espécie panmítica, com suficiente fluxo gênico entre regiões geográficas diferentes, diminuindo as pressões de seleção localizadas, então não existiria uma estrutura definida de população. Isto implicaria que a variação presente seria sujeita a freqüente recombinação, continuamente gerando novas combinações de alelos as quais rapidamente espalhariam alelos que seriam particularmente favoráveis ao parasita (como a resistência a drogas, por exemplo) entre todas as populações. Se, por outro lado, diferentes populações naturais de *Schistosoma* estão adaptadas a seus ambientes locais e não trocam genes freqüentemente com populações de habitats vizinhos, então existe o potencial para a sub-divisão da população ocorrer. Cada uma destas sub-populações relativamente isoladas teria, então, um conjunto de características para particularidades tais como suscetibilidade a drogas e a patologia (CURTIS & MINCHELLA, 2000).

A estrutura populacional do *Schistosoma* seria, então, indefinida porque o fluxo gênico tende sempre a homogeneizar populações de parasitas através de vilas, regiões ou continentes. Isto poderia ocorrer por meio de dois processos, ou o homem atuaria como um hospedeiro móvel

fornecendo parasitas de uma variedade de foco de infecção (“ liquidificador genético ”) ou os portadores de esquistossomose seriam infectados por grupos de genótipos que foram agrupados em populações de moluscos e estes genótipos seriam simultaneamente liberados nas fezes dos pacientes (CURTIS & MINCHELLA, 2000).

7. Análise da variabilidade intra-específica através do RAP-PCR

A técnica de “ diferencial display “ modificada utilizada neste trabalho (PIENTA & SCHWAB, 2000) tem algumas vantagens sobre a técnica convencional. Ao usar hexâmeros aleatórios como iniciadores para a transcrição reversa, é mais provável que o cDNA resultante inclua regiões codificantes porque não é fechado pela cauda de poli(A) do RNA mensageiro e exclui o uso de radioatividade. Este cDNA reflete apenas as seqüências traduzíveis em proteínas (exons) ou RNA funcional. Além disso, ela requer pequenas quantidades de RNA (2µg).

O RAP-PCR é um poderoso método que permite a comparação de organismos similares e a identificação e isolamento de genes com expressão diferencial (LIANG & PARDEE, 1992; WELSH et al., 1992; PRASHAR & WEISSMAN, 1996). Genes com expressão diferencial aparecem como bandas presentes na eletroforese de uma linhagem mas não na de outras. Desta maneira podemos avaliar a real influência de um determinado gene no momento da extração. As condições de extração e manutenção dos parasitas tiveram de ser as mais padronizadas possíveis, uma vez que, qualquer alteração, como o meio de cultura utilizado ou o tempo decorrido da perfusão até a extração do RNA afetam a expressão gênica.

As mesmas linhagens com características fenotípicas distintas analisadas por RAPD também foram avaliadas segundo a expressão diferencial de genes utilizando-se a técnica de RAP-PCR. Esta é presumivelmente mais sensível, uma vez que analisa a transcrição do gene, o que poderá determinar o fenótipo distinto da linhagem (figuras 22, 23 e 24). Observamos ainda que os fragmentos gerados pelo RAPD são, na sua maioria, maiores que os gerados por RAP-PCR. Isto ocorre devido a presença dos introns, regiões não codificadoras, presentes no DNA genômico. O controle para confirmar a qualidade do cDNA (figura 20) mostrou um resultado bastante interessante, na medida em que a segunda banda obtida com iniciadores específicos parece ser linhagem-específica, estando presente apenas na linhagem LE. Isto já a tornaria um possível candidato a marcador molecular e, até mesmo, diagnóstico.

O RAP-PCR permite estudar variações nos padrões de expressão protéica que foram causadas por mutações. Como é improvável que muitas mutações em um locus causem efeitos drásticos, presumimos, portanto, que as proteínas específicas para os loci nos quais os mutantes morfológicos são identificados, estão sujeitas, como outras enzimas e proteínas, a sofrer um grande número de substituições de aminoácidos que tenham somente pequenos efeitos na sua função. Estimativas gerais da proporção de sítios de aminoácidos que renderiam mutações “ drásticas “ não são possíveis, especialmente na visão de relações desconhecidas entre o grau de enfraquecimento enzimático e o grau de distúrbio morfogenético (COSTA, 1987). É, então, adotado o valor de 1/3 para a proporção de sítios de aminoácidos que são potencialmente drásticos em uma proteína, que poderiam ter efeitos severos na fisiologia ou morfogênese.

Quando comparamos a variabilidade genômica das linhagens BH e LE com a variabilidade gênica em relação ao iniciador Rd7 (TGCCGAGCTG) (figuras 03 e 24), observamos esta discrepância. A porcentagem de polimorfismo de DNA foi de 58,7% e de RNA, 9,1%; sendo que dos onze fragmentos de cDNA amplificados, somente um era polimórfico (marcador CLE7). Podemos concluir, então, que a maior variabilidade está em regiões não-codificadoras ou em genes que não são expressos na fase adulta. Mesmo assim, é muito interessante observar essa variabilidade de RNA em linhagens da mesma área geográfica e com características tão semelhantes. As duas linhagens têm como hospedeiro intermediário a *B. glabrata* mas, pertencentes a linhagens de moluscos diferentes. A linhagem BH é mantida na *B. glabrata* albina, enquanto a LE é mantida na linhagem melânica. Sabe-se que mesmo entre os moluscos desta espécie, considerado bom hospedeiro intermediário, existe uma variação na suscetibilidade entre linhagens de molusco (DIAS et al., 1987; ALLEGRETTI, 1990). Poderia-se supor, então, que esta expressão diferencial seria responsável pela maior infectividade ou capacidade de desenvolvimento de uma linhagem de parasita no seu hospedeiro intermediário. Não podemos descartar, no entanto, a participação do sistema imune do molusco determinado geneticamente na maior ou menor suscetibilidade à infecção pelo parasita.

8. Marcadores sexo-específicos

Em contraste com outros trematódeos digenéticos, Schistosomas são gonocóricos. As fêmeas são heterogaméticas e numerosos clones fêmea-específicos foram encontrados (SPOTILA et al.,

1987; SPOTILA et al., 1989; WALKER et al., 1989; WEBSTER et al., 1989), mas a região do cromossomo responsável pela determinação do sexo permanece desconhecida. Vários estudos mostraram a sobrevivência diferencial das fêmeas tanto na forma imatura como na adulta (JOHNSTON et al., 1993).

Alguns dos marcadores sexo-específicos encontrados neste trabalho (figuras 22, 23, 26, 27, 28, 29 e 31) eram também linhagem-específicos. A expressão sexo-diferencial é provavelmente devida a diferenças próprias do metabolismo e fisiologia entre os vermes machos e fêmeas e a diferença entre linhagens, como já citado, pode estar relacionada com a característica biológica de determinada linhagem. O conteúdo protéico é extremamente variável em vermes adultos, sendo que vários fatores afetam o tipo e a quantidade de proteínas encontradas nestes parasitas, tais como o hospedeiro e o tempo de incubação em cultura. Proteínas associadas à contração muscular (actina e miosina), por exemplo, estão altamente presentes nos estágios adultos, principalmente no macho devido sua necessidade muscular para fazer a migração contra a corrente sanguínea pareado com a fêmea (RUMJANEK, 1987). Muitas proteínas têm sido, então, caracterizadas como sendo sexo-específicas como as glutatona transferases, envolvidas em mecanismos de resistência (BOBEK et al., 1986; SIMPSON & KNIGHT, 1986), o que demonstra existirem diferenças marcantes na composição protéica entre machos e fêmeas. Outras proteínas, por sua vez, estão envolvidas na ovoposição da fêmea.

9. Sequenciamento de fragmentos polimórficos

Alguns dos fragmentos polimórficos obtidos neste trabalho, tanto por RAPD como por RAP foram submetidos ao sequenciamento.

A enzima Taq polimerase utilizada nas amplificações dos fragmentos polimórficos adiciona um A ao produto final. e o vetor utilizado (Esquema 05) é encontrado comercialmente digerido com um T em suas extremidades, o que o torna apropriado para clonagem de produtos de PCR.

A seqüência de banda polimórfica MBH600-10 (figura 29, linha 2) originada de cDNA foi analisada no programa BLAST e apresentou homologias de aminoácidos muito baixas quando comparada com outras seqüências de proteínas do banco de dados, talvez estando a seqüência incompleta. Isto é possível devido ao fato das amplificações serem processadas com iniciadores aleatórios.

Nosso fragmento polimórfico apresentou identidade de 89 a 99% com clones genômicos, entre eles um pseudo-gene desta proteína humana (Tabela 04). O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma importante enzima da via glicolítica (glicólise). Esta enzima já foi caracterizada em *S. mansoni* e *S. haematobium* e parece estar correlacionada com resistência a re-infecção com estes parasitas após quimioterapia (EL RIDI et al., 2001).

Após o seqüenciamento, a banda G400-9 de 400pb amplificada nas linhagens adaptadas a *B. glabrata* com o iniciador Rd9 (figura 07) apresentou homologia com a transposase do TN10 (Tabela 06). Cada elemento transponível é ocasionalmente ativado para se mover de um local a outro no DNA da mesma célula por um processo denominado transposição. A transposase é a enzima responsável por este processo. O TN10, um transposon de procariotos é um elemento ativo de transposição que regula negativamente a expressão de sua própria transposase (SIMONS & KLECKNER, 1983). Os genomas normalmente contém muitas variedades de elementos transponíveis, sendo que estes representam 10% do genoma total de eucariotos superiores. O maior efeito destes elementos é sobre a variabilidade, sendo que os rearranjos na seqüência de DNA causados pelos transposons claramente alteram o padrão de expressão de genes próximos a ele afetando vários aspectos do desenvolvimento animal, podendo trazer benefícios ou detrimientos ao organismo (ALBERTS et al., 1989).

Nossos dados ainda são bastante preliminares, mas podemos sugerir que um possível elemento de transposição possa estar em local diferente no genoma das linhagens adaptadas a *B. tenagophila* (SJ1 e SJ2), influenciando, desta forma, a adaptabilidade a espécies diferentes de *Biomphalaria*.

Em relação ao produto CBH300-4 de 300pb, amplificado por RAP com o iniciador Rd4 em casais da linhagens BH, a seqüência de nucleotídeos mostra homologia com o gene da subunidade 28S de *Schistosoma* (Tabela 07). Apesar destas seqüências serem consideradas altamente conservadas e serem freqüentemente utilizadas em estudos de filogenia entre grupos distintos, alguns polimorfismos na seqüência já foram utilizados para distinguir espécies distintas de *Schistosoma*. (LITTWOOD & JOHSTON, 1995; KANE & ROLLINSON, 1998). Estes seqüenciamentos serão posteriormente repetidos, mas estes dados sugerem que existe algum tipo de alteração na seqüência de nucleotídeos transcrita para a subunidade 28S do ribossomo nesta linhagem.

Este trabalho abre amplas perspectivas para a genética básica, genética populacional, evolução e epidemiologia as quais contribuiriam para um melhor entendimento desta importante doença endêmica mundial. O potencial de permuta de fatores genéticos que influenciam a diversidade antigênica, patologia da doença, especificidade a hospedeiros e resistência a drogas pode acarretar profundas conseqüências para a evolução futura das relações parasita-hospedeiro e na etologia e controle da esquistossomose. Estes estudos são essenciais em diferentes focos de infecção com dinâmicas de transmissão variáveis para garantir métodos de controle efetivos e eficientes. Os marcadores obtidos aqui podem auxiliar também em diagnóstico e identificação mais precisa das linhagens BH, SJ1, SJ2, LE, MAP e Ouh, como mostrado na Tabela 08. Estes estudos moleculares, ainda em fase preliminar, já revelam mudanças micro-evolucionárias ocorridas em populações de *S. mansoni* e indicam caminhos para questões macro-evolucionárias.

V. CONCLUSÕES

A partir das informações obtidas no presente trabalho, podemos concluir que:

Quanto ao RAPD-PCR

- 1 - Os marcadores de RAPD são ferramentas úteis e viáveis na investigação da variabilidade intra-específica do *Schistosoma mansoni* e na identificação de linhagens.
- 2 – A quantidade de polimorfismo, detectado por RAPD-PCR, entre as linhagens BH, SJ1, SJ2, Ouh e LE foi de cerca de 75% (24,3% de bandas compartilhadas por todas as linhagens).
- 3 - As linhagens adaptadas a *B. glabrata* podem ser diferenciadas das adaptadas a *B. tenagophila* pelo marcador G400-9.
- 4 – As linhagens paulistas podem ser distinguidas das mineiras pelo marcador SP200-9.
- 5 – A linhagem LE apresentou 2 marcadores linhagem-específicos: LE2100-7 e LE2000-9.
- 6 – A linhagem tolerante Ouh apresentou 2 marcadores linhagem-específicos: Ouh250-10 e Ouh200-11, possivelmente relacionados a essa tolerância.
- 7 – O iniciador TGCCGAGCTG mostrou-se capaz de distinguir a linhagem MAP das outras por gerar um perfil eletroforético característico.
- 8 – Os marcadores observados em nossas análises mostram-se viáveis de serem usados como iniciadores diagnósticos no campo e em estudos de laboratório.
- 9 – Os perfis eletroforéticos e de curvas densiométricas do RAPD são homogêneos e podem ser usados para geração de árvores filogenéticas de linhagens de *S. mansoni*.

10 – As distâncias genéticas maiores entre as linhagens LE e Ouh podem ser devidas a fixação da maioria dos alelos em linhagens mantidas durante muito tempo em laboratório.

11. As menores distâncias genéticas entre as linhagens SJ1 e SJ2 refletem que a seleção genética feita em laboratório é um processo recente e que a maior suscetibilidade apresentada pelo hospedeiro intermediário á segunda não reflete uma modificação em nível de DNA.

11 – A origem geográfica (áreas ecológicas diversas) influencia o grau de divergência intra-específica como observado no dendograma obtido com os produtos do RAPD, onde as linhagens foram separadas em dois ramos distintos: paulistas e mineiras.

12 – A linhagem LE está mais distante evolutivamente, com relação à espécie de hospedeiro intermediário, aos outros dois grupos de linhagens que possuem uma relação filogenética mais estreita.

13 – A relação filogenética mais estreita entre as linhagens BH, SJ1 e SJ2 refletem a existência de um possível fluxo gênico gerado por migrações internas entre regiões dos estados de São Paulo e Minas Gerais. No entanto, elas ainda apresentam considerável nível de divergência genética, como demonstrado pelo marcador SP200-9.

Quanto ao RAP-PCR

1 – A técnica provou ser capaz de detectar expressão gênica diferencial entre vermes recém-perfundidos das linhagens BH, SJ1 e LE.

2 – Os marcadores de RAP-PCR foram capazes de diferenciar as linhagens BH, SJ e LE com os iniciadores Rd2 (TGCTCTGCCC), Rd10 (GGGTAACGCC), Rd7 (TGCCGAGCTG) e Rd3 (CTGCTGGGAC).

3 – A técnica conseguiu gerar marcadores sexo-específicos para fêmeas da linhagem LE (FLE400-3), fêmeas da linhagem BH (FBH320-2) e machos da linhagem BH (MBH600-2).

4 – O marcador para machos da linhagem BH (MBH600-10) tem alta identidade de nucleotídeo (99%) com uma proteína humana desconhecida e identidade de nucleotídeo de 89% com gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase.

5 – O marcador para linhagens adaptadas a *B. glabrata* G400-9 tem alta identidade de nucleotídeos (99%) com vetor TN10 e alta identidade de aminoácido.

6 – O marcador CBH300-4 apresentou alta homologia de nucleotídeo (98%) com gene do ribossomo 28S.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing, Inc, N.Y. and London, 1989. 1219.
- AMARAL, R.S., PORTO, M.A.S. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, suppl. 3, p. 73-90, out./dez., 1994.
- ANDERSON, L.A., CHEEVER, A.W. Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the mouse. **Bull. WHO**, v. 46, p. 233-241, 1972.
- ANDERSON, R. M., MAY, R. M. Prevalence of schistosome infections within molluscan populations: observed patterns and theoretical predictions. **Parasitol.**, v. 79, p. 63-94, 1979.
- ARAÚJO, N. et al. Susceptibility to chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, p. 890-894, 1980.
- ARMSTRONG, J. et al. RAPDistance Programs, Version 1.03 for The Analysis of Patterns of RAPD Fragments. Canberra: Australian National University, 1994.
- ÁVILA, H. et al. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 42, p. 175-188, 1991.

♣ Referências bibliográficas elaboradas conforme a NBR-6023/2000 (ABNT).

As abreviações dos títulos dos periódicos seguem o Serial Sources for The Biosis Previews. Data-base. V. 1990, Philadelphia: Biosis 1991.

- AVISE, J. et al. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Review Ecol. and Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- AYALA, F.J. In: MILKMAN, R. **Perspectives on Evolution**. Sinauer, 1982. p. 60-82.
- BALLOUL, J.M. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. **Nature**, v. 326, p. 149, 1987a.
- BALLOUL, J.M. Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S. mansoni* expressed in *E. coli*. In: MAcINNIS, A.J. **Molecular paradigms for the eradication of helminth parasites**. Alan R. Liss, New York, 1987b. p. 77-84.
- BARBOSA, F. S. In: CUNHA, AS. " **Esquistossomose mansoni** ". Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1970. p. 31-59.
- BARNES, R.B. **Zoologia dos Invertebrados**. Livraria Roca, São Paulo, 1984. 1179 p.
- BARRAL, V. et al. Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome by using random amplified polymorphic DNA markers. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 59, p. 211-222, 1993.
- BARRAL, V. et al. Distribution of schistosome genetic diversity within naturally infected *Rattus rattus* detected by RAPD markers. **Parasitol.**, v. 113, p. 511-517, 1996.
- BASCH, P.F. An interpretation of snail-trematode infection rates: specificity based on concordance of compatible phenotypes. **Int. J. Parasitol.**, v. 5, p. 449-452, 1975.
- BASCH, P.F., SAMUELSON, J. Cell biology of schistosomes. I. Ultrastructure and transformations. In: WILER, D.J. **Modern Parasite Biology – cellular, imunological and molecular aspects**. 1990. p. 91-106.

- BASSAM, B.J., CAETANO-ANOLLÉS, G., GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 196, p. 80-83, 1991.
- BAYNE, C.J., BUCKLEY, P.M., DEWAN, P.C. *Schistosoma mansoni*: cytotoxicity of hemocytes from susceptible hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasit.**, v. 50, p. 409-416, 1980.
- BAYNE, C.J., YOSHINO, T.P. Determinants of compatibility in mollusc-trematode parasitism. **Am. Zool.** v. 29, p.399-407, 1989.
- BEIDLER, J.L., HILLIARD, P.R., RILL, R.L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 374-380, 1982.
- BELL, G. **The Materpierce of Nature: the Evolution and Genetics of Sexuality**. University of California Press, Berkeley, 1982.
- BERGQUIST, N.R., COLLEY, D.G. Schistosomiasis vaccines: research to development. **Parasitol Today**, v. 14, p. 99-104, 1998.
- BOBEK, L. et al. Characterization of a female-specific DNA derived from a developmentally regulated mRNA in the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 5544-5548, 1986.
- BOBEK, L.A.; et al. Analysis of a small gene family encoding an egg shell (chorion) protein of the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 3008-3016, 1988.
- BOBEK, L.A.; et al. *Schistosoma haematobium*: Analysis of eggs shell protein genes and their expression. **Exp. Parasitol.**, v. 68, p. 17-30, 1989.

- BONESSO-SABADINI, P. I. P., DIAS, L. C. S., CARVALHO, J. F. *Schistosoma mansoni*: Suscetibilidade da linhagem Ouh (Ourinhos, Vale do Paranapanema-SP) ao oxamniquine e praziquantel. **Rev. Ciências Farm.**, v. 15, p. 33, 1994.
- BOULANGER, D. et al. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. **Paras. Immunol.**, v. 13, p. 473-490, 1991.
- BRINDLEY, P.J. et al. A genomic change associated with the development of resistance to hycanthone in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 36, p. 243-252, 1989.
- BRINDLEY, P.J. et al. Characterization of a programmed alteration in an 18S ribosomal gene that accompanies the experimental induction of drug resistance in *Schistosoma mansoni*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 7754-7758, 1991.
- BROME, P.B., RADKE, M.G. An improved mouse retraining chamber. **Jpn. J. Parasitol.**, v. 20, p. 81-82, 1971.
- BRUCE, J.I. et al Drug resistance in schistosomiasis: A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 143-150, 1987.
- BRYANT, C., FLOCKHART, H. A. Biochemical strain variation in parasitic helminths. **Adv. Parasitol.**, v. 25, p. 276-311, 1986.
- BUTH, D.G. The electrophoretic data in systematic studies. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 15, p. 501-522, 1984.
- CAMPOS, R. et al. Hycanthone resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 261-262, 1976.

- CAPRON, A. et al. Vaccine strategies against schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, suppl. 5, p. 1-9, 1992.
- CARLTON, J.M et al A rapid technique for the detection of DNA polymorphisms in *Plasmodium*. **Exp. Parasitol.**, v. 80, p. 163-166, 1995.
- CARVALHO, O.S., MILWARD-ANDRADE, R., SOUZA, C.P. Susceptibilidade de *Biomphalaria tenagophila* (d' Orbigny, 1835), de Itajubá (MG), à infecção pela cepa " LE " de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, de Belo Horizonte, MG (Brasil). **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 13, p. 20-25, 1979.
- CHIEFFI, P.P. Resistência de cepa de *Biomphalaria tenagophila*, originária de Londrina (Paraná, Brasil) à infecção por duas cepas de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 9, n. 4, p. 209-212, jul./ag., 1975.
- CHRISTOPHERSON, J.B. The successful use of antimony in bilharziosis. Administred as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). **Lancet**, v. 2, p. 325-327, 1918.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., ARCHER, S. Drug resistance in schistosomes. **Parasitol. Today**, v. 9, p. 162-166, 1993.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., MORONI, R. Hycanthone/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. **Exp. Parasitol.**, v. 75, p. 425-432, 1992.
- CLARK, A G., LANIGAN, M.S., Prospects for estimating divergence with RAPDs. **Mol. Biol. Evol.**, v. 10, n. 5, p. 1096-1111, 1993.
- CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico **Epidemiologia e controle da esquistossomose e o nordeste semi-árido**. Brasil, 1978.

- COELHO, P.M.Z. et al. Dimensões do granuloma hepático produzido por ovos de duas linhagens geográficas do *Schistosoma mansoni*, no camundongo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 213-217, 1989.
- COLES, G.C. et al. Drug resistance in schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 347, 1986.
- COLES, G.C. et al. Tolerance of Kenian *Schistosoma mansoni* to oxamniquine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 782-785, 1987.
- COSTA, S. P. Genética molecular de microorganismos e fundamentos da engenharia genética. São Paulo. Manole, p. 559, 1987.
- CRAIG, A., LANGSLEY. G. A malaris genome project: how a good idea is being put into practice. **Bulletin de l'Institute Pasteur** ., v.91, p. 179-187, 1993.
- CURTIS, J., MINCHELLA, D.J. Schistosome population genetic structure: when clumping worms is not just splitting hairs. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 2, p. 68-71, 2000.
- DARWIN, C. **On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life**. Reprinted. Chicago, Illinois: E.A. Weeks and Company, 1859. 503p.
- DAVIS, A. Antischistosomal drugs and clinical practice in human schistosomiasis. In: JORDAN, P, STURROK, R.F. Human Schistosomiasis. Cat International, 1993. 394p.
- DELGADO, V.S. et al. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and on both sexes of the parasite. **Parasitol. Res.**, v. 78, p. 648-654, 1992.

- DIAS, L.C.S., GONÇALVES, E.R. O *Schistosoma mansoni* diz não às drogas. **Ciência Hoje**, v. 14, n. 14, p. 22-25, set., 1992.
- DIAS, L.C.S., ÁVILLA-PIRES, F.D., PINTO, A.C.M. Parasitological and ecological aspects of schistosomiasis mansoni in the Valley of the Paraíba do Sul River (São Paulo State, Brazil) I - Natural infection of small mammals with *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 496-500, 1978a.
- DIAS, L.C. de S., PEDRO, R.J., DEBERALDINI, E.R. Use of praziquantel in patientis with schistosomiasis mansoni previously treated with oxamniquine and/or hycanthone: resistance of *Schistosoma mansoni* to schistosomicidal agents. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, p. 652-659, 1982.
- DIAS, L.C. DE S., UETA, M.T., GUARALDO, A.M.A., Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* a diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 29, p. 205-212, jul./ag., 1987.
- DIAS, L.C. de S. et al. Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v. 12, p. 110, 1978b.
- DIAS, L.C. de S. et al. Suscetibilidade a esquistossomicidas de linhagens de *Schistosoma mansoni*. **In: CONGRESSOS INTEGRADOS DE PARASITOLOGIA**, São Paulo, 1983..**Anais...** São Paulo: 1983 205p.
- DIAS, L.C. de S. et al. The epidemiology and control of schistosomiasis mansoni where *Biomphalaria tenagophila* is the snail host. **Rev. Saúde Pública**, v. 22, p. 462-463, 1988.
- DIAS NETO, E. et al. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 57, p. 83-88, 1993a.

- DIAS NETO, E. et al. The use of RAPDs for the study of genetic diversity of *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*. In: PENA, S.D.J. et al. DNA fingerprinting state of the science. Switzerland: Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 1993b. p. 339-345.
- DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology**, v. 26, p. 297-302, 1945.
- DOBZHANSKY, T. **Genetics and the origin of species**, 3^a ed. Columbia, Univ. Press, New York, 1951.
- DUVAX-MIRET, O. et al. Molecular cloning and sequencing of the α -tubulin gene from *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Pararasitol.**, v. 49, p. 337-340, 1991.
- EBERT, D. Virulence and local adaptation of a horizontally transmitted parasite. **Science**, v. 265, p. 1084-1086, 1994.
- EL RIDI, R. et al, Human T and B-cell responses to *Schistosoma mansoni* recombinant glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase correlate with resistant to reinfection with *S. mansoni* or *Schistosoma haematobium* after chemotherapy, **Infect. Immun.** p. 237-244, 2001.
- FALLON, P.G. et al. *Schistosoma mansoni*: Maturation rate and drug susceptibility of different geographic isolates. **Exp. Parasit.**, v. 86, p. 29-36, 1997.
- FARIAS, G.S. **Endemias rurais, Métodos de trabalho adotados pelo DNERU**. Rio de Janeiro: Mistério da Saúde, Departamento de Endemias Rurais, 1968.
- FAROOQ, N Historical development. In: ANSARI, N. Epidemiology and Control of Schistosomiasis (Bilharziasis). S. Karger, Basel, 1973. p. 1-16.

- FIGUEIREDO, A.C. **Estudo de características biológicas e morfológicas de cepa paulista de *Schistosoma mansoni* do Vale do Ribeira.** Campinas, SP: Instituto de Biologia da UNICAMP, 1991. (Tese, Mestrado em Ciências Biológicas na área de Parasitologia).
- FIGUEIREDO, AC., DIAS, L.C.S. & MARQUES, E.H.F. Biological and morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* from Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. I – Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* snail to sympatric *S. mansoni* strain. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v. 34, n. 3, p. 199-203, mai./jun., 1992.
- FLETCHER, M., LO VERDE, P.T., WOODRUFF, D.S. Genetic variation in *Schistosoma mansoni*: enzyme polymorphisms in polulations from Africa, Southeast Asia, South America and West Indies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 30, p. 406-421, 1981.
- FRANDSEN, F. Discussion of compatability between *Schistosoma* and their intermediate hosts, assessment of the degree of host-parasite compatability and evaluation of schistosome taxonomy. **Z. Parasitenkd.** v. 58, p. 275-296, 1979.
- FREITAS, J.R. de, BOSCHI, M.B., SANTOS, M.B.L. dos Suscetibility de “ híbridos “ de *Biomphalaria tenagophila* à cepa LE (BH) do *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 27, p. 6-12, 1985.
- GASSER, R.B., MORAHAN, G., MITCHEL, G.F. Sexing single larval stages of *Schistosoma mansoni* by polimerase chain reaction. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 47, p. 255-258, 1991.
- GERARD, C., MONE, H., THERON, A. *Schistosoma mansoni* – *Biomphalaria glabrata*: dynamics of the sporocysts population in relation to the miracidial dose and the host size. **Canadian J. Zool.**, v. 71, p. 1880-1885, 1993.

- GOMES, E. Caracterização biológica e morfológica da linhagem paulista de *Schistosoma mansoni* (Ouh) do Vale do Paranapanema (Ourinhos), SP. Campinas, SP: Instituto de Biologia da UNICAMP, 1996. (Tese, Mestrado em Ciências Biológicas na área de Parasitologia).
- GOMES, E., DIAS, L. C. S., TAKAKU, L., STANGENHAUS, G. Biological and morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* from the Paranapanema Valley (Ourinhos), São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS E REUNIÃO NACIONAL DE ESQUISTOSSOMOSE, 4, Rio de Janeiro, 1993. Anais... resumo nº 51, Rio de Janeiro, 1993.
- GRANATH JR., W.O, YOSHINO, T.P. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail *Biomphalaria glabrata*.. **Exp. Parasit.**, v. 58, p. 188-193, 1984.
- GROSSMAN, A.L. et al Karyotype evolution and sexchromosome differentiation in schistosomes (Trematoda, Schistosomatidae). **Chromosoma**, v. 84, p. 413-430, 1981.
- GUARALDO, AM.A et al. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). **Rev. Saúde públ.**, S. Paulo, v. 15, p. 436-448, 1981.
- GUIMARÃES, R.X. et al. Resistência ao hycanthone e oxamniquine em doentes com esquistossomose forma clínica hepatointestinal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 25, p. 48-50, 1979.
- GUO, Z.G., JOHNSON, AM. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polimerase chain reaction. **Parasitol.**, v. 111, p. 127-132, 1995.

- GUPTA, S., TRENHOLME, K., ANDERSON, R.M., DAY, K.P. Antigenic diversity and the transmission dynamics of *Plasmodium falciparum*. **Science**, v. 263, p. 961-963, 1994.
- GUSMÃO, C.X. et al. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of brazilian kereatitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.33, p. 19-26, 2000.
- HARRIS, H. Enzyme polymorphismms in man. **Proc. R. Soc. London. Ser.**, v. B 164, p. 298-310, 1966.
- HAYES, J.D., WOLF, R. Molecular mechanisms of drug resistance. **Biochem. J.**, v. 272, p. 281-295, 1990.
- HENDRICK, P. Shooting the RAPDs. **Nature**, v. 355, p. 679-680, 1992.
- HEUN, M., HELENTJARIS, T. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. **Theor. Appl. Genet.**, v. 85, p. 961-968, 1993.
- HIGGINS-OPITZ, S.B., DETTMAN, C.D. The infection characteristics of a South African isolate of *Schistosoma mansoni* : a comparison with a Puerto Rican isolate in a BALB/c mice and *Mastomys coucha*. **Parasitol. Res.**, v. 77, n. 2, p. 142-151, 1991.
- HOCKLEY, D.J. Ultrastructure of tegument of *Schistosoma*. **Adv. Parasitol.**, v. 64, p. 233-305, 1973.
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la ditribution florale. **Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.**, v. 44, p. 223-270, 1908.
- JARCHO, S. Theodor Bilharz as ethonographer and geographer. **Bull. N. Y. Acad. Med.**, v. 44, p. 373-374, 1968.

- JOHNSTON, D.A. et al. Opening the can of worms: Molecular analysis of Schistosome populations. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 8, 1993
- JONES, J.T., KUSEL, J.R. Intra-specific variation in *Schistosoma mansoni* **Parasitol. Today**, v. 5, p. 37-39, 1989.
- KANE, R.A. , ROLLINSON, D. Comparison of the intergenic spacers and 3' end regions of the large subunit (28S) ribosomal RNA gene from three species of *Schistosoma* . **Parasitol.**, v. 117, pt 3, p. 235 – 242, 1998.
- KASSIN, O.O., RICHARDS, C.S. Host reactions in *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* miracidia involving variations in parasite strains numbers and sequence of exposures. **J. Parasitol.**, v. 9, p. 565, 1979.
- KATZ, N. Schistosomiasis control in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, suppl. I, p. 33-35, 1998.
- KATZ, N., PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil . **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 3, p. 303-308, 2000.
- KATZ, N. et al. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 7, p. 381-387, 1973.
- KAUKAS, A. et al. Phylogenetic analysis of *Schistosoma haematobium* group species based on randomly amplified polymorphic DNA. **Int. J. Parasitol.**, v. 24, p. 285-290, 1994.
- KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature**, v. 217, p. 624-626, 1968.
- KING, M.C. , WILSON, A.C. Evolution at two levels: molecular similarities and biological differences between humans and chimpanzees. **Science**, v.188, p. 107-116, 1975.

- KINOTTI, G.K. The significance of variation in the susceptibility of *Schistosoma mansoni* to the antischistosomal drug oxamniquine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 151-156, 1987.
- KNIGHT, M. et al. *Schistosoma mansoni*: use of a cloned ribosomal RNA gene probe to detect restriction fragment length polymorphism in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasit.**, v.73, p.285-294, 1991
- LARSON, S. E. et al. Use of a RAPD-PCR to differentiate genetically defined lines of an intermediate host of *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.** v. 82, p.237-244, 1996.
- LEVENE, H. Genetic equilibrium when more than one ecological niche is available. **Amer. Natur.** v. 87, p.331-333, 1953.
- LEWIS, F.A. A laboratory based approach to biological control of snails. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ESQUISTOSSOMOSE e REUNIÃO NACIONAL DE ESQUISTOSSOMOSE, 5, Salvador, 1995. **Anais...** Salvador, 1995.
- LEWONTIN, R.C. **The Genetic Basis of Evolutionary Change**. Columbia University Press, 1974.
- LEWONTIN, R.C., HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of a genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, p. 595-609, 1966.
- LI, S.L., et al. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.**, v.70, p.1112, 1973.
- LI, Y. et al. Diversity among schistosomes: perspectives for control. **Trends in Parasit.**, v. 17, n. 3, mar., p. 113-115, 2001.

- LIANG, P., PARDEE, AB. Differential display of eukaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, p. 967-971, 1992.
- LINK, W. et al. Genetic diversity in european and mediterranean faba bean germ plasma revealed by RAPD markers. **Theoret. Appl. Genet**, v.90, p.27-32, 1995.
- LITTLEWOOD, D.T. , JOHSTON, D.A Molecular phylogenetics of the four *Schistosoma* species groups determined with partial 28S ribosomal RNA gene sequences **Parasitol.**,v.111. p. 167-175, 1995.
- LOKER, E.S. On being a parasite in an invertebrate host: a short survival course. **J. Parasitol.** V.80, p.728-747, 1994.
- LOUREIRO, S. A questão social na epidemiologia da esquistossomose mansônica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84, suppl. I, p. 125-133, 1989.
- LOVERDE, P.T. et al. Evidence for host-induced selection in *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 71, p. 297-301, 1985.
- LYDEARD, C. et al. Genetic variability among natural populations of the liver fluke, *Fascioloides magna*, in white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*. **Canadian J. Zool.**, v. 67, p. 2021-2025, 1989.
- MACEDO, A.M. et al. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*. A new tool for characterization of strains and clones. **Mol. Biochem. Parasitol.** (in press), 1992.
- MACHADO-SILVA, J.R. et al. *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 comparative morphological studies of some Brazilian strains. **Rev Inst Med Trop São Paulo.**, v. 37, p.441-447.

-
- MAGALHÃES, E.M.Z., MAGALHÃES, L.A., CARVALHO, J.F. Relação entre a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* em camundongos e a suscetibilidade do molusco vetor. I. Infecciosidade de cercárias e carga de vermes. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 25, p. 359-366, 1991.
- MAGALHÃES, L.A. Estudo dos dados obtidos de uma população de *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte infectada por *Schistosoma mansoni* da mesma cidade, e de uma população de *B. tenagophila* de Campinas, infectada por *S. mansoni* de São José dos Campos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 3, n. 4, p. 195-196, 1969.
- MAGALHÃES, L.A., CARVALHO, J.F. Determinação do número de cercárias provenientes de cepas diferentes de *Schistosoma mansoni* que conseguem penetrar, sob determinadas condições de laboratório, em *Mus musculus*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 3, n. 5, p. 249-251, set./out., 1969.
- _____ Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* das linhagens de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP) em *Mus musculus*. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 7, p. 285-287, 1973a.
- _____ Estudo morfológico de *Schistosoma mansoni* pertencentes a linhagens de Belo Horizonte (MG) e de São José dos Campos (SJ). **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 7, p. 289-294, 1973b.
- _____ Sobre o comportamento de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* de estudo quantitativo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 10, p. 169-194, 1976.
- MAGALHÃES, L.A., DIAS, L.C. DE S. Estudo da suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (SP), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP). **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 7, p. 295-297, 1973.

- MAGALHÃES, L.A., ALCÂNTARA, F.G., CARVALHO, J.F. Alguns dados referentes ao estudo parasitológico e anatomopatológico de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 9, p. 1-5, 1975.
- MAGALHÃES, V.C. **Estudo das características biológicas e morfológicas da linhagem MAP de *Schistosoma mansoni***. Campinas, SP: Instituto de Biologia da UNICAMP, 1996. (Tese, Mestrado em Ciências Biológicas na área de Parasitologia).
- MAIZELS, R.M. et al. Immunological modulation and invasion by helminth parasites in human populations. **Nature**, v. 365, p. 797-805, 1993.
- MALEK, E.A. Susceptibility of tropicorbid snails from Louisiana to infection with *Schistosoma mansoni*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v.16. p. 715-717, 1967.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- MARSHALL, I. Experimental chemotherapy. In: ROLLINSON, D., SIMPSON, A.J.G. **The biology of schistosomes from Genes to Latrine** New York/London: Academic Press, 1987. p. 399-430.
- McCUTCHAN, T.F. et al. Differentiation of Schistosomes by species, strain, and sex using cloned DNA markers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 889-893, 1984.
- McMANUS, D.P., HOPE, M. Molecular variation in human schistosomes. **Acta Trop.**, V. 53, p. 255-276, 1993.
- McMANUS, D.P., BOWLES, J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. **Int.. J. for Parasitol.**, v. 26, p. 687-704, 1996.

- McNAIR, A.T. et al. Cloning and characterisation of the gene encoding the 28-Kda glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. **Gene**, v. 124, p. 245-249, 1993.
- MELHORN, H. **Parasitology in Focus**. Springer Verlag, 924 pp, 1988.
- MELO, C.M. **Caracterização biológica e morfológica da linhagem paulista de *Schistosoma mansoni* da região de Campinas, SP**. Campinas, SP: Instituto de Biologia da UNICAMP, 1994. (Tese, Mestrado em Ciências Biológicas na área de Parasitologia).
- MILLER, P., WILSON, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitol.**, v. 77, p. 281, 1978.
- MINCHELLA, D.J., LoVERDE, P.T. Laboratory comparison of the relative success of *Biomphalaria glabrata* stocks which are susceptible and insusceptible to infection with *Schistosoma mansoni*. **Parasitol.**, v. 86, p. 335-344, 1983.
- MINCHELLA, D.J. et al. Distribution of Schistosome genetic diversity within molluscan intermediate hosts.. **Parasitol.**, v. 111, p. 217-220, 1995.
- MINCHELLA, D.J. et al. In: FRIED, B., GRACZYK, T.K. **Advances in Trematode Biology**. CRC Press, 1997. p. 405-446.
- MORGAN, U.M. et al. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, p. 702-705, 1993.
- MULVEY, M. et al. Comparative population genetic structure of a parasite (*Fascioloides magna*) and its definitive host. **Evolution**, v. 45, p. 1628-1640, 1991.
- MURPHY, R.W. et al. Proteins I: Isozymes electrophoresis. In: HILLIS, D.M., MOTITZ, C. **Molecular Systematics**. USA: Sinauer Associates, Inc., USA, v. 45-126, 1990.

- NABIH, H.I. , EL-ANSARY, A. Genetic studies on fresh water snails: "specific intermediate hosts for shistosomiasis". II. Isolation and base composition determination of deoxyribonucleic acid. **Cell. Molec. Biol.**, v.26, p.455-458, 1980.
- NADLER, S.A. Microevolution and the genetic structure of parasite populations. **Int. J. Parasitol.**, v. 20, p. 11-30, 1995.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **Am. Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, 1987.
- NEI, M., LI, W-H. Mathematical model for study genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5267-5273, 1979.
- NEVO, E. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. **Theor. Popul. Biol.**, v. 13, p. 121-177, 1978.
- NEWTON, W. L. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 38, p. 362, 1952.
- NOVAK, M.A, MAY, R.M. Superinfection and the evolution of parasite virulence. **Proc. Royal. Soc. London**, v. B255, p. 81-89, 1994.
- OLIVIER, L., STIREWALT, M.A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 38, p.19-23, 1952.
- PARAENSE, W.L. Controle da esquistossomose no Brasil. **In: CONCLAVE DA FEDERAÇÃO BRASILEIRAS DE ACADEMIAS DE MEDICINA**, 4, Belo Horizonte, 14 a 16 de maio, 1992. **Anais...** Belo Horizonte, 1992.

- PARAENSE, W.L., CORRÊA, L.R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 5, p. 15-22, 1963a.
- _____. Suscetibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 5, n.1, p. 23-29, jan./jev., 1963b.
- _____. Differential suscetibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 64, n. 5, p. 822-826, 1978.
- _____. Observations of two biological races of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 76, p. 287-291, 1981.
- PELLEGRINO, J. & KATZ, N. Experimental chemoterapy of schistosomiasis mansoni In: *Advances in Parasitology*. London and New York: Academic Press, v. 6, p. 233-290, 1968.
- PELLEGRINO, J., MACEDO, D.G. A simplified method for the concentration of cercariae. **J. Parasitol.**, v. 41, p. 329-330, 1955.
- PENA, S.D.J. et al. Sequence-specific “ gene signatures “can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 1946-1949, march, 1994.
- PENSCHOW, J.D. et al Female-specific genomic PCR sequences from *Schistosoma mansoni* as probes for hibridization histochemistry. **Int. J. Parasitol.**, v. 23, n. 3, p. 407-409, 1993.
- PICA-MATTOCCIA, L., ARCHERS, S., CIOLI, D. Hycanthone resistance in schistosomoses correlates with lack of an enzymatic activity which produces the covalent binding of hycanthone to parasite macromolecules. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 55, p. 167-176, 1992.

- PIENTA, K.J., SCHWAB, E.D. Modified differential display technique that eliminate radioactivity and decreases screening time. **Biotechniques**, vol.28, p. 272-277, 2000.
- PILLAY, D., PILLAY, B. Random amplified polymorphic DNA analysis shows intraspecies variation among *Schistosoma mansoni* isolates. **Med. Sci. Res.**, v. 22, p. 369-371, 1994.
- PINTO, P.M. et al. Contrasting genomic variability between clones from field isolates and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 409-414, 1997.
- PIZA, J.T., RAMOS, A. de S., CAMARGO, L.V. Vale do Paraíba, foco endêmico de esquistossomose. **Arq. Hig. Saúde Pública**, v. 25, p. 35-40, 1960.
- POGUE, G.P. et al Identification of intra- and interspecific *Leishmania* genetic polymorphisms by arbitrary primed polymerase chain reactions and use of polymorphic DNA to identify differentially regulated genes. **Parasitol. Res.**, v. 81, p. 282-290, 1995.
- POWERS, K.G., CHEEVER, A.W. Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the rhesus monkey. **Bull. WHO**, v. 46, p. 295, 1972.
- PRASHAR, Y., WEISSMAN, S.M. Analysis of differential gene expression by display of 3' end restriction fragments of cDNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 659, 1996.
- PROCUNIER, J.D., FERNANDO, M.A., BARTA, J.R. Species and strain differentiation of *Eimeria* spp. of domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. **Parasitol. Res.**, v. 79, p. 98-102, 1993.
- RAMOS, A. de S. et al. Focos ativos de esquistossomose mansônica no Vale do Paraíba, estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São paulo, v. 3, p. 59-65, 1969.

- REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**, 2ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio e Janeiro, 1991.
- RICHARDS, C.S. Genetic of a molluscan vector of schistosomiasis. **Nature**, v. 226, p. 806-810, 1970.
- RICHARDS, C. S. *Schistosoma mansoni*: Susceptibility reversal with age in the snail host *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, v. 42, p. 165-168, 1977.
- RICHARDS, C. S., MERRIT, J. W. Genetic factors in the suscetibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 21, p. 425, 1972.
- ROBERTSON, H. D., JEPPESEN, P. G. N. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. **J. Mol. Biol.**, v. 68, p.417, 1972.
- ROCHE, C. et al. Cloning and characterization of the gene enconding *Schistosoma mansoni* glutathione peroxidase. **Gene**, v. 138, p. 149-154, 1994.
- RODRIGUES, N.B. et al. Estrutura populacional de *Schistosoma mansoni* determinada por microsátélites de DNA. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 36, 2001.
- ROGERS, S.H., BUEDING, E. Hycanthone resistance: Development in *Schistosoma mansoni*. **Science**, v. 172, p. 1057-1058, 1971.
- ROLLINSON, D., SOUTHGATE, V.R. The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. In: ROLLINSON, D., SOUTHGATE, V.R. The Biology of Schistosomes from Genes to Latrines. San Diego: Academic Press, 1987. p. 1-49.
- ROLLINSON, D., WALKER, T.K., SIMPSON, A.J.G. New approaches to Schistosome identification. **Parasitol. Today**, v. 2, n. 1, 1986.

- ROLLINSON, D. et al. Identification of schistosome hybrids and larval parasites using rRNA probes. **Syst. Parasitol.**, v. 15, p. 65-73, 1990.
- ROLLINSON, D. et al. Some molecular insights into schistosome evolution. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, p. 11-28, 1997.
- RUMJANEK, F.D. Biochemistry and physiology. **In:** SIMPSON, A.J.G. The Biology of schistosomes from genes to latrines. London: Academic Press, cap. 6, 1987, p. 163-183.
- SAMBON, L.W. Remarks on *Schistosoma mansoni*. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 10, p. 303-304, 1907.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTANA, J.V., MAGALHÃES, L.A., RANGEL, H.A. Seleção de linhagem de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* visando maior suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 12, p. 67, 1978.
- SANTOS, F.R., PENA, S.D.J., EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a y-linked intranucleotide repeat DNA polymorphism. **Hum. Gen.**, v. 90, p. 655-656, 1993.
- SAOUD, M.F.A. Comparative studies on the characteristics of some geographical strains of *Schistosoma mansoni* in mice and hamsters. **J. Helminthol.**, v. 39, p. 101-112, 1965.
- SAOUD, M.F.A. . The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n. 5, p. 585-600, 1966.
- SELANDER, R.K., KAUFMAN, D.W. Genic variability and strategies of adaptation in animals **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 70, p. 1875-1877, 1973.

- SEVERSON, D.W. Applications of molecular marker analysis to mosquito vector competence. **Parasitol. Today.**, v.10, p.336-340, 1994.
- SHIRLEY, M.W., BUMSTEAD, N. Intra-specific variation within *Eimeria tenella* detected by the random amplification of polymorphic DNA. **Parasitol. Res.**, v. 80, p. 346-351, 1994.
- SHORT, R.B. et al, Conventional Giemsa-stained and C-banded chromosomes of seven strains of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 75, p. 920-926, 1980.
- SIMPSON, A.J.G., KNIGHT, M. Cloning of a major developmentally regulated gene expressed in mature female-specific polypeptide of *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 6, p. 125-137, 1982.
- SIMPSON, A.J.G., SHER, A., MCCUTCHAN, T.E. The genome of *Schistosoma mansoni* isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 6, p. 125-137, 1982.
- SIRE, C. et al. Genetic diversity and recruitment pattern of *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* snail population: a field study using random-amplified polymorphic DNA marks. **J. Parasitol.**, v. 85, p. 436-441, 1999.
- SIMONS, R.W., KLECKNER, N. Translational control of IS10 transposition. **Cell**, v. 34, n. 2 p. 683 – 691, 1983.
- SLATKIN, M. et al. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, p. 787-792, 1987.
- SMITH, G.L., SANSONE, C., SOCRANSKY, S.S. Comparison of two methods for the small-scale extraction of DNA from subgingival microorganisms. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 135-140, sep., 1989.

- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: Group variation in serum protein of normal human adults. **Biochem. J.**, v. 61, p. 629-641, 1955.
- SNARY, D., SMITH, M.A., CLEGG, J.A. Surface proteins of *Schistosoma mansoni* and their expression during morphogenesis. **Eur. J. Immunol.**, v. 10, p. 573-575, 1980.
- SPOTILA, L.D. et al. A cloned DNA identifies the sex of *Schistosoma mansoni* cercariae. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 26, p. 17-20, 1987.
- SPOTILA, L.D. et al. A retroposon-like short repetitive DNA element in the genome of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. **Cromosoma**, v. 97, p. 421-428, 1989.
- STANDEN, O.D. Experimental infection of *Austrolorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni*. I. Individual and mass infection of snails, and the relationship of infection to temperature and season. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 46, p. 48-53, 1952.
- STEINDEL, M. et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, p. 71-80, 1993.
- STEINDEL, M. et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **J. Euk. Microbiol.**, v. 41, n. 3, may-june, 1994.
- STURROCK, B. M. The influence of infection with *Shistosoma mansoni*. **J. Inv. Pathol.**, v.35, p.217-218, 1966.
- SUCEN (Superintendência do Controle de Endemias) – **Relatório: Situação da esquistossomose no estado de São Paulo**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 1982.
- TAKAHATA, N. Gene identity and genetic differentiation of populations in the finite island model. **Genetics**, v. 194, p. 497-512, 1983

- TANAKA, M. et al. Yeast artificial chromosome (YAC) based genome mapping of *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 69, p. 41-51, 1995.
- TAUTZ, D., RENZ, M. An optimized freeze-squeeze method for recovery of DNA fragments from agarose gels. **Anal. Biochem.**, v. 132, p. 14-19, 1983.
- TDR News. UNDP/WORLD BANK/WHO, n. 41, November, 1992.
- THOMPSON, J.N. **The coevolutionary process**. Chicago: University of Chicago Press, 1994. p. 121-133.
- THOMPSON, R.C.A. **Parasitol. in Focus**, p. 391-411, 1988.
- THOMPSON, R.C.A., LYMBERG, A.J. Intraspecific variation in parasites – What is a strain? **Parasitol. Today**, v. 6, n. 11, 1990
- TIBAYRENC, M. & AYALA, F. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: Genetical, taxonomic and epidemiological significance. **Evolution**, v. 42, p. 277-292, 1988.
- TIBAYRENC, M. et al.. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 1335-1339, 1993.
- UNNASCH, T.R. The filarial genome project. **Parasitology Today**. v.10, p.415-416, 1994.
- VALENTINE, J.W. Genetics strategies of adaptation. In: AYALA, F. **Molecular Evolution**. Sunderland: Sinauer Assoc. Inc., 1976, p. 78-94.
- VIEIRA, L.Q. et al. Genomic variability in field populations of *Schistosoma mansoni* in Brazil ad detected with a ribosomal gene probe. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, p. 69-78, 1991.

- WAITUMBI, J.N., MURPHY, N.B. Inter- and intra-specific differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 58, p. 181-186, 1993.
- WALKER, T.K., ROLLISON, A.J.G., SIMPSON, A.J.G. A DNA probe from *Schistosoma mansoni* allows rapid determination of the sex of larval parasites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 33, p. 93-100, 1989.
- WARREN, K.S. A comparison of the Puerto Rican, Brazilian, Egyptian and Tanzanian strains of *Schistosoma mansoni* in mice: penetration of cercariae, maturation of schistosomes and production of liver disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 795-802, 1967.
- WEBSTER, P., MANSOUR, T.E., BIEBER, D. Isolation of a female-specific, highly repeated *Schistosoma mansoni* DNA probe and its use in an assay of cercarial sex. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 6, p. 217-222, 1989.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Ac. Res.**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.
- WELSH, J. et al. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucl. Ac. Res.**, v. 20, p. 4965, 1992.
- WHO The control of schistosomiasis. **WHO technical Report Series**, 2° report. Genève: WHO Expert Committee, 1991.
- WHO The control of schistosomiasis. **WHO technical Report Series**, 2° report. Genève: WHO Expert Committee, 1993.
- WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Ac. Res.**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

- WILSON, R.A., BARNES, P.E. The tegument of *Schistosoma mansoni*: observations on the formation, structure and composition of cytoplasmatic inclusions in relation to tegument function. **Parasitol.**, v. 68, p. 239-258, 1974.
- YOLES, T.K. et al. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. **J. Parasitol.**, v. 33, p. 419, 1947.
- ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M. **Observações sobre a capacidade de infecção do molusco vetor e a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 no hospedeiro vertebrado.** Campinas, SP: Instituto de Biologia da UNICAMP, 1987. (Tese de Doutorado).
- ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M., MAGALHÃES, L.A., CARVALHO, J.F. Relação entre patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e suscetibilidade do molusco vetor. IV - Infeciosidade dos miracídeos. **Rev. Saúde Públ. S. Paulo**, v. 31, n. 5, p. 488-494, 1997.
- ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M., MAGALHÃES, L.A., CARVALHO, J.F. Relação entre a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* em camundongos e a suscetibilidade do molusco vetor. 1. Infeciosidade das cercárias e carga de vermes. **Rev. Saúde Públ. S. Paulo**, v. 25, p. 359-366, 1991.
- ZANOTTI, E.M., MAGALHÃES, L.A., PIEDRABUENA, A.E. Avaliação da patogenicidade decorrente da infecção pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, agente de infecções unissexuais em *Mus musculus*. **Rev. Saúde Públ. S. Paulo**, v. 17, p. 394-405, 1983.

APÊNDICE

1) Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento polimórfico de MBH10 de *Schistosoma mansoni* com a sequência de nucleotídeos de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Homo sapiens* realizado com o programa Blastn.

```
>F0123456789101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899100
Human DNA sequence from clone RP4-365114 on chr
3' end of the gene for a novel protein (translation of
cDNA Em:AK000219), a GAPD (glyceraldehyde-3-phosphate
dehydrogenase) pseudogene, ESTs, STSs and GSSs, complete
sequence [Homo]
Length = 144781

Score = 395 bits (194), Expect = e-107
Identities = 313/350 (89%), Gaps = 2/350 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 52      ctgcccagag-ggagggaatctagagaggcagctctggctacagtggtttgcagagctgct 110
                ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| |||
Sbjct: 26164 ctgcccagagaggagggaatctagagaggcagctttggctacagcagctttgcagagctgct 26223

Query: 111     gtgggctccatctagtccaacttcactgcagctttattacactgtgaagggaaccg 170
                ||||| ||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| |||
Sbjct: 26224 gtggacctgcccagttcaacttcctggtgctttgtttacactgtgaagggaaccg 26283

Query: 171     cctactcaagcctcagtaattgatgggtgctctcccccacccaagctctagcatccagg 230
                ||||| ||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| |||
Sbjct: 26284 cctactcaagcctcagtaattgatgggtgctctcccccacccaagctcaagcatccagg 26343

Query: 231     ttgacttcagactgctgtgctggcagtgagaatttcaatccagtggatcttagctttgctg 290
                ||||| ||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| |||
Sbjct: 26344 ttgacttcagactgctgtgctggcagtgagaatttcaatccagtgg-tcttagctttgctg 26402

Query: 291     agctccatgggggttgggatctgctgagctagaccacttggctccctggctccagccccc 350
                ||||| ||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| |||
Sbjct: 26403 ggctccatgggggttgggatctgctgagctagaccacttggctccctggctccagccccc 26462

Query: 351     ttccaggagagtggaatgggttctgtctcactggcattccagacaccactgg 400
                ||||| ||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| |||
Sbjct: 26463 ttccaggggagtggaatgggttctgtctcactggcattccagggcaccactgg 26512
```

2) Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento polimórfico G400-9 com a sequência de nucleotídeos da transposase do vetor TN10 realizado com o programa Blastn.

```
>gi|11545515|gb|AF307748.1|AF307748 Tn10 delivery vector pHV1249 transposase, CAT,
erythromycin
      resistance, and ampicillin resistance genes, complete cds
      Length = 9092
```

```
Score = 548 bits (276), Expect = e-154
Identities = 280/282 (99%)
Strand = Plus / Minus
```

```
Query: 46   cgtaggcctagtcgcgtaggcaggacttttcaagtctcgagggtttcttcaatctgcatt 105
          |||
Sbjct: 1233 cgtaggcctagtcgcgtaggcaggacttttcaagtctcggaaggtttcttcaatctgcatt 1174
```

```
Query: 106  cgcttcgaatagatattaacaagttggttggtggtcgaatttcaacargtaagttagtt 165
          |||
Sbjct: 1173 cgcttcgaatagatattaacaagttggttggtggtcgaatttcaacaggttaagttagtt 1114
```

```
Query: 166  gctagaacccatggctcctttgccgacgctgagtagattttaggtgacgggtggtgacaa 225
          |||
Sbjct: 1113 gctagaacccatggctcctttgccgacgctgagtagattttaggtgacgggtggtgacaa 1054
```

```
Query: 226  tgagtccgtgtcgagcgctgattttttcggccttttagagcgagatttataacaatagaatt 285
          |||
Sbjct: 1053 tgagtccgtgtcgagcgctgattttttcggccttttagagcgagatttataacaatagaatt 994
```

```
Query: 286  tggcatgagattggattgcttttagtcagcctcttatagcct 327
          |||
Sbjct: 993  tggcatgagattggattgcttttagtcagcctcttatagcct 952
```

3) Alinhamento da sequência de aminoácidos do fragmento polimórfico G400-9 de *Schistosoma mansoni* com a sequência de nucleotídeos da transposase TN10 realizado com o programa Blastx

```
>gi|11545516|gb|AAG37886.1| (AF307748) transposase [Tn10 delivery vector pHV1249]
      Length = 402
```

```
Score = 192 bits (489), Expect = 4e-49
Identities = 93/96 (96%), Positives = 94/96 (97%)
Frame = -2
```

```
Query: 326 GYKRLTKSNPISCQILLYKSRSGRKNQRSTRTHCHHPSPKIYSASAKEPWVLATNLXVE 147
          GYKRLTKSNPISCQILLYKSRSGRKNQRSTRTHCHHPSPKIYSASAKEPWVLATNL VE
Sbjct: 215 GYKRLTKSNPISCQILLYKSRSGRKNQRSTRTHCHHPSPKIYSASAKEPWVLATNLPVE 274
```

```
Query: 146 IRTPKQLVNIYSKRMQIEETLRDLKSPAYGLGLRHN 39
          IRTPKQLVNIYSKRMQIEET RDLKSPAYGLGLRH+
Sbjct: 275 IRTPKQLVNIYSKRMQIEETFRDLKSPAYGLGLRHS 310
```

4) Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento CBH300-4 de *Schistosoma mansoni* com a sequência de nucleotídeos do gene ribossomal 28S de *S. mansoni* realizado com o programa Blatn..

```
>gi|695740|emb|Z46503.1|SMPR28SRR S.mansoni gene for 28S ribosomal RNA (NMRI-Puerto Rica)
```

```
Length = 1694
```

```
Score = 514 bits (258), Expect = e-143
```

```
Identities = 269/272 (98%), Gaps = 1/272 (0%)
```

```
Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 25 taacatgtgcgcgggtcattgggtgttacgaaacccaaaggcgaagtgaaggtaaagggtt 84
          |||
Sbjct: 1188 taacatgtgcgcgagtcattgggtgttacgaaacccaaaggcgaagtgaaggtaaagggtt 1247
```

```
Query: 85 cggtctgtccggactaagggtgagatcctgttgtcttgctcatactttccaagttgcgagc 144
          |||
Sbjct: 1248 cggtctgtccggactaagggtgagatcctgttgtcttgctcatactttccaagttgcgagc 1307
```

```
Query: 145 agcgggcgcatcaccggcccgtcccatgacgtagacatgtgacctcgtgttgtgtgcacc 204
          |||
Sbjct: 1308 agcgggcgcatcaccggcccgtcccatgacgtagacatgtgacctcgtgttgtgtgcacc 1367
```

```
Query: 205 gtcggggcgga-saagagcgtagacgttgagacccgaaagatggtgaactatgcttgtga 263
          |||
Sbjct: 1368 gtcggggcggaagcaagagcgtagacgttgagacccgaaagatggtgaactatgcttgtga 1427
```

```
Query: 264 aggttgaagccagaggaaactctggtggagga 295
          |||
Sbjct: 1428 aggttgaagccagaggaaactctggtggagga 1459
```


FM.

Name of the RAPDistance datafile is claudia
 Number of samples = 5
 Name of sample # 1 is BH
 Name of sample # 2 is SJ1
 Name of sample # 3 is SJ2
 Name of sample # 4 is Cuh
 Name of sample # 5 is LE
 Number of populations = 1
 Number of samples of population # 1 is 5
 Number of bands = 144
 Number of primers = 5
 Name(s) of the primer(s) Rd7 Rd8 Rd9 Rd10 Rd11
 Length(s) of the primer(s) 10 10 10 10 10
 Number of bands in each primer group 29 23 35 23 34
 Name of band #1 is Rd7.1
 Name of band #2 is Rd7.2
 Name of band #3 is Rd7.3
 Name of band #4 is Rd7.4
 Name of band #5 is Rd7.5
 Name of band #6 is Rd7.6
 Name of band #7 is Rd7.7
 Name of band #8 is Rd7.8
 Name of band #9 is Rd7.9
 Name of band #10 is Rd7.10
 Name of band #11 is Rd7.11
 Name of band #12 is Rd7.12
 Name of band #13 is Rd7.13
 Name of band #14 is Rd7.14
 Name of band #15 is Rd7.15
 Name of band #16 is Rd7.16
 Name of band #17 is Rd7.17
 Name of band #18 is Rd7.18
 Name of band #19 is Rd7.19
 Name of band #20 is Rd7.20
 Name of band #21 is Rd7.21
 Name of band #22 is Rd7.22
 Name of band #23 is Rd7.23
 Name of band #24 is Rd7.24
 Name of band #25 is Rd7.25
 Name of band #26 is Rd7.26
 Name of band #27 is Rd7.27
 Name of band #28 is Rd7.28
 Name of band #29 is Rd7.29
 Name of band #30 is Rd8.1
 Name of band #31 is Rd8.2
 Name of band #32 is Rd8.3
 Name of band #33 is Rd8.4
 Name of band #34 is Rd8.5
 Name of band #35 is Rd8.6

Name of band #36 is Rd8.7
 Name of band #37 is Rd8.8
 Name of band #38 is Rd8.9
 Name of band #39 is Rd8.10
 Name of band #40 is Rd8.11
 Name of band #41 is Rd8.12
 Name of band #42 is Rd8.13
 Name of band #43 is Rd8.14
 Name of band #44 is Rd8.15
 Name of band #45 is Rd8.16
 Name of band #46 is Rd8.17
 Name of band #47 is Rd8.18
 Name of band #48 is Rd8.19
 Name of band #49 is Rd8.20
 Name of band #50 is Rd8.21
 Name of band #51 is Rd8.22
 Name of band #52 is Rd8.23
 Name of band #53 is Rd9.1
 Name of band #54 is Rd9.2
 Name of band #55 is Rd9.3
 Name of band #56 is Rd9.4
 Name of band #57 is Rd9.5
 Name of band #58 is Rd9.6
 Name of band #59 is Rd9.7
 Name of band #60 is Rd9.8
 Name of band #61 is Rd9.9
 Name of band #62 is Rd9.10
 Name of band #63 is Rd9.11
 Name of band #64 is Rd9.12
 Name of band #65 is Rd9.13
 Name of band #66 is Rd9.14
 Name of band #67 is Rd9.15
 Name of band #68 is Rd9.16
 Name of band #69 is Rd9.17
 Name of band #70 is Rd9.18
 Name of band #71 is Rd9.19
 Name of band #72 is Rd9.20
 Name of band #73 is Rd9.21
 Name of band #74 is Rd9.22
 Name of band #75 is Rd9.23
 Name of band #76 is Rd9.24
 Name of band #77 is Rd9.25
 Name of band #78 is Rd9.26
 Name of band #79 is Rd9.27
 Name of band #80 is Rd9.28
 Name of band #81 is Rd9.29
 Name of band #82 is Rd9.30
 Name of band #83 is Rd9.31
 Name of band #84 is Rd9.32
 Name of band #85 is Rd9.33
 Name of band #86 is Rd9.34
 Name of band #87 is Rd9.35

Name of band #88 is Rd10.1
 Name of band #89 is Rd10.2
 Name of band #90 is Rd10.3
 Name of band #91 is Rd10.4
 Name of band #92 is Rd10.5
 Name of band #93 is Rd10.6
 Name of band #94 is Rd10.7
 Name of band #95 is Rd10.8
 Name of band #96 is Rd10.9
 Name of band #97 is Rd10.10
 Name of band #98 is Rd10.11
 Name of band #99 is Rd10.12
 Name of band #100 is Rd10.13
 Name of band #101 is Rd10.14
 Name of band #102 is Rd10.15
 Name of band #103 is Rd10.16
 Name of band #104 is Rd10.17
 Name of band #105 is Rd10.18
 Name of band #106 is Rd10.19
 Name of band #107 is Rd10.20
 Name of band #108 is Rd10.21
 Name of band #109 is Rd10.22
 Name of band #110 is Rd10.23
 Name of band #111 is Rd11.1
 Name of band #112 is Rd11.2
 Name of band #113 is Rd11.3
 Name of band #114 is Rd11.4
 Name of band #115 is Rd11.5
 Name of band #116 is Rd11.6
 Name of band #117 is Rd11.7
 Name of band #118 is Rd11.8
 Name of band #119 is Rd11.9
 Name of band #120 is Rd11.10
 Name of band #121 is Rd11.11
 Name of band #122 is Rd11.12
 Name of band #123 is Rd11.13
 Name of band #124 is Rd11.14
 Name of band #125 is Rd11.15
 Name of band #126 is Rd11.16
 Name of band #127 is Rd11.17
 Name of band #128 is Rd11.18
 Name of band #129 is Rd11.19
 Name of band #130 is Rd11.20
 Name of band #131 is Rd11.21
 Name of band #132 is Rd11.22
 Name of band #133 is Rd11.23
 Name of band #134 is Rd11.24
 Name of band #135 is Rd11.25
 Name of band #136 is Rd11.26
 Name of band #137 is Rd11.27
 Name of band #138 is Rd11.28
 Name of band #139 is Rd11.29

Name of band #140 is Rd11.30
 Name of band #141 is Rd11.31
 Name of band #142 is Rd11.32
 Name of band #143 is Rd11.33
 Name of band #144 is Rd11.34

Primer # 1 named Rd7 length 10 number of bands 29

BU ST₁ ST₂ ST₃ ST₄ ST₅

	1	2	3	4	5
1	0	1	1	1	1
2	0	0	0	0	1
3	0	0	0	1	0
4	1	1	1	0	1
5	1	0	1	0	1
6	0	1	0	0	0
7	0	0	0	1	0
8	0	0	0	0	1
9	0	0	0	0	1
10	1	0	0	0	1
11	0	0	0	1	0
12	0	0	0	0	1
13	1	1	1	1	1
14	1	0	0	0	1
15	0	0	0	0	1
16	1	1	1	1	0
17	0	0	0	0	1
18	0	0	0	1	0
19	0	0	0	0	1
20	1	1	1	1	1

	1	2	3	4	5
21	1	1	1	1	0
22	1	1	0	0	1
23	1	1	1	1	1
24	0	1	1	0	1
25	0	0	0	1	0
26	1	0	0	0	0
27	0	0	0	1	0
28	1	0	0	1	0
29	0	1	0	0	1

Primer # 2 named Rd8 length 10 number of bands 23

BU ST₁ ST₂ ST₃ ST₄ ST₅

	1	2	3	4	5
1	0	1	0	0	1
2	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	1
4	1	1	1	1	0
5	1	1	1	1	1
6	0	0	0	0	1
7	1	1	0	1	1

8	0	1	0	1	1
9	0	0	0	0	1
10	1	0	1	1	1
11	0	1	0	0	0
12	1	0	1	1	1
13	0	0	0	1	0
14	1	0	1	1	1
15	0	0	0	1	1
16	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	0
18	0	0	1	1	1
19	1	1	1	1	1
20	0	0	0	0	1

	64	53	53	53	46
	1	2	3	4	5
21	1	1	1	1	1
22	0	0	0	0	1
23	1	1	1	1	1

Primer # 3 named Rd9 length 10 number of bands 35

	64	53	53	53	46
	1	2	3	4	5
1	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	1
3	1	0	0	0	0
4	1	1	1	1	1
5	0	0	0	1	0
6	1	1	0	0	1
7	1	1	0	0	0
8	0	0	0	1	0
9	0	0	0	1	1
10	0	1	0	0	0
11	1	1	1	1	0
12	1	0	0	0	0
13	0	0	0	1	0
14	0	1	0	0	0
15	1	0	0	0	1
16	0	0	0	1	0
17	0	1	0	0	0
18	1	0	0	0	0
19	0	0	0	1	0
20	0	1	1	0	0

	64	53	53	53	46
	1	2	3	4	5
21	1	0	0	0	0
22	1	1	1	1	1
23	1	0	0	0	0
24	0	0	1	1	0
25	0	1	1	1	0
26	1	0	0	0	0

BP ST₁ ST₂ Out LG

27	1	1	1	1	1
28	1	0	0	0	0
29	0	0	0	0	1
30	0	1	1	1	0
31	1	1	1	1	1
32	1	0	0	0	0
33	0	1	1	1	0
34	1	0	1	0	1
35	1	1	0	0	1

Primer # 4 named Rd10 length 10 number of bands 23

BP ST₁ ST₂ Out LG

	1	2	3	4	5
1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1
3	1	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0
5	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1
7	1	0	1	0	0
8	1	0	0	0	0
9	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1
14	1	1	0	0	1
15	0	0	0	1	0
16	0	0	0	1	0
17	0	0	0	0	1
18	1	1	1	0	0
19	0	1	0	1	1
20	1	1	1	1	1

BP ST₁ ST₂ Out LG

	1	2	3	4	5
21	1	0	0	0	0
22	1	1	1	1	1
23	0	1	0	0	0

Primer # 5 named Rd11 length 10 number of bands 34

BP ST₁ ST₂ Out LG

	1	2	3	4	5
1	1	1	0	0	0
2	0	0	1	1	0
3	1	1	1	1	1
4	1	0	0	0	0
5	0	0	1	0	0
6	0	0	1	0	0
7	0	0	0	0	1
8	1	1	1	1	0
9	0	0	0	0	1

	ST1	ST2	OW	LG
10	0	0	1	0
11	1	1	1	0
12	1	1	1	0
13	1	1	1	1
14	0	1	1	0
15	0	0	0	1
16	1	1	1	0
17	0	0	0	1
18	1	1	1	0
19	0	0	0	1
20	1	1	1	1

	ST1	ST2	OW	LG
	1	2	3	4
21	0	0	0	1
22	0	1	0	0
23	1	1	1	1
24	1	1	1	1
25	0	0	0	1
26	1	1	1	1
27	1	1	1	0
28	1	1	1	0
29	1	1	0	0
30	0	0	0	1
31	1	0	1	1
32	1	1	1	0
33	0	0	0	1
34	1	1	1	0

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE