

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DOS CURSOS DE PÓS GRADUAÇÃO

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Ancylostoma caninum*
(ERCOLANI, 1859) PARASITO DE *Canis familiaris* UTILIZANDO A
TÉCNICA DE RAPD-PCR**

HUDSON ANDRADE DOS SANTOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Maria Norma Melo

BELO HORIZONTE - MG
2000

S237e Santos, Hudson Andrade dos, 1962-
2000 Estudo da variabilidade genética de *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) parasito de *Canis familiaris* utilizando a técnica de RAPD-PCR / Hudson Andrade dos Santos. – Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 2000.
63p.: il
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
1. Cão – Doenças – Teses. 2. Cão – Parasito – Teses. 3. *Ancylostoma* – Teses. I. Título

CDD – 636.708 96

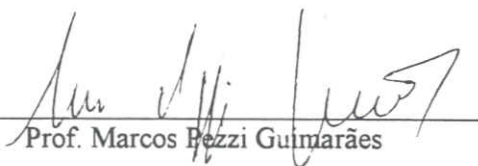
Dissertação defendida e aprovada em 31 de agosto de 2000, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profa. Maria Norma Melo
(Orientadora)



Prof. José Oswaldo Costa



Prof. Marcos Pezzi Guimarães



Profa. Amália Verônica Mendes Silva



Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo

Dedico ao “Mestre” Hélio Martins de Araújo Costa “*in memorian*”
por todos ensinamentos e incentivo na minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Norma de Melo pela orientação e carinho, mesmo com todas atribuições, se mostrou sempre disposta a auxiliar, além de abrir as portas de seu laboratório para que este trabalho fosse desenvolvido.

Ao Professor José Oswaldo Costa pela co-orientação, amizade e incentivo ao meu desenvolvimento profissional.

Ao Professor Hélio Martins de Araújo Costa “*in memorian*”: “Hoje, mais do que nunca, sinto a sua presença, pois a minha saudade o traz de volta, porque não morre quem nos outros vivem; não morre quem nos vivos vive.”

Ao Departamento de Parasitologia, na pessoa do chefe do Departamento Prof. Evaldo Nascimento, pela liberação, convívio e aprimoramento profissional, pois “Pode-se vencer pela inteligência, pela habilidade ou pela sorte, mas nunca sem o trabalho”.

Aos professores da Parasitologia Veterinária, Walter dos Santos Lima, Antônio César Rios Leite e Múcio Flávio pela concessão da liberação para realização do mestrado e pelo incentivo e apoio durante este período, e, em especial, ao Marcos Pezzi Guimarães, por ter gentilmente cedido seu laboratório para extrações e preparação dos pré-mix para a realização das reações de RAPD.

Ao corpo docente e discente do curso de Pós Graduação da Escola de Veterinária da UFMG pelos ensinamentos, amizade e pronto atendimento.

Ao professor Ivan Sampaio pela atenciosa colaboração nos cálculos estatísticos.

Aos meus pai, José Soares dos Santos e Neusa Marcelina de Andrade Santos a quem devo minha existência e que incondicionalmente sempre estiveram presentes e com carinho me apoiaram nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos irmãos Shirley, Robson, Rosemary, Jefferson e sobrinhos pelo carinho e amizade.

À minha querida esposa Lucinete pelo apoio, incentivo e paciência durante este período, sempre com uma palavra amiga nos momentos mais difíceis.

Aos meus grandes amigos, Amália, Glorinha, Narcisa, Merian, Celinha, José Luiz, Patrícia, Marcia, Adriana Garcia que sempre estiveram ao meu lado, porque “para fazer grandes coisas não é preciso estar acima dos homens, é necessário estar com eles.”

À todos os meus amigos particulares pelo carinho, amizade e força em todos os momentos.

À Deborah A. Ferreira, estagiária exemplar, do Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG que com sua dedicação deu grande contribuição na execução deste trabalho.

Aos meus amigos do Departamento de Parasitologia, Maria Conceição, Edna Maia, Jefferson, Vanderlany, Afonso, Joãozinho, Edna Pires, Orlando, Mercês, Marinete, João Carlos, Vera, Sumara, Ana, Milton, Floriano, Geni, Edméia, e principalmente à Rosálida e Célia pelo inestimável apoio.

À Rosângela e Soraia pela competente e inestimável ajuda, sem a qual o desenvolvimento deste trabalho seria impossível.

Ao Departamento de Zoonose da Prefeitura Municipal de Vitória – ES, na pessoa do Dr. Gilton Luiz Almada por gentilmente ceder a sala de necrópsia e animais capturados para coleta dos helmintos para este estudo.

Ao Departamento de Zoonose da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte – MG na pessoa da Dr^a. Heloisa de Freitas por gentilmente ceder a sala de necrópsia e animais capturados para coleta dos helmintos para este estudo.

À Universidade de Alfenas pela gentileza em ceder seu laboratório de patologia e animais para necrópsia e coleta dos helmintos. Aos professores Flademir Wolthers e Amália Verônica Mendes Silva e alunos monitores e estagiários, Ivan, Maurício, Michelle, Juliano, Ricardo e Kelly no auxílio a necrópsia e coleta dos helmintos para este estudo.

A diretora do curso de Ciências Biológicas das Faculdades Metodistas Integradas Izabela Hendrix Airam Viggiano Gonçalves e Professora Maria Auxiliadora Batista Leite pelo reconhecimento, confiança e oportunidade de demonstrar o meu trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Morfologia	16
2.2 Gênero <i>Ancylostoma</i> (Dubini, 1843).....	16
2.3 Espécie <i>Ancylostoma caninum</i>	17
2.3.1 Ciclo biológico.....	17
2.3.2 Ocorrência mundial.....	18
2.3.3 Ocorrência no Brasil	18
2.3.4 Patogenia	19
2.3.5 Diagnóstico parasitológico	19
2.4 Estudos morfológicos e bioquímicos	20
2.5 Biologia molecular	20
2.6 Técnica do RAPD-PCR (Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico)	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Obtenção dos <i>Ancylostoma caninum</i>	23
4.1.1 Procedência dos cães para obtenção dos adultos de <i>A. caninum</i>	23
4.1.2 Identificação dos <i>Ancylostoma caninum</i>	24
4.2 Obtenção do DNA genômico dos <i>Ancylostoma caninum</i>	25
4.2.1 Extração do DNA	25
4.2.2 Quantificação do DNA	26
4.3 Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD).....	26
4.3.1 Padronização da reação de RAPD-PCR	26
4.3.2 Seleção dos iniciadores para a reação de RAPD-PCR	26
4.3.3 Reação de RAPD-PCR.....	27
4.5 Análise dos produtos amplificados	28
4.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata.....	28
4.5.2 Revelação do gel de poliacrilamida	28
4.6 Análise dos dados e construção dos fenogramas	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Obtenção dos <i>Ancylostoma caninum</i>	29
5.2 Extração e quantificação do DNA dos <i>A. caninum</i>	29
5.3 Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD).....	30
5.3.1 Padronização da amplificação pela técnica de RAPD-PCR	30
5.3.2 Seleção dos iniciadores para a reação de RAPD-PCR	30
5.3.3 Perfis de RAPD-PCR com os iniciadores selecionados	30
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	55
8 PERSPECTIVAS	55
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de RAPD-PCR.....	33
Figura 2.	Quantificação de DNA de espécimes de <i>Ancylostoma caninum</i> em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.....	35
Figura 3.	Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida com iniciador G06 com concentrações de 1ng, 2ng e 5ng de <i>Ancylostoma caninum</i> para padronização da amplificação.....	37
Figura 4.	Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, utilizando iniciador G06, de espécimes de <i>Ancylostoma caninum</i>	39
Figura 5.	Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, utilizando iniciador G11, de espécimes de <i>Ancylostoma caninum</i>	41
Figura 6.	Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, utilizando iniciador G15, de espécimes de <i>Ancylostoma caninum</i>	43
Figura 7.	Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, utilizando iniciador G18, de espécimes de <i>Ancylostoma caninum</i>	45
Figura 8.	Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, utilizando iniciador M13:40 forward, de espécimes de <i>Ancylostoma caninum</i>	47
Figura 9.	Fenograma construído por UPGMA, baseado nos valores de distância genética (D) entre os espécimes de <i>Ancylostoma caninum</i> de diferentes localidades, obtidos por RAPD com os iniciadores G06, G11, G15, G18 e M13:40 forward.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Principais características morfológicas e morfométricas das espécies do gênero <i>Ancylostoma</i>	17
Quadro 2.	Origem geográfica dos <i>Ancylostoma caninum</i> utilizados no presente estudo.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Iniciadores utilizados nos experimentos de RAPD-PCR.....	27
Tabela 2.	Componentes da RAPD-PCR por tubo de reação.....	27
Tabela 3.	Número de bandas, média e proporção de bandas compartilhadas e média de bandas por linha entre <i>Ancylostoma caninum</i> obtidas pela metodologia do RAPD, com 5 iniciadores utilizados.....	30
Tabela 4.	Bandas compartilhadas entre os <i>Ancylostoma caninum</i> de acordo com a procedência, obtidas pelo RAPD com os 5 iniciadores utilizados.....	31

LISTA ABREVIATURAS

AFA – Álcool, Formol Comercial, Ácido acético e Água destilada
AP-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores arbitrários
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
dNTP – Mistura de 2 deoxinucleosídeos 5 trifosfato
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
HCl – Ácido Clorídrico
Kb – Kilobases (unidade correspondente a mil pares de bases)
KCl – Cloreto de Potássio
MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mL – Mililitro ($1 \text{ litro} \times 10^{-3}$)
ng – Nanogramas ($1 \text{ grama} \times 10^{-9}$)
OTU – Unidades Taxonômicas Operacionais
p/v – Peso por volume
Pb – Pares de base (dois nucleotídeos emparelhados por pontes de hidrogênio GC e AT)
PBS – Solução de salina tamponada
PCR – Reação de Polimerização em Cadeia
pmol – picomol
Primers – Iniciadores da Reação de PCR
Proteinase – Enzima que degrada proteínas
pv – Peso vivo
RAPD – DNAs Polimórficos Amplificados Aleatoriamente
RFLPs – Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição
RNA – Ácido Ribonucléico
RNAse – Enzima que degrada especificamente o RNA
rpm – Rotações Por Minuto
RPMI – Meio de Cultura para Cultivo de Células
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
Taq – *Thermus aquaticus*, bactéria termófila da qual se obtém uma das DNAs polimerases termoestáveis utilizadas na reação de PCR
TBE – Tampão com Tris-Borato e EDTA
TEMED – N'N'N'N', Tetrametil Etilenodiamina
Tris – Hydroximetil Amino Metano
UPGMA – Método da Média Aritmética não Ponderada
vv – Volume por volume
μL – Microlitro ($1 \text{ litro} \times 10^{-6}$)

RESUMO

A variabilidade genética de *Ancylostoma caninum* foi estudada utilizando marcadores moleculares multilocais do tipo RAPD das três populações procedentes dos estados de Minas Gerais: região metropolitana de Belo Horizonte, Sul de Minas Gerais (Poços de Caldas e Três Corações) e do estado do Espírito Santo (Vitória). Através da utilização de cinco iniciadores (G06, G11, G15, G18 e M13-40 forward) foram obtidos 56 marcadores polimórficos ou não entre 250 pb a 2036 pb. O programa DNA-POP foi utilizado para calcular a proporção de bandas compartilhadas entre quaisquer dois exemplares de *A. caninum*. Esta proporção foi de 78% variando entre 74% a 86%. Não foram observados padrões idênticos de bandas entre os *A. caninum* estudados. O número de bandas compartilhadas foi usado para calcular os índices de similaridades e, a partir deles, calculou-se a distância genética para todos os pares com todos os iniciadores e com os valores obtidos foi construído um fenograma pelo método UPGMA (média aritmética não ponderada) através do programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 1.01 desenvolvido por Kumar et al. (1993). Considerando a procedência dos indivíduos observou-se que os espécimes de mesma localidade mostraram-se mais homogêneos, o que permitiu agrupá-los pelo menos parcialmente de acordo com sua origem geográfica. Há uma maior variabilidade interpopulacional do que intrapopulacional. A homogeneidade intrapopulacional observada foi maior na região metropolitana de Vitória (ES), seguida pela região metropolitana de Belo Horizonte e depois Sul de Minas Gerais. O fenograma revelou a existência de dois ramos na árvore construída, um abrigando as populações ou agrupamentos da região metropolitana de Belo Horizonte, e parte do Sul de Minas Gerais (Poços de Caldas) e o outro abrigando o agrupamento de Vitória (ES) e parte do Sul de Minas Gerais (Três Corações). O significado do agrupamento da parte da população do Sul de Minas com a de Vitória permanece obscuro, em virtude da falta de um maior conhecimento da genética desta população. A técnica do RAPD demonstrou ser uma ferramenta eficiente para estudo de variabilidade genética em *A. caninum* de diferentes áreas geográficas separando as populações estudadas.

Palavras-chave: *Ancylostoma caninum*, RAPD-PCR, Variabilidade genética

ABSTRACT

Genetic variation was studied using molecular markers revealed by RAPD of three populations from the state of Minas Gerais: the metropolitan area of Belo Horizonte, the South of Minas Gerais (Poços de Caldas and Três Corações); and one from the state of Espírito Santo metropolitan area of Vitória. Using five primers (G06, G11, G15, G18 and M13-40 forward) fifty-six polymorphic or monomorphic markers between 250 to 2036 pb were obtained. The DNA-POP program was used to calculate the proportion of compartilized bands between each pair of individuals. This proportion was 78% varying between 74% and 86%. Identical patterns of bands were not recorded in the *A. caninum* examined. The number of compartilized bands was used to calculate the similarity indices. Genetic distances were calculate using similarity indices. These values originated a phenogramme constructed using UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) with MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software (version 1.01 developed by Kumar et al., 1993). A high degree of genetic variability was evidenced among intrapopulations and was found that individuals from the same localities were the most homogeneous allowing grouping at least partially according to their geographical origin. The phenogramme revealed the existence of two branches in the constructed tree. The one branch included material from the metropolitan area of Belo Horizonte and part (Poços de Caldas) from the South of Minas Gerais. The other branch included Vitória (ES) and part of the South of Minas Gerais (Três Corações). The significance of the grouping of part of the South of Minas Gerais material with Vitória remains obscure but could be due to the lack of better understanding of the genetics of this populations. The RAPD techniques proved to be an efficient tool to study genetic variability in *A. caninum* populations.

Key-words: *Ancylostoma caninum*, RAPD-PCR, Genetic variation

1. INTRODUÇÃO

A família Ancylostomidae é uma das mais importantes da classe Nematoda, cujos estádios parasitários ocorrem em mamíferos, incluindo o homem, levando a doenças de caráter crônico e debilitante que podem evoluir para conseqüências fatais. Esta família é subdividida em várias subfamílias, das quais duas, Ancylostominae e Bunostominae, abrigam várias espécies de interesse em medicina humana e veterinária, como: *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma tubaeforme*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Bunostomum* spp e *Uncinaria stenocephala*.

Os ancilostomídeos são hematófagos e produzem quadros clínicos variados como dermatite, pneumonia, enterites e diarreia, principalmente em hospedeiros jovens. A sintomatologia pode aparecer duas semanas pós-infecção, caracterizada por diarreia, às vezes sangüinolenta, anorexia, perda de peso, vômitos e anemia severa, podendo assumir formas graves ou mesmo fatais (Reinemeyer, 1993). Esses helmintos são hospedeiros-específicos (Burrows, 1962), entretanto, não são raras as infecções humanas causadas por *Ancylostoma caninum*, parasito de cão, levando a um quadro de enterite eosinofílica (Prociv & Croese, 1996) e *Ancylostoma ceylanicum*, parasito do homem na Ásia, pode ser encontrado parasitando gatos (Stewart, 1994).

Dentre as espécies de interesse na medicina veterinária ganham destaque *A. caninum* (Ercolani, 1859) e *A. braziliense* (Faria, 1910), parasitos do intestino delgado de cães e gatos, não só pela ampla distribuição geográfica, como também pelos danos causados aos seus hospedeiros, além de serem os principais agentes etiológicos da "larva migrans" cutânea do homem.

A identificação específica dos ancilostomídeos é extremamente importante para o diagnóstico da infecção, estudos

epidemiológicos e medidas de profilaxia e controle da doença (Gasser et al., 1998).

O diagnóstico das espécies de interesse médico veterinário pode ser feito a nível individual pelos sintomas clínicos, embora estes possam ser confundidos com aqueles de infecções virais entéricas. O diagnóstico de certeza é alcançado pelo exame parasitológico de fezes, com o encontro de ovos característicos dos helmintos. Os métodos utilizados, no entanto, não permitem identificar o agente etiológico especificamente, uma vez que os ovos são morfológicamente semelhantes. Portanto, o diagnóstico específico é conseguido através da morfologia das larvas L3, obtidas por coprocultura ou pelo exame dos exemplares adultos coletados em necrópsias.

Os adultos machos e fêmeas apresentam dimorfismo sexual acentuado, tanto pelo maior tamanho das fêmeas, como principalmente pela morfologia da extremidade posterior. Estas características associadas à morfologia e estrutura da cápsula bucal permitem identificar *A. caninum* com certa facilidade.

Entretanto, ao examinarmos morfológicamente exemplares adultos de *Ancylostoma caninum*, em hospedeiros da mesma espécie ou de espécies diferentes, observamos pequenas diferenças nas medidas de estruturas importantes na identificação específica, que nos leva a suspeitar de variações intra-específicas.

Em um estudo comparativo com exemplares de *A. caninum* de cães do estado de Goiás e gatos de outras partes do país, Santos (1980) verificou diferenças significativas no comprimento e largura do corpo, comprimento do esôfago e da boca e largura da bolsa copuladora. Entretanto, as medidas das estruturas básicas utilizadas na diferenciação específica, como comprimento dos espículos e gubernáculo não apresentaram variação significativa. Estas pequenas variações, embora dentro dos limites de estudos taxonômicos utilizando morfologia e morfometria, levantam dúvidas sobre a posição taxonômica, pois os espécimes poderiam ser morfológicamente similares, mas

geneticamente distintos (Stewart, 1994). O autor comenta que estas espécies, cepas ou populações apresentando estas diferenças poderiam desenvolver a capacidade de infectar diferentes espécies de hospedeiros.

Por outro lado, há diversos estudos mostrando que mesmo na ausência de diferenças morfológicas significativas, muitas espécies de parasitos são geneticamente distintas, (Chilton et al., 1992) e isto foi observado entre os membros da família Ancylostomidae, quando Romstad et al. (1998) encontraram que *Necator americanus* da África e da Malásia apresentam diferentes seqüências de ITS-2 (segundo espaçador transcrito interno) de rDNA, embora os helmintos fossem morfológicamente semelhantes. Há ainda outros estudos mostrando que espécies morfológicamente distintas podem apresentar variações genéticas mínimas (Hillis & Dixon, 1991).

Durante as três últimas décadas, estudos bioquímicos e de genética molecular têm mostrado que a maior parte das populações naturais de animais, dentre elas os nematodos, são geneticamente heterogêneas (revisito por Powell, 1975; Nevo, 1978; Nadler, 1990; Anderson et al., 1998).

Atualmente, o estudo dos helmintos tornou-se mais abrangente, passando a utilizar além das características morfológicas e morfométricas, dados moleculares. Em relação a taxonomia, por exemplo, além das abordagens tradicionais de morfologia e morfometria, estes estudos passaram a incorporar dados sobre relações filogenéticas, visto que as espécies não são entidades estáticas, mas estão em constante adaptação, principalmente aquelas com reprodução sexuada (Mayr, 1982).

De fato, a moderna tendência no estudo dos parasitos reconhece que as abordagens morfológicas e moleculares se integram e cada uma tem vantagens e desvantagens, e que em geral, os estudos que incorporam ambos, dados morfológicos e moleculares, podem fornecer melhores descrições e

interpretações da diversidade biológica, do que aqueles que enfocam apenas uma destas abordagens.

A utilização de dados moleculares no estudo dos parasitos de interesse veterinário ganhou novo impulso com o desenvolvimento da biologia molecular, que trouxe novas e poderosas ferramentas para melhorar e desenvolver o conhecimento e a compreensão das relações hospedeiro-parasita, da taxonomia e classificação, do diagnóstico específico utilizando os parasitos em qualquer estágio do seu ciclo biológico, de vacinas usando a tecnologia do DNA recombinante, de novas drogas antiparasitárias, dos mecanismos de resistência dos helmintos aos antiparasitários, da seleção de hospedeiros geneticamente resistentes, da epidemiologia molecular e biologia evolucionária e fisiologia de parasitos e seus hospedeiros (Zarlenga, 1994; Christensen et al., 1994; Stevenson et al., 1995; Prichard, 1997; Hotez et al., 1999).

Muitas destas questões são melhor respondidas através do estudo da variabilidade genética dos parasitos utilizando marcadores genéticos, como por exemplo isoenzimas, RFLP (Polimorfismo por tamanho de fragmentos de restrição) e RAPD-PCR (Amplificação aleatória de DNA polimórfico), que têm permitido estabelecer os padrões de variação genética dentro e entre as populações naturais.

Grande esforço tem sido feito para desenvolver técnicas de estudo de variabilidade genética ou polimorfismo dos nematóides que parasitam o homem, animais e vegetais. Além das observações morfológicas, o polimorfismo pode ser detectado através de técnicas bioquímicas que mostram variações a nível de enzimas e outras proteínas, embora este polimorfismo possa estar diretamente relacionado e influenciado por pressões de seleção externa. Métodos bioquímicos, como eletroforese de proteínas e, em especial, o estudo dos perfis isoenzimáticos têm sido largamente empregados para detectar variabilidade genética, com vantagem sobre a variabilidade detectadas pelas

características morfológicas, uma vez que os fenótipos detectados podem ser interpretados sob um contexto genético (como alelos de um locus), enquanto a base genética da maioria das variações morfológicas é desconhecida (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990; Flockhart et al., 1982; Nadler, 1990).

A detecção e exploração da sequência de DNA e RNA representam um dos mais altos níveis de resolução para estudos de variabilidade genética (Nadler, 1990) e de fato, estas metodologias têm auxiliado os parasitologistas a resolverem algumas questões como a identificação de espécies e subespécies, estudo de variações inter e intra específicas de nematóides, pois o polimorfismo genético é resultante de variações na sequência de nucleotídeos do DNA, podendo ser detectado a este nível (Currant et al., 1985, 1986; Chambers et al., 1986; Garate et al., 1991).

Para identificação e estudos filogenéticos, não é necessário que as características genéticas analisadas estejam diretamente relacionadas com a função ou outra diferença fenotípica entre as formas.

O método baseado no DNA é relativamente estável, principalmente quando comparado com aqueles que envolvem enzimas, e o material pode ser estocado para estudos posteriores. Devido a sensibilidade para detectar variações nas posições de nucleotídeos nas sequências de DNA e sendo o genoma de uma espécie o mesmo em qualquer estágio do seu ciclo de vida, o estudo pode ser feito nos diferentes estádios evolutivos dos helmintos; ovos, larvas ou adultos machos ou fêmeas (Gasser et al., 1993; Humbert & Cabaret, 1995; Hawdon, 1996).

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante e em especial o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR ("Polymerase Chain Reaction" ou Reação em Cadeia da Polimerase), abriram caminho para uma verdadeira mudança na biologia e na pesquisa, visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas envolvendo diagnóstico

e melhoramento genético de plantas e animais domésticos.

A revolução nos estudos de variabilidade genética se iniciou com o desenvolvimento de marcadores enzimáticos. Com o advento das modernas técnicas de biologia molecular, surgiram vários métodos de detecção de polimorfismo diretamente ao nível de DNA. Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphism"- RFLP) (Grodzicker et al., 1974). Mais recentemente, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia (PCR), utilizando uma DNA polimerase (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares. Aliadas às técnicas de clonagem e seqüenciamento de DNA, estas metodologias têm possibilitado um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura dos genomas eucariotos.

Um grande avanço na área de marcadores moleculares, baseados em PCR, ocorreu em 1990 quando dois grupos, independentemente, descreveram uma modificação no protocolo de PCR, que permitiu a análise genômica de organismos, de modo simples, rápido e altamente informativo sem a necessidade do conhecimento prévio de sequência do DNA (Williams et al., 1990 e Welsh & McClelland, 1990). A técnica conhecida como RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), se baseia na utilização de iniciadores curtos de sequência arbitrária, que se ligam ao DNA molde em estudo (Williams et al., 1990) e a técnica denominada AP-PCR ("Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction") difere desta apenas no tamanho dos iniciadores utilizados (Welsh & McClelland, 1990). A diferença da técnica desenvolvida ao mesmo tempo pelos dois grupos citados está basicamente no comprimento do iniciador. Na técnica do RAPD são utilizados iniciadores mais curtos de 10 bases de comprimento e na técnica de AP-PCR iniciadores mais longos de 20 bases de comprimento. Apesar dos iniciadores possuírem sequência arbitrária, a amplificação tecnicamente ocorre em

lugares específicos do genoma. O anelamento ocorre em baixas condições de estringência, sendo que os iniciadores se ligam a múltiplos sítios complementares a eles, que estejam separados por aproximadamente 2-3 Kb um do outro e opostamente orientados ao sítio de ligação, de modo que um único iniciador começa a replicação tanto na direção direta 5'-3' como na reversa 3'-5'. A Figura 1 mostra um esquema representativo da técnica do RAPD-PCR.

Estas tecnologias trouxeram uma verdadeira "democratização" da análise de polimorfismo molecular ao permitirem estudos de variabilidade genética em espécies anteriormente não contempladas. Elas vêm sendo usadas nos estudos de organismos nos quais a ausência ou diferença de caracteres não permitiam a diferenciação morfológica, tornando o emprego de técnicas moleculares de diferenciação genômica, bastante interessante.

Independente do nome, se AP-PCR ou RAPD-PCR, a técnica de PCR utilizando iniciadores de sequência arbitrária abriu uma nova perspectiva para a análise genômica de indivíduos e populações. O uso de marcadores RAPD na análise genética tem se difundido rapidamente e dentre suas aplicações estão a análise da estrutura e diversidade genética em populações, o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies, a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica de RAPD-PCR baseia-se na amplificação simultânea de regiões anônimas de DNA usando um único iniciador de sequência arbitrária, gerando um padrão de múltiplas bandas. Este processo possibilita comparar similaridades ou diferenças do DNA (por presença ou ausência de bandas e total de bandas compartilhadas) mostradas na reação de PCR. Os fragmentos sintetizados são revelados por eletroforese em gel agarose, corado com brometo de etídio, observados sob luz ultra violeta, ou em gel de poliacrilamida, revelado com nitrato de

prata. Assim, a natureza do polimorfismo dos produtos gerados de diferentes amostras de DNA pode ser comparada.

O RAPD-PCR teoricamente permite o uso de um número ilimitado de diferentes iniciadores aleatórios capazes de reconhecer sítios específicos, porém desconhecidos, do genoma, muitos dos quais são polimórficos e podem ser únicos para cada população de organismos.

Utilizando a técnica do RAPD-PCR o presente trabalho tem por objetivo avaliar os níveis de variação genética dentro de populações naturais de *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859), parasitos de cães (*Canis familiaris*) provenientes de regiões geograficamente distintas, nos estados de Minas Gerais (Belo Horizonte, Formiga e Sul de Minas) e Espírito Santo (Vitória).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Morfologia da Família Ancylostomidae

Os membros da família Ancylostomidae apresentam extremidade anterior curvada dorsalmente e a abertura oral direcionada antero-dorsalmente, com cápsula bucal ampla e profunda e dentes ou lâminas cortantes na margem ventral. Apresentam nitido dimorfismo sexual, tendo os machos uma bolsa copuladora bem desenvolvida.

A família está dividida em duas subfamílias: Ancylostominae, com cavidade bucal apresentando um a seis dentes na face ventral, com dois gêneros: *Ancylostoma* e *Agriostomum* e Bunostominae, com cavidade bucal provida de placas cortantes, com três gêneros: *Necator*, *Bunostomum* e *Uncinaria*.

2.2. O Gênero *Ancylostoma* (Dubini, 1843)

O quadro abaixo mostra algumas características morfológicas, morfométricas e os hospedeiros das espécies encontradas no gênero *Ancylostoma*: *A. duodenale* (Dubini, 1843); *A. caninum* (Ercolani, 1859); *A. braziliense* (Faria, 1910); *A. tubaeforme* (Zeder, 1800) e *A. ceylanicum* (Loos, 1911).

Quadro 1. Principais características morfológicas e morfométricas das espécies do gênero *Ancylostoma*

Espécie	Comprimento do corpo em mm		Número de dentes na cavidade bucal	Hospedeiros
	Macho	Fêmea		
<i>A. duodenale</i>	8-11	10-18	4 grandes e 2 pequenos	Homem
<i>A. caninum</i>	11-13	14-20	6 grandes	Cão, gato
<i>A. braziliense</i>	5-7,5	6,5-9	2 grandes e 2 pequenos	Cão, gato
<i>A. ceylanicum</i>	5-7,5	6,5-9	2 grandes e 2 pequenos	Cão, gato
<i>A. tubaeforme</i>	9,5-11	12-15	6 grandes	Gato

No gênero *Ancylostoma*, quatro espécies têm interesse veterinário por parasitar animais domésticos, destacando-se entre elas o *A. caninum* parasito de cães domésticos (*Canis familiaris*) e gatos (*Felis catus*) ambos com ampla distribuição mundial.

2.3. A Espécie *Ancylostoma caninum*

O *A. caninum* tem cavidade bucal infundibuliforme com três dentes de cada lado na margem ventral. No fundo da cápsula bucal um par de dentes dorsais triangulares e um par de dentes ventrolaterais podem ser vistos. O macho apresenta bolsa copuladora bem desenvolvida com os raios ventrais unidos longitudinalmente, raio dorsal bifurcado, sendo cada ramo tridigitado, raio dorsal externo originando-se do mesmo tronco do dorsal e raios laterais saindo de um mesmo tronco. Os espículos têm o mesmo comprimento, que variam de 0,73 mm a 0,96 mm e apresentam gubernáculo. A fêmea apresenta a vulva situada próximo a junção do segundo com o terceiro terço do corpo. O útero e os ovários se enrolam em forma de espiral em torno do tubo intestinal. Os ovos medem 55-72,2 por 34-44,7 μ e contêm um embrião de oito células no momento da postura (Burrows, 1962).

2.3.1. Ciclo Biológico

Os adultos de *A. caninum*, machos e fêmeas, permanecem fixados à mucosa do intestino delgado, principalmente no jejuno (97,5%) e íleo (1,2%), mas dependendo da carga parasitária podem estar distribuídos por todo o intestino delgado (Melo et al., 1977). As fêmeas, após a cópula, realizam postura de ovos que são eliminados com as

fezes. No solo, em condições favoráveis de temperatura, umidade e oxigênio, em sete dias eclode uma larva rhabditóide de 1º estágio (L1). Esta larva passa por dois estágios de desenvolvimento: larva rhabditóide de 2º estágio (L2) e larva filarióide infectante de 3º estágio (L3). As larvas infectantes (L3) permanecem vivas no solo por até 49 dias, dependendo da temperatura e umidade (Mark, 1975), migrando sobre o filme capilar de água que se forma sobre as partículas da superfície do solo, onde aguardam o contato com seu hospedeiro (Kalkofen, 1987). A infecção dos hospedeiros pode ocorrer pelas vias percutânea, com penetração ativa na pele, pela mucosa ou conjuntiva ou passivamente por via oral.

No cão, a principal via de infecção é a oral e mais raramente a percutânea. A infecção pela via transplacentária também pode ocorrer, quando as cadelas se infectam durante o período de gestação ou quando larvas latentes saem do período de quiescência nos tecidos da cadela e durante sua migração atravessam a placenta e se fixam nos tecidos do feto. Após o parto, as larvas presentes nos filhotes caem na corrente sanguínea, migram pela via hepato-traqueal e atingem o intestino delgado, onde se tornam adultos. Outra via de infecção é através do colostro, onde já foram detectadas larvas de *A. caninum* (Stone & Peckhan, 1970). Alguns insetos também podem albergar as larvas infectantes por algum tempo, funcionando como hospedeiros paratênicos, até serem ingeridos pelos hospedeiros definitivos (Little, 1961).

A infecção por via oral se dá através da ingestão de alimentos e água contaminados com as larvas infectantes (L3). As L3 perdem a cutícula externa no estômago por ação do suco gástrico e do pH. Após três dias de infecção, migram para o intestino delgado e penetram na mucosa, atingindo as células de Lieberkühn, onde mudam para L4 em, aproximadamente, cinco dias. Em seguida as larvas L4 voltam a luz do intestino, realizam muda para L5, fixam-se à mucosa do intestino, iniciando o hematofagismo, e após amadurecimento de seus órgãos genitais, copulam e começam o período de postura de ovos. Isto pode ocorrer entre 14 a 21 dias.

Na infecção percutânea as larvas infectantes L3 penetram na pele auxiliada por ação de enzimas. As larvas migram pelos tecidos do hospedeiro, alimentando-se de nutrientes do soro, até atingirem um vaso sanguíneo ou linfático (Hawdon & Schad, 1991; Schad, 1991). Pela circulação as larvas (L3) são carregadas para o coração e pulmões, onde perfuram os capilares, migram para os alvéolos, onde mudam para L4 (Looss, 1911). As larvas L4 deglutidas, alcançando o intestino delgado, penetram nas glândulas intestinais, onde realizam a muda de L4 para larva de 5º estágio (L5) ou adulto jovem, que retornam à luz do intestino, fixam-se à mucosa, copulam e começam o período de postura. O período de pré-patência varia de 35 a 60 dias.

Nos cães, nos quais o parasito realiza o ciclo pulmonar (Looss, 1911), as larvas já podem ser encontradas na faringe 48 horas após a penetração cutânea (Matsusaki, 1950). Algumas larvas podem continuar na circulação sistêmica indo para os diversos órgãos realizando uma migração somática, onde algumas serão destruídas pelas defesas do hospedeiro e outras se tornarão latentes.

2.3.2. Ocorrência Mundial

A espécie *A. caninum* é de distribuição mundial com altas taxas de prevalência no mundo, ocorrendo em basicamente todos os continentes (América, Ásia, Europa, África e Oceania). Em inquéritos coproparasitológicos e necrópsias de cães

domiciliados e de rua, a incidência está entre 18% e 100%, dependendo da região e condições ambientais (Kulisic et al., 1998; Wachira et al., 1993; Rep, 1975; Dada et al., 1979; Hauslinger et al., 1993; Franc et al., 1997; Young & Ming, 1997; Blagburn et al., 1996; Kazacos, 1978; Khuong et al., 1998; Gaca et al., 1998; Lee & Lee, 1996; Daodi et al., 1995; Vargas & Contreras, 1998; Sandhu et al., 1997; Soeripto et al. 1978; Makene et al., 1996; Jani et al., 1995), constituindo assim um sério problema de saúde animal, principalmente em áreas rurais (Qiang et al., 2000).

Além da sua importância na saúde animal, o *A. caninum* ganha destaque por ser responsável também pelos quadros de *larva migrans*, principalmente em crianças (Lima et al., 1984; Albanese et al., 1995; Hendrix et al., 1996; Malgor et al., 1996; Larrieu et al., 1997), além de ser considerado, por alguns autores, como uma "nova" zoonose, com relatos de infecção humana desde 1944 (Barreto & Amaral, 1944; Kenney, 1994; Prociv & Croese, 1994; Croese, 1995; Croese et al., 1996).

2.3.3. Ocorrência no Brasil

A prevalência da helmintose intestinal canina, causada por *A. caninum*, tem sido relatada há vários anos em todas as regiões do Brasil. Gordon & Young em 1922, em cães do estado do Amazonas, observaram ocorrência de 100% de *A. caninum* nos animais necropsiados. Zago Filho & Barreto (1957) relataram a prevalência de 98,76% em Ribeirão Preto (SP). Costa et al. (1986), na lista de helmintos parasitos de animais domésticos do Brasil, relataram o encontro de *A. caninum* em cães dos Estados de Amazonas, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Paraná, São Paulo e Piauí.

Carneiro et al. (1973) em Goiânia (GO) e Brito et al. (1980) no Rio de Janeiro observaram prevalência de 93%, enquanto Lara et al. (1981) em Pelotas (RS) verificaram prevalência de 98%. No estado de São Paulo, Farias et al., em 1995 observaram prevalência de 45% em Araçatuba e Bittencourt et al. (1996), em

Espírito Santo do Pinhal, observaram prevalência de 43%.

Em 1999, Porto et al. no Recife (PE) observaram frequência de 90,29%, e Silva et al. em Patos (PB) de 60%.

Em Belo Horizonte (MG), estudos atuais sobre a distribuição deste helminto não têm sido realizados, mas estudos mais antigos mostram altas taxas de prevalência, sendo de 96% nos estudos de Batista Jr. et al. (1962) de 100% naqueles de Costa & Freitas (1964).

2.3.4. Patogenia

A maior prevalência do *A. caninum* ocorre em animais menores de um ano, principalmente entre os 2 e 6 meses de idade, decrescendo com o aumento da idade (Franc et al., 1997; Itoh & Itoh, 1998; Blagburn et al., 1996; Khuong et al., 1998; Sandhu et al., 1997).

Nos animais, a patogenia se deve à migração das larvas e implantação dos vermes no intestino delgado. As larvas provocam, no local de penetração (pele ou mucosas), lesões traumáticas que são acompanhadas por fenômenos vasculares e inflamatórios, com hiperemia, prurido e edema. A extensão das lesões e da sintomatologia estão associadas ao número de larvas penetrantes e ao grau de sensibilidade do hospedeiro, sendo mais intensos nas reinfecções (Yuanqing et al., 1998). Infecções secundárias por microrganismos podem ocorrer, levando a formação de pústulas e pequenas ulcerações. Alterações pulmonares envolvendo a passagem de larvas pelos alvéolos são incomuns, mas podem ocorrer, levando à tosse e febre.

A principal ação patogênica dos vermes no intestino delgado de seus hospedeiros é produzida pela espoliação sangüínea e depende do número de vermes instalados. Os sintomas se agravam quando a oviposição se inicia e incluem dor epigástrica, diminuição do apetite, indigestão, cólica, indisposição, náuseas, vômitos, flatulência, diarreia, que pode ser mucossanguinolenta e, mais raramente,

constipação. A anemia causada pelo intenso hematofagismo, no qual um único espécime pode sugar 0,8 mL de sangue/dia, é o principal sinal da ancilostomose (Wells, 1931). Além da espoliação direta, ocorrem constantes mudanças de local de fixação, seja pelo edema local ou pela constante procura da fêmea e/ou macho para cópula, as lesões continuam perdendo sangue, levando assim a um agravamento do quadro com anemia por deficiência de ferro e hipoproteinemia do hospedeiro.

A instalação e persistência da anemia microcítica e hipocrômica, de leucocitose, de eosinofilia e de baixa taxa de hemoglobina levam a alterações importantes que agravam o quadro clínico. Embora os parasitos ingiram albumina, a hipoalbuminemia está associada à diminuição da capacidade de síntese de albumina pelo fígado, à perda de plasma nos locais onde os vermes se fixam e à desnutrição (Foster & Cort, 1932). A diminuição do apetite é comumente observada, assim como o apetite depravado, caracterizado sobretudo por geofagia.

Histologicamente, as áreas parasitadas mostram um processo inflamatório com predomínio de eosinófilos íntegros e degranulados, macrófagos e neutrófilos, congestão, edema e pequenas hemorragias (no cório), fragmentos de células muciparas, fibrilas colágenas desintegradas e destruição de vasos. Os casos fatais revelam, no exame *post mortem*, jejunitis e jejuno-ileite, ulcerações, hemorragias severas, supurações, necrose, gangrena e, mais raramente, peritonite fibrino-purulenta (Alves, 1999).

Na etiologia das gastroenterites, as infecções por *A. caninum* são responsáveis por altas taxas de morbimortalidade associadas ou não a infecções por corona e/ou parvovírus (Alves, 1999).

2.3.5. Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico das ancilostomoses é realizado pelo encontro de ovos característicos nas fezes. Entretanto, nos casos agudos de ancilostomose em filhotes,

quando a infecção ocorre no período fetal, pode-se não encontrar ovos nas fezes.

Freqüentemente o diagnóstico coproparasitológico das helmintoses em cães tem sido realizado através de métodos qualitativos de sedimentação (Hoffman, Pons & Janer, 1934), flutuação (Willis) e métodos quantitativos (Stoll & Hausheer, 1926), cujo resultado expressa o número de ovos por grama de fezes (OPG).

O diagnóstico dos ancilostomídeos pode ser feito através da morfologia do ovo. Entretanto, o diagnóstico específico só é conseguido através da morfologia das larvas L3 infectantes, obtidas de coproculturas pelo método de Moraes (1948), através do comprimento total, tipo de cutícula, cavidade bucal, comprimento do esôfago e faringe, tipo de cauda e presença de primórdio genital (Schad, 1991) ou mais facilmente, dos exemplares adultos, coletados em necrópsias. A diferenciação específica dos membros adultos da família Ancylostomidae é feita através da morfologia da cápsula bucal, bolsa copuladora e medidas dos espículos, dentre outros (Burrows, 1962).

2.4. Estudos Morfológicos e Bioquímicos

Os estudos morfológicos tradicionais, com observações e medidas de estruturas, eram os únicos meios de se fazer a classificação taxonômica dos helmintos. Com o surgimento da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de métodos bioquímicos de dosagens e separação de proteínas, em especial enzimas, estas novas metodologias foram incorporadas aos estudos taxonômicos.

Os estudos bioquímicos, sobretudo de proteínas, estão diretamente relacionadas com as expressões fenotípicas e por conseguinte genotípicas de cada espécie, permitindo separá-las ainda em subespécies ou populações variantes, de acordo com a expressão de enzimas, principalmente isoenzimas, que podem ser expressadas devido à pressão de seleção do ecossistema no qual o indivíduo está inserido. O estudo isoenzimático tem sido usado, quando os estudos morfológicos não são conclusivos, para esclarecer dúvidas da

situação taxonômica de algumas espécies (Cutillas et al., 1996).

Com relação à família Ancylostomidae, sua identificação específica pode ser feita através de estruturas características, examinando-se os parasitos adultos ou larvas de terceiro estágio, não requerendo assim, métodos mais sofisticados de diagnóstico. Em ancilostomídeos, sobretudo aqueles de importância na parasitologia humana e veterinária, os estudos bioquímicos têm sido realizados com a finalidade principal de identificar e caracterizar antígenos de interesse no diagnóstico imunológico e no desenvolvimento de vacinas profiláticas, além daqueles antígenos importantes na compreensão dos mecanismos patogênicos das larvas e adultos para seus hospedeiros (Carr & Pritchard, 1996; Pritchard, 1995; Ghosh et al., 1996; Qiang et al., 2000).

2.5. Biologia Molecular

A helmintologia molecular, bem como o conhecimento do genoma de nematóides cresceu rapidamente em anos recentes, em parte, como resultado do projeto de seqüenciamento do genoma do *Caenorhabditis elegans*, nematóide de vida livre, que se tornou um dos mais bem conhecidos genomas eucariota. O projeto não só trouxe um número enorme de informações, mas também ferramentas analíticas extremamente importantes, permitindo o desenvolvimento de métodos para estudo de outros genomas e facilitando grandemente a análise de seqüência de genes, com novos níveis de sofisticação. Para os parasitologistas que trabalham com nematóides em particular, este modelo tornou-se de enorme importância para o entendimento da biologia de parasitos (*C. elegans* sequence to biology. *Science*, 282 (5396): 1240-1945, 1988). Outros projetos genoma de helmintos estão em desenvolvimento como por exemplo os de *Brugia* sp., *Wuchereria bancrofti*, dentre outros (Blaxter & Kennedy, 2000).

Grande progresso foi, portanto, alcançado em recentes anos usando as ferramentas da biologia molecular na parasitologia veterinária. As aplicações específicas

incluem a classificação de parasitos, o diagnóstico de infecção, a compreensão da patologia e fisiologia dos parasitos, o desenvolvimento de vacinas antiparasitárias, o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias, o mecanismo de resistência a drogas antiparasitárias, a seleção de hospedeiros com resistência genética e o aperfeiçoamento de sistema de controle biológico de parasitos.

Assim, sondas para diagnóstico marcadas radioativamente ou cromogenicamente, a identificação de antígenos que conferem maior resistência produzidos pela tecnologia do DNA recombinante para produção de vacinas, maior conhecimento da relação hospedeiro-parasita e elucidação de dúvidas de origem taxonômica e evolutiva estão sendo alcançados (Prichard, 1997).

Em relação aos ancilostomídeos, há inúmeros trabalhos na área da biologia molecular abordando várias questões ligadas sobretudo à identificação específica, relações filogenéticas, resistência a antihelmínticos, biologia do desenvolvimento e imunologia. O genoma e genes de *Necator americanus* e de outros ancilostomídeos estão sendo desvendados e inúmeras informações vêm sendo obtidas sobre antígenos para vacinação, como proteínas tipo catepsina, conhecidas como ASP (Ancylostoma Secreted Protein or Ancylostoma Activation – associated Secreted Protein) uma família de proteínas associadas à lisossoma e proteínas com atividade anticoagulantes com baixo peso molecular, com importante atividade biológica na prevenção da coagulação do sangue ingerido por estes parasitos dos seus hospedeiros. Em *N. americanus* o seqüenciamento do genoma tem mostrado genes com diferentes funções na biologia do parasito, que certamente há correspondentes nos demais ancilostomídeos (Arasu, 1998; Carr & Prichard, 1996; Hawdon, 1996; Ghosh et al., 1996; Blaxter & Kennedy, 2000).

A identificação específica dos dois mais importantes ancilostomídeos do homem, o *N. americanus* e o *A. duodenale*, tem sido feita com a utilização do primeiro espaçador

transcrito interno ITS-1 do DNA ribossomal ou rDNA (Monti et al., 1998). Ainda utilizando a seqüência de ITS (ITS-2 de rDNA) Romstad et al., (1998) mostraram variabilidade em *Necator americanus* do Togo (África) e Sarawak (Malásia), concluindo que as populações das duas áreas são geneticamente distintas, mas morfologicamente semelhantes (espécies crípticas). Ainda em *N. americanus*, Gasser et al., 1998 mostram a diversidade genética neste parasito através da utilização de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) por "mutation scanning".

Todos estes estudos poderão ter implicações muito profundas na compreensão de aspectos fundamentais da biologia, eficácia de antihelmínticos, na epidemiologia, profilaxia e controle de ancilostomídeos.

2.6. A Técnica do RAPD-PCR (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)

O RAPD é usado para comparar a similaridade ou diferenças de DNA sintetizados durante a reação de PCR usando iniciadores aleatórios. Os fragmentos sintetizados são revelados em forma de bandas em géis de agarose, corados pelo brometo de etídio e expostos à luz ultra violeta (Sambrook et al., 1989) ou para obter melhor resolução e sensibilidade, pode-se usar géis de poliácridamida, corados pelo nitrato de prata (Caetano-Anolês et al., 1991; Santos et al., 1993). O polimorfismo mostrado pelas bandas obtidas com os produtos de diferentes amostras de DNA pode ser comparado. A natureza do polimorfismo gerado pelo RAPD não é inteiramente conhecida. Evidências experimentais indicam que a mudança em uma única base do genoma é suficiente para que não ocorra o anelamento com o iniciador (Williams et al., 1990).

Os produtos de RAPD fornecem numerosos fragmentos de tamanhos diferentes, os quais podem variar entre diferentes espécies. A utilização de marcadores de RAPD detecta a diversidade sobre todo o genoma, com vantagem adicional sobre as outras técnicas por sua rapidez,

reprodutibilidade, simplicidade, alta resolução e pela pequena quantidade de DNA requerido para as análises de rotina. A técnica pode ser utilizada para discriminar entre espécies, cepas e indivíduos, sem a necessidade de se conhecer previamente a sequência do DNA e de se utilizar marcadores radioativos. Através das bandas provenientes do RAPD pode-se, analisando a porcentagem de bandas compartilhadas ou não, medir a distância genética entre indivíduos.

Uma característica fundamental dos marcadores de RAPD é o fato de que eles se comportam como marcadores genéticos dominantes. Ao se observar uma banda gerada por RAPD, não é possível distinguir se aquele fragmento se originou a partir de uma ou duas cópias de sequências amplificadas. Isto significa que o genótipo de um indivíduo heterozigoto com produtos de amplificação originados de um único cromossoma, não pode ser distinguido daquele de um indivíduo homozigoto, cujos produtos de amplificação se originaram de ambos cromossomas (Williams et al., 1990). O genótipo dominante (homo ou heterozigoto) é revelado pela presença de uma banda de peso molecular específico, e o genótipo recessivo é revelado pela ausência desta mesma banda. É possível comparar, genotipicamente, pares de indivíduos analisando a porcentagem de bandas compartilhadas ou não (Apostol et al., 1993), sendo que na análise filogenética de população cada produto pode ser tratado como um carácter (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Um dos primeiros trabalhos empregando o RAPD-PCR na diferenciação de nematóides parasitos de plantas e avaliação da variabilidade genética foi realizado por Casweel-Chem et al. (1992). Os autores conseguiram, além de diferenciar as espécies de *Heterodera cruciferae* e *H. schachtii*, espécies muito próximas, e com a mesma distribuição geográfica, demonstrar também a grande variabilidade intraespecífica de *H. schachtii*. Os autores discutem ainda as vantagens do RAPD para avaliar a variabilidade genética, sua fácil

execução, reprodutibilidade, além de não requerer uso de radioisótopos.

Cenis (1993) estudando 18 populações de diferentes espécies do nematóide parasitos de plantas, *Meloidogyne* sp., por análise através de RAPD, observou que a técnica permitiu a distinção de todas as espécies e a avaliação da variabilidade genética existente entre diversas populações.

Utilizando a técnica de RAPD, Siles et al., (1997) mostraram em *Anisakis simplex* isolados de diferentes espécies de hospedeiros de uma mesma área geográfica, duas populações com alta variabilidade genética e com diferentes adaptações a diferentes hospedeiros.

Chacón et al. (1994) utilizaram RAPD para diferenciar populações pertencentes a diferentes grupos de nematóides de difícil diagnóstico *Trichinella* spp. (parasitos de mamíferos), *Meloidogyne* spp., *Globodera* spp. e *Heterodera* spp. (parasitos de plantas). Utilizando apenas um iniciador (M-13-40 forward) o autor identificou espécies e cepas de nematóides dentro destes gêneros, e em relação a *Trichinella*, este iniciador distinguiu quatro diferentes padrões polimórficos.

Jacquet et al. (1995), através de estudos biológicos, ecológicos, morfológicos e de variabilidade genética de três espécies de *Haemonchus*, *H. contortus*, *H. placei* e *H. longistipes*, da mesma origem geográfica (Mauritânia), discriminaram, através da análise dos produtos do RAPD, as três espécies, além de mostrarem uma menor similaridade entre o *H. placei* e *H. contortus*. Observaram maior variabilidade intraespecífica em *H. contortus*, em relação as outras duas espécies estudadas.

A existência de espécies na família Trichostrongilidae, com pequenas diferenças morfológicas, parasitando diferentes hospedeiros, que leva a algumas confusões sistemáticas, estimulou os estudos de Humbert & Cabaret (1995) que testaram a praticabilidade do método de RAPD na identificação de espécies e análise filogenética de alguns nematóides dessa família. Os autores utilizaram larvas

(L₃) e vermes adultos machos obtidos de animais natural ou experimentalmente infectados, como as espécies *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus*, *Spiculopteragia bochmi*, *Cooperia oncophora*, *Ostertagia leptospicularis*, *Trichostrongylus vitrinus*, *T. columbriformis* e *Ashworthius gagarini*. Seus resultados demonstraram ser possível usar o RAPD para identificação destes nematóides. Entretanto, as distâncias genéticas observadas com os iniciadores utilizados não permitiram construir árvores filogenéticas para as espécies pertencentes aos diferentes gêneros dentro da família.

Rodríguez et al. (1996), através do RAPD, enfatizam a especificidade, sensibilidade e simplicidade desta técnica no diagnóstico ou identificação de espécies de *Trichinella* spp.

Joachim et al. (1997), usando RAPD-PCR para definir marcadores genéticos, conseguiram separar espécies, cepas e grupos de cepas empregando larvas de *Oesophagostomum* spp. parasito de suíno, inclusive cepas resistentes e susceptíveis a antihelmínticos.

A despeito da simplicidade e da informação de alto valor fornecida pelo RAPD-PCR na identificação, estudos de variabilidade genética intra e inter específica de helmintos nematóides, poucos trabalhos com ancilostomídeos de interesse em medicina humana e veterinária têm sido realizados, utilizando esta técnica. Os estudos com *Ancylostomídeos* têm se concentrado principalmente na identificação e diferenciação específicas utilizando vários estádios do ciclo de vida destes helmintos, adultos, ovos e larvas.

Hawdon et al. (1996) usando RFLP-PCR, foi capaz de diferenciar com alta especificidade ancilostomídeos humanos *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* a partir de ovos e larvas, diferenciando ainda entre infecções puras ou mistas.

Mieszczanek & Wedrychowicz (1999), através da PCR com DNA extraído de ovos de dois ancilostomídeos de cães *Ancylostoma caninum* e *Uncinaria stenocephala*, conseguiram diferenciar estas

duas espécies. Os autores usaram como iniciadores cDNA específico para a cisteína proteinase de *A. caninum*, o que resultou em alta sensibilidade, sendo o método indicado para diagnóstico de rotina de infecções de ancilostomídeos dos cães.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar a variabilidade genética de populações naturais de *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) parasitos de *Canis familiaris* procedentes de diferentes áreas geográficas do estado de Minas Gerais e Espírito Santo.

3.2. Objetivos Específicos

Utilizar a técnica do RAPD como um marcador molecular no estudo de variabilidade genética de *Ancylostoma caninum*.

Identificar diferenças intra e inter populacionais de *Ancylostoma caninum* procedentes de diferentes áreas geográficas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos *Ancylostoma caninum*

4.1.1. Procedência dos Cães para Obtenção de Adultos de *Ancylostoma caninum*

Dos 34 cães machos e fêmeas, sem raça definida e com idade variando entre 6 a 24 meses, utilizados no presente estudo, eram procedentes de cinco municípios, quatro do Estado de Minas Gerais: Belo Horizonte, Formiga, Poços de Caldas e Três Corações, e um do Estado do Espírito Santo, Vitória.

Os cães foram capturados pelos Centros de Zoonoses das Secretarias Municipais de Saúde das Prefeituras dessas cidades.

Os cães procedentes de Belo Horizonte e Formiga foram necropsiados no Laboratório de Helmintologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Aqueles procedentes de

Poços de Caldas e Três Corações foram necropsiados no Departamento de Patologia e Parasitologia da Universidade de Alfenas, Alfenas (MG), enquanto os animais procedentes de Vitória foram necropsiados no Centro de Zoonose da Prefeitura Municipal de Vitória (ES).

4.1.2. Identificação dos *Ancylostoma caninum*

Os animais foram anestesiados com tionembutal (25mg/Kg/pv) e sacrificados com solução de cloreto de potássio 10% (5mL/animal) intra venosa. A técnica de necrópsia seguiu os protocolos padrões do Departamento de Parasitologia para coleta de helmintos intestinais, brevemente descritas a seguir. Na necrópsia, os animais tiveram o intestino delgado removido e aberto em solução salina 0,85%, as mucosas foram raspadas para promover o desprendimento dos vermes adultos ali fixados e os sedimentos lavados em tamis de malha de 0,25 mm. Em seguida, os sedimentos foram transferidos com jatos de água para um pirex de vidro transparente, de onde os ancilostomídeos foram coletados, identificados a vista desarmada e transferidos para placas de Petri com solução salina 0,85%. A placa foi examinada ao microscópio estereoscópico e os exemplares machos, foram lavados em salina 0,85% e identificados ao microscópio óptico, sem uso de fixadores e/ou diafanizadores. Além da visualização de estruturas características do *A. caninum*

utilizados na identificação específica, proposta por Burrows, (1962), como cápsula bucal com três pares de dentes e bolsa copuladora, foram realizadas também medidas do comprimento total, amplitude da cavidade bucal, da bolsa copuladora e espículos, para identificação desta espécie.

Os espécimes machos selecionados foram lavados três vezes em salina 0,85% e colocados em placas de Petri contendo meio de RPMI (SIGMA-1640) em quantidade suficiente para cobri-los. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 48 horas, com uma troca de meio de cultura, para limpeza da cavidade bucal e tubo digestivo. Após este período, os espécimes foram examinados ao microscópio estereoscópico para observar se a cavidade bucal e tubo digestivo se mostravam limpos, sem conteúdo aparente.

Em um experimento piloto para avaliar a sobrevivência dos *A. caninum*, fêmeas adultas coletadas nas necrópsias, após lavadas em solução de salina 0,85%, foram colocadas em meio RPMI e mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, com trocas diárias de meio. Observou-se que as fêmeas sobreviviam por até sete dias, e durante este período realizavam postura de ovos de onde emergiram larvas de 1º estágio.

O Quadro 2 mostra a origem e a data da coleta dos exemplares utilizados no presente trabalho.

Quadro 2. Origem geográfica dos *Ancylostoma caninum* utilizados no presente estudo

ESPÉCIE	ORIGEM GEOGRÁFICA	CÓDIGO DE REFERÊNCIA
<i>Ancylostoma caninum</i>	Belo Horizonte - MG	CAN/BR/99/BH01
<i>Ancylostoma caninum</i>	Belo Horizonte - MG	CAN/BR/99/BH02
<i>Ancylostoma caninum</i>	Belo Horizonte - MG	CAN/ BR/99 /BH03
<i>Ancylostoma caninum</i>	Belo Horizonte - MG	CAN/BR/99/BH04
<i>Ancylostoma caninum</i>	Poços de Caldas - MG	CAN/BR/99/PC01
<i>Ancylostoma caninum</i>	Poços de Caldas - MG	CAN/BR/99/PC02
<i>Ancylostoma caninum</i>	Poços de Caldas - MG	CAN/BR/99/PC03
<i>Ancylostoma caninum</i>	Poços de Caldas - MG	CAN/BR/99/PC04
<i>Ancylostoma caninum</i>	Três Corações - MG	CAN/BR/99/TC01
<i>Ancylostoma caninum</i>	Três Corações - MG	CAN/BR/99/TC02
<i>Ancylostoma caninum</i>	Formiga - MG	CAN/BR/00/Fo01
<i>Ancylostoma caninum</i>	Vitória - ES	CAN/BR/00/Vt01
<i>Ancylostoma caninum</i>	Vitória - ES	CAN/ BR/00/Vt02
<i>Ancylostoma caninum</i>	Vitória - ES	CAN/BR/00/Vt03
<i>Ancylostoma caninum</i>	Vitória - ES	CAN/BR/00/Vt04

Os machos e fêmeas, não utilizados neste estudo, após identificados e lavados em salina 0,85%, foram fixados em álcool 70%, AFA, Formol 10% a 60°C e arquivados no Laboratório de Helminologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG para estudos posteriores.

4.2. Obtenção do DNA Genômico dos *Ancylostoma caninum*

4.2.1. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada segundo a metodologia proposta por Humbert & Cabaret (1995), com pequenas modificações propostas por Silva, 1999.

Os parasitos, em número de dez machos, escolhidos aleatoriamente de cada necrópsia entre aqueles colocados em meio de RPMI-1640, foram retirados do meio e lavados três vezes em PBS (Solução de Salina Tamponada) estéril pH 7,2. Após este procedimento, os helmintos foram transferidos em número de um exemplar

para tubos Eppendorf estéreis, triturados com pistilos de vidro, previamente moldados para os tubos Eppendorf, em 37,5µl de solução de lise (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, 50mM EDTA pH 8,0, 1% SDS), acrescida de 75 µl de solução aquosa de proteinase K (20 mg/mL) (GIBCO-BRL). O volume final foi completado, com solução de lise para 150µl, os tubos foram homogeneizados em agitador mecânico e incubados em banho-maria a 40°C durante a noite.

As extrações dos DNAs foram realizadas com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1). Após homogeneizados por dez minutos, os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 4.000 rpm a 4°C, a fase aquosa foi retirada e transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com duas vezes o volume do sobrenadante com etanol 95% gelado. Após a homogeneização, os tubos foram colocados na geladeira por 15 minutos, em seguida o DNA foi centrifugado por dez minutos a 10.000 rpm. Logo após este

procedimento, o sobrenadante foi desprezado por inversão e os tubos permaneceram invertidos sobre papel absorvente até completa secagem do sedimento. O precipitado obtido nesta etapa foi ressuspensionado em metade do volume inicial, utilizado na extração, em solução aquosa de ribonuclease (80 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8,0) contendo 50 mM/mL de Ribonuclease A (GIBCO-BRL) e incubado a 37°C por duas horas. Nova extração usando-se fenol e clorofórmio foi realizada e as amostras, precipitadas com etanol, foram deixadas a -20°C até o dia seguinte. O DNA obtido foi ressuspensionado em 10 µl de água destilada e deionizada e conservado em geladeira até o momento de uso.

4.2.2. Quantificação do DNA

O DNA foi quantificado por eletroforese em gel de agarose (GIBCO-BRL B97) a 1%, e corado pelo brometo de etídio (150 mL de TBE, 1,2 g Agarose, 10 µl brometo de etídio 0,5 µl/mL). Para quantificação foram utilizados 2 µl de cada amostra, aos quais foram adicionados 8 µl de tampão da amostra 2X (TBE 5X, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol, 0,25%, Ficcoll 400 a 25%), Sambrook *et al.* (1989).

A concentração de DNA de cada amostra foi estimada pela comparação visual das bandas do DNA dos ancilostomídeos com as bandas de seis diferentes concentrações (15ng, 31ng, 63ng, 125ng, 250ng e 500ng) de um padrão de DNA do fago λ (DNA Quantification Standards Phage λ DNA – GIBCO-BRL). Este procedimento permitiu ainda observar a integridade do DNA purificado.

O DNA foi visualizado no gel sob luz ultra violeta e fotografado com filme polaroid 600 plus para comparação visual com os padrões de DNA, onde a intensidade das bandas está relacionada com a quantidade de DNA da amostra.

4.3. Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD)

Na amplificação foram utilizados DNAs extraídos de apenas um exemplar de cada

necrópsia, aleatoriamente selecionado entre aqueles obtidos dos vários espécimes machos utilizados. O processo de amplificação foi o mesmo descrito por Gomes *et al.* (1995).

4.3.1. Padronização da Reação de RAPD-PCR

As condições de amplificação do DNA genômico dos *A. caninum* foram padronizadas em relação à concentração de DNA. Para padronização da concentração ideal a ser utilizada nas reações de amplificação foram testadas três diferentes concentrações, 1ng, 2ng e 5ng de DNA por reação.

O iniciador utilizado foi o G06 (Tab. 1) na concentração de 6,4pmoles/mL e o protocolo de amplificação foi aquele no item 4.3.3.

Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida como descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.2. A concentração de DNA utilizada nas amplificações foi escolhida a partir da visualização dos produtos amplificados.

As amostras de DNA foram diluídas em água miliQ autoclavada. Todas as medidas sabidamente recomendadas para evitar contaminações nas reações de PCR foram previamente tomadas (Kwork & Higushi, 1989).

4.3.2. Seleção dos Iniciadores para a Reação de RAPD-PCR

Foram testados oito iniciadores aleatórios, sintetizados pela OPERON TECHNOLOGIES (Alameda, CA – USA) com exceção do iniciador M13-40 forward que foi sintetizado pela GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD – USA). A Tabela 1 mostra a sequência e algumas características dos iniciadores utilizados.

4.3.3. Reação de RAPD-PCR

Para obtenção do padrão de RAPD, reações de amplificação foram realizadas com volume final de 10 µl contendo 10mM Tris-HCl pH 8,5, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 200mM de dNTP, 6,4 pmoles do iniciador (GO6, G11, G15, G18, M13-40 Forward, L15996, Reverse 2 e QG1), 0,8 unidades de

Taq DNA Polimerase (Centro de Biotecnologia – CENBIOT, RS, Brasil) junto com 1µl de DNA (1 ng/µL). Os controles negativos receberam todos os componentes acima nas devidas proporções, necessários à reação, com exceção do DNA. A mistura foi coberta com uma gota de óleo mineral (10 µl).

Tabela 1. Iniciadores utilizados nos experimentos de RAPD-PCR

INICIADOR	SEQUÊNCIA	Nº DE NUCLEOTIDEOS	%G C	REFERÊNCIA
GO6	5'GTG CCT AAC C 3'	10	60%	HUMBERT & CABARET (1995)
G11	5'TGC CCG TCG T 3'	10	70%	HUMBERT & CABARET (1995)
G15	5'ACT GGG ACT C 3'	10	60%	HUMBERT & CABARET (1995)
G18	5'GGC TCA TCT C 3'	10	60%	HUMBERT & CABARET (1995)
M13-40 Forward	5'GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'	17	52%	HU et al. (1982)
Reverse 2	5'CAG TAT TCA GGG CGT CAA GC 3'	20	55%	BARTA et al. (1997)
L15996	5'CTC CAC CAT TAG CAC CCA AAG C 3'	22	54%	DIRIENZO et al. (1991)
QG1	5'CCA TTA GCA CCC AAA GCA GAC CTC ACC CTG TGG AGC 3'	36	58%	

Tabela 2. Componentes da RAPD-PCR por tubo de reação

COMPONENTES	QUANTIDADE
Tampão	1,0 µL (50mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ e 10 mM Tris HCl pH 8,5)
Deoxinucleotideos Trifosfatos (dNTPs)	0,5 µL (2,5 mM de cada (dCTP, dATP, dGTP, dTTP))
Iniciadores	1,0 µL (6,4 pmoles)
Taq DNA Polimerase	0,4 µL (0,2 unidade/µL)
DNA	1 ng/µL
Volume final	10 µL
Óleo mineral estéril	10 µL

O procedimento para amplificação foi aquele descrito por Gomes et al., 1995, para *Leishmania* (LRAPD). Os ciclos de amplificação consistiram de um passo inicial de desnaturação a 95°C por cinco minutos, dois ciclos de anelamento a 30°C por dois minutos, extensão a 72°C por um minuto e desnaturação a 95°C por 30 segundos, num total de 33 ciclos, quando a temperatura de anelamento foi aumentada para 40°C. No ciclo final, a etapa de extensão foi estendida para 5 minutos. Para as reações de amplificação foi utilizado um termociclador M.J. Research PTC-100.

4.5 Análise dos Produtos Amplificados

4.5.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Corado pela Prata

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% não desnaturante em TBE (89mM TRIS-BORATO, 2mM EDTA pH 8.0) por aproximadamente 4 horas ou até que o corante xileno-cianol tivesse percorrido 9 cm. O marcador, de peso molecular conhecido, utilizado foi o 1Kb DNA Ladder (PROMEGA), com fragmentos variando entre 250 pb a 2036 pb. Foram aplicados 10 µL de cada amostra (3 µL do produto amplificado em 7 µL de tampão da amostra 2X) por canaleta do gel, ao qual foi submetido uma tensão de 100 volts.

4.5.2. Revelação do Gel de Poliacrilamida

Após a eletroforese, os fragmentos amplificados foram visualizados por coloração pelo nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Santos et al., 1993. O gel foi fixado à temperatura ambiente em solução fixadora (etanol absoluto 10% e ácido acético 0,5%) por 5 minutos e corado em solução de nitrato de prata 0,17% (nitrato de prata e solução fixadora) por 10 minutos. Em seguida, o gel foi lavado em água destilada para retirada do excesso de prata e revelado em solução de NaOH 3% (p/v) e 0,3 de formaldeído 37% (v/v) por aproximadamente 10 minutos ou até o aparecimento das bandas.

A revelação foi interrompida com solução de fixação e os géis fotografados com filme Kodak 35 mm – 50 ISO/18 DIN sob luz branca, utilizando-se filtro azul e câmara NIKON FM2. Os negativos foram revelados em papel fotográfico KODAK 18 x 24 cm para posterior análise das bandas. As revelações e ampliações foram realizadas com produtos Kodak, contendo misturas reveladoras adequadas.

4.6. Análises dos Dados e Construção dos Fenogramas

As fotografias dos géis foram analisadas visualmente, sendo os padrões de bandas inseridos manualmente no computador.

O programa DNA-POP (Pena & Nunes, 1990), foi usado para calcular a proporção de bandas compartilhadas entre diferentes espécimes. Este programa usa como princípio básico a divisão vertical do gel em níveis de mobilidade. Um nível é definido pela presença de, pelo menos, uma banda em qualquer uma das canaletas do gel. O gel é analisado do topo ao final e quando uma banda é encontrada, definindo assim um nível, o número da canaleta onde ela se encontra, bem como o número de outras canaletas contendo bandas exatamente no mesmo nível são colocados no programa. Depois de computar todas as bandas, de acordo com o número da canaleta onde se encontram e o nível de mobilidade, o programa calcula a proporção de bandas compartilhadas entre n amostras corridas no mesmo gel em $n(n-1)/2$ comparações de pares baseando-se em $S=2 \sum n_{xy}(n_x+n_y)$ onde n_x e n_y são o número de bandas compartilhadas nas amostras x e y e n_{xy} é o número de bandas compartilhadas entre as amostras x e y . O número total de bandas e a proporção de bandas compartilhadas para cada par e, no final para todos os pares são calculados pelo programa.

Os dados obtidos pelo programa DNA-POP foram utilizados para construir tabelas de comparação do número de bandas compartilhadas entre os espécimes de *A. caninum* de diferentes localidades.

Os valores foram comparados e testados estatisticamente utilizando-se o teste *t* de Student para determinar diferenças significativas, ao nível de significância de 95%.

A proporção de bandas compartilhadas ou coeficiente de similaridade (S) foi transformado em coeficiente de dissimilaridade (D) a partir de $D=1-S$. Os valores D foram usados como medida da distância genética para construção de árvores fenéticas ou fenogramas pelo método da Média Aritmética não Ponderada ou UPGMA - Método de Agrupamento aos Pares Utilizando Médias Aritméticas (Sneath & Sokal, 1973).

No UPGMA, as medidas das distâncias genéticas (D) são computadas para todos os pares de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) e os valores obtidos são dispostos em uma matriz triangular semelhante a que se segue:

Onde D_{ij} é a distância de duas OTUs "i" e "j".

OTU	1	2	3
2	D_{12}		
3	D_{13}	D_{23}	
4	D_{14}	D_{24}	D_{34}

O agrupamento das OTUs inicia-se a partir das duas OTUs que apresentam menor valor de distância. Estas duas OTUs, agrupadas com o ponto ramificação localizado na distância $D_{ij}/2$, são combinadas como se fossem uma única OTU. Novas distâncias são calculadas entre a nova OTU combinada e as demais usando a média aritmética de distância. Novamente as duas OTUs com menor distância são agrupadas e o processo continua, até que todas as OTUs tenham sido adicionadas, sendo assim construída a árvore fenética, a partir da relação matemática entre os valores das distâncias calculadas.

Todo processo de agrupamento e construção de árvore final através da UPGMA foi realizado pelo software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

versão 1.01 desenvolvido por Kumar et al., 1993.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção dos *Ancylostoma caninum*

Os 34 cães do presente estudo, sem raça definida e de ambos os sexos, com idades variando de 6 a 24 meses, apresentavam-se às necrópsias poliparasitados, sendo os helmintos encontrados: *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Dipylidium caninum*, *Toxocara canis* e *Trichuris vulpis*.

Os animais com idade de até 18 meses encontravam-se com maior número de parasitos, principalmente *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Dipylidium caninum* e *Toxocara canis*.

Dos 34 animais necropsiados, 27 (79%) encontravam-se parasitados por *A. caninum* e 20 (59%) por *Ancylostoma braziliense*. Estes ancilostomídeos foram identificados inicialmente ao nível de gênero e depois os machos ao nível de espécie. Os machos de *A. caninum* foram examinados ao microscópio óptico e as medidas dos exemplares examinados encontravam-se dentro da variação proposta por Burrows (1962).

5.2. Extração e Quantificação do DNA dos *Ancylostoma caninum*

O DNA genômico foi extraído de 10 exemplares machos, aleatoriamente escolhidos, segundo a técnica descrita em material e métodos.

O DNA foi extraído de um espécime individualmente. A quantificação dos DNAs mostrou que cada exemplar forneceu DNA em quantidade que variou de 20ng a 450ng, suficiente para realizar as reações de RAPD com apenas um indivíduo empregando os iniciadores selecionados. A Figura 2 mostra o resultado da dosagem, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, do DNA dos espécimes de *A. caninum* utilizados nas reações de RAPD.

5.3. Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD)

5.3.1. Padronização da Amplificação pela Técnica de RAPD

Os resultados da quantificação do DNA, utilizando o iniciador G06, permitiu a otimização da RAPD-PCR em relação a concentrações de DNA. Das três concentrações, 1ng, 2ng e 5ng testadas, a de 1ng mostrou melhor resultado na amplificação com o iniciador G06, o qual foi reprodutível, sendo então esta concentração utilizada com todos os iniciadores (Fig. 3).

5.3.2. Seleção dos Iniciadores para a Reação de RAPD-PCR

Dos oito iniciadores testados (Tab. 1), cinco foram selecionados para as reações de RAPD-PCR, sendo eles G06, G11, G15, G18 e M13-40 forward, por apresentarem perfis com maior número de bandas, boa definição e reprodutibilidade. A partir da escolha dos iniciadores, foram realizadas as reações de RAPD-PCR.

5.3.3. Perfis de RAPD-PCR com os Iniciadores Selecionados

As Figuras 4, 5, 6, 7 e 8 mostram os perfis de RAPDs com os iniciadores G06, G11,

G15, G18 e M13-40 forward, respectivamente. Foi usado como controle positivo DNA de *Leishmania braziliensis* (Dados não mostrados).

Os controles negativos ou não resultaram em amplificação de fragmentos ou bandas ou quando presentes estas bandas foram muito fracas e sem homologia com os produtos da amplificação dos DNAs dos espécimes analisados.

A média do número de bandas visualizadas nos géis, com todos iniciadores utilizados, foi de $56,2 \pm 14,3$ (SD), variando de 37 a 76.

A média de bandas compartilhadas entre todos os *A. caninum* foi de $27,4 \pm 14,2$ (Média $\pm$ desvio padrão) com mínimo de 37 e máximo de 76 bandas entre 250 pb a 2036 pb. A proporção de bandas compartilhadas entre quaisquer dois *A. caninum* foi de 78%, variando de 74% a 86% e a média de bandas por linha com os mesmos iniciadores foi de $34,4 \pm 15,2$ (SD), variando de $19,3 \pm 1,7$ (SD) a $59,6 \pm 5,2$ (SD) (Tab. 3). Não foram observados padrões idênticos de bandas entre os *A. caninum* estudados.

Tabela 3. Número de bandas, média e proporção de bandas compartilhadas e média de bandas por linha entre *Ancylostoma caninum* obtidos pela metodologia do RAPD, com 5 iniciadores utilizados

Iniciadores	Número de Bandas	Média Bandas Compartilhadas	Proporção de Bandas Compartilhadas	Média de Bandas por Linha
G - 06	37	$14,8 \pm 1,7$ (SD)	77 %	$19,3 \pm 1,7$ (SD)
G - 11	50	$20,4 \pm 2,0$ (SD)	74 %	$27,5 \pm 1,9$ (SD)
G - 15	76	$51,4 \pm 5,8$ (SD)	86 %	$59,6 \pm 5,2$ (SD)
G - 18	59	$23,0 \pm 2,4$ (SD)	75 %	$30,6 \pm 2,2$ (SD)
M - 13	59	$27,6 \pm 4,3$ (SD)	79 %	$35,1 \pm 5,2$ (SD)
MÉDIA	$56,2 \pm 14,3$ (SD)	$27,4 \pm 14,2$ (SD)	78 %	$34,4 \pm 15,2$ (SD)

O padrão de bandas obtido com os iniciadores, G-06, G11, G15, G18 e M13-40 forward mostraram que cada exemplar de *A. caninum* apresenta um perfil característico, composto por várias bandas polimórficas e algumas bandas monomórficas. Com o iniciador G-06 (Fig. 4), a média de bandas compartilhadas entre todos os exemplares foi de $14,8 \pm 1,7$ (Média $\pm$ desvio padrão) com nenhuma banda compartilhada e o máximo de 35 bandas entre 250 pb e 2036 pb. A proporção de bandas compartilhadas entre quaisquer dois exemplares foi de 77%, variando de 65% a 100% (Tab. 3).

Com o iniciador G-11 (Fig. 5) a média de bandas compartilhadas entre todos os exemplares foi de $20,4 \pm 2,0$ (Média $\pm$ desvio padrão) com mínimo de 5 e o máximo de 40 bandas entre 250 pb e 2036 pb. A proporção de bandas compartilhadas entre quaisquer dois exemplares foi de 74%, variando de 60% a 95% (Tab. 3).

Com o iniciador G-15 (Fig. 6) a média de bandas compartilhadas entre todos os exemplares foi de $51,4 \pm 5,8$ (Média $\pm$ desvio padrão) com mínimo de 2 e o máximo de 29 bandas entre 250 pb e 2036

pb. A proporção de bandas compartilhadas entre quaisquer dois exemplares foi de 86%, variando de 71% a 98% (Tab. 3).

Com o iniciador G-18 (Fig. 7) a média de bandas compartilhadas entre todos os exemplares foi de $23,0 \pm 2,4$ (Média $\pm$ desvio padrão) com mínimo de 6 e o máximo de 36 bandas entre 250 pb e 2036 pb. A proporção de bandas compartilhadas entre quaisquer dois exemplares foi de 75%, variando de 64% a 94% (Tab. 3).

Com o iniciador M13-40 forward (Fig. 8) a média de bandas compartilhadas entre todos os exemplares foi de $27,6 \pm 4,3$ (Média $\pm$ desvio padrão) com mínimo de 10 e o máximo de 34 bandas entre 250 pb e 2036 pb. A proporção de bandas compartilhadas entre quaisquer dois exemplares foi de 79%, variando de 66% a 90% (Tab. 3).

A análise dos perfis de RAPD de acordo com a procedência, regiões, metropolitana de Belo Horizonte, Sul de Minas Gerais e metropolitana de Vitória (ES), é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Bandas compartilhadas entre *Ancylostoma caninum* de acordo com a procedência, obtidas pelo RAPD com 5 iniciadores utilizados

MÉDIA DE BANDAS COMPARTILHADAS ± DESVIO PADRÃO						
Procedência	Iniciadores					Média
	G06	G11	G15	G18	M13	
Belo Horizonte	24,2 ± 3,8	24,8 ± 2,5	17,7 ± 1,8	21,8 ± 3,2	18,2 ± 4,0	21,3 ± 3,3
Sul de Minas	21.5 ± 3,6	23,8 ± 2,0	9,4 ± 2,3	20,1 ± 4,4	15,5 ± 1,6	18,1 ± 5,7
Vitória – ES	13.7 ± 5,2	11,7 ± 3,0	8,2 ± 0,6	23,7 ± 4,4	17,7 ± 1,8	15,0 ± 6,0
Média Ponderada	20,0 ± 4,2	20,6 ± 5,7	11,4 ± 4,0	21,6 ± 1,5	16,9 ± 1,2	18,1 ± 2,4

A média de bandas compartilhadas entre *A. caninum* da região metropolitana de Belo Horizonte foi de $21,3 \pm 3,3$ (Média $\pm$ desvio padrão), do Sul de Minas Gerais de $18,1 \pm 5,7$ (Média $\pm$ desvio padrão) e da região metropolitana de Vitória (ES) de $15,0 \pm 6,0$ (Média $\pm$ desvio padrão).

A análise dos RAPDs dos *A. caninum* das regiões metropolitana de Belo Horizonte (MG), Sul de Minas Gerais (Poços de Caldas e Três Corações) e metropolitana de Vitória (ES), com os diferentes iniciadores, mostrou que com o iniciador G06, a média de bandas compartilhadas foi de $24,2 \pm 3,8$ (Média $\pm$ desvio padrão), $21,5 \pm 3,6$ (Média $\pm$ desvio padrão) e $13,7 \pm 5,2$ (Média $\pm$ desvio padrão). Com o iniciador G11 a média de bandas compartilhadas foi de $24,8 \pm 2,5$ (Média $\pm$ desvio padrão), $23,8 \pm 2,0$ (Média $\pm$ desvio padrão) e $11,7 \pm 3,0$ (Média $\pm$ desvio padrão). Com o iniciador G15, a média de bandas compartilhadas foi de $17,7 \pm 1,8$ (Média $\pm$ desvio padrão), $9,4 \pm 2,3$ (Média $\pm$ desvio padrão) e $8,2 \pm 0,6$ (Média $\pm$ desvio padrão). Com o iniciador G18 a média de bandas compartilhadas foi de $21,8 \pm 3,2$ (Média $\pm$ desvio padrão), $20,1 \pm 4,4$ (Média $\pm$ desvio padrão) e $23,7 \pm 4,4$ (Média $\pm$ desvio padrão). Com o iniciador M13-40

forward, a média de bandas compartilhadas foi de $18,2 \pm 4,0$ (Média $\pm$ desvio padrão), $15,5 \pm 1,6$ (Média $\pm$ desvio padrão) e $17,7 \pm 1,8$ (Média $\pm$ desvio padrão).

Comparando as médias de bandas compartilhadas entre os *A. caninum* das regiões metropolitana de Belo Horizonte, Sul de Minas e região metropolitana de Vitória (ES), pelo teste t de Student com os diferentes iniciadores, observamos diferenças significativas com os iniciadores G06 e G11 entre os agrupamentos de Belo Horizonte e Sul de Minas, com aquele de Vitória (ES).

Com o iniciador G15 foram observadas diferenças significativas entre os agrupamentos de Belo Horizonte com aqueles do Sul de Minas e Vitória (ES), os quais não apresentaram diferenças significativas entre si. Com os iniciadores G18 e M13-40 forward não observamos diferenças significativas entre os agrupamentos.

O fenograma construído pelo programa MEGA a partir da média dos valores D obtidos nos RAPDs, com os cinco iniciadores utilizados (G06, G11, G15 e G18) é mostrado na Figura 9.

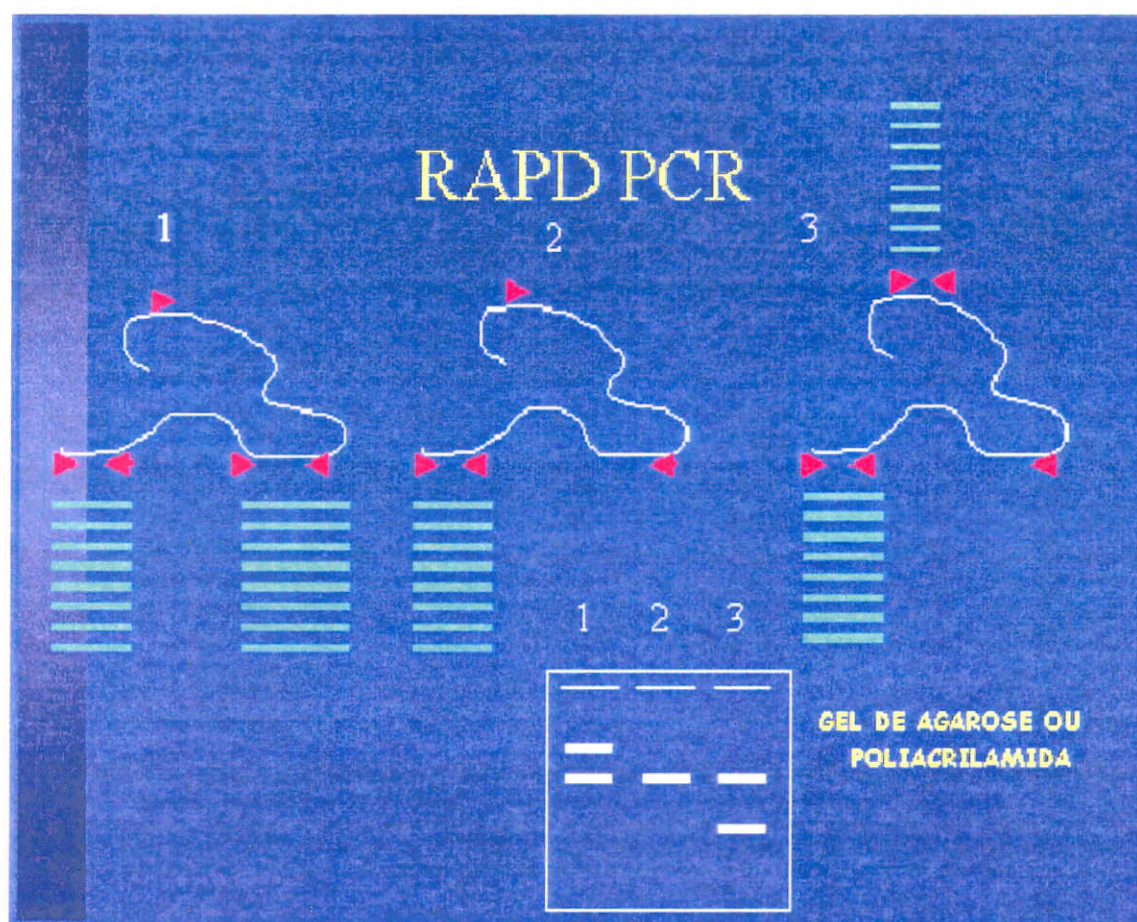


Figura 1. Esquema representativo da técnica de RAPD-PCR.

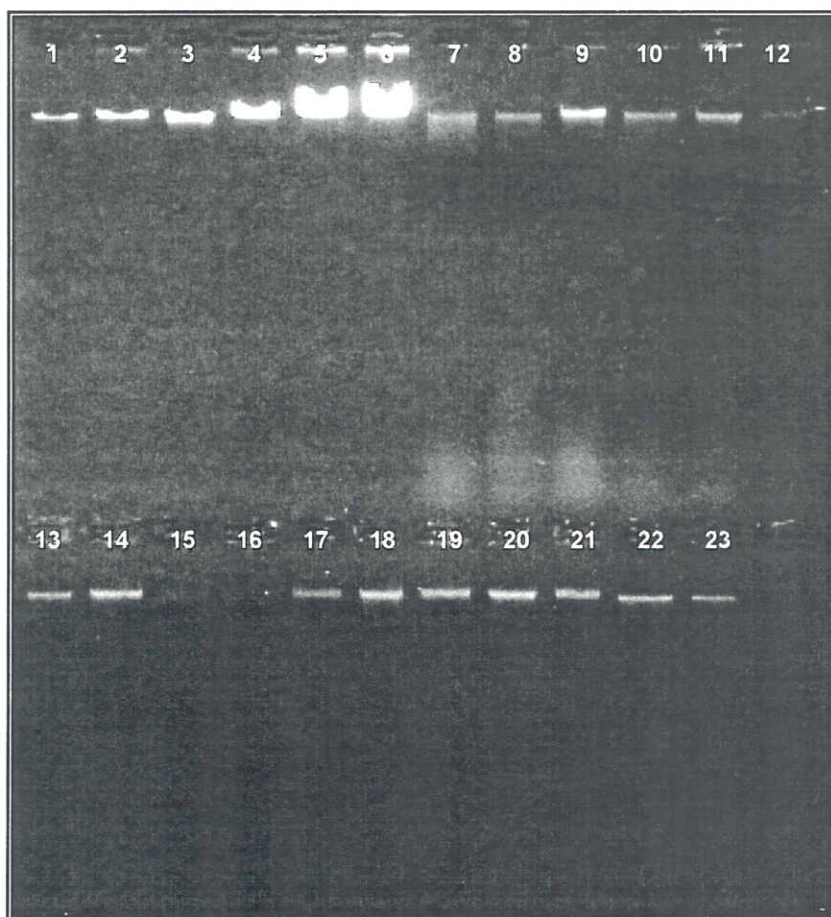


Figura 2. Dosagem de DNA de espécimes de *Ancylostoma caninum* em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Canaletas 1 - 6: DNA do fago λ (DNA Quantification Standards Phage λ DNA Gibco-BRL em concentrações de 15ng, 31ng, 63ng, 125ng, 250ng e 500ng, respectivamente. Canaletas 7-23: *Ancylostoma caninum* de *Canis familiaris* de diferentes localidades.

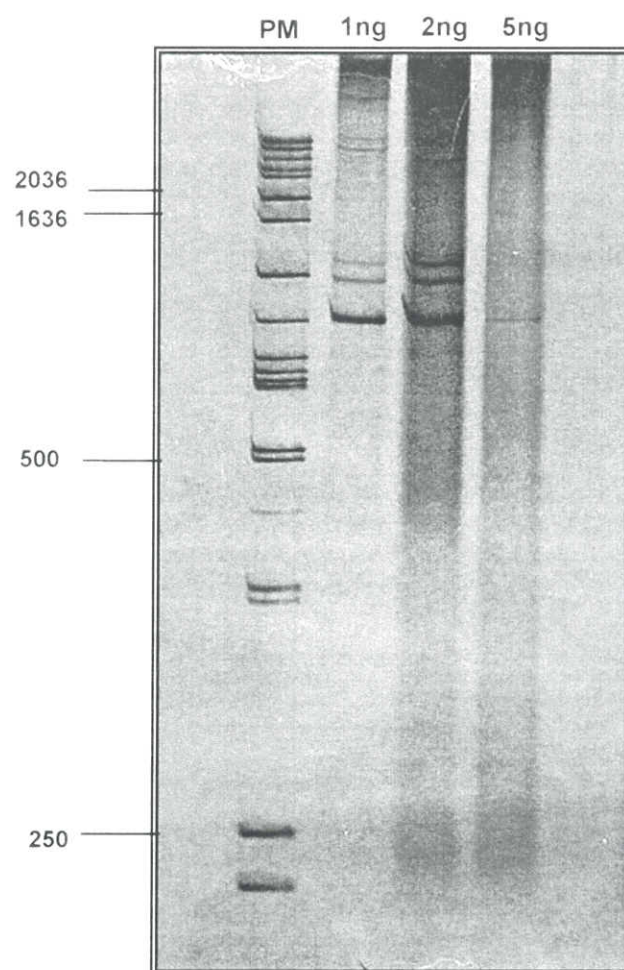


Figura 3. Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida com iniciador G06 de *Ancylostoma caninum* com diferentes concentrações de DNA (1ng, 2ng e 5ng). PM = Peso molecular 1 Kb (PROMEGA)

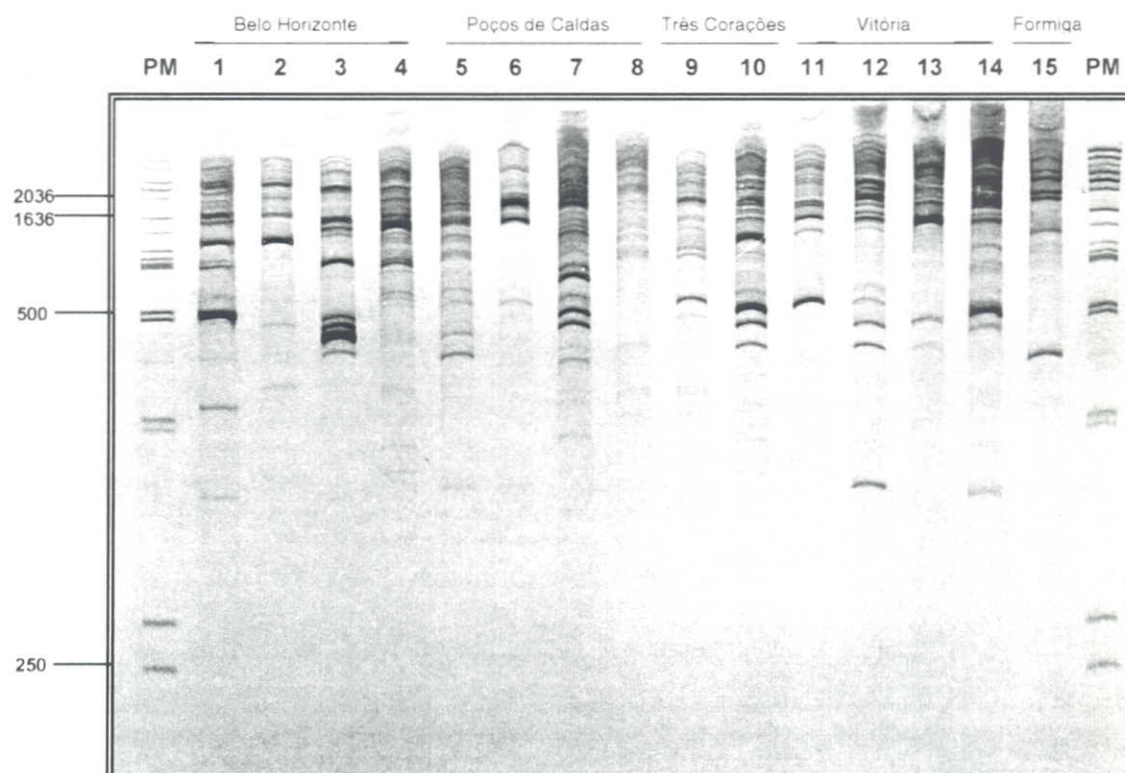


Figura 4. Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, com o iniciador G06, de *Ancylostoma caninum* de diferentes localidades. Canaletas: PM = Marcador de peso molecular 1 Kb (PROMEGA), 1-4 = Belo Horizonte - MG (CAN/BR/99/BH01, CAN/BR/99/BH02, CAN/BR/99/BH03, CAN/BR/99/BH04); 5 - 8 = Poços de Caldas - MG (CAN/BR/99/PC01, CAN/BR/99/PC02, CAN/BR/99/PC03, CAN/BR/99/PC04); 9 - 10 = Três Corações - MG (CAN/BR/99/TC01, CAN/BR/99/TC02), 11 - 14 = Vitória - ES (CAN/BR/00/Vt01, CAN/BR/00/Vt02, CAN/BR/00/Vt03, CAN/BR/00/Vt04) e 15 = Formiga - MG (CAN/BR/00/Fo01).

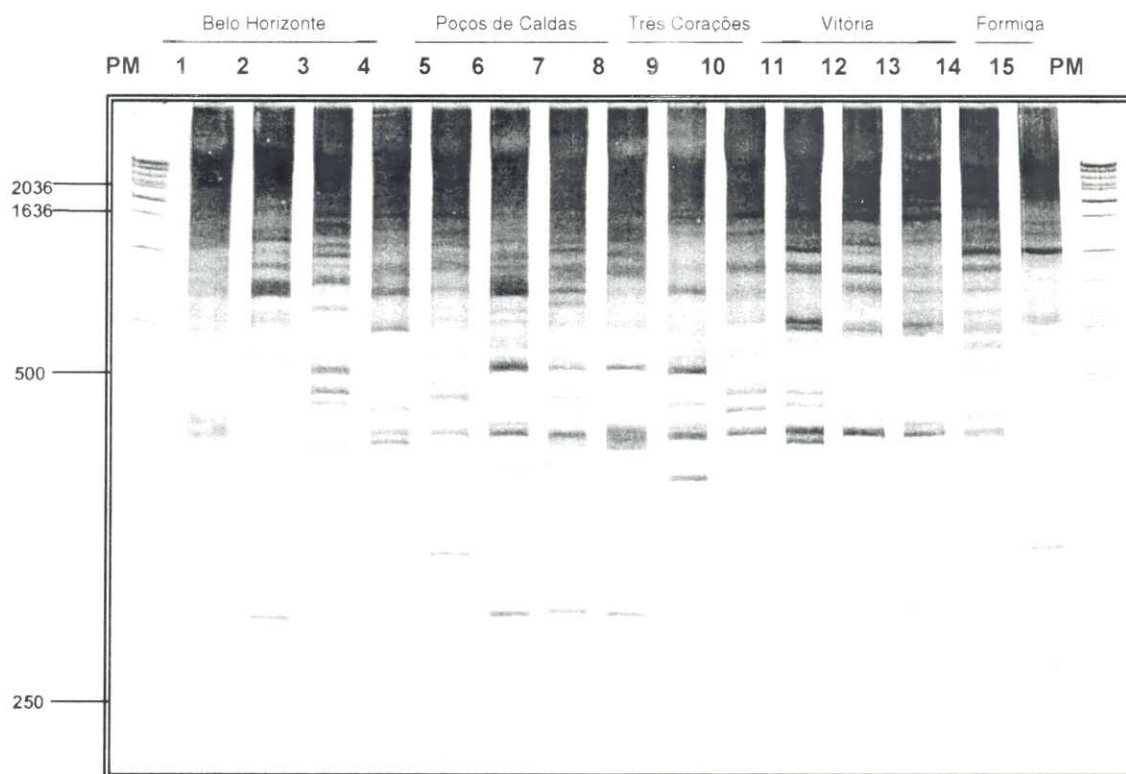


Figura 5. Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, com o iniciador G11, de *Ancylostoma caninum* de diferentes localidades. Canaletas: PM = Marcador de peso molecular 1 Kb (PROMEGA), 1-4 = Belo Horizonte - MG (CAN/BR/99/BH01, CAN/BR/99/BH02, CAN/BR/99/BH03, CAN/BR/99/BH04); 5 - 8 = Poços de Caldas - MG (CAN/BR/99/PC01, CAN/BR/99/PC02, CAN/BR/99/PC03, CAN/BR/99/PC04); 9 - 10 = Três Corações - MG (CAN/BR/99/TC01, CAN/BR/99/TC02), 11 - 14 = Vitória - ES (CAN/BR/00/Vt01, CAN/BR/00/Vt02, CAN/BR/00/Vt03, CAN/BR/00/Vt04) e 15 = Formiga - MG (CAN/BR/00/Fo01).

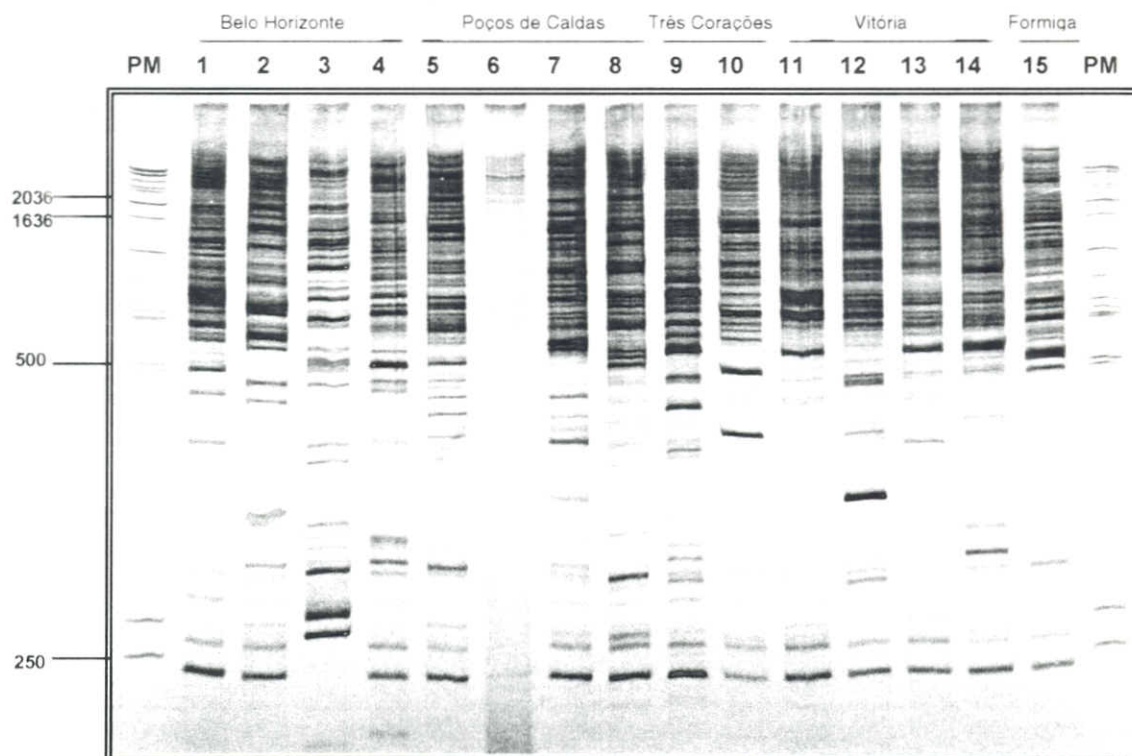


Figura 6. Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, com o iniciador G15, de *Ancylostoma caninum* de diferentes localidades. Canaletas: PM = Marcador de peso molecular 1 Kb (PROMEGA), 1-4 = Belo Horizonte - MG (CAN/BR/99/BH01, CAN/BR/99/BH02, CAN/BR/99/BH03, CAN/BR/99/BH04); 5 - 8 = Poços de Caldas - MG (CAN/BR/99/PC01, CAN/BR/99/PC02, CAN/BR/99/PC03, CAN/BR/99/PC04); 9 - 10 = Três Corações - MG (CAN/BR/99/TC01, CAN/BR/99/TC02), 11 - 14 = Vitória - ES (CAN/BR/00/Vt01, CAN/BR/00/Vt02, CAN/BR/00/Vt03, CAN/BR/00/Vt04) e 15 = Formiga - MG (CAN/BR/00/Fo01).

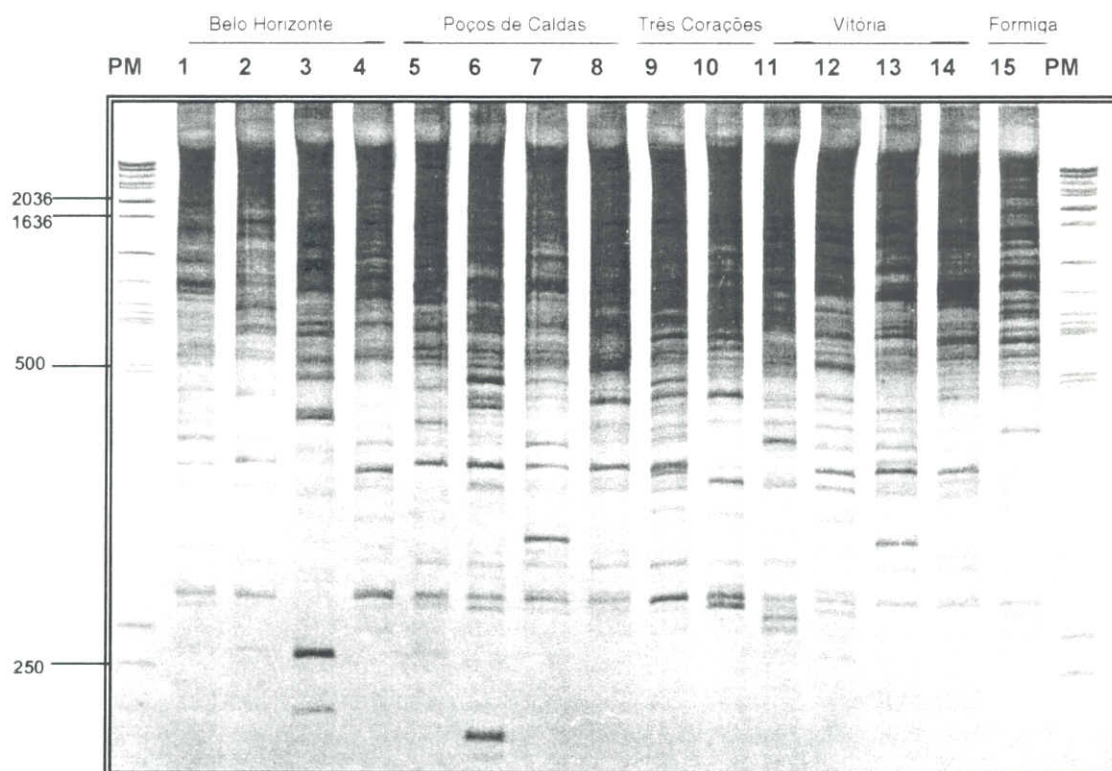


Figura 7. Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, com o iniciador G18, de *Ancylostoma caninum* de diferentes localidades. Canaletas: PM = Marcador de peso molecular 1 Kb (PROMEGA), 1-4 = Belo Horizonte - MG (CAN/BR/99/BH01, CAN/BR/99/BH02, CAN/BR/99/BH03, CAN/BR/99/BH04); 5 - 8 = Poços de Caldas - MG (CAN/BR/99/PC01, CAN/BR/99/PC02, CAN/BR/99/PC03, CAN/BR/99/PC04); 9 - 10 = Três Corações - MG (CAN/BR/99/TC01, CAN/BR/99/TC02), 11 - 14 = Vitória - ES (CAN/BR/00/Vt01, CAN/BR/00/Vt02, CAN/BR/00/Vt03, CAN/BR/00/Vt04) e 15 = Formiga - MG (CAN/BR/00/Fo01).

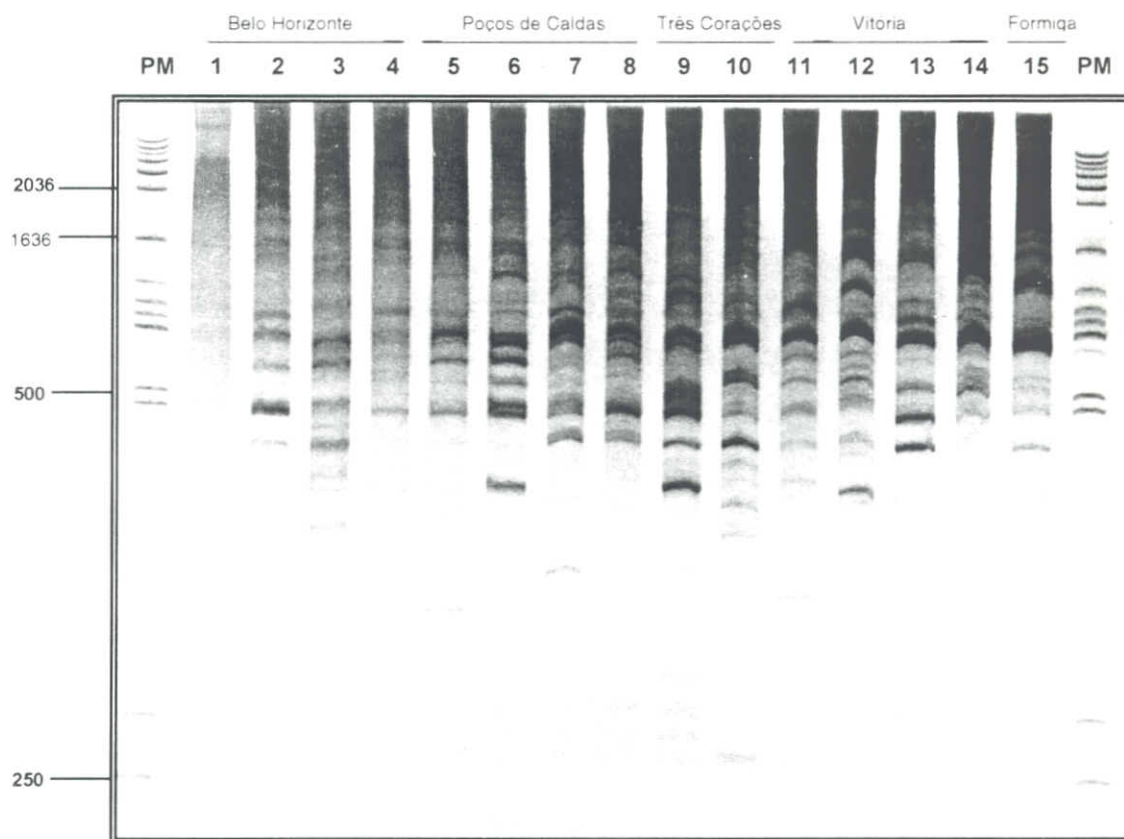


Figura 8. Perfil de RAPD em gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, com o iniciador M13:40 forward, de *Ancylostoma caninum* de diferentes localidades. Canaletas: PM = Marcador de peso molecular 1 Kb (PROMEGA), 1-4 = Belo Horizonte - MG (CAN/BR/99/BH01, CAN/BR/99/BH02, CAN/BR/99/BH03, CAN/BR/99/BH04); 5 - 8 = Poços de Caldas - MG (CAN/BR/99/PC01, CAN/BR/99/PC02, CAN/BR/99/PC03, CAN/BR/99/PC04); 9 - 10 = Três Corações - MG (CAN/BR/99/TC01, CAN/BR/99/TC02), 11 - 14 = Vitória - ES (CAN/BR/00/Vt01, CAN/BR/00/Vt02, CAN/BR/00/Vt03, CAN/BR/00/Vt04) e 15 = Formiga - MG (CAN/BR/00/Fo01).

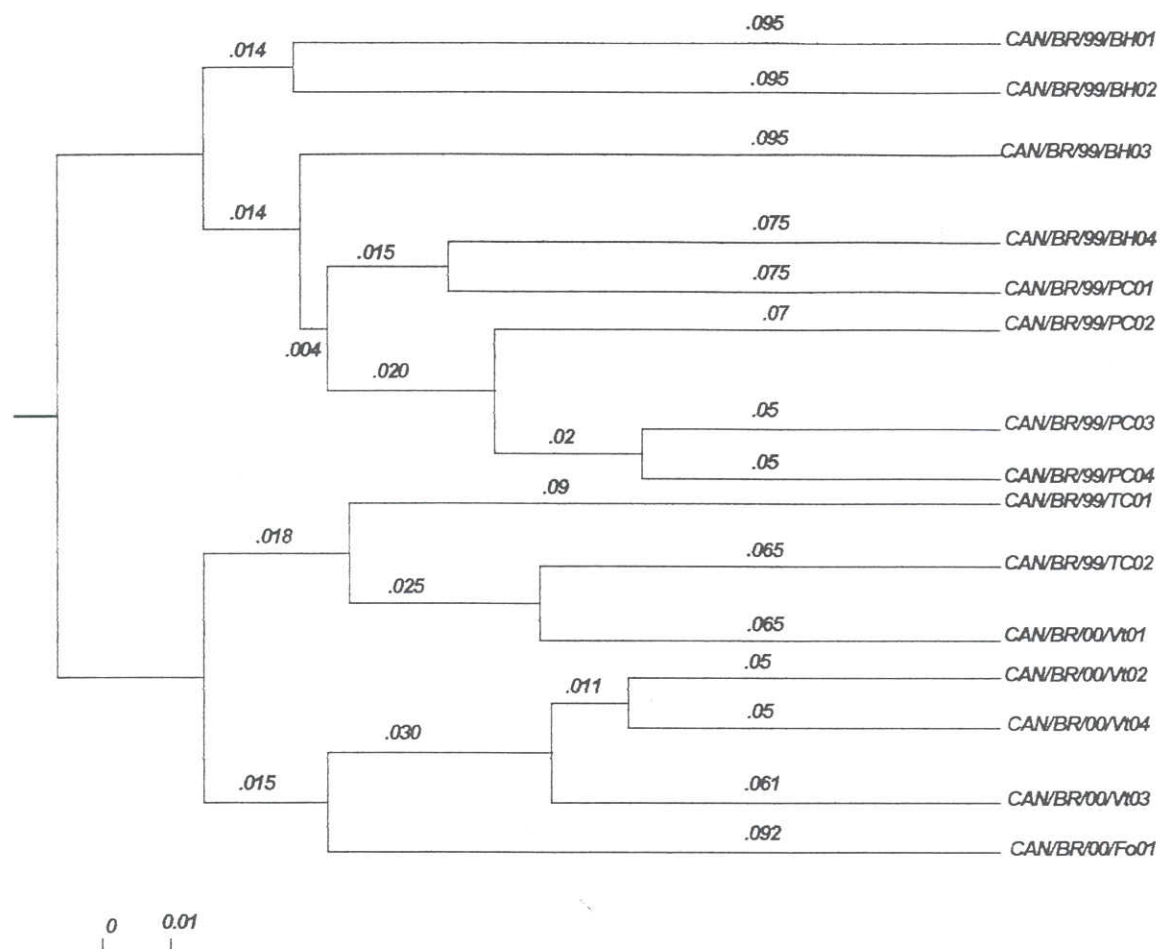


Figura 9. Fenograma construído por UPGMA, com valores da distância genética (D) entre *Ancylostoma caninum* de diferentes localidades, obtido por RAPD com os iniciadores G06, G11, G15, G18 e M13-40 forward. Os números indicam a distância genética entre os espécimes, calculados pelo programa MEGA.

6. DISCUSSÃO

A comparação de níveis de diversidade genética dentro de uma população não é tarefa simples. Abordamos esta questão em *Ancylostoma caninum* através de marcador genético multilocal RAPD (Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico) baseada na PCR. Não há na literatura trabalhos estudando variabilidade genética em *A. caninum*, sobretudo utilizando RAPD. Em outros ancilostomídeos a variabilidade genética tem sido mostrada como em *N. americanus* e *A. duodenale* através de outras metodologias que têm apontado inclusive diversidade geográfica em *N. americanus* (Gasser et al., 1998; Romstad et al., 1998; Blaxter, 2000).

O *A. caninum*, entretanto, tem sido muito estudado em relação à sequência de genes que codificam proteínas com importante atividade biológica nestes parasitos, embora seu genoma não seja inteiramente conhecido. O RAPD torna-se portanto uma metodologia que pode ser empregada em estudo de variabilidade deste parasito, já que não requer o conhecimento prévio de sequência do DNA a ser amplificado.

Os *A. caninum* aqui estudados foram coletados de animais de diferentes localidades dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, ambos da região Sudeste. Os cães necropsiados, na sua grande maioria, apresentavam-se poliparasitados, sendo que as espécies de helmintos encontradas foram semelhantes àsquelas encontradas por outros autores que trabalharam com helmintos intestinais de cães de outras áreas do Brasil (Carneiro et al., 1973; Brito et al., 1980; Lara et al., 1981; Farias et al., 1995; Bittencourt et al., 1996; Porto et al., 1999; Silva et al., 1999) e mesmo do mundo (Rep, 1975; Dada et al., 1979; Hauslinger et al., 1993; Lee & Lee, 1996; Franc et al., 1997; Vargas & Contreras, 1998; Kulisic et al., 1998).

Em relação a origem geográfica dos animais, não houve variação nas espécies de helmintos encontradas quando comparamos Belo Horizonte, Sul de Minas e Vitória. Apesar de não existirem trabalhos atuais com prevalência de helmintos

intestinais em cães procedentes das áreas geográficas de origem dos animais do presente trabalho, em um trabalho realizado na região metropolitana de Belo Horizonte (Batista Jr. et al., 1962), mostram as mesmas espécies de helmintos, acrescidos das espécies *Dipetalonema* sp e *Spirocerca lupi*, que não foram encontrados nos nossos animais.

Embora não tenhamos separado os animais por faixa etária, podemos observar que em geral os animais com até 18 meses de idade encontravam-se mais parasitados, principalmente por *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Dipylidium caninum* e *Toxocara canis*. Estes resultados são diferentes daqueles de Farias et al. (1995) que, em São Paulo, observaram que animais mais jovens com idade de até seis meses apresentavam-se parasitados com maior número de espécies e exemplares de helmintos.

Em relação ao parasitismo por ancilostomídeos nos 34 animais necropsiados, 79% encontravam-se parasitados por *Ancylostoma caninum*. Estes resultados diferem daqueles encontrados por Batista Jr. et al., (1962) que, trabalhando com animais procedentes de Belo Horizonte, mostraram o encontro desta espécie em 96% dos 100 animais necropsiados. No entanto, nossas porcentagens de parasitados encontram-se dentro da média de resultados de outros autores que em trabalhos realizados em várias regiões do Brasil no período de 1973 a 1999 em cães domiciliados ou de rua, encontraram prevalências que variaram entre 43% e 98% (Carneiro et al., 1973; Brito et al., 1980; Lara et al., 1981; Silva et al., 1999).

Como, ao lado do *A. caninum*, encontramos também um parasitismo de 59% por *A. braziliense*, foi necessário, inicialmente, separar os ancilostomídeos dos outros helmintos e examiná-los ao microscópio ótico para identificação espécie-específica. Para esta identificação nos baseamos nas medidas das estruturas características, como proposto por Burrows (1962). Isto nos permitiu separar *A. caninum* de *A.*

braziliense, além de possibilitar diferenciá-los de *A. tubaeforme* (Zeder, 1800), outra espécie do gênero, parasito de gato que pode ser encontrada parasitando cães, e que se apresenta muito semelhante ao *A. caninum*, diferindo basicamente no comprimento do esôfago e tamanho do espículo. Esta espécie até o momento não foi descrita no Brasil.

As observações e medidas ao microscópio ótico das estruturas características dos espécimes machos de *A. caninum* se encontravam dentro da variação proposta por Burrows, (1962), permitindo o diagnóstico específico.

Antes de proceder a extração do DNA para os estudos propostos, os *A. caninum* foram colocados em meio de RPMI – 1640 (SIGMA), incubados a 37°C em estufa de CO₂ por 48 horas com uma troca de meio. Este meio é comumente usado para cultivo celular e, recentemente, vem sendo utilizado na manutenção de nematóides para produção de antígenos secretados e excretados e cultivo de larvas *in vitro* (Farrar & Klei, 1985; Hata, 1993; Iglesias *et al.*, 1997; Von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 1998). Este procedimento visou manter os helmintos vivos até a extração do DNA e eliminar o conteúdo da cápsula bucal e dos intestinos a fim de minimizar o efeito de contaminantes, como por exemplo sangue ingerido pelo helminto dos seus hospedeiros, o que poderia interferir na amplificação do DNA por PCR. Esta não foi uma preocupação de vários autores que trabalharam com ancilostomídeos (Hawdon, 1996; Gasser *et al.*, 1996 e 1998; Mieszczanek & Wedrychowicz, 1999; Blaxter, 2000) e outros nematóides hematófagos parasitos do trato digestivo de vertebrados (Stevenson *et al.*, 1995; Humbert & Cabaret, 1995; Jacquet *et al.*, 1995).

Há uma enorme variedade de protocolos para obtenção de DNA de nematóides (Gasser & Hoste, 1995; Humbert & Cabaret, 1995; Joachim *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 1996 e 1997) incluindo ancilostomídeos (Hawdon *et al.*, 1996; Mieszczanek & Wedrychowicz, 1999). O método utilizado

neste trabalho foi o proposto por Humbert & Cabaret, 1995. Este método havia sido anteriormente utilizado para extração de DNA de nematóides, quando Silva (1999) padronizou as condições de extração de DNA de ciatostomíneos parasitos de equídeos, testando quatro diferentes protocolos, sendo este o que mostrou melhor resultado. Este método foi o mais adequado para obter DNA de um exemplar de *A. caninum* em quantidade suficiente para realizar as reações de RAPD com todos iniciadores utilizados.

A utilização de um protocolo já testado e a introdução da trituração com um pistilo de vidro esmerilhado, artesanalmente fabricado e adaptado ao tubo Eppendorf de 1,5 mL, facilitou romper a cutícula dos helmintos aumentando a eficiência da extração (dados não mostrados), permitindo obter o DNA de modo rápido e de boa qualidade para realização do estudo proposto.

A dosagem do DNA em gel de agarose permitiu não só observar a quantidade de DNA extraído de cada exemplar, que variou de 20ng a 450ng de DNA, mas ainda observar a integridade do mesmo. A grande variação observada na quantidade de DNA dos exemplares pode ser devido a vários fatores, por exemplo a perda de DNA durante a extração.

Na padronização da reação de RAPD em relação a quantidade de DNA foram testadas concentrações de 1ng, 2ng e 5ng utilizando o iniciador G06. A concentração de 1ng foi a melhor concentração para se obter boa resolução e reprodutibilidade dos resultados nas condições utilizadas.

A influência da concentração de DNA molde nos perfis de bandas de RAPD tem sido relatada entre os autores, embora com algumas divergências. Assim, Muralidharan & Wakeland (1993), Van Belkum (1994) e Welsh & McClelland (1990) concluem que a reprodutibilidade dos perfis de bandas do RAPD é pouco afetada pela concentração de DNA molde. Entretanto, outros autores observaram que o DNA molde, quando adicionado em grandes quantidades na reação, pode resultar no aparecimento de rastro ou na falta de definição das bandas

no gel, enquanto pouco DNA gera padrões de bandas não reprodutíveis. Isto foi observado por Williams et al. (1993), quando utilizou várias diluições de um mesmo DNA para reações de RAPD-PCR, obtendo resultados que mostraram variações não só na intensidade das bandas, como nos perfis gerados.

Utilizando a dosagem do DNA em agarose e a padronização da concentração em 1ng, obtivemos padrões de bandas reprodutíveis com todos os iniciadores utilizados.

Todos os géis foram analisados, e foi possível observar diferenças quantitativas na intensidade de algumas bandas. Estas diferenças não foram consideradas neste estudo, uma vez que fatores que poderiam afetar a reprodutibilidade e intensidade das bandas como concentração de sais, magnésio, dNTPS, iniciadores, Taq DNA polimerase e concentração de DNA molde foram previamente testadas para *A. caninum* e haviam sido anteriormente padronizados com outros helmintos (Silva, 1999).

De fato, vários estudos com diferentes seres vivos mostram que o número, reprodutibilidade e intensidade de bandas nos perfis de RAPD são função de múltiplos parâmetros já bem documentados por Welsh & McClelland, (1990) e revistos por DAVIN-REGLI et al., (1995) e LIMA et al., (1998).

Em relação ao protocolo de amplificação da RAPD-PCR foi utilizado aquele descrito para *Leishmania* sp., LRAPD (Gomes et al. 1995) o qual foi previamente testado num experimento piloto com o iniciador G06. Ele havia sido empregado não só com *Leishmania* (Gomes et al., 1995), mas ainda com nematóides ciatostomíneos parasitos de eqüídeos (Silva, 1999), mostrando excelentes resultados na amplificação de DNA de três espécies da Subfamília Cyathostominae.

Conforme os dois grupos que descreveram a reação de RAPD-PCR ou AP-PCR pode-se utilizar tanto iniciadores curtos com 10 pares de bases (Williams et al., 1990), como

iniciadores longos com 20 ou mais pares de bases (Welsh & McClelland, 1990).

Devido à alta sensibilidade da técnica, a escolha dos iniciadores é um fator da maior importância na utilização do RAPD-PCR. Diferentes autores têm mostrado que o uso de iniciadores com o conteúdo de Guanina + Citosina (G C) entre 50 a 70% apresenta produtos com maior número de bandas e melhor resolução em gel de agarose ou poliacrilamida (Caetano-Anollés et al., 1991; Williams et al., 1993; Haymer et al., 1994).

No nosso estudo não houve preocupação com o tamanho dos iniciadores. Testamos oito iniciadores aleatórios, sendo quatro curtos, com 10 pb, um iniciador, considerado universal (M13-40 forward), com 17 pb e três iniciadores longos, Reverse 2 com 20 pb, L15996 com 22 pb e QG1 com 36 pb. Destes iniciadores apenas os com 10 pb e o M13-40 forward foram utilizados por mostrarem resultados reprodutíveis e adequados ao estudo proposto e se encontrarem dentro das porcentagens de G C recomendada pelos autores já citados. Os três restantes não apresentaram número e padrões de bandas adequados para análise da variabilidade genética nas populações de *A. caninum* estudadas (dados não mostrados).

Os resultados do presente trabalho demonstram que o número de bandas polimórficas geradas pelos iniciadores empregados foi suficiente para mostrar a variabilidade genética intra-específica de *A. caninum*.

A variabilidade genética, ou polimorfismo de DNA, pode ser atualmente avaliada por várias técnicas, mas o surgimento da técnica do RAPD-PCR em 1990, por ser uma técnica simples, com resultados rápidos, sensibilidade e reprodutibilidade, levou a um grande avanço no estudo do DNA para produção de marcadores genéticos.

De fato, o uso de marcadores genéticos, produzidos pelo RAPD, permite estabelecer os padrões de variação genética dentro e entre as populações naturais. A partir destes

conhecimentos é possível fazer inferências sobre importantes parâmetros da biologia dessas espécies. Estes marcadores, associados a estudos da dinâmica hospedeiro-parasito e da epidemiologia, representam uma poderosa ferramenta para análise detalhada e melhor compreensão dos processos de transmissão e genética de população.

A sensibilidade e eficácia desta técnica já foi comprovada em diversos trabalhos com vários nematódeos (Caswell-Chen et al., 1992; Humbert & Cabaret, 1995; Jacquet et al., 1995; Joachim et al., 1997; Siles et al., 1997), inclusive ancilostomídeos (Hawdon et al., 1996; Mieszczanek & Wedrychowicz, 1999).

A utilização da técnica da RAPD-PCR em nematódeos tem possibilitado separar grupos, observar variações intra-específica mostrando divergência em populações de diferentes localidades, identificar gêneros e espécies utilizando adultos, larvas e ovos (Humbert & Cabaret, 1995; Silva, 1999). No estudo da variabilidade genética de outros helmintos, sobretudo nematódeos, o RAPD tem mostrado variação intra-específica em espécies de *Radopholus similis*, *Steinemema* sp., *Haemonchus* sp., *Oesophagostomum* sp., *Trichinella* sp. e *Trichostrongylidae* (Hahn et al., 1994; Liu & Berry, 1995; Jacquet et al., 1995; Humbert & Cabaret, 1995; Semenova et al., 1996; Rodriguez et al., 1996; Joachim et al., 1997).

No nosso estudo, o RAPD mostrou variabilidade genética com os iniciadores utilizados. O número de bandas polimórficas foi suficiente para distinguir entre as populações analisadas. Os perfis genéticos gerados apresentaram várias bandas polimórficas e bandas monomórficas, presentes em indivíduos de todas as localidades geográficas estudadas, significando que o genoma de *A. caninum* possui regiões conservadas independente da sua procedência. Este fato reflete ancestralidade entre os indivíduos das várias populações (Kambhampati et al., 1992).

As diferenças na intensidade de algumas bandas não foram consideradas em nosso estudo, sendo computado apenas presença ou ausência da banda, independente da intensidade.

Houve baixa frequência de bandas exclusivas em cada grupo, indicando que a maior parte da divergência entre as populações determinada por estes marcadores, deveu-se a variações na frequência de bandas mais do que na presença de bandas exclusivas para uma população de mesma origem geográfica.

A média do número de bandas visualizadas nos géis, com todos iniciadores utilizados, foi de 56,2 variando de 37 a 76 e a proporção de bandas compartilhadas foi em média 78% variando de 74% a 86%, dependendo da sequência e tamanho do iniciador utilizado.

Considerando a procedência dos *A. caninum*, nós observamos que os perfis de bandas entre os espécimes da mesma localidade foram mais homogêneos com a maior parte dos iniciadores utilizados e permitiram agrupá-los parcialmente de acordo com sua origem geográfica.

Existe uma maior variabilidade interpopulacional do que intrapopulacional. A homogeneidade intrapopulacional observada foi maior na região metropolitana de Vitória (ES), seguida pela região metropolitana de Belo Horizonte e depois o Sul de Minas.

Nós nos baseamos na proporção de bandas compartilhadas para construção do fenograma pelo método UPGMA, método fenético que se baseia na hipótese de que cada OTU's sofreu a mesma pressão evolutiva.

O fenograma revelou que os indivíduos, de acordo com a sua procedência geográfica, se agrupam de forma marcante ou de forma discreta. Pode-se verificar a existência de dois ramos distintos onde se observa a separação dos agrupamentos de Belo Horizonte e parte do Sul de Minas (Poços de Caldas) no ramo superior e o agrupamento de Vitória (ES), incluindo

espécimes do Sul de Minas (Três Corações) no ramo inferior. O significado do agrupamento de espécimes de Três Corações junto com os de Vitória permanece obscuro em virtude da falta de um maior conhecimento da genética destas populações. A associação com a população de Vitória (ES) também não pode ser explicada pela proximidade geográfica que favoreceria o fluxo gênico entre as populações. Esperava-se que os indivíduos de Três Corações (MG) se agrupassem com os de Poços de Caldas (MG) pela proximidade das duas cidades, que fazem parte da mesma região do Sul do estado de Minas Gerais e que não apresentam grandes diferenças ecológicas, biogeográficas ou mesmo outras características como número de habitantes e renda *per capita*.

Nem sempre diferentes origens geográficas levam a variabilidade genética, principalmente em espécies com reprodução sexuada e que têm uma grande mobilidade, podendo ser transportados de um local para outro.

O espécime de Formiga, representado por apenas um indivíduo, foi incluído no fenograma geral com todos iniciadores, quando se associou ao grupo de Vitória (ES), mas foi excluído da análise por procedência geográfica pois neste caso seria um indivíduo fora do contexto analisado.

O estudo da variabilidade genética de *A. caninum* abre perspectivas de se caracterizar geneticamente populações deste parasito e de se estudar fatores importantes ligados à biologia funcional deste helminto, como por exemplo patogenicidade e virulência, dentre outros aspectos.

7. CONCLUSÕES

A partir da análise genética de populações de *A. caninum* através de marcadores moleculares do tipo RAPD foi possível chegar as seguintes conclusões:

A técnica de RAPD-PCR revelou-se uma ferramenta muito útil no estudo da variabilidade genética de *A. caninum* dos

estados de Minas Gerais e Espírito Santo, Brasil.

A partir deste estudo é possível considerar a utilização de alguns iniciadores daqueles testados neste trabalho e que resultaram em melhores marcadores de variabilidade genética para estudos futuros com outras populações de *A. caninum*.

A técnica de RAPD-PCR com os iniciadores utilizados e nas condições testadas permitiu observar polimorfismos úteis no conhecimento genômico de *A. caninum*, detectando nas populações estudadas um menor nível de variabilidade genética intrapopulacional e um maior nível de variabilidade intraespecífica.

No fenograma construído, os *A. caninum* das diferentes localidades foram agrupados em dois ramos distintos, um com a população da região metropolitana de Belo Horizonte e parte do Sul de Minas Gerais (Poços de Caldas) e o outro com a população da região metropolitana de Vitória (ES) e a outra parte do Sul de Minas Gerais (Três Corações). O significado do agrupamento dos espécimes de Três Corações (MG) junto com os da região metropolitana de Vitória (ES) permanece obscuro por falta de maior conhecimento da genética destas populações.

8. PERSPECTIVAS

Esperamos que este estudo possa servir como uma base de dados genéticos que poderão ser usados como ponto de partida para estudos mais abrangentes incluindo espécimes de outros municípios de Minas Gerais e do Brasil, contribuindo para o entendimento da genética de *A. caninum* em especial e dos ancilostomídeos de um modo geral, favorecendo a compreensão da epidemiologia e a busca de genótipos correlacionados a aspectos clínicos relevantes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANESE, G., DI CINTIO, R., BENEGLI, M. et al. Larva migrans in Italy. *Int. J. Dermatol.*, p.464-465, 1995.
- ALVES, L.C. Helminthose intestinal canina. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1999, Salvador, p. 48.
- ANDERSON, T.J.C. *Ascaris* infections in humans from North América: molecular evidence for cross-infection. *Parasitol.*, v.110, p.215-219, 1995.
- ANDERSON, T.J.C., BLOUIN, M.S., BEECH, R.N. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Adv. Parasitol.*, v.41, p.219-283, 1998.
- APOSTOL, B.L., BLACK, I.V.W.C., MILLER, B.R., BEATY, B.J. Estimation of the number of full sibling families at ovipositions site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theor. Appl. Genet.*, v.86, p.991-1000, 1993.
- BARRETO, M.P., AMARAL, D.F. Sobre dois casos de parasitismo do homem pelo *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859), Hall, 1913. *Rev. Clin. São Paulo*, v.16, n.6, p.235-240, 1944.
- BATISTA JR, J.A., COSTA, H.M.A., FREITAS, M.G. Endo e ectoparasitos de *Canis familiaris* em Belo Horizonte II distribuição de helmintos em cães por grupos etários e sexo. *Arq. Esc. Vet., Univ. Fed. de Minas Gerais*, v.14, p.113-126, 1962.
- BIOCCA, E. Ridescrizione di *Ancylostoma tubaeforme* (ZEDER, 1800) parassita del gatto, considerato erroneamente sinonimo de *Ancylostoma caninum* (ERCOLANI, 1859), parassita del cane. *Riv. Parasitol.*, v.15, n.4, p.267-278, 1954.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., BITTENCOURT, A.J., PERES, A., D'A DE Q. Frequência de parasitoses de pequenos animais do hospital veterinário da faculdade medicina veterinária "Prof. Antônio Secundino de São José." *Ecossistema*, v.21, p.32-35, 1996.
- BLAGBURN, B.L., LINDSAY, D.D., VAUGHAN, J.L. et al. Prevalence of canine parasites based on fecal flotation. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.18, n.5, p.483-509, 1996.
- BLAXTER, M. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. *Int. J. Parasitol.*, v.30, n.4, p.347-355, 2000.
- BLAXTER, M., KENNEDY, M. Molecular helminthology moves forward. *Parasitol. Today*, v.16, n.1, p.5-6, 2000.
- BURROWS, R.B. Comparative morphology of *Ancylostoma tubaeforme* (ZEDER, 1800) and *Ancylostoma caninum* (ERCOLANI, 1859). *J. Parasitol.*, v.48, n.5, p.715-718, 1962.
- CAETANO-ANOLÉS, G., BASSAM, B.J., GRESSHOF, P.M. DNA amplification fingerprinting using very short oligonucleotide primers. *Biotech. Technol.*, v.9, p.553-557, 1991.
- CARR, A., PRITCHARD, D.I. Identification of hookworm (*Necator americanus*) antigens and their translation "in vitro". *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.19, n.3, p.251-258, 1996.
- CASWELL-CHEN, E.P., WILLIAMSON, V.M., WU, F.F. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Heterodera cruciferae* and *H. schachtii* populations. *J. Nematol.*, v.24, n.3, p.343-351, 1992.
- CENIS, J.L. Identification of four major *Meloidogyne* spp. By random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathol.*, v.83, p.76-80, 1993.
- CHACÓN, M.R., RODRIGUEZ, E., PARKHOUSE, R.M.E. et al. The differentiation of parasitic nematodes using random amplified polymorphic DNA. *J. Helminthol.*, v.68, p.109-113, 1994.
- CHAMBERS, A.E., ALMOND, N.M., KNIGHT, M. et al. Repetitive DNA as a tool for the identification and comparison of nematode variants: application of *Trichinella* isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.21, p.113-120, 1986.

- CHILTON, N.B., BEVERIDGE, I., ANDREWS, R.B. Detection by allozyme electrophoresis of cryptic species of *Hypodontus macropi* (Nematoda: Strongyloidea) from macropodid marsupials. *Int. J. Parasitol.*, v.22, p.271-279, 1992.
- CHRISTENSEN, C.M., ZARLENGA, D.S., GASBARRE, L.C. *Ostertagia*, *Haemonchus Cooperia* and *Oesophagostomum*: construction and characterization of genus specific DNA probes to differentiate important parasites of cattle. *Exp. Parasitol.*, v.78, p.93-100, 1994.
- COSTA, H.M.A., FREITAS, M.G. Ancilostomose canina – relação entre a quantidade de ovos de ancilostomídeos nas fezes e a intensidade de infestação. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, v.16, p.223-229, 1964.
- COSTA, H.M.A., GUIMARÃES, M.P., LEITE, A.C.R., LIMA, W.S. Distribuição de helmintos parasitos de animais domésticos no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.38, n.4, p.465-579, 1986.
- CROESE, J. Seasonal influence on human enteric infection by *Ancylostoma caninum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.53, n.2, p.158-161, 1995.
- CROESE, J., FAIRLEY, S., LOUKAS, A., et al. A distinctive aplitous ileitis linked to *Ancylostoma caninum*. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v.11, n.6, p.524-531, 1996.
- CURRENT, J., BAILLIE, D.L., WEBSTER, J.M. Use of genomic DNA restriction fragment length differences to identify nematode species. *Parasitol.*, v.90, p.137-144, 1985.
- CURRENT, J., McCLURE, M.A., WEBSTER, J.M. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length differences in total DNA. *J. Nematol.*, v.18, p.83-86, 1986.
- CUTILLAS, C., GERMAN, P., ARIAS, P., GUEVARA, D. Characterization of *Trichuris skrjabini* by isoenzyme gel electrophoresis: comparative study with *Trichuris ovis*. *Acta Trop.*, v.62, p.63-69, 1996.
- DADA, B.J., ADEGBOYE, D.S., MOHAMMED, A.N. A survey of gastro intestinal helminth parasites of stray dogs in Zaria, Nigeria. *Vet. Rec.*, v.104, n.7, p.145-146, 1979.
- DAODI, W., XIAOMING, L., XINGYUM, H. Investigation of helminths parasitizing dogs and cats in Guizhou. *Chin. J. Vet. Sci. Technol.*, v.25, n.2, p.13-15, 1995.
- DAVIN-REGLI, A., ABED, Y., CHARREL, R.N. et al. Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res. Microbiol.*, v.146, p.561-568, 1995.
- DUBINI, A. "Nuovo verme intestinale umano (*Agchylostoma duodenale*) costituente un sesto genere dei nematoidei proprii dell'uomo." *Ann. Univ. Med. Milano*, v.106, p.5-13, 1843.
- ERCOLANI, G.B. Nuovi elementi teorico-pratici di medicina veterinaria. Bologna, p.1-550, 1859.
- ESBENSHADE, P.R., TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *J. Nematol.*, v.22, p.10-15, 1990.
- FARIA, G. Contribuição para a sistemática helmintológica brasileira III. *Ancylostoma brasiliense* n. sp. parasito de gatos e cães. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.2, n.2, p.286-293, 1910.
- FARIAS, N.A., CHRISTOVÃO, M.L., STOBBE, N.S. Frequência de parasitas intestinais em cães (*Canis familiaris*) e gatos (*Felis domestica*) em Araçatuba/SP. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.4, n.1, p.57-60, 1995.
- FARRAR, R.G., KLEI, T.R. In vitro development of *Strongylus edentatus* to the fourth larval stage with notes on *Strongylus vulgaris* and *Strongylus equinus*. *J. Parasitol.*, v.71, n.4, p.489-499, 1985.

- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FLOCKHART, H.A., HARRISON, S.E., DOBINSON, A.R., JAMES, E.J. Enzyme polymorphism in *Trichinella*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.76, p.541-545, 1982.
- FOSTER, A. O., CORT, W.W. The effect of a deficient diet on the susceptibility of dogs and cats to non-specific strains of hookworms. *Am. J. Hyg.*, v.16, p.582-601, 1932.
- FRANC, M., CADIERGUES, M.C., MARCHAND, A. et al. Intestinal parasitism in dogs and cats. Results of an epidemiological survey in France. *Rev. de Medec. Vet.*, p.247-250, 1997.
- GACA, K., MICHALSKI, M.M., SZELAGIEWICZ, M., et al. Prevalence of nematodes in dogs. *Med. Wet.*, v.54, n.6, p.407-408, 1998.
- GARATE, T., ALBARRAN, E., BOLAS-FERNANDES, F. et al. DNA polymorphism within Spanish *Trichinella* isolates. *Parasitol. Res.*, v.77, p.602-605, 1991.
- GASSER, R.B. Mutation scanning methods for the analysis of parasite genes. *Int. J. Parasitol.*, v.27, n.12, p.1449-1463, 1997.
- GASSER, R.B., CHILTON, N.B., HOSTE, H., BEVERIDGE, I. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Res.*, v.21, p.2525-2526, 1993.
- GASSER, R.B., HOSTE, H. Genetic markers for closely-related parasitic nematodes. *Mol. Cell. Probes*, v.9, n.5, p.315-320, 1995.
- GASSER, R.B., MONTI, J.R., BAO-ZHEN, Q. et al. A mutation scanning approach for the identification of hookworm species and analysis of population variation. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.92, p.303-312, 1998.
- GASSER, R.B., STEWART, L.E., SPEARE, R. Genetic markers in ribosomal DNA for hookworm identification. *Acta Trop.*, v.62, n.1, p.15-21, 1996.
- GHOSH, K., HAWDON, J., HOTEZ, P. Vaccination with alum-precipitated recombinant *Ancylostoma* - secreted protein 1 protects mice against challenge infections with infective hookworm (*Ancylostoma caninum*) larvae. *J. Infect. Dis.*, v.17, n.6, p.1380-1383, 1996.
- GOMES, R.F., MACEDO, A.M., PENA, S.D.J., MELO, M.N. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp. Parasitol.*, v.80, p.681-687, 1995.
- GORDON, R.M., YOUNG, C.J. Parasites in dogs and cats in Amazonas. *An. Trop. Med. Parasitol.*, v.16, n.3, p.297-300, 1922.
- GRODZICKER, T., WILLIAMS, J., SHARP, P., SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* v.39, p.439-446, 1974.
- HAHN, M.L., BURROWS, P.R., GNANAPRAGASAM, N.C. et al. Molecular diversity amongst *Radopholus similis* populations from Sri Lanka detected by RAPD analysis. *Fundam. Appl. Nematol.*, v.17, n.3, p.275-281, 1994.
- HATA, H., In vitro cultivation of the third and fourth stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *J. Vet. Med.*, v.55, n.2, p.345-347, 1993.
- HAUSLINGER, M.A., BURGU, A., EL-SEIFY, M.A., EL-ASSALY, T. Comparative studies of the helminth status of stray dogs human health consequences. *Tierarztl. Umsch.*, v.596, p.603-606, 1993.
- HAWDON, J.M. Differentiation between the human hookworms *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* using PCR-RFLP. *J. Parasitol.*, v.82, n.4, p.642-647, 1996.

- HAWDON, J.M., JONES, B.F., HOFFMAN, D.R., HOTEZ, P.J. Cloning and characterization of *Ancylostoma*-secreted protein. A novel protein associated with the transition to parasitism by infective hookworm larvae. *J. Biol. Chem.* v.271, p.6672-6678, 1996.
- HAWDON, J.M., SCHAD, G.A. Long-term storage of hookworm infective larvae in buffered saline solution maintains larval responsiveness to host signals. *J. Helminthol. Soc. Wash.*, v.58, p.140-142, 1991.
- HAYMER, D.S. Arbitrary (RAPD) primer sequences used in insect studies. *Insect Mol. Biol.*, v.3, n.3, p.191-194, 1994.
- HENDRIX, C.M., BRUCE, H.S., KELLMAN, N.J., et al. Cutaneous larva migrans and enteric hookworm infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, p.1763-1767, 1996.
- HILLIS, D.M., DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.*, v.66, p.411-453, 1991.
- HOFFMAN, W.A., PONS, J.A., JANER, J.L. Sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. Puerto Rico: *J. Publ. Health*, v.9, p.283-291, 1934.
- HOTEZ, P.J., HAWDON, J.M., CAPPELLO, M. Molecular approaches to vaccinating against hookworms. *Pediatr. Res.* v.40, p.515-521, 1996.
- HOTEZ, P.J., GHOSH, K., HAWDON, J.M. et al. Experimental approaches to the development of a recombinant hookworm vaccine. *Immunol. Rev.*, v.171, p.163-171, 1999.
- HUMBERT, J.F., CABARET, J. Use of random amplified polymorphic DNA for identification of ruminant trichostrongylid nematodes. *Parasitol. Res.*, v.81, p.1-5, 1995.
- HUNG, G.C., CHILTON, N.B., BEVERIDGE, I. et al. Molecular delineation of *Cylicocyclus nassatus* and *C. ashworthi* (Nematoda: Strongylidae). *Int. J. Parasitol.*, v.27, n.5, p.601-605, 1997.
- HUNG, G.C., JACOBS, D.E., KRECEK, R.C. et al. *Strongylus asini* (Nematoda Strongyloidea), genetic relationships with other *Strongylus* species determined by ribosomal DNA. *Int. J. Parasitol.*, v.26, n.12, p.1407-1411, 1996.
- IGLESIAS, L., VALERO, A., ADROHER, F.J. Some factors which influence the *in vitro* maintenance of *Anisakis simplex* (Nematoda). *Folia Parasitol. (Praha)*, v.44, n.4, p.297-301, 1997.
- ITOH, N., ITOH, S. Survey of intestinal nematodes in young dogs. *J. Vet. Med.*, p.983-986, 1998.
- JACQUIET, P., HUMBERT, J.F., COMES, M., et al. Ecological morphological and genetic characterization of sympatric *Haemonchus* spp. parasites of domestic ruminants in Mauritania. *Parasitol.*, v.110, p.483-492, 1995.
- JANI, R.G., JANI, B.M., DAVE, M.R. Prevalence of intestinal parasites in dogs at Anand (Gujarat). *J. Vet. Parasitol.*, v.9, n.1, p.51-53, 1995.
- JOACHIM, A., DAUGSCHIES, A., CHRISTENSEN, C.M., et al. Use of random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction for the definition of genetic markers for species and strains of porcine *Oesophagostomum*. *Parasitol. Res.*, v.83, p.646-654, 1997.
- KALKOFEN, U.P. Hookworms of dogs and cats. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.*, v.17, p.1341-1354, 1987.
- KAMBHAMPATI, S., BLACK, I.V.W.C., RAI, K.S. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques statistical analysis and applications. *J. Med. Entomol.*, v.29, p.939-945, 1992.
- KAZACOS, K.R. Gastrointestinal helminths in dogs from a humane shelter in Indiana. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.173, n.8, p.995-997, 1978.
- KENNEY, R.T. Parasitic causes of diarrhea. *Pediatric Ann.*, v.23, n.8, p.414-422, 1994.

- KHUONG L. H., HUAN L. V. et al. Canine hookworm disease in Ho Chi Minh city. *Khoa Hoc Ky Thuat Thu Y.*, p.69-73, 1998.
- KULISIC, Z., PAVLOVIC, I., MILUTINOVIC, M., ALEKSIC-BAKRAC, N. Intestinal parasites of dogs and role of dogs in epidemiology of larva migrans in the Belgrade area. *Helminthologia (Bratisl)*, p.79-82, 1998.
- KUMAR, S., TAMURA, K., MASATOSHI, N. *Molecular evolutionary genetics analysis*, version 1.01. Pennsylvania State University, 1993.
- KWORK, S., HIGUSCHI, R. Avoiding false positive with PCR. *Nature*, v.339, p.237-238, 1989.
- LANE, C. "*Ancylostoma braziliense*." *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.16, n.4, p.347-352, 1922.
- LARRIEU, E., ALVAREZ, E., CAVAGION, L. et al. The contamination of urban areas by the faeces of pets in the urban areas of general pico, Argentina. *Vet. Argent.*, v.14, n.133, p.198-200, 1997.
- LEE, M.S., LEE, M.B. Identification and prevalence of small intestinal nematodes of dog in the Taegu area. *Korean J.Vet.Res.*, v.36, n.2, p.483-494, 1996.
- LIMA, R.M.G., GUIMARÃES, S.E.F., PINHEIRO, L.E.L. Fatores que afetam a amplificação de DNA pela técnica de RAPD (random amplified polymorphic DNA). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.50, n.4, p.401-407, 1998.
- LIMA, W.S., CAMARGO, M.C.V., GUIMARÃES, M.P. Surto de larva migrans cutânea em uma creche de Belo Horizonte, Minas Gerais (BRASIL). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.26, n.2, p.122-124, 1984.
- LITTLE, M.D. Observations on the possible role of insects as paratenic hosts for *Ancylostoma caninum*. *J. Parasitol.*, v.47, p.263-267, 1961.
- LIU, J., BERRY, R.E. Differentiation of isolates in the genus *Steinernema* (Nematoda: Steinernematidae) by random amplified polymorphic DNA fragments and morphological characters. *Parasitol.*, v.111, p.119-125, 1995.
- LOOSS, A. The anatomy and life history of *Agchylostoma duodenale* Dub. Part. II. The development in the free state. *Rec. Egypt. Gov. School Med. Cairo*, v.4, p.163-613, 1911.
- MAKENE, V.W., MUHAIRWA, A.P., MTAMBO, M.M.A. et al. Prevalence of canine gastrointestinal parasites in Morogoro, Tanzânia. *J. Applied Anim. Res.*, v.10, n.2, p.149-153, 1996.
- MALGOR, R., OKU, Y., GALLARDO, R., YARZÁBAL, L. High prevalence of *Ancylostoma* spp. Infection in dogs, associated with endemic focus of human cutaneous larva migrans, in Tacuarembó, Uruguay. *Parasite*, v.3, p.131-134, 1996.
- MARK, D.L. Survival of *Ancylostoma caninum* on bluegrass pasture. *J. Parasitol.*, v.63, n.3, p.484-488, 1975.
- MATSUSAKI, G. Studies on the life history of the hookworm. VII. On the development of *Ancylostoma caninum* in the normal host. *Yokohama Med. Bull.*, v.1, p. 111-120, 1950.
- MAYR, E. Speciation and macro-evolution. *Evolution*, v.36, p.1119-1132, 1982.
- MELO, E.B., ROCHA, U.F., MAUGÊ, G.C., et al. Distribution of the genus *Ancylostoma* (Dubini, 1843) along the digestive tube of the dog. *Arq. Inst. Biol. (São Paulo)*, v.44, n.1-2, p.85-87, 1977.
- MIESZCZANEK, J., WEDRYCHOWICZ, H. Differentiation of two dog hookworm species usin PCR. *Acta Parasitol.*, v.44, n.1, p.81-83, 1999.
- MONTI, J. R., CHILTON, N. B., QIAN, B. Z., GASSER, R. B. Specific amplification of *Necator americanus* or *Ancylostoma duodenale* DNA by PCR using markers in ITS-1 rDNA, and its implications. *Mol. Cell. Probes*, v.12, n.2, p.71-78, 1998.

- MONIS, P.T. The importance of systematics in parasitological research. *Int. J. Parasitol.*, v.29, n.3, p.381-388, 1999.
- MORAES, R.G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. *Rev. Serv. Esp. Saúde Pública*, v.1, n.3, p.507-624, 1948.
- MULLIS, K.B., FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA "in vitro" via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, v.155, p.335-350, 1987.
- MURALIDHARAN, K., WAKELAND, E.K. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *Biotechnol.*, v.14, p. 652, 1993.
- NADLER, S. A. Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *J. Parasitol.*, v.81, n.3, p.395-403, 1995.
- NADLER, S. A. Molecular approaches to studying helminth population genetics and phylogeny. *Int. J. Parasitol.*, v. 20, n.1, p.11-29, 1990.
- NEVO, E. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theor. Popul. Biol.* v.13, p.121-177, 1978.
- PENA, S.D.J., NUNES, A.C. DNA-POP and DNA-PATTER, two simple computer programs for population studies and paternity analyses with DNA fingerprints. *Fingerprint News*, v.2, p.7-8, 1990.
- PORTO, W.J.N., ALVES, L.C., FAUSTINO, M.A.G., MAIOR, M.P.S. Diagnóstico parasitológico de fezes X diagnóstico pós-mortem em cães da cidade do Recife. In: *Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 11, 1999, Salvador, 1999, p. 172.
- POWELL, J.R. Protein variation in natural populations of animals. *Evol. Biol.*, v.8, p.79-119, 1975.
- PRICHARD, R. Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.*, v.54, p.259-268, 1994.
- PRICHARD, R. Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.*, v.71, p.155-175, 1997.
- PRITCHARD, D.I. The survival strategies of hookworms. *Parasitol. Today*, p.255-259, 1995.
- PROCIV, P., CROESE, J. Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*: hookworms reappraised in the light of a "new" zoonosis. *Acta Trop.*, v.62, p.23-44, 1996.
- QIANG S, BIN Z, SHUA-HUA X, et al. Variation between ASP-1 molecules from *Ancylostoma caninum* in China and the United States. *J. Parasitol.*, v.86, n.1, p.181-185, 2000.
- REINEMEYER, C.R. Post-therapeutic of gastrointestinal parasitisms of small animals. In: *Annual Waldbam/OSU Symposium*, 17., 1993, p.80-89.,
- REP BH, Intestinal helminths in dogs and cats on the Antillian Islands Aruba, Curaçao and Bonaire. *Trop. Geogr. Med.*, v.27, n.3, p.317-323, 1975.
- RODRÍGUEZ, E., NIETO, J, CASTILLO, J.A., GÁRATE, T. Characterization of spanish *Trichinella* isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Helminthol.*, v.70, p.335-343, 1996.
- ROMSTAD, A., GASSER, R.B., NANSEN, P. et al. *Necator americanus* (Nematoda: Ancylostomatidae) from Africa and Malaysia have different ITS-2 rDNA sequences. *Int. J. Parasitol.*, v.28, p.611-615, 1998.
- ROMSTAD, A., GASSER, R.B., NANSEN, P., et al. Characterization of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* by PCR-RFLP of rDNA. *J. Parasitol.* v.83, n.5, p.963-966, 1997.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v.239, p.487-491, 1988.
- SAMBROOK, J., FRISCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

- SANDHU, S.S., SINGH, S., SINGH, J. A note on hookworms infection in dogs in Ludhiana (Punjab). *J. Vet. Parasitol.*, v.11, n.2, p.201-203, 1997.
- SANTOS, F.R., PENA, S.D.J., EPPLIN, J.T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.*, v.90, p.655-656, 1993.
- SANTOS, M.A.Q. Pesquisa de *Ancylostoma tubaeforme* (ZEDER, 1800) em gatos domésticos (*Felis catus domesticus* LINEU, 1758) de algumas regiões do Brasil. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1980. 63p. (Tese, Mestrado em Parasitologia).
- SCHAD, G.A. The Parasite. In: H.M. GILLES, BALL, P.A.G. (Eds.), *Human parasitic diseases. hookworm infections*, Amsterdam: Elsevier, 1991, v.4, p.15-49.
- SEMENOVA, S.K., ROMANOVA, E.A., RYSKOV, A.P. Genetic differentiation of helminths with the randomly primed polymerase chain reaction. *Genetika*, p.304-309, 1996.
- SILES, M., CUÉLLAR, C., PERTEGUER, M.J. Genomic identification of *Anisakis simplex* isolates. *J. Helminthol.*, v.71, p.73-75, 1997.
- SILVA, A.V.M. Helminths parasitos de equídeos: Estudos taxonômicos e de ocorrência em alguns estados brasileiros. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1999. 176p. (Tese, Doutorado em Parasitologia).
- SILVA, W.W., JÚNIOR, M.E.S., ASSIS, L.M., COUTO, E.A. Fauna helmíntica em cães domiciliados no sertão paraibano – Patos/PB. In: *Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 11, Salvador, 1999, p. 171.
- SNEATH, P. H. A., SOKAL, R.R. *Numerical Taxonomy*. Principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman, 1973, 573 p.
- SOERIPTO, N., LOEHOERI, S. et al. Studies on the prevalence of hookworms in the dog's intestine and the pathology of the intestinal wall. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v.9, n.2, p.237-243, 1978.
- STEVENSON, L.A., CHILTON, N.B., GASSER, R.B. Differentiation of *Haemonchus placei* from *H. contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) by the ribosomal DNA second internal transcribed spacer. *Int. J. Parasitol.* v.25, p.483-488, 1995.
- STEWART, L. Taxonomy of hookworms of the genus *Ancylostoma* in the Townsville regions. Australia: James Cook University, 1994. (MSC thesis)
- STOLL, N.R., HAUSHEER, W.C. Concerning two options in dilution egg counting: small drop and displacement. *Am. J. Hyg.*, v.6, p.134-145, 1926.
- STONE, W.M., PECKHAM, J.C. Infectivity of *Ancylostoma caninum* larvae from canine milk. *Am.J.Vet.Res.*, v.31, p.1693-1694, 1970.
- VAN BELKUN, A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.7, p.174-184, 1994.
- VARGAS, R., CONTRERAS, R. Intestinal helminthoses in street dogs (*Canis familiaris*) captured in the metropolitan area of San Jose, Costa Rica. *Ciênc. Vet. (Heredia)*, v.21, n.1, p.43-45, 1998.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., RICKLING, S., SCHNIEDER, T., Improved in vitro cultivation of larvae of the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. *Parasitol. Res.*, v.84, n.8, p.682-684, 1998.
- WACHIRA, T.M., SATTRAN, M., ZEYHLE, E., NJENGA, M.K., Intestinal helminths of public health importance in dogs in Nairobi. *East Afr. Med. J.*, v.70, n.10, p.617-619, 1993.
- WELLS, H.S. Observations on the blood sucking activities of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *J. Parasitol.*, v.17, p. 167-182, 1931.

- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K., HANAFEY, M.K., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzimol.*, v.218, p.704-740, 1993.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- YOUNG, F.C., MING, M.K. Survey for endoparasitic zoonoses in stray dogs and cats in taipei city. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.*, p.26-33, 1997.
- YUANQING, Y., SHUHUA, X., HAINAN, R., et al. Cutaneous and subcutaneous granulomata formation in mice imunonized and challenged with third stage infective hookworm. *Acta Trop.*, v.69, n.3, p.229-238, 1998.
- ZAGO FILHO, H., BARRETO, M.P. Estudo sobre a prevalência e intensidade de infestação por helmintos intestinais em cães e gatos de Ribeirão Preto, SP. *Rev.Bras. Malariol. Doenças Trop.*, v.9, n.2, p.295-304, 1957.
- ZARLENGA, D.S. Advances in parasite control through biotechnology. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.204, n.10, p.1616-1621, 1994.
- ZEDER, J.G.H. Erster Nachtrag zur naturgeschichte der eingerweidewürmer, mit zuzätz und anmerkungrn herausgegeben. *Leipzig*, p.74-75, 1800.