

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Celi Da Silva Medeiros

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO ALBENDAZOL EM UMA CEPA DE
Ancylostoma ceylanicum SELECIONADA EM MODELO EXPERIMENTAL:
integração de abordagens fenotípicas e genotípicas**

Belo Horizonte

2022

Celi Da Silva Medeiros

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO ALBENDAZOL EM UMA CEPA DE
Ancylostoma ceylanicum SELECIONADA EM MODELO EXPERIMENTAL:
integração de abordagens fenotípicas e genotípicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Doutora em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Orientação: Prof.^a Dr.^a Élide Mara Leite Rabelo

Coorientação: Prof. Dr. Luis Fernando Viana Furtado

Belo Horizonte
2022

043

Medeiros, Celi da Silva.

Caracterização da resistência ao Albendazol em uma cepa de *Ancylostoma ceylanicum* selecionada em modelo experimental: integração de abordagens fenotípicas e genotípicas [manuscrito] / Celi da Silva Medeiros. – 2022.

102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Élide Mara Leite Rabelo. Coorientação: Prof. Dr. Luis Fernando Viana Furtado.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Ancylostoma*. 3. Resistência a Medicamentos. 4. Benzimidazóis. 5. Albendazol. 6. Tubulina (Proteína). I. Rabelo, Élide Mara Leite. II. Furtado, Luis Fernando Viana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

TESE 337/2022/08

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO ALBENDAZOL EM UMA CEPA DE ANCYLOSTOMA CEYLANICUM SELECIONADA EM MODELO EXPERIMENTAL: INTEGRAÇÃO DE ABORDAGENS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS"

ALUNA: CELI DA SILVA MEDEIROS

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e seis de outubro de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Artur Kanadani Campos

UFV

Cristiana Ferreira Alves de Brito

FIOCRUZ-Minas

Lívio Costa Júnior

UFMA

Felipe Bisaggio Pereira

UFMG

Luis Fernando Viana Furtado - Coorientador

UFMG

Élida Mara Leite Rabelo - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Élida Mara Leite Rabelo, Vice diretor(a)**, em 26/10/2022, às 17:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luis Fernando Viana Furtado, Professor do Magistério Superior**, em 26/10/2022, às 17:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Bisaggio Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 26/10/2022, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Artur Kanadani Campos, Usuário Externo**, em 26/10/2022, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livio Martins Costa junior, Usuário Externo**, em 26/10/2022, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiana Ferreira Alves de Brito, Usuária Externa**, em 26/10/2022, às 17:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1789470** e o código CRC **33C9E12A**.

Referência: Processo nº 23072.257696/2022-10

SEI nº 1789470

Criado por [sumarapg](#), versão 2 por [sumarapg](#) em 27/09/2022 10:38:52.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – APQ-01289-21 e APQ-02273-21).

AGRADECIMENTOS

Obrigada ao meu Deus sempre presente em minha vida, iluminando, guiando, protegendo, me enchendo de energia, saúde, e permitindo que eu chegasse até aqui. Ele sabe de minha origem, como esse sonho parecia impossível.

Agradecimentos à minha família, mãe Margarida, irmãos Maurício, Celma, Waldir, Walter e Cibele. Agradeço ao meu esposo Medeiros e meus filhos Nathália e Eduardo, meus orgulhos.

Agradeço a professora Dra Élide Rabelo, pela orientação, por acreditar que eu seria capaz apesar das minhas dificuldades. Obrigada por respeitar os meus limites, pela paciência, dedicação, presença assídua, disponibilidade, bom humor e convivência harmoniosa nesses seis anos de mestrado e doutorado.

Muita grata a você professor Dr Fernando Furtado, pela coorientação deste projeto, pelo aprendizado, paciência, disponibilidade, carinho e amizade. Espero que você tenha muito sucesso em sua vida profissional e pessoal, você já é um vencedor. A UFMG tem muito a ganhar com o seu conhecimento, paciência e dedicação na arte de ensinar.

Obrigada aos meus colegas de laboratório, Vivian que me ensinou muito sobre ciência e sobre a vida. Sucesso para você amiga. Obrigada Talita, doçura de menina, prestativa, bem-humorada, inteligente, sempre disposta a ajudar e ensinar. Você vai longe, com certeza. Obrigada aos novos companheiros de laboratório João, Carol e Lucas, toda sorte do mundo para vocês, Deus ilumine suas trajetórias.

Obrigada aos amigos e colaboradores professor Dr Guilherme Miranda e Dra Lara Ribeiro, a ajuda de vocês foi muito importante para concretização deste trabalho.

Obrigada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, e a todos os professores que compartilharam os seus conhecimentos e experiências, amizade, vocês são diferenciados, nota 1000.

Agradecimento especial às secretárias do Programa de Pós-Graduação Sumara e Sibebe, por serem sempre tão comprometidas. Obrigada Sumara por todos esses anos de ajuda, conversas, orientações, palavras de incentivo, muito obrigada por ser sempre gentil, prestativa e profissional. A Sibebe, por todo apoio e atenção, boa vontade, e essa alegria que só transmite coisas boas. Vocês fazem a diferença para todos os alunos e para o programa.

Muito obrigada ao Gesner Francisco, coordenador da Biblioteca J. Baeta Vianna, que me auxiliou na formatação deste trabalho, e a todos que conviveram comigo nestes últimos anos e contribuíram direta ou indiretamente para a conquista deste título.

“Sem esmorecer para não desmerecer.”
(Oswaldo Cruz)

RESUMO

Os geo-helminthos representam um grave problema para a saúde humana e animal em diferentes partes do mundo. O nematódeo zoonótico que infecta canídeos e felídeos, *Ancylostoma ceylanicum*, tem se apresentado altamente endêmico entre humanos, compreendendo a segunda espécie de ancilostomídeo mais comum em muitas partes do mundo. Uma das formas indicadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como estratégia de controle das geo-helminthoses é o tratamento periódico em massa com compostos benzimidazólicos. Todavia, essa estratégia leva ao estabelecimento de cepas resistentes ao tratamento em várias espécies de nematódeos, por meio de seleção de genótipos com perfil para resistência a esse grupo de fármacos. Em nematódeos de ruminantes já é bem estabelecido a relação entre resistência aos benzimidazóis e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1. Entretanto, não há confirmação desse mecanismo para nematódeos que infectam humanos e canídeos. O objetivo desse trabalho foi selecionar por pressão seletiva, usando o fármaco albendazol, uma cepa resistente de *A. ceylanicum* em modelo experimental e posterior caracterização fenotípica e genotípica, bem como avaliar a presença de resistência cruzada entre a cepa selecionada com medicamentos de outras classes. A cepa foi selecionada com sucesso por meio de passagens seriadas de infecção em hamsters, seguidas de tratamento com doses crescentes do fármaco. O sequenciamento para as regiões dos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 demonstrou uma correlação altamente significativa entre a frequência do SNP no códon 198 e o aumento da concentração do fármaco. Também com o aumento da dose do fármaco foi detectado um novo SNP para o códon 200, já descrito para parasitos de ruminantes, mas nunca descrito para nematódeos infectando humanos. Testes foram realizados para verificação da resistência cruzada, utilizando os fármacos albendazol, mebendazol, ivermectina e nitazoxanida. Os resultados encontrados demonstraram somente a existência de resistência lateral entre os fármacos analisados. Na comparação das infecções entre as cepas selvagem e resistente ao albendazol não foi verificada diferença significativa nos aspectos patogênicos entre os dois grupos, mas o número de vermes recuperados foi maior na cepa selvagem, revelando sua melhor adaptação ao hospedeiro. O comprimento total dos vermes da cepa resistente foi maior em relação à cepa selvagem, resultado possivelmente devido a um maior número de vermes, sobreviventes nos animais infectados com a cepa selvagem (efeito “crowding”). Os resultados aqui encontrados sugerem fortemente a associação de alterações em códons do gene codificador da proteína β -tubulina com os mecanismos de resistência aos benzimidazóis, em ancilostomídeos, a exemplo do que já foi demonstrado para parasitos de ruminantes.

Palavras-chave: *Ancylostoma ceylanicum*; resistência; benzimidazóis; albendazol; β -tubulina.

ABSTRACT

Geohelminths represent a serious problem for human and animal health in different parts of the world. The zoonotic nematode that infects canids and felids, *Ancylostoma ceylanicum*, has been highly endemic among humans, comprising the second most common hookworm species in many parts of the world. One of the ways indicated by the World Health Organization (WHO) as a strategy to control geohelminths is the periodic mass treatment with benzimidazole compounds. However, this strategy leads to the establishment of treatment-resistant strains in several nematodes, through the selection of genotypes with a profile for resistance to this line of drugs. In ruminant nematodes, the relationship between resistance to benzimidazoles and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in codons 167, 198 and 200 of the β -tubulin isotype 1 gene is well established. However, there is no confirmation of this mechanism for nematodes that infect humans. and canids. The objective of this work was to select by selective pressure, using the drug albendazole, a resistant strain of *A. ceylanicum* in an experimental model and subsequent phenotypic and genotypic characterization, as well as evaluating the presence of cross-resistance between the selected strain and drugs from other classes. The strain was successfully selected through serial passages of infection in hamsters, with increasing doses of the drug, followed by treatment. Sequencing of the regions of codons 167, 198 and 200 of the isotype 1 β -tubulin gene demonstrated a highly significant correlation between the frequency of the SNP at codon 198 and the increase in drug concentration. Sequencing also revealed an increase in the frequency of the mutated allele at codon 198 directly proportional to the number of passages of the resistant strain, with increasing drug concentration. Also with this increase in the drug dose, a new SNP was detected for codon 200, already described for ruminant parasites, but never described for nematodes infecting humans. Tests were performed to verify cross-resistance, using the drugs albendazole, mebendazole, ivermectin and nitazoxanide. The results found only demonstrated the existence of lateral resistance among the analyzed drugs. In the comparison of infections between the susceptible and resistant strains to albendazole, no significant difference was observed in the pathogenic aspects between the two groups, but the number of worms recovered was higher in the wild strain, revealing its better adaptation to the host. The total length of the worms of the resistant strain was greater in relation to the wild strain, a result probably due to the greater number of worms present in the host, over the wild strain. The results found here strongly suggest the association of alterations in codons of the gene encoding the Beta-tubulin protein with the mechanisms of resistance to benzimidazoles in hookworms, as has already been demonstrated for ruminant parasites.

Keywords: *Ancylostoma ceylanicum*; Drug resistance; Benzimidazoles; Albendazole; β -tubulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Dados mundiais com número de crianças que requerem quimioterapia preventiva para helmintoses transmitidas pelo solo em 2019 (OMS, 2020)	18
Figura 02: Ciclo de vida dos ancilostomídeos	20
Figura 03: Modo de ação dos benzimidazóis	24
Figura 04: Sequência ilustrativa para obtenção da cepa de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> resistente ao albendazol	35
Figura 05: Representação dos primers nas reações de PCR para amplificação de partes do gene da β -tubulina isotipo 1 do <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	39
Figura 06: Roteiro ilustrativo do teste de fertilidade das fêmeas em comparação das cepas de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> selvagem e resistente ao albendazol	44
Figura 07: Roteiro ilustrativo do teste de eclodibilidade para comparação das cepas de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> selvagem e resistente ao albendazol	45
Figura 08: Sequência ilustrativa do roteiro para verificação da resistência cruzada	47
Figura 09: Cromatogramas dos sequenciamentos dos códons 167, 198 e 200 para a cepa resistente de <i>A. ceylanicum</i>	51
Figura 10: Exemplos de estruturas morfológicas que foram medidas na comparação de vermes das cepas selvagem e resistente ao ABZ do <i>A. ceylanicum</i>	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01: Evolução da presença de polimorfismos (SNPs) para o códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> durante procedimentos para obtenção da cepa resistente ao albendazol	50
Gráfico 02: Comparação do Eritrograma entre os grupos infectados com a cepa selvagem e resistente de <i>A. ceylanicum</i> e o grupo controle não infectado	53
Gráfico 03: Comparação da dosagem de ferro sérico entre os grupos infectados com a cepa selvagem e resistente de <i>A. ceylanicum</i> e o grupo controle não infectado.....	54
Gráfico 04: Comparação da dosagem de proteínas totais entre os grupos infectados com a cepa selvagem e resistente de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> e o grupo controle não infectado	55
Gráfico 05: Comparação do teste de eclodibilidade de larva de <i>A. ceylanicum</i> da cepa selvagem e resistente ao albendazol em diferentes concentrações do fármaco	55
Gráfico 06: Comparação da taxa de fertilidade em 24 horas das fêmeas recuperadas dos grupos das cepas de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> selvagem e resistente ao albendazol	56
Gráfico 07: Comparação da massa individual dos grupos infectados com a cepa selvagem e resistente de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> e grupo controle não infectado, durante o período de 28 dias da infecção.....	57
Gráfico 08: Comparação do comprimento do intestino delgado dos hamsters entre os grupos infectados com a cepa de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> selvagem e resistente ao albendazol e o grupo controle não infectado.....	58
Gráfico 09: Quantificação de ovos por grama de fezes (OPG) durante infecção para comparação da infecção entre as cepas selvagem e resistente ao albendazol.....	59
Gráfico 10: Comparação do número de vermes recuperados entre as cepas de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> selvagem e resistente ao albendazol	61
Gráfico 11: Média do número de vermes adultos recuperados por hamster em cada grupo nas cepas selvagem e resistente de <i>A. ceylanicum</i> em teste para avaliação de resistência cruzada ao albendazol	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Publicações de autores que identificaram a presença de <i>A. ceylanicum</i> em humanos.....	22
Quadro 02: Iniciadores utilizados para amplificação do gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>A. ceylanicum</i> , temperaturas de anelamento e amplicon esperado	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Quantitativo de parasitos recuperados durante os ciclos de infecções e tratamentos sucessivos para obtenção da cepa de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> resistente ao albendazol.....	49
Tabela 02: Análise morfométrica dos vermes recuperados da comparação de infecção das cepas selvagem e resistente de <i>A. ceylanicum</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ABZ	Albendazol
Annita	Nitazoxanida
BZ	Benzimidazol
CARS	Consórcio para Resistência e Suscetibilidade ao Anti-Helmíntico, do inglês “Consortium for Anthelmintic Resistance and Susceptibility”
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CTRL:	Controle
DALY	Anos de vida perdidos ajustado por incapacidade, do inglês “disability adjusted life years”
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”
DPI	Dias pós-infecção
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês “Ethylenediaminetetra Acetic Acid”
EHT	Teste de eclodibilidade de larva, do inglês “Egg Hatch Test”
FECRT	Teste de redução de contagem de ovos nas fezes, do inglês “Faecal Egg Count Reduction Test”
G	Guanina
L1	Larva de primeiro estágio
L3	Larva de terceiro estágio
MBZ	Mebendazol
MDA	Administração de droga em massa, do inglês “Mass Drug Administration”
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Ovos por grama de fezes
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salina, do inglês “Phosphate Buffered Saline”
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”
PEG	Polietilenoglicol

pH	Potencial de hidrogênio
Phe	Fenilalanina, do inglês “Phenylalanine”
PM	Peso molecular
qPCR	PCR em tempo real, do inglês “real time – Polymerase Chain Reaction”
RDW	Distribuição da largura das células vermelhas, do inglês “Red blood cell Distribution Width”
RFLP-PCR	Polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição – reação em cadeia da polimerase, do inglês “restriction fragment length polymorphism – polymerase chain reaction”
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”
SDS	Duodecil sulfato de sódio, do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate”
SmartAmp2	Processo de amplificação inteligente, do inglês “Smart Amplification Process”
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês “Single Nucleotide Polymorphism”
STH	Helminth transmitido pelo solo, do inglês “Helminth Transmitted by Soil”
T: Timina	Tirosina, do inglês “Tyrosine”
TAE	Tris/acetato/EDTA
TBE	Tris/ácido bórico/EDTA
Tris-HCL	Tris hidrocloreto
Tyr	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Os ancilostomídeos	17
1.2 Os Benzimidazóis (BZs)	23
1.3 Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos benzimidazóis ..	25
1.4 Resistência ao tratamento em ancilostomídeos	26
1.5 Resistência cruzada anti-helmíntica	28
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Considerações éticas	33
4.2 Seleção da cepa de <i>A. ceylanicum</i> resistente ao albendazol	33
4.2.1 Infecção de hamsters com <i>A. ceylanicum</i>	36
4.2.2 Quantificação de ovos pelo método de Gordon e Whitlock (OPG).....	36
4.2.3 Preparo coprocultura e recuperação de larvas.....	36
4.2.4 Eutanásia, necrópsia e recuperação de vermes adultos.....	37
4.2.5 Extração de DNA do nematódeo <i>A. ceylanicum</i>	37
4.2.6 Reações de PCR (polymerase chain reaction).....	38
4.2.7 Purificação do DNA	40
4.2.8 Sequenciamento das amostras	41
4.3 Comparação de cepas Selvagem e Resistente.....	42
4.3.1 Infecção dos grupos.....	42
4.3.2 Quantificação de ovos pelo método de Gordon e Whitlock.....	42
4.3.3 Aferição da massa corporal.....	40
4.3.4 Coleta de sangue, eritrograma e dosagens bioquímicas.....	42
4.3.5 Eutanásia, necrópsia e recuperação de vermes adultos.....	43
4.3.6 Comparação da taxa de fertilidade das cepas Selvagem e Resistente	43
4.3.7 Teste de eclodibilidade de larvas	44
4.3.8 Análise morfológica dos vermes adultos de <i>A. ceylanicum</i>	45
4.4 Verificação da presença de resistência cruzada ou lateral	46
4.5 Análise estatística.....	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Seleção da cepa resistente ao albendazol do nematódeo <i>A. ceylanicum</i>	48
5.2 Varredura de Polimorfismos de Nucleotídeo Único.....	49
5.3 Comparação entre as infecções com as cepas Selvagem e Resistente	52
5.3.1 Análise do eritrograma.....	52
5.3.2 Dosagens de Ferro sérico e Proteínas totais.....	54
5.3.3 Teste de Eclodibilidade de Larvas (EHT).....	55
5.3.4 Taxa de Fertilidade das fêmeas.....	56
5.3.5 Comparação da massa dos hamsters dos grupos Controle e dos grupos infectados com as cepas de <i>A. ceylanicum</i> Selvagem e Resistente ao ABZ	57
5.3.6 Comprimento do intestino delgado	57
5.3.7 Estimativa da carga parasitária	58
5.3.8 Recuperação de vermes no experimento de comparação de infecção com as cepas de <i>A. ceylanicum</i> Selvagem e Resistente ao ABZ	60

<i>5.3.9 Análises morfométricas</i>	61
5.4 Verificação da presença de Resistência Cruzada	64
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE A – PRODUÇÕES RESULTANTES DA EXECUÇÃO DA TESE	91
APÊNDICE B – COLABORAÇÕES RESULTANTES DA EXECUÇÃO DA TESE	93
ANEXO A – CERTIFICADO CEUA/UFMG	96
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DA PATENTE	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os ancilostomídeos

Os ancilostomídeos estão inclusos no Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Superfamília Strongyloidea e Família Ancylostomatidae (ZHANG, 2013). Atualmente existem descritas mais de 100 espécies de ancilostomídeos, que têm como hospedeiros definitivos canídeos, felídeos e humanos, dependendo da espécie do parasito (HOTEZ *et al.*, 2006). Dentre as principais espécies, destacam-se *Necator americanus* (Stiles 1902), *Ancylostoma braziliense* (Faria 1909), *A. caninum* (Ercolani 1859), *A. ceylanicum* (Looss 1911) e *A. duodenale* (Dubini 1943).

Assim como a ascaridose e a tricurose, a ancilostomose é considerada uma geo-helminiose, o que implica dizer que o agente etiológico dessas doenças é um helminto que necessita de uma fase de desenvolvimento no solo (BETHONY *et al.*, 2006). Essas doenças estão entre as principais doenças negligenciadas em todo mundo. As infecções estão amplamente distribuídas nas áreas tropicais e subtropicais, sendo que a maior prevalência ocorre na África subsaariana, na China, nas Américas, no Pacífico e Ásia Oriental. Nestas regiões, mais de 270 milhões de crianças em idade pré-escolar e mais de 600 milhões de crianças em idade escolar vivem em áreas onde estes parasitos são intensamente transmissíveis, e necessitam de tratamento e intervenções preventivas (OMS, 2018).

A OMS estima que aproximadamente 1,5 bilhões de pessoas, ou 24% da população mundial, estão infectadas por um ou mais desses geo-helminios. No ano de 2010 os ancilostomídeos mais comumente relatados (*A. duodenale* e *N. americanus*) infectaram, com base em inquéritos coproparasitológicos, aproximadamente 470 milhões de pessoas em todo mundo, mais da metade dessas infecções ocorrendo na Ásia e no Pacífico (TRAUB, 2013; PULLAN *et al.*, 2014; AULA *et al.* 2020; STRACKE *et al.*, 2020).

No Brasil, um inquérito nacional da Fiocruz sobre a Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminioses, coordenado por Naftale Katz, realizado entre os anos de 2010 e 2015, com escolares de 521 municípios brasileiros relatou que 2,73% (5192) da população estudada estava infectada por ancilostomídeos (KATZ, 2018).

Os geo-helminios intestinais em geral provocam grandes morbidades em seus hospedeiros, podendo causar desconforto e dor abdominal, náuseas, mal-estar, tontura, fraqueza, baixo desenvolvimento corporal, prejuízo cognitivo, anemia e nos casos mais graves

pode levar à morte (OMS, 2018). Segundo a OMS (2020), em alguns países de áreas endêmicas, mais de 100 milhões de crianças necessitam de quimioterapia preventiva para geo-helmintos, como pode ser observado na Figura 1.

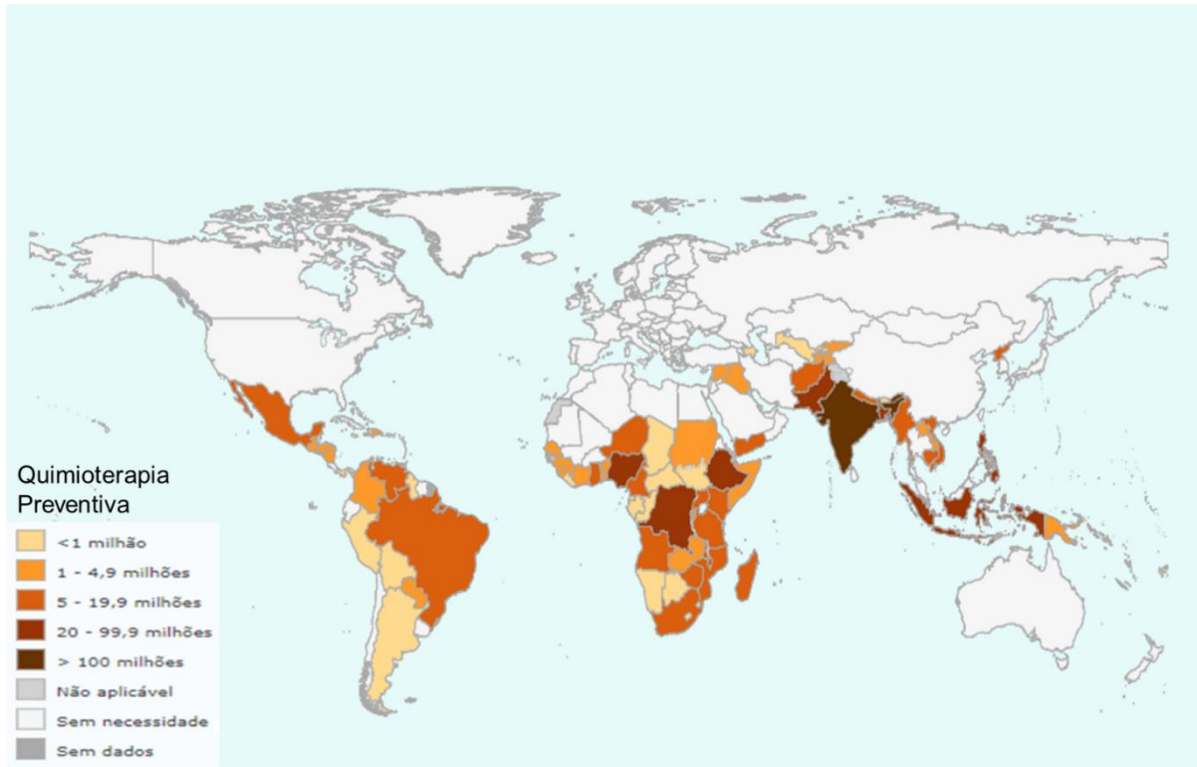


Figura 01: Dados mundiais do ano de 2019 do número de crianças que requerem quimioterapia preventiva para geo-helmintoses. Quanto mais escura a cor do mapa, maior é o número de crianças que requerem quimioterapia preventiva, variando de regiões sem necessidade a mais de 100 milhões de crianças (OMS, 2020).

As duas espécies de ancilostomídeos antropofílicos mais comumente relatadas parasitando o intestino delgado de humanos são *N. americanus* e *A. duodenale* (BETHONY *et al.*, 2006; PHOSUK *et al.*, 2013; STRACKE *et al.*, 2020). As espécies zoonóticas *A. ceylanicum*, *A. caninum* e *A. braziliense* parasitam o intestino delgado de canídeos e felídeos, mas também podem infectar humanos. As espécies *A. braziliense* e *A. caninum* podem causar inflamação eritematosa e pruriginosa na derme, síndrome da larva *migrans* cutânea, conhecida popularmente como bicho geográfico, sendo que *A. caninum* pode ainda causar enterite eosinofílica no homem, uma infiltração intensa e segmentar principalmente no intestino delgado (KOIKE, 1960; HASSLINGER, 1986; PROCIV, P.; CROESE, J., 1996). Destas três últimas espécies que apresentam caráter zoonótico e podem infectar o homem, apenas *A. ceylanicum* era considerado capaz de desenvolver o ciclo e se tornarem sexualmente maduros em humanos (BETHONY *et al.*, 2006; PHOSUK *et al.*, 2013; TRAUB, 2013), porém relatos

pontuais recentes têm demonstrado que *A. caninum* pode causar infecções patentes em humanos (NGCAMPHALALA *et al.*, 2019; FURTADO *et al.*, 2020).

O homem adquire a ancilostomose de duas formas: penetração ativa na pele da larva filarioide (L3) em contato com o solo ou vegetação contaminados, ou através da ingestão destas larvas, presentes em água e alimentos contaminados. Quando as L3 infectam o hospedeiro através da penetração ativa na pele, estas invadem a circulação sanguínea e são carregadas para o coração e pulmões. Nos pulmões penetram nos alvéolos, migram pela árvore brônquica e traqueia, chegando até a faringe, onde podem ser expelidas com a expectoração ou ingeridas, chegando ao intestino delgado, se desenvolvem em adultos jovens e posteriormente ancilostomídeos em fase adulta, aproximadamente após 14 dias pós infecção inicia a eliminação de ovos. Os ovos não embrionados são eliminados nas fezes do hospedeiro, as condições favoráveis de temperatura, umidade e luminosidade determinam o desenvolvimento larval, a larva L1 rhabditóide eclode no ambiente e se desenvolve até larva L3 filarióide, forma infectante (SOULSBY, 1965). Helmintos do gênero *Ancylostoma* também podem ser adquiridos através da ingestão das L3. Quando adquirido por via oral, o parasito não realiza ciclo pulmonar e sofre as mudas no próprio intestino delgado, dando origem ao verme adulto, como é o caso da infecção experimental de *A. ceylanicum* em hamsters da espécie *Mesocricetus auratus* (SOULSBY, 1965). Na Figura 2 é representado o ciclo de vida dos ancilostomídeos.

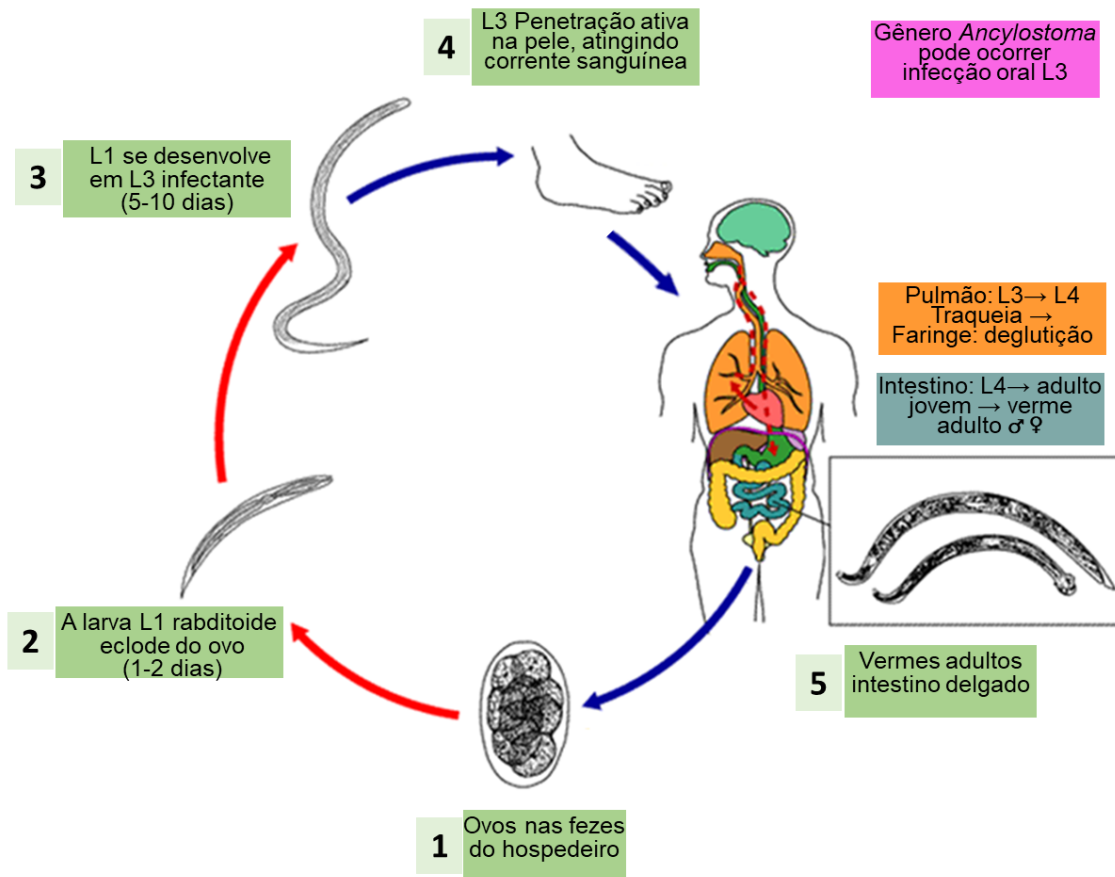


Figura 2: Ciclo de vida dos ancilostomídeos. 01: ovo embrionado; 02: larva rabditoide L1 eclode do ovo; 03: larva filarioide L3; 04: infecção ativa por L3; 05: vermes adultos no intestino delgado. (adaptado de <https://www.cdc.gov/dpdx/hookworm/index.html>).

Em décadas anteriores aos anos 2000, as infecções em humanos por ancilostomídeos eram atribuídas ao *N. americanus* e *A. duodenale*, suposição essa baseada na morfologia indistinguível de ovos nas fezes e a ausência de conhecimento de uma terceira espécie de ancilostomídeo zoonótico, o *A. ceylanicum* (AULA *et al.*, 2020). O avanço em ensaios diagnósticos e uso ampliado da biologia molecular para diferenciar infecções por espécies de ancilostomídeos indicou o *A. ceylanicum* como altamente endêmico, compreendendo a segunda espécie mais comum, depois de *N. americanus*, no Sudeste Asiático e Pacífico, estima-se que essa espécie infecte aproximadamente 100 milhões de pessoas em áreas endêmicas (TRAUB, 2013; STRACKE, 2020). Estudos recentes relatam o alto índice de infecções por *A. ceylanicum* em cães, gatos domésticos e humanos que compartilham o mesmo ambiente em áreas endêmicas no nordeste da Índia, Mianmar, Malásia, Laos, Indonésia, Sri Lanka, Taiwan, Japão, província de Fujian na China, nas Filipinas, Ilhas Salomão, Austrália, extremo oeste de Serra Leoa, Madagascar, Camboja, Tailândia, Suriname, Guiana, Bangkok e Emirados Árabes Unidos (TRAUB, 2013; STRACKE *et al.*, 2020).

Infecções em humanos pelo nematódeo zoonótico *A. ceylanicum* vêm sendo identificadas e relatadas com frequência, em algumas publicações essas infecções apresentam proporções relativamente altas (STRACKE *et al.*, 2020). Com o aprimoramento nas técnicas de diagnóstico, principalmente com utilização da biologia molecular para identificação das espécies, as infecções que anteriormente eram consideradas raras, hoje são consideradas problemas de saúde pública e motivo de preocupação para pesquisadores e governantes. Infecções pelo *A. ceylanicum* têm sido diagnosticadas em áreas endêmicas para helmintos transmitidos pelo solo e já foram descritos casos individuais de viajantes, que foram contaminados em áreas endêmicas e diagnosticados quando retornaram a sua cidade de origem, o que tem provocado a disseminação dos nematódeos para diversas localidades (AULA *et al.*, 2020; STRACKE *et al.*, 2020).

No Quadro 1 é apresentado o resultado de alguns trabalhos realizados entre os anos de 2008 e 2021 que, com o auxílio do diagnóstico molecular, pesquisadores detectaram em humanos, infecção pelo nematódeo zoonótico *A. ceylanicum*.

Quadro 01: Publicações de autores que identificaram a presença de *A. ceylanicum* em humanos.

Autor	Ano	Local da pesquisa	Tipo de diagnóstico	Prevalência	Nematódeo				
Traub <i>et al.</i>	2008	Bangkok	PCR/RFLP	3,4% 07/204	5/204 <i>Necator</i> 2/204 <i>Acey</i>				
Jiraanankul <i>et al.</i>	2011	Área central da Tailândia	PCR/Sequenciamento	92% 46/50 4% 02/50 2% 01/50 2% 01/50	<i>Necator</i> <i>Acey</i> <i>Aduo</i> <i>Necator + Acey</i>				
Conlan <i>et al.</i>	2012	Norte Laos	PCR/Sequenciamento	82,35% 14/17 17,65% 03/17	<i>Necator</i> <i>Acey</i>				
Nguí <i>et al.</i>	2012a	Malásia	PCR/Sequenciamento	87,2% 41/47	<i>Necator</i>				
	2012b			23,4% 11/47	<i>Acey</i>				
	2013			10,6% 5/47	<i>Necator + Acey</i>				
	2014			Estudo de caso	<i>Acey</i>				
Koehler <i>et al.</i>	2013	Austrália	PCR/Sequenciamento	42% 05/12 33% 04/12 17% 02/12	<i>Necator</i> <i>Aduo</i> <i>Acey</i>				
				Phosuk <i>et al.</i>	2013	Nordeste Tailândia	PCR/Sequenciamento	60% 06/10 30% 03/10 10% 01/10	<i>Necator</i> <i>Acey</i> <i>Aduo</i>
								Sul Tailândia	100% 20/20
Inpankaew <i>et al.</i>	2014	Camboja	PCR/Sequenciamento			51,6% 64/124 51,6% 64/124 3,2% 04/124		<i>Necator</i> <i>Acey</i> <i>Aduo</i>	
				George <i>et al.</i>	2015	Tamil/India	PCR/RFLP	95% 39/41 15% 06/41 5% 02/41	<i>Necator</i> <i>Aduo</i> <i>Acey</i>
								Aung <i>et al.</i>	2017
Bradbury <i>et al.</i>	2017	Ilhas Salomão	PCR/Sequenciamento						
				Papaiakevou <i>et al.</i>	2017	Timor Leste	PCR/RFLP	34,4% 21/61	<i>Acey</i>
						Argentina		100% 08/08	<i>Aduo</i>
O'Connell <i>et al.</i>	2018	Refugiados EUA	PCR/Sequenciamento	25,4% 467/1839	<i>Necator</i>				
		Mianmar, Tailândia		5,4% 99/1839	<i>Acey</i>				
Aula <i>et al.</i>	2020	Filipinas	PCR/Sequenciamento	34,5% 149/432 26,6% 34/128 28,1% 64/228 13,2% 30/228 4% 9/228 4,8% 11/228 4,4% 10/228	<i>Necator</i> <i>Acey</i> <i>Aduo</i> <i>Necator + Aduo</i> <i>Necator + Acey</i> <i>Acey + Aduo</i> <i>Necator + Acey + Aduo</i>				
				Bui <i>et al.</i>	2021	Long An, Vietnã	PCR/RFLP	47,9% 23/48 31,3% 15/48 20,8% 10/48	<i>Necator</i> <i>Acey</i> <i>Necator + Acey</i>

Acey: *Ancylostoma ceylanicum* *Aduo:* *Ancylostoma duodenale* *Necator:* *Necator americanus*

1.2 Os Benzimidazóis (BZs)

Os BZs pertencem a uma classe de anti-helmínticos de amplo espectro, são muito utilizados para tratamento de infecções gastrointestinais por diversos nematódeos, principalmente para os geo-helmintos *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e ancilostomídeos. Possuem baixo custo financeiro, simples esquema posológico, fácil administração (via oral) e ação contra as diferentes formas evolutivas (ovos, larvas, adultos) de nematódeos (BRUNTON *et al.*, 2012). São representados, principalmente, pelas formulações químicas tiabendazol, mebendazol (MBZ) e albendazol (ABZ), os quais apresentam como o principal modo de ação a inibição da polimerização de monômeros de α e β -tubulina em microtúbulos (LACEY, 1988; NOGALES, 2000).

Os BZs se ligam à β -tubulina inibindo a formação de microtúbulos, causando interferência na polimerização da tubulina e desestabilização dos microtúbulos (LACEY, 1988). Os microtúbulos estão em constante polimerização, participam da formação do citoesqueleto, do fuso mitótico e do transporte intracelular. Essas estruturas são formadas por dímeros de α - e β -tubulinas e se mantêm estabilizados com a adição de um dímero da α - β -tubulina num extremo, e a perda de outro dímero no extremo oposto da cadeia (NOGALES, 2000). A ligação do fármaco com a β -tubulina ocorre ao mesmo tempo em que o microtúbulo está perdendo o dímero no lado oposto, o que vai ocasionar o seu encurtamento e desaparecimento. O anti-helmíntico acaba, assim, inibindo uma série de mecanismos celulares, como transporte de proteínas, manutenção da estrutura celular, segregação cromossômica e mitose. Mecanismos secundários de ação dos BZs também já foram descritos, como a inibição da absorção de glicose (KEYSTONE; MURDOCH, 1979), bloqueio da fosforilação oxidativa (JONES; WATSON, 1965), inibição da enzima fumarato redutase mitocondrial (PRICHARD, 1973), o que leva a uma depleção letal de glicogênio, culminando na morte celular (BETHONY *et al.*, 2006; DIAWARA *et al.*, 2009; BRUNTON *et al.*, 2012; WHITTAKER *et al.*, 2017). Na Figura 3 é representado o modo de ação dos BZs na proteína β -tubulina.

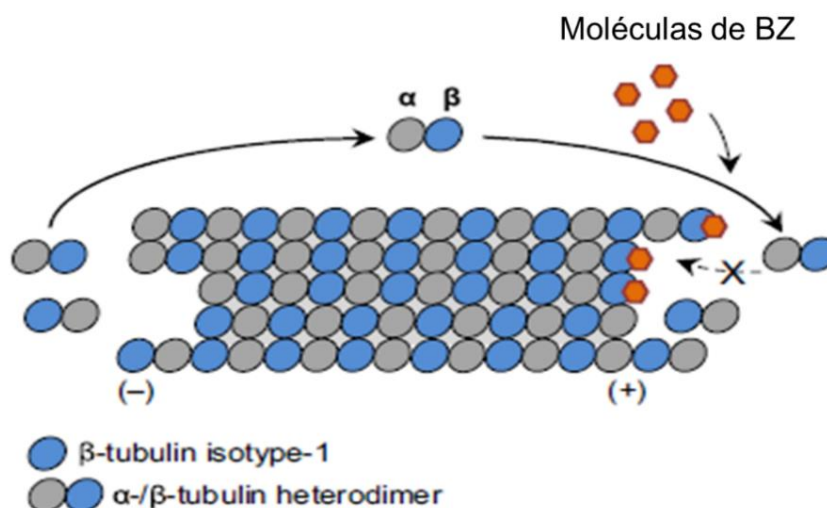


Figura 03: Modo de ação dos benzimidazóis. BZ se liga à β -tubulina impedindo que o dímero α e β -tubulinas se ligue na cadeia de formação dos microtúbulos. (Adaptado de LACEY, 1988; NOGALES, 2000 e WHITTAKER *et al.*, 2017).

A resolução WHA54.19, aprovada em 2001 pela Assembleia Mundial de Saúde, instituiu o programa de administração do tratamento em massa para as populações de regiões endêmicas contra parasitos intestinais, sendo recomendados os fármacos BZs: ABZ (400 mg) ou MBZ (500 mg), administrados em dose oral única (OMS, 2012). Estes medicamentos são utilizados mundialmente em programas de eliminação de vermes para o tratamento de infecções causadas por nematódeos e cestódeos intestinais ou alojados nos tecidos (DEMBELE *et al.*, 2010; SWANSON *et al.*, 2012).

A cobertura de tratamento preventivo com os medicamentos BZs (ABZ e MBZ) para crianças de idade pré-escolar e escolar atingiu 58,64 % da população mundial em 2019, sendo que os fármacos foram administrados para um número aproximado de 777,5 milhões de pessoas; em 2010 essa cobertura era de 30,94% das crianças. A meta da Organização Mundial da Saúde (OMS) é reduzir até 2030 a prevalência de infecção por geo-helminto, através do incremento mundial na distribuição de fármacos para as regiões endêmicas (OMS, 2020; ROOSE *et al.*, 2021).

O programa de desparasitação da OMS tem apresentado resultados positivos em relação às melhores condições de saúde das populações atingidas, porém a administração do tratamento em massa, de uma única classe de fármaco na medicina humana, tem levantado a preocupação pelo surgimento da resistência ao tratamento. Vários estudos nos últimos anos vêm relatando que esse modelo de controle das helmintoses pode selecionar populações resistentes para estes fármacos (HUMPHRIES *et al.*, 2017; ZUCCHERATO *et al.*, 2019; ORR *et al.*, 2019; FURTADO *et al.*, 2019a; ROOSE *et al.*, 2021). A partir dessa pressão seletiva, a população

começa a apresentar uma diminuição da resposta ao tratamento ou até mesmo a perda de efeito do fármaco sobre o parasito, surgindo assim o problema da resistência, que é definida como a diminuição da eficiência do tratamento contra uma população de parasitos que, originalmente, era sensível a esse fármaco (SANGSTER; GILL, 1999; DIAWARA *et al.*, 2009).

1.3 Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos benzimidazóis

A resistência aos BZs é comumente associada a polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1. A trinca TTC presente nos códons 167 e 200 que codifica uma fenilalanina (Phe, TTC) sofre mutação do segundo nucleotídeo para TAC, passando a codificar uma tirosina (Tyr, TAC). A trinca GAG do gene da β -tubulina isotipo 1 no códon 198 que codifica um glutamato (Glu, GAG) sofre mutação do segundo nucleotídeo para GCG e passa a codificar uma alanina (Ala, GCG) (KWA *et al.*, 1994; GHISI *et al.*, 2007).

Vários estudos com nematódeos de animais e humanos já relataram a presença de SNPs relacionados à resistência ao BZs nos códons 167, 198 ou 200 no gene da β -tubulina (BARRÈRE *et al.*, 2013; NICIURA *et al.*, 2012; DIAWARA *et al.*, 2013a). Acredita-se que a presença desses polimorfismos possa alterar a conformação estrutural da proteína β -tubulina, uma vez que com a troca de uma base nitrogenada, o códon passa a codificar um novo aminoácido resultando em alterações moleculares e bioquímicas, impedindo a associação do fármaco com o seu local de ligação. De acordo com Prichard (2007) o fármaco não é considerado um agente mutagênico que provoca a presença do SNP, o seu uso periódico é que pode selecionar indivíduos com o genótipo relacionado à resistência, caso esse polimorfismo esteja presente em uma subpopulação de parasitos, e esses resistam ao tratamento herdando a capacidade de sobrevivência à exposição anti-helmíntica.

Em parasitos de importância veterinária, a resistência ao tratamento é um problema recorrente, a presença de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 e a baixa eficácia dos fármacos já foi correlacionada para os nematódeos gastrointestinais mais importantes, como *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus* spp (BARRÈRE *et al.*, 2013; REDMAN *et al.*, 2015; AVRAMENKO *et al.*, 2020). A alta prevalência de infecção por nematódeos gastrointestinais é uma das restrições econômicas mais importantes na produção pecuária na Europa e possivelmente em todo o mundo (BARRÈRE *et al.*, 2012; RAMÜNKE *et al.*, 2016).

Existem poucos trabalhos que procuram elucidar os mecanismos moleculares relacionados a resistência aos anti-helmínticos em humanos. A presença de polimorfismos associados à resistência já foi detectada para o códon 167 do gene da β -tubulina de *A. lumbricoides* no Haiti, no Quênia e no Panamá por Diawara *et al.* (2009), e por Rashwan *et al.* (2017), no Haiti. Para o códon 200 já foram detectados SNPs para *A. lumbricoides* em um estudo realizado no Brasil (Furtado *et al.* 2019b); para *N. americanus* por Diawara *et al.* (2013a), no Quênia, e por Zuccherato *et al.* (2018) e Furtado *et al.* (2018a) em estudo no Brasil. SNPs para os códons 198 de *N. americanus* foram detectados em amostras do Sri-Lanka, por Rashwan *et al.* (2016), SNPs nos códon 167 e 200 de *N. americanus* foram encontrados por Orr *et al.* (2019) em Gana. Para *T. trichiura* foram encontrados SNPs nos códons 167, 198 e 200 (DIAWARA *et al.*, 2009; DIAWARA *et al.*, 2013a, RASHWAN *et al.*, 2017) em amostras do Quênia, Haiti e Panamá e no códon 198 em amostras do Brasil (MENDES DE OLIVEIRA *et al.*, 2022).

SNPs relacionados à resistência em ancilostomídeos zoonóticos, mas que também infectam humanos, também foram encontrados para o códon 167 de *A. caninum* por Jimenez Castro *et al.* (2021) nos EUA e nos códons 200 de *A. caninum* por Furtado *et al.* (2014) e códon 198 de *A. braziliense* (FURTADO *et al.*, 2018b) em estudos realizados no Brasil. Acredita-se que a baixa sensibilidade observada no tratamento da tricurose com os BZs pode estar associada a presença de SNPs para os três códons do gene da β -tubulina isotipo 1 relacionados à resistência, em *T. trichiura* (DIAWARA *et al.*, 2013a; DIAWARA *et al.*, 2013b; RASHWAN *et al.*, 2016).

1.4 Resistência ao tratamento em ancilostomídeos

A efetividade ou falhas no tratamento antiparasitário para controle dos helmintos parasitos de importância veterinária e humana tem sido investigada em vários trabalhos, como o estudo de Avramenko *et al.*, (2020) que avaliou a presença de nematóides gastrointestinais resistentes ao ABZ em bovinos e bisões norte-americanos e o trabalho de Orr *et al.*, (2019) que avaliou marcadores genéticos de resistência aos BZs entre ancilostomídeos de humanos, em Gana. Resultados positivos relativos ao uso do ABZ divergem de alguns trabalhos que denotam falha no tratamento utilizando diferentes fármacos. Pesquisa realizada por Keiser e Utzinger (2008), em busca sistemática em diferentes bancos de dados, concluiu que a eficácia do ABZ oral de dose única, MBZ e pamoato de pirantel contra infecções por ancilostomídeos em humanos foram de 72%, 15% e 31%, respectivamente.

Em estudo realizado por Humphries *et al.* (2013) em Gana, com crianças em idade escolar no município de Kintampo, relataram que a prevalência de ancilostomose entre a população avaliada foi de 39,1% (109/279), após tratamento com dose única de ABZ (400mg), a taxa de cura foi de apenas 43% (46 de 107). Uma das justificativas na falha do tratamento defendidas por Humphries *et al.* (2017) é que o tratamento profilático é direcionado apenas às crianças, e as taxas de cura modestas reforçam a necessidade de uma investigação mais aprofundada sobre as diretrizes dos programas de desparasitação e dos relatos de resistência ao benzimidazol em Gana.

Estudo realizado por Dunn *et al.* (2019), com crianças em Mianmar, demonstrou que o intervalo de seis meses entre o tratamento em massa em algumas comunidades é tempo suficiente para a infecção de geo-helminthos retornarem aos níveis de prevalência, e quase sempre, os mesmos indivíduos estão sendo constantemente infectados entre as rodadas de tratamento, outras medidas de controle, como saneamento básico e educação em saúde são necessárias para minizar os casos de reinfecções.

Estudo realizado com cães no sul do Brasil, identificou *A. caninum* como resistente ao pamoato de pirantel combinado com praziquantel, bem como ao fenbendazol, o nematódeo foi suscetível à milbemicina oxima com praziquantel. Os resultados deste estudo ressaltam a importância da solicitação do exame coproparasitológico antes e após os tratamentos para avaliar a eficácia dos antiparasitários, garantir a saúde e bem-estar animal e minimizar a exposição dos animais aos fatores de risco (D'AMBROSO FERNANDES *et al.*, 2022).

Os mecanismos moleculares relacionados ao processo de resistência aos BZs em ancilostomídeos ainda não são bem esclarecidos, uma vez que vários estudos que relatam falha de tratamento para esses parasitos não utilizaram métodos moleculares para correlacionar a baixa eficácia dos BZs (AULA *et al.*, 2020). Estudo realizado por O'Connell *et al.* (2018), com refugiados da Tailândia revelou uma baixa eficiência pós-tratamento com ABZ para *N. americanus*, a qual variou de 42%-69%. Os autores discutem que a baixa eficácia do tratamento pode ter sido devido à grande variação no intervalo de tempo entre as três datas de coleta das amostras, antes e após tratamento. Nesse estudo, foi realizada a busca de polimorfismos para os códons 167 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 relacionados à resistência, porém nenhum SNP foi encontrado.

Alguns trabalhos descreveram mutações no gene da β -tubulina isotipo 1 de ancilostomídeos, como os de Diawara *et al.* (2013a) para o códon 200 e Rashwan *et al.* (2016) para o códon 198 de *N. americanus*. Jimenez Castro *et al.* (2021) detectaram mutação no códon 167 de *A. caninum*. Furtado *et al.* (2018b) encontrou mutações nos códons 198 de *A.*

braziliense. Estudo de Schwenkenbecher *et al.* (2007) não relatou mutação no códon 167 e 200 de *N. americanus* em crianças que receberam medicação de forma periódica com falha no tratamento. Schwenkenbecher e Kaplan (2009) analisando o nematódeo *A. caninum* não detectaram qualquer alteração no códon 198. Em pesquisa realizada por Zuccherato *et al.* (2018) em varredura de polimorfismos nos códons 167, 198 e 200 de *A. lumbricoides*, nenhum SNP foi encontrado. Orr *et al.* (2019) encontrou SNPs nos códons 167 e 200 de *N. americanus*, em crianças em idade escolar de Kintampo, Gana.

Furtado *et al.* (2019a) isolou uma cepa resistente ao ABZ de *A. ceylanicum* através de pressão seletiva de tratamento, após infecções sucessivas em modelos experimentais de hamsters. As análises moleculares realizadas não foram capazes de determinar os mecanismos envolvidos no processo de resistência. Os SNPs comumente associados com resistência aos BZs em outros helmintos não foram encontrados no gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa selecionada. Não foi possível a análise do envolvimento de outros mecanismos de resistência nesta cepa, uma vez que ela apresentou baixa adaptabilidade ao hospedeiro, durante sua manutenção, tendo sido perdida após algumas passagens no hospedeiro.

O diagnóstico preciso para a identificação das espécies de geo-helmintos é de extrema importância para a verificação da efetividade da ação de um fármaco. Colella *et al.* (2021) revelaram uma diferença substancial na taxa de cura de infecções por ancilostomose em pessoas numa comunidade do Camboja (80,1% maiores de 12 anos). Após o tratamento com ABZ, exames de fezes utilizando microscopia, 81,5% das amostras apresentaram resultados negativos, quando as amostras foram submetidas ao exame por qPCR, apenas 46,4% das amostras estavam negativas, o que confirma que exames moleculares são mais precisos e confiáveis para diagnósticos e avaliação de cura.

1.5 Resistência cruzada anti-helmíntica

A resistência cruzada acontece quando um organismo é tratado com um tipo de fármaco e é capaz de apresentar resistência a outro produto com mecanismos de ação distintos. Estes relatos já foram descritos para os fármacos levamisol e BZs, em *H. contortus*, *Trichostrongylus* sp. e *Ostertagia* sp. Estudo realizado por Eng *et al.* (2006) destaca que a resistência à ivermectina e a moxidectina (*H. contortus* e *Onchocerca volvulus*) pode estar associada ao gene da β -tubulina (Códon 200 TAC), de maneira que o uso dessas lactonas macrocíclicas pode selecionar nematódeos com SNPs no códon 200 do gene β -tubulina isotipo 1, polimorfismo este associado à resistência aos BZs em nematódeos de importância veterinária e humana. Esta

predisposição do helminto resistente à ivermectina e moxidectina, apresentar a probabilidade de ser resistente também aos BZs requer uma investigação mais aprofundada.

De acordo com Blackhall *et al.* (2008), alguns mecanismos que independem da proteína β -tubulina podem estar relacionados com o processo de resistência aos BZs, e cita alterações nos genes da glicoproteína-P (gp-P), a qual é responsável pelo bombeamento do fármaco para o exterior das células do verme. O aumento dos níveis de gp-P reduz a quantidade de fármaco capaz de atingir seu alvo, diminuindo sua ação. Esse mecanismo pode envolver um aumento da expressão da proteína em células intestinais do helminto, diminuindo o acesso do fármaco para outros tecidos do verme. Wilkinson *et al.* (2012) sugeriram que um SNP no códon 687 de um dos genes da glicoproteína-P está associado à resistência ao triclabendazol em *Fasciola hepatica*.

A resistência anti-helmíntica pode ser classificada como lateral, cruzada ou múltipla. A resistência lateral ocorre quando um organismo apresenta resistência a um fármaco de uma mesma classe de medicamentos, os quais apresentam modo de ação semelhante, como exemplo os fármacos ABZ e MBZ. A resistência cruzada assemelha-se a resistência lateral, porém ocorre entre compostos químicos com diferentes modos de ação. A resistência múltipla ocorre quando há indivíduos em uma população, que são resistentes a dois ou mais anti-helmínticos de diferentes grupos (PRICHARD, 1980; VERA, 2014).

A falha no tratamento dos ancilostomídeos com diferentes fármacos tem demonstrado de forma conclusiva que a resistência anti-helmíntica múltipla é um problema emergente. Jimenez Castro *et al.* (2019) relatou pela primeira vez em um estudo com cães nos EUA, a presença de resistência múltipla aos BZs, lactonas macrocíclicas e pirantel em *A. caninum*, de modo que a maioria das amostras analisadas apresentou SNP no códon 167 do gene da β -tubulina. Esse nematódeo é prevalente em cães galgos, que estão em exposição quase constante a larvas infectantes de terceiro estágio nos exercícios de corrida, e são tratados com grande frequência com diferentes anti-helmínticos, em curtos intervalos de tempo, o que acaba exercendo forte pressão de seleção para resistência aos medicamentos, semelhante aos fatores epidemiológicos que levaram a altos níveis de resistência a múltiplos fármacos em nematódeos de pequenos ruminantes em todo o mundo.

D'Ambroso Fernandes *et al.* (2022) em uma avaliação parasitológica de 38 cães (Brasil), com o objetivo de identificar helmintos resistentes a antiparasitários e avaliar a eficácia anti-helmíntica, detectou uma população de *A. caninum* resistente ao pamoato de pirantel em associação com os fármacos praziquantel e fenbendazol. O autor também concluiu que cães sem raça definida que habitam ambientes contendo solo ou grama foram mais propensos a

serem infectados em comparação com cães de raça pura que residem em ambientes impermeáveis. Os resultados deste estudo revelam a importância do acompanhamento coparasitológico pelos profissionais antes e após os tratamentos para avaliar a eficácia dos antiparasitários e minimizar a exposição desnecessária dos animais aos anti-helmínticos, o que favorece a seleção por pressão para parasitos multirresistentes.

2 JUSTIFICATIVA

A ancilostomose é uma das parasitoses que está entre as infecções mais comuns e negligenciadas em todo o mundo, afetando as comunidades mais pobres e desfavorecidas. Apesar dos programas de controle para esta helmintose, como o tratamento profilático com administração em massa dos fármacos do grupo dos BZs (ABZ e MBZ) e melhorias nas condições de acesso à saúde pública e saneamento básico, o índice de infecção por esses parasitos ainda é muito elevado.

Estudos recentes evidenciaram que a infecção zoonótica pelo *A. ceylanicum* em humanos está se tornando cada vez mais comum entre países de áreas endêmicas, especialmente aqueles onde as pessoas convivem com cães ou gatos. A implementação de medidas de controle eficazes para infecções por ancilostomídeos deve considerar seriamente essa implicação zoonótica. A espécie *A. ceylanicum* se constitui em um ótimo modelo para estudo em laboratório, uma vez que é possível reproduzir satisfatoriamente a infecção em hamsters, obtendo resultados semelhantes à patogenia provocada em humanos.

É possível que o tratamento periódico em massa resulte na seleção de cepas de ancilostomídeos resistentes, uma vez que falhas no tratamento contra esses helmintos já foram descritas tanto em animais quanto em humanos. Estudos atuais já relataram a baixa eficácia do tratamento contra ancilostomídeos, porém a presença de SNPs relacionados à resistência quase sempre apresenta baixa frequência em populações que não responderam ao tratamento, o que pode sugerir a participação de outros mecanismos moleculares envolvidos no processo. Além disso, em pesquisas recentes do nosso grupo, uma cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol foi selecionada *in vivo*, todavia, o sequenciamento completo do gene do isotipo 1 da β -tubulina não apresentou SNPs significativos, que já são associados com resistência para outras espécies de nematódeos.

Portanto, existe uma lacuna relativa aos mecanismos de resistência aos benzimidazóis para diversos nematódeos que infectam humanos. Diferentemente de nematódeos de ruminantes, como a espécie *H. contortus*, que apresenta vários isolados resistentes aos benzimidazóis, não existem isolados naturalmente resistentes, para as espécies de ancilostomídeos. Dessa forma a obtenção de uma cepa resistente aos benzimidazóis é de extrema importância para a caracterização desses mecanismos em espécies tão importantes para a saúde humana e animal. Os dados moleculares obtidos poderão auxiliar nos métodos profiláticos para controle da ancilostomose envolvendo o desenvolvimento de novas formulações anti-helmínticas direcionadas a diferentes alvos moleculares do parasito.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter uma cepa de *Ancylostoma ceylanicum* resistente ao albendazol, selecionada em modelo experimental, para caracterização fenotípica e genotípica.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar uma cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol por pressão seletiva do fármaco;
- Realizar busca por marcadores moleculares relacionados à resistência nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 na cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol;
- Comparar experimentalmente as cepas de *A. ceylanicum* selvagem e resistente ao albendazol, baseado em parâmetros parasitológicos, morfométricos e patogênicos;
- Avaliar a presença de resistência cruzada na cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol com os medicamentos ivermectina, nitazoxanida e mebendazol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, em reunião de 29/04/2019, número de protocolo 25/2019.

4.2 Seleção da cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol

A cepa resistente de *A. ceylanicum* foi obtida a partir de uma cepa selvagem do nematódeo, submetida a sucessivas infecções e tratamentos em hamsters (*M. auratus*) fêmeas, com idade entre quatro e seis semanas, criados em ambiente controlado de biotério. Todos os hamsters utilizados nos experimentos receberam um tratamento oral profilático de 0,4 mg/200µL de ABZ assim que chegavam ao laboratório, aproximadamente uma semana antes de serem infectados, minimizando assim o risco de interferência de alguma infecção pré-existente que pudesse prejudicar o procedimento.

Inicialmente dois grupos de seis hamsters infectados com a cepa selvagem foram utilizados para coleta de fezes, com a finalidade de realização de coproculturas, de acordo com metodologia de Roberts e O'Sullivan (1950). As larvas foram recuperadas pelo Método de Rugai (1954). Um número aproximado de 5.000 L3 foram tratadas em um tubo tipo Falcon contendo 15 mL de solução de albendazol (0,2 µg/mL) (Sigma, St. Louis) durante 18 horas. Esse tratamento prévio foi realizado para a seleção inicial, *in vitro*, das larvas, contendo genótipos que pudessem ser associados com resistência. Após a incubação, essas larvas passaram por um novo processo de purificação (SERAFIM *et al.*, 2014) e foram ressuspensas em água previamente aquecida (42 °C). Para nova quantificação, larvas com movimentos serpentiformes ativos foram contadas em microscópio estereoscópico. As larvas imóveis e retas foram consideradas mortas, conforme descrito por Croll e Blair (1973). As larvas sobreviventes desta seleção prévia foram utilizadas para dar início ao processo da seleção da cepa resistente.

Em cada ciclo de infecção foram utilizados três grupos com seis hamsters cada, infectados por via oral com auxílio de agulha de gavagem, com aproximadamente 75 L3, um Grupo Controle, infectado e não tratado, e os outros dois grupos infectados e tratados com doses distintas de ABZ. Os hamsters infectados tiveram as fezes coletadas para coproculturas e

quantificação de ovos por grama de fezes (OPG) a cada 2 dias entre o 14° ao 30° DPI (Dias Pós Infecção).

Anteriormente, Furtado *et al.* (2019a) determinaram a dosagem de 0,2 mg de ABZ por animal como a dose letal para eliminar 100% da infecção pela cepa selvagem. Assim, no 20° DPI, os dois grupos de hamsters infectados foram tratados com concentrações crescentes de ABZ em quatro passagens de infecções. Os hamsters foram eutanasiados no 30° DPI, os vermes recuperados do intestino delgado, separados por sexo e animal de origem e armazenados a -20°C para posterior análise molecular. A partir da contagem de OPG e da recuperação de larvas das coproculturas pós-tratamento, o grupo tratado com a maior concentração do fármaco e que houve recuperação de vermes vivos após eutanásia, foi utilizado para novas infecções, até obtenção da cepa resistente.

No estudo atual, o último tratamento no qual foi possível recuperar vermes vivos após eutanásia dos hamsters foi de 0,3mg ABZ/200µL, e as coproculturas realizadas nesta infecção foram utilizadas para recuperar larvas e fazer a manutenção da cepa em laboratório. As concentrações de ABZ utilizadas para tratamento dos hamsters nesta etapa de seleção da cepa variaram de 0,016 a 0,4 mg ABZ/200µL. Na Figura 4 é apresentado um esquema detalhado dos ciclos de infecções para obtenção da cepa resistente de *A. ceylanicum*.

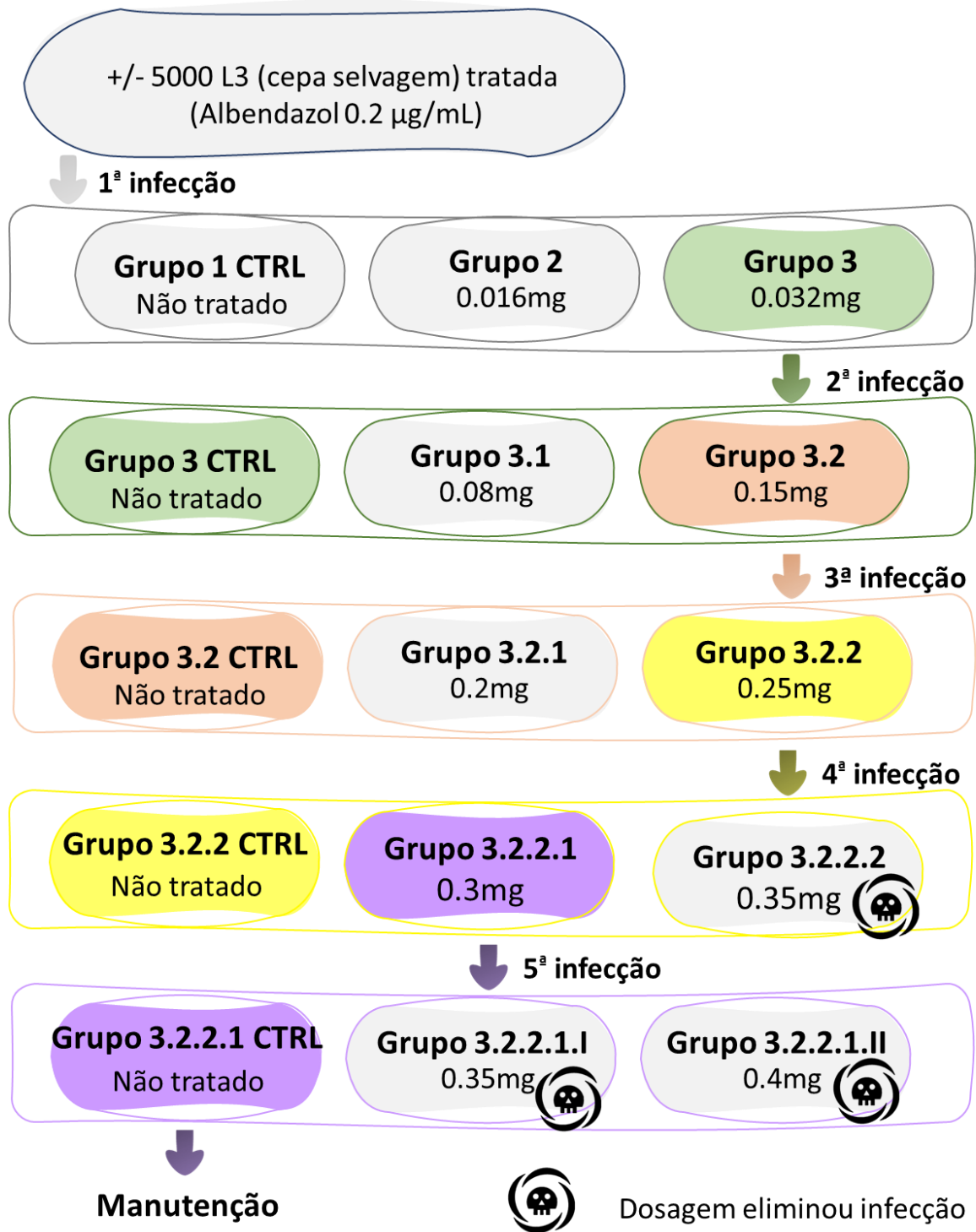


Figura 04: Sequência ilustrativa para obtenção da cepa de *Ancylostoma ceylanicum* resistente ao albendazol. O grupo tratado com a maior concentração do fármaco e que houve recuperação de vermes vivos após eutanásia, foi utilizado para prosseguimento de novas infecções, até obtenção da cepa resistente e manutenção em laboratório. Cada grupo continha 06 hamsters.

4.2.1 Infecção de hamsters com *A. ceylanicum*

Para a obtenção da cepa resistente de *A. ceylanicum* foram realizadas sucessivas infecções e tratamentos com diferentes grupos de hamsters. A partir do 14º até 30º DPI foram realizadas coproculturas em um intervalo aproximado a cada dois dias. As larvas foram recuperadas pelo Método de Rugai (1954), colocadas em tubo tipo Falcon de 50 mL, centrifugado a 1000 xg por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado até um volume médio de 10 mL. A concentração ideal de larvas infectantes foi obtida com o auxílio de microscópio estereoscópico, onde foi observada a viabilidade e a quantificação das larvas. Os grupos foram infectados por via oral com auxílio de agulha de gavagem com uma média de 75 L3/200µL por animal. As coproculturas utilizadas nesta fase foram realizadas após o tratamento com albendazol, no 20º dia e que após esse tratamento ainda apresentavam ovos nas fezes obtidas entre o 25º a 30º DPI.

4.2.2 Quantificação de ovos pelo método de Gordon e Whitlock (OPG)

A contagem de ovos pelo método de Gordon e Whitlock (1939) durante o processo de seleção da cepa resistente ocorreu em cada ciclo de infecção e foi realizada do 14º ao 30º DPI, a cada 2 dias, quando havia material biológico suficiente. Os hamsters foram mantidos em gaiola própria para coleta de fezes durante o período noturno por aproximadamente 14 horas. As fezes foram recolhidas com o auxílio de um palito de madeira, dois gramas de fezes foram pesados e colocados em um copo de vidro, foi adicionada uma solução saturada de açúcar e água. A solução fecal foi homogeneizada e retirada duas alíquotas para preencher os dois lados da câmara de McMaster. A câmara foi levada ao microscópio óptico e realizada a contagem dos ovos utilizando o aumento de 10X. A quantificação da carga parasitária foi expressa em ovos por grama de fezes de acordo com protocolo Gordon e Whitlock (1939).

4.2.3 Preparo de coprocultura e recuperação de larvas

Durante o período para obtenção da cepa resistente foram realizadas coproculturas a cada 2 dias, entre o 14º ao 30º DPI de cada ciclo de infecção. Os hamsters foram mantidos em gaiola própria para coleta de fezes durante o período noturno por aproximadamente 14 horas. As fezes foram recolhidas na manhã seguinte com o auxílio de um palito de madeira, colocadas em um recipiente e misturadas com cerca de 2 mL de água para amolecer. Em seguida foi

misturada vermiculita, na proporção de cerca de duas partes de vermiculita para uma de fezes, o frasco identificado com o nome da cepa (grupo) e data. O frasco foi coberto com gaze, ou papel alumínio perfurado, para entrada de ar e incubado em estufa, à temperatura de 25° a 27° C, durante sete dias. Decorridos esse período foi realizada a recuperação das larvas infectantes pelo método de Rugai (1954).

As larvas foram obtidas de coproculturas, a mistura de fezes e vermiculita foi envolvida em gaze dobrada em 8, esse volume foi submerso em um cálice de vidro de 250 mL contendo água pré-aquecida a 45 °C, deixado em repouso por no mínimo 2 horas. Decorridos esse período, a coprocultura envolvida em gaze foi retirada do cálice e o líquido transferido para um tubo de plástico tipo Falcon de 50 mL, centrifugado a 1000 xg por 1 minuto, o sobrenadante descartado até um volume aproximado de 10 mL, e a concentração de larvas L3 necessárias à infecção (+/-75 L3/200µL) ajustadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

4.2.4 Eutanásia, necrópsia e recuperação de vermes adultos

Para obtenção da cepa resistente, os animais foram eutanasiados por volta do 30° DPI. Os hamsters foram sacrificados com sobredose de anestésico (45 mg/kg de solução de cloridrato de xilazina e 240 mg/kg de ketamina) via intraperitoneal após jejum noturno. Os animais foram colocados de decúbito dorsal, a cavidade abdominal dissecada longitudinalmente, o intestino delgado retirado e dissecado em placa de Petri contendo PBS 0,15M e pH 7,4. Os vermes foram recuperados diretamente da mucosa intestinal, separados por sexo e contabilizados. Os vermes machos foram conservados individualmente em tubo de poliestireno tipo eppendorf de 1,5mL, em freezer -20°C, para posterior análise molecular.

4.2.5 Extração de DNA do nematódeo *A. ceylanicum*

Os vermes de *A. ceylanicum* utilizados para extração de DNA foram recuperados do intestino delgado dos hamsters, a cada ciclo da infecção, separados por sexo e lavados 2 a 3 vezes com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 0,15M e pH 7,4. Foram selecionados vermes do sexo masculino para evitar que a presença de ovos no interior das fêmeas interferisse nas análises moleculares. Um total de 182 extrações de DNA foram realizadas entre vermes das cepas selvagem (14) e vermes recuperados durante as passagens de infecções e tratamentos até o isolamento da cepa resistente (168).

Os vermes machos foram armazenados, individualmente, em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL e o DNA extraído de acordo com o protocolo do Laboratório de Parasitologia Molecular do ICB/UFMG, descrito a seguir. Nos tubos contendo os vermes, foram adicionados 200 µL de tampão de lise (50 mM de EDTA, 100 mM de Tris-HCl pH 7,4, 100 mM de NaCl e SDS 10%). O verme foi triturado com o auxílio de um pistilo de vidro, previamente esterilizado, em seguida foi adicionado mais 200 µL do tampão de lise. Foi adicionado ao tubo 4 µL de proteinase K (10 µg/µL), seguida de incubação em banho seco a 65 °C por 30 minutos. Decorridos esse período, foram adicionados 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (proporção 24:1) e a amostra centrifugada por 12000 xg a 25°C por 5 minutos. Com o auxílio de uma pipeta, a fase superior foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, adicionados 4 µL de RNase (100 µg/µL) e o tubo incubado em banho seco a 37 °C por 30 minutos. Na etapa seguinte, os passos anteriores, de adição de clorofórmio, centrifugação e transferência da fase superior para um novo tubo foram repetidos. Em seguida foram adicionados 400 µL de isopropanol, o material foi homogeneizado, centrifugado por 14.000 xg a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante descartado vertendo totalmente o tubo. Foram adicionados 400 µL de etanol 70%, seguida de centrifugação por 12000 xg a 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante novamente descartado. Novamente foram adicionados 400 µL de etanol 70%, a amostra centrifugada e o sobrenadante descartado. Por fim, o DNA foi ressuspense em 10 µL de água milli-Q, sua concentração foi determinada por espectrofotometria através do aparelho Epoch (Biotek, Estados Unidos) e armazenado na geladeira (4°C). A qualidade do DNA foi determinada com base na relação de absorbância 260/280 para determinar a pureza do material.

4.2.6 Reações de PCR (*polymerase chain reaction*)

Para a amplificação do DNA, foi realizada uma duplex PCR. Na primeira reação, foram utilizados quatro oligonucleotídeos iniciadores (primers): um par flanqueando a região do códon 167 e outro par flaqueando a região dos códons 198 e 200, que se encontram próximos entre si no genoma de *A. ceylanicum*. Não utilizamos apenas um par de primers nesta primeira reação porque entre os códons 167 e 198 existe a presença de íntrons, impossibilitando, a amplificação desse grande fragmento. Do produto da primeira reação, foram realizadas duas Nested-PCRs independentes: uma utilizando um par de primer para amplificar a região do códon 167 e outra com um segundo par de primer para amplificar os códons 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1. A Figura 5 ilustra as reações para amplificação de partes do gene da β -tubulina isotipo 1 do *A. ceylanicum*.

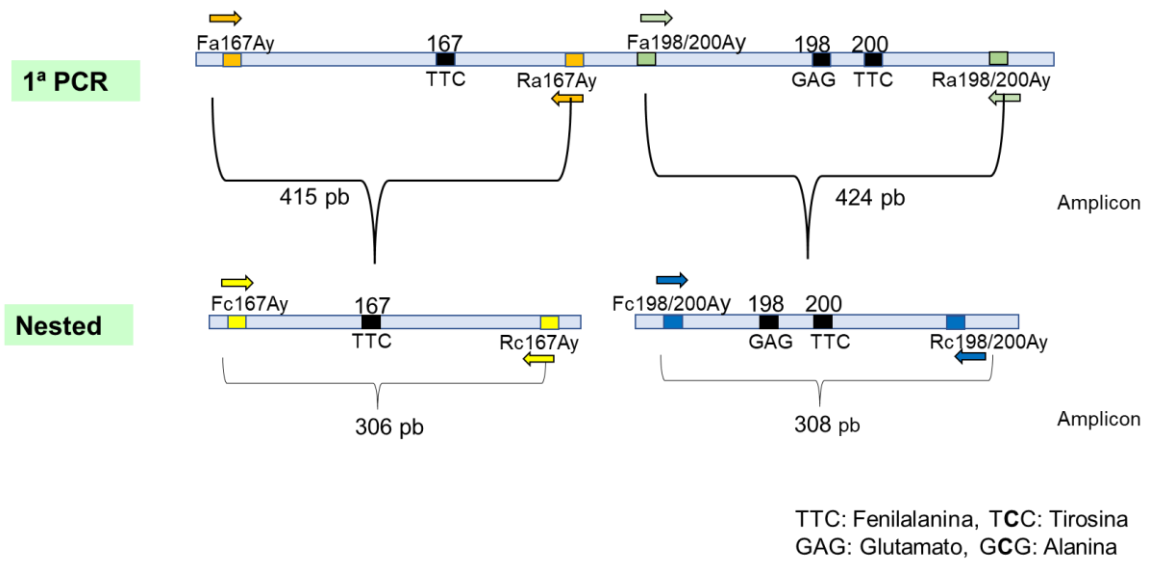


Figura 5: Representação dos iniciadores nas reações de PCR para amplificação de partes do gene da β -tubulina isotipo 1 do *Ancylostoma ceylanicum*.

Os iniciadores utilizados para a reação foram desenhados por Furtado *et al.* (2019a). Os primers utilizados nas reações estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Iniciadores utilizados para amplificação de partes do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*, temperaturas de anelamento e amplicon esperado.

Códon	Iniciador (5' – 3')	T ^o C anelamento	Amplicon
167	Fa167Ay: TGA GCT CGT CGA TAA CGT CC Ra167Ay: TGA GGT CAT CCC CAG TTT GAC	58 ^o C	415 pb (1 ^a Reação)
	Fc167Ay: CAG GTA TTT CGC AAC CGT GC Rc167Ay: AGG AAC ACG ACC AGC GTT T	58 ^o C	306 pb (2 ^a Reação)
198/200	Fa198/200Ay: TGT TCC TAA AAA GGG GTC GGG Ra198/200Ay: AAG CGA AGG CAG GTA GTG AC	58 ^o C	424 pb (1 ^a Reação)
	Fc198/200Ay: GCA GTC CAC GTT CCT GCT TA Rc198/200Ay: ACC GGA CAT TGT TAC AGA CAC T	58 ^o C	308 pb (2 ^a Reação)

O volume final das reações por amostra foi de 10 μ L, sendo 1 μ L de solução tampão (10X); 0,8 μ L de dNTP (2,5nM); 0,2 μ L de Mix primer (10 μ M) (primeira PCR); 0,2 μ L de GoTaq[®] DNA Polymerase (5U/ μ L) (Promega, Estados Unidos); 6,8 μ L de H₂O e 1 μ L de DNA (~25 ng) genômico (primeira PCR) e 1 μ L de DNA amplificado (Nested-PCR). Para o controle negativo, o DNA foi substituído por água ultrapura, para avaliar a possível presença de contaminantes. Para o controle positivo foi utilizado 1 μ L DNA genômico do respectivo nematódeo, previamente amplificado e confirmado por sequenciamento.

As amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Alemanha) utilizando o programa: 95 °C por 5 minutos para desnaturação inicial da dupla fita de DNA, 25 ciclos a 95 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 58°C por 45 segundos, seguido de 72 °C por 45 segundos e uma etapa final de extensão a 72 °C por 7 minutos.

Para confirmação da amplificação, o produto das reações de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) (KASVI, Brasil), com tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos). Na primeira canaleta foi dispensado 5 µL de marcador de peso molecular (1Kb DNA ladder, Invitrogen) e 1 µL de GelRed®. Nas demais canaletas do gel foram aplicados o controle positivo, as amostras e, por fim, o controle negativo (água ultrapura no lugar do DNA). Em cada canaleta, foi aplicado um volume de 5 µL de amostra, 1 µL de tampão de amostra e 1 µL de GelRed®. As amostras foram corridas no gel com uma voltagem de 100v durante 30 minutos. O gel foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta e as imagens foram fotografadas, analisadas e arquivadas.

4.2.7 Purificação do DNA

As reações de PCR com a finalidade de purificação e sequenciamento das amostras seguiram a metodologia descrita no item 4.2.6, porém com um volume final de 30 µL, obedecendo as mesmas concentrações. A Nested-PCR foi realizada em duas reações distintas, uma para amplificar o códon 167 e outra para amplificar os códons 198/200. Os produtos de PCR foram purificados com PEG (Promega, Estados Unidos) (20% polietilenoglicol 8.000 em solução de NaCl 2,5 M) conforme descrito a seguir.

Em um microtubo de 0,5 mL foram dispensados 30 µL de produto de PCR amplificado e adicionado o mesmo volume de PEG 20% (NaCl 2,5 M + PEG 20%), seguida de forte homogeneização em vórtex. Os tubos foram incubados em banho-Maria a 37°C por 15 minutos, em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 16.000 xg a 25°C, o sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma pipeta. Foram adicionados ao tubo 125 µL de etanol 80% gelado. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13000 xg e o sobrenadante retirado cuidadosamente. Novamente foi adicionado ao tubo 125 µL de etanol 80% gelado, centrifugados por 5 minutos a 13000 xg e o sobrenadante descartado. Os tubos foram secos à temperatura ambiente, vertidos sobre um papel toalha até não restar vestígios de etanol. Por fim, o precipitado de DNA foi ressuspensão em 20 µL de água ultrapura. O DNA purificado foi

dosado, em duplicata, através de espectrofotômetro Epoch (Biotek, Estados Unidos) e armazenado a -20 °C.

4.2.8 Sequenciamento das amostras

As amostras foram sequenciadas segundo método descrito originalmente por Sanger *et al.* (1977). As reações do sequenciamento foram realizadas em placas de 96 poços, utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Estados Unidos) em um volume final de 10 µL contendo 1 µL do iniciador direto ou reverso (10 µM), 5 µL de produto de PCR purificado (30 ng para cada 100 pb) e 4,0 µL de BigDye. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Alemanha) com um ciclo inicial de 1 minuto a 96°C, seguidos de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Para a precipitação de nucleotídeos não incorporados foram adicionados 1 µL de acetato de amônio (7,5 M) em cada poço da placa e 25 µL de etanol absoluto e a placa vortexada vigorosamente. A placa foi vedada com selante e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, em seguida a placa foi centrifugada a 4.000 xg por 45 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e a placa mantida invertida para escorrer o álcool. Foram adicionados às amostras 150 µL de etanol 70%, e em seguida centrifugadas a 4.000 xg por 15 min a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão por agitação em vórtex com 10 µL do tampão de solubilização contendo 70% de formamida e 1 mM de EDTA. O sequenciamento dos fragmentos foi executado no sequenciador automatizado ABI 3130xl/Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Estados Unidos) de 16 capilares. Cada amostra foi sequenciada no sentido direto e reverso, e a análise do cromatograma foi realizada utilizando o software FinchTV (Geospiza, Estados Unidos).

Foram analisados nos cromatogramas os códon 167, 198 e 200 do gene da β-tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum* a procura de possíveis SNPs. Para os códon 167 e 200, a trinca de bases nitrogenadas TTC (**T/T** DNA selvagem) quando ocorre a mutação aparecerá como **T/A** heterozigoto ou **A/A** homozigoto. Para o códon 198 a trinca de bases nitrogenadas GAG (**A/A** DNA selvagem) quando ocorre a mutação aparecerá como **A/C** heterozigoto ou **C/C** homozigoto. Os dados foram analisados e agrupados de acordo com a amostra de DNA de origem, para a cepa selvagem ou para as passagens de infecção para obtenção da cepa resistente.

4.3 Comparação de cepas Selvagem e Resistente

Para comparação das cepas selvagem e resistente, foi realizado um novo experimento, no qual foram utilizados três grupos de hamsters, com seis animais por grupo, a saber: Grupo Controle, que não foi infectado; Grupo Selvagem, infectado com larvas provenientes da cepa selvagem e Grupo Resistente, infectado com larvas oriundas da cepa resistente isolada. Os animais foram acompanhados pelo período de 28 dias, para comparação de aspectos patogênicos, parasitológicos e morfométricos.

4.3.1 Infecção dos grupos

A infecção do Grupo Selvagem e do Grupo Resistente foi realizada com 75 L3, via oral, conforme metodologia descrita no item 4.2.1.

4.3.2 Quantificação de ovos pelo método de Gordon e Whitlock

Para quantificação de OPG no estudo de comparação das cepas Selvagem e Resistente, as fezes foram coletadas por grupo entre o 14º DPI até o momento da eutanásia (28º DPI) a cada 2 dias. A quantificação foi realizada em triplicata de acordo com protocolo descrito no item 4.2.2. No dia da eutanásia também foram coletadas amostras de fezes dos dois grupos infectados diretamente da porção final do intestino grosso de cada animal, para quantificação de OPG individual e teste de eclodibilidade de larvas.

4.3.3 Aferição da massa corporal

Para o estudo de comparação de massa corporal dos grupos Controle e dos grupos infectados com as cepas Selvagem e Resistente ao ABZ, cada hamster teve sua massa corporal aferida individualmente em balança semianalítica no dia zero e a cada 6/7 dias após a infecção, até o momento da eutanásia.

4.3.4 Coleta de sangue, eritrograma e dosagens bioquímicas

A coleta de sangue dos três grupos de hamsters em estudo ocorreu no dia zero da infecção e no dia da eutanásia. O sangue de cada animal foi coletado por punção sublingual e

dividido em dois tubos, um contendo EDTA 0,5 M para eritrograma, o outro sem anticoagulante para exames bioquímicos. A dosagem de ferro sérico e as proteínas totais foram determinadas com kit comercial, seguindo as recomendações do fabricante (Doles, Brasil). O sangue coletado com conservante EDTA 0,5 M no dia da eutanásia foi encaminhado ao Centro de Diagnósticos e Monitoramento Animal (CDMA), onde o hemograma foi realizado em aparelho de impedância com avaliação do eritrograma completo (Hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM, HGM, CHGM, plaquetas e RDW) e leucograma completo (dados não mostrados).

4.3.5 Eutanásia, necrópsia e recuperação de vermes adultos

A eutanásia e necrópsia para a comparação da infecção entre os grupos infectados com a cepa Selvagem, Resistente e o grupo Controle ocorreu no 28º DPI, protocolo descrito no item 4.2.4.

Para o experimento de comparação das cepas Selvagem e Resistente de *A. ceylanicum*, os vermes machos e fêmeas recuperados no dia da eutanásia foram separados por grupo e sexo. As fêmeas foram separadas por animal de origem para realização do teste *in vitro* de Taxa de fertilidade. Os vermes machos foram separados por animal de origem, lavados com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 0,15M e pH 7,4 por três vezes, fixados em água a 80°C e transferidos para tubos identificados de poliestireno tipo eppendorf de 1,5 mL contendo solução de formaldeído 3,7% para posterior morfometria. Após o teste da taxa de fertilidade, as fêmeas também foram preparadas para a morfometria.

O intestino delgado dos três grupos de hamsters foi fixado aberto, sobre um papel filtro, com solução de formaldeído 3,7% tamponado e, depois de 24 horas, foram medidos com o auxílio de uma régua milimétrica, enrolados a partir da extremidade posterior sobre ele mesmo e conservados em cassetes histológicos identificados, acondicionados em uma nova solução de formaldeído 3,7% para futura análise histológica. Foi realizada a comparação estatística dos comprimentos dos intestinos entre os grupos infectados com as cepas selvagem e resistente ao ABZ e o grupo Controle não infectado para avaliar se o mecanismo da patogênese tinha provocado alguma alteração morfológica no tamanho do intestino.

4.3.6 Comparação da taxa de fertilidade das cepas Selvagem e Resistente

O teste de fertilidade das fêmeas de *A. ceylanicum* das cepas Selvagem e Resistente foi realizado no 28º DPI, após eutanásia dos hamsters. Vermes fêmeas foram recuperadas do

intestino dos hamsters e colocadas em placas de 12 poços contendo 10 mL de RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*), sendo que os vermes de um mesmo animal de origem, foram colocados em um único poço (Figura 06). A placa foi incubada em estufa por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. No dia posterior os vermes foram retirados da placa, o líquido de cada poço foi cuidadosamente recolhido para um tubo do tipo Falcon de 15 mL e centrifugado a 10.000 xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 1 mL de formaldeído 10%, os ovos presentes em cada poço foram corados com lugol e quantificados em lâmina, através de microscópio óptico. O número de ovos contados em cada poço foi dividido pelo número de fêmeas ali colocadas para determinar a taxa de fertilidade.

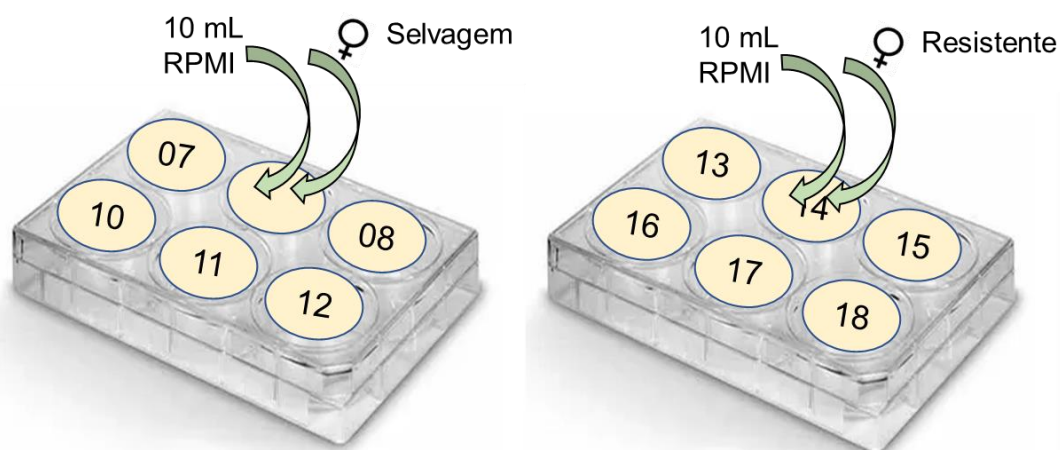


Figura 06: Teste de fertilidade entre as fêmeas recuperadas entre grupo de hamsters infectados com as cepas de *A. ceylanicum* selvagem (selvagem- 5 hamsters) e resistente ao albendazol (6 hamsters).

4.3.7 Teste de eclodibilidade de larvas

O teste *in vitro* de eclodibilidade de larvas para verificar a resistência dos ovos ao ABZ, em comparação das cepas Selvagem e Resistente, foi realizado de acordo com o protocolo de Humphries *et al.* (2013). No dia da eutanásia, aproximadamente 3 gramas de fezes foram coletadas diretamente da porção final do intestino grosso de cada hamster. As fezes foram diluídas em tubo tipo Falcon de 50 mL contendo solução saturada de açúcar, centrifugadas a 14.000 xg por 5 min, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon de 50 mL, o qual teve o volume completado com água destilada, e as amostras centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O precipitado individual de cada amostra foi ajustado para 300 ovos e suspensos em um volume final de 600 µL. Cem microlitros desse volume foi adicionado aos poços individuais de uma placa de microtitulação de 96 poços contendo 100 µL de suspensões

de albendazol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) preparadas em metanol (5 mg/mL) e diluídas em água destilada com concentrações finais = 0; 0,1; 1,25; 2; 5 e 8 $\mu\text{g/mL}$. Após a adição do concentrado de ovos na placa com as diferentes concentrações de albendazol, ela foi incubada à temperatura ambiente e, após 48 horas, o número de larvas de ancilostomídeo de primeiro estágio eclodidas em cada poço foi determinado usando microscópio estereoscópico. A Figura 07 abaixo detalha a técnica utilizada para o teste de eclodibilidade de larvas.

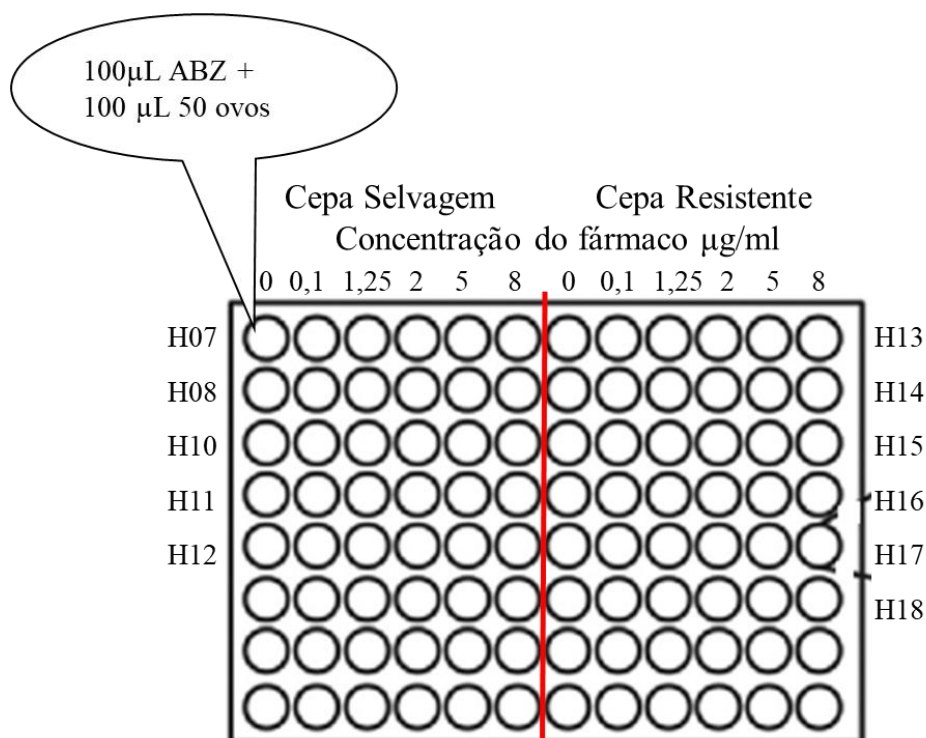


Figura 07: Teste de eclodibilidade de larvas. Grupo Selvagem H07, H08, H10-H12, Grupo Resistente H13-H18. H: Hamster. Em cada poço da placa foi dispensado 100 μL de suspensão de Albendazol diluído nas concentrações 0; 0,1; 1,25; 2; 5 e 8 $\mu\text{g/mL}$ para cada amostra e 100 μL de suspensão contendo 50 ovos de *Ancylostoma ceylanicum* de cada amostra.

4.3.8 Análise morfométrica dos vermes adultos de *A. ceylanicum*

Os vermes adultos recuperados do intestino delgado dos hamsters foram lavados em PBS por três vezes, separados por sexo e preparados para morfometria microscópica. Foram avaliados quatro vermes machos e quatro vermes fêmeas de cada hamster infectado, totalizando 80 vermes, sendo 20 machos e 20 fêmeas do grupo selvagem e 20 machos e 20 fêmeas resistentes ao ABZ. Nos machos e fêmeas foram avaliados os seguintes parâmetros morfológicos: comprimento total e largura máxima, comprimento e largura da capsula bucal e dentes, comprimento e largura do esôfago, distância das papilas cervicais à extremidade

anterior. As fêmeas tiveram medidas a distância entre a vulva e o ânus à extremidade posterior, e os machos os espículos 1, 2 e gubernáculo.

Os nematódeos coletados foram fixados em formol 10% quente (80°C), diafanizados em lactofenol de Amann e colocados entre lâmina e lamínula de vidro com lactofenol para observação e análise em microscópio óptico. As imagens dos parasitos foram capturadas com câmera digital (AxioCamERc 5s, Carl Zeiss) acoplada ao microscópio e a morfometria realizada através do programa Axio Vision Rel. 4.8. As medidas foram realizadas em milímetros, e as estruturas menores em micrômetros.

4.4 Verificação da presença de resistência cruzada ou lateral

Após a obtenção da cepa resistente, foi realizado um novo experimento para verificar se os vermes resistentes ao ABZ também seriam resistentes a outros fármacos. Nesta etapa, foram infectados 10 grupos de hamsters com 6 animais em cada, sendo que 5 grupos foram infectados com a cepa selvagem e 5 grupos com a cepa resistente ao ABZ, de acordo com metodologia do item 4.2.1. Foi realizada a quantificação de ovos por grama de fezes (OPG, descrito no item 4.2.2) em câmara de McMaster, em repetições de 3 contagens, a cada dois dias, do 14º DPI até o momento da eutanásia. O tratamento com os diferentes fármacos ocorreu no 21º DPI, sendo que três grupos de cada cepa (Selvagem e Resistente) foram tratados com a dose letal pré-estabelecida dos fármacos MBZ (Helmilab, Brasil), Ivermectina (Allax, Brasil) e Nitazoxanida (Eurofarma, Brasil). Um grupo da cepa selvagem e outro da cepa resistente foram tratados com a dosagem máxima de recuperação de vermes sobreviventes no processo de seleção da cepa resistente (0,3mg/200µL) de ABZ (Prati-Donaduzzi, Brasil), e dois grupos controles, um da cepa selvagem e outro da cepa resistente, não foram tratados.

A dose letal para o *A. ceylanicum* foi obtida para cada fármaco a partir do tratamento da infecção no 21º DPI de um grupo de hamster infectado com a cepa selvagem, e as concentrações escolhidas foram orientadas pela bula do fabricante. De acordo com os testes prévios na cepa selvagem, a dose letal para o fármaco MBZ foi de 0,3mg/200µL, Ivermectina 0,010mg/200µL e Nitazoxanida 1,687mg/200µL. A eutanásia dos hamsters ocorreu no 28º DPI, e a necropsia e recuperação de vermes adultos foi realizada como descrito no item 4.2.4. Na Figura 8 é apresentado o roteiro do procedimento para verificação da presença de resistência cruzada.

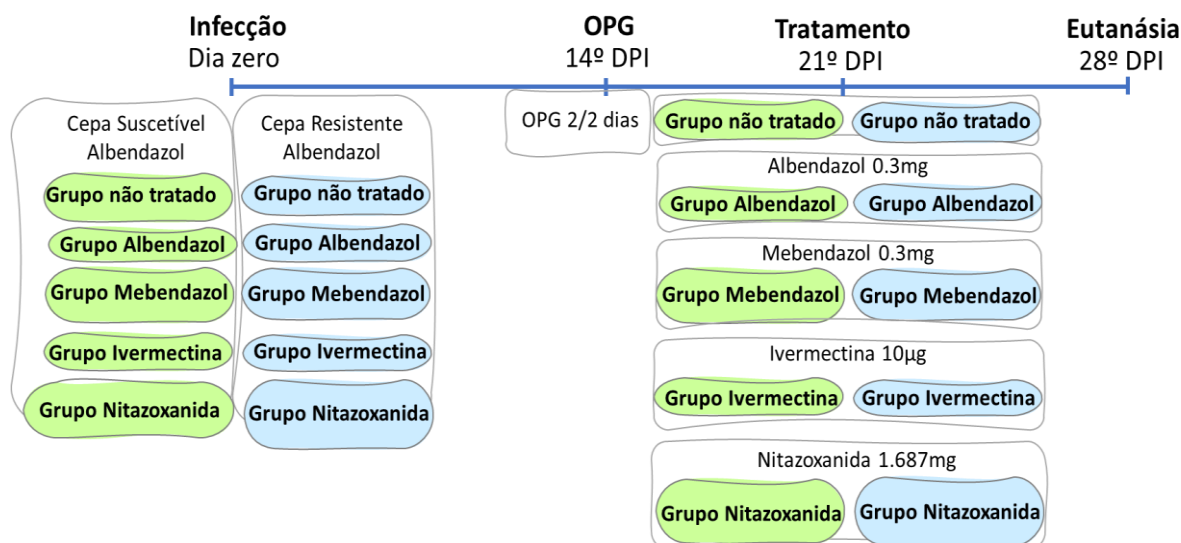


Figura 08: Sequência ilustrativa do roteiro para verificação da resistência cruzada. Dia zero: infecção dos grupos; 14-21º DPI (Dias Pós Infecção) realização de OPG; 21º DPI tratamento com diferentes fármacos; 28º DPI eutanásia e recuperação de vermes.

4.5 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de Grubbs para detecção de “outliers” (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). A análise estatística foi realizada utilizando o software Graph Pad Prism 5.0. Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov. As análises entre dois grupos foram feitas com os métodos estatísticos teste T não pareado (dados paramétricos). Para análise de três ou mais grupos, os dados foram submetidos aos testes ANOVA One way ou ANOVA Two way seguido do teste múltiplo comparativo Bonferroni, ou de Tukey. Todos os resultados analisados foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p \leq 0,05$.

Para o cálculo do IC 50 e IC 90 do teste de eclodibilidade de larvas, as concentrações de ABZ utilizadas foram transformadas em logaritmo e as taxas de eclosão em porcentagem. Em seguida, foi realizada uma regressão não linear desses dados para chegar ao valor de inibição.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção da cepa resistente ao albendazol do nematódeo *A. ceylanicum*

Durante os ensaios para obtenção da cepa resistente foi recuperado um total de 839 vermes adultos, sendo 414 machos e 425 fêmeas. Ao longo dos ensaios foram recuperadas as seguintes quantidades de vermes, somando os três grupos (Controle e tratados), 1: 235 (109 ♂, 126 ♀), 2: 105 (50 ♂, 55 ♀), 3: 192 (92 ♂, 100 ♀), 4: 166 (89 ♂, 77 ♀), 5: 73 (29 ♂, 44 ♀), e no primeiro grupo de manutenção, 68 vermes foram recuperados (45 ♂, 23 ♀).

Durante os ciclos de infecções, houve perda de animais para os diferentes grupos, antes do momento da eutanásia. Entretanto, as fezes foram coletadas do 14 DPI até o momento da morte precoce dos hamsters e foram utilizadas para coproculturas para as passagens subsequentes da obtenção da cepa resistente. Esses animais que morreram não foram usados para análises estatísticas, foram usados apenas para a doação das fezes, já coletadas para a obtenção da cepa resistente. Todos os animais do Grupo G3.1 (dose 0,08mg) morreram. Do outro subgrupo G3.2 (dose 0,15 mg) sobreviveram 03 animais.

A Tabela 01 mostra o número de hamsters eutanasiados em cada grupo e o número de vermes recuperados.

Tabela 01- Quantitativo de parasitos recuperados durante os ciclos de infecções e tratamentos sucessivos para obtenção da cepa de *Ancylostoma ceylanicum* resistente ao albendazol.

Grupos	N° de animais eutanasiados	Parasitos Recuperados		
		♂	♀	Total
G1 CTRL	4	63	85	148
G2 (0,016mg)	4	37	33	70
G3 (0,032mg)	4	9	8	17
G3 CTRL	3	15	24	39
G3.1 (0,08mg)	0	N/A	N/A	N/A
G3.2 (0,15mg)	3	35	31	66
G3.2 CTRL	3	29	27	56
G3.2.1 (0,2mg)	4	34	39	73
G3.2.2 (0,25mg)	3	29	34	63
G3.2.2 CTRL	3	44	29	73
G3.2.2.I (0,3mg)	4	45	48	93
G3.2.2. II (0,35mg)	5	0	0	0
G3.2.2.I CTRL (0,3mg)	6	29	44	73
Manutenção 0,3mg	6	45	23	68
Total		414	425	839
N/A= Não se aplica				

5.2 Varredura de Polimorfismos de Nucleotídeo Único

Após seleção da cepa de *A. ceylanicum* resistente ao ABZ, o DNA de uma pequena amostra de 10 vermes individuais foi obtido. Para obtenção de um resultado prévio, as sequências correspondentes ao códon 167 e 198/200 desses vermes foram amplificadas e sequenciadas. O resultado do sequenciamento revelou a presença de 100% de SNPs para o códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1, sendo oito mutações em homozigose e duas em heterozigose. Para os códons 167 e 200 não foi observado nenhum SNP.

Após o resultado da presença de polimorfismos somente para o códon 198 nas 10 amostras analisadas de vermes resistentes ao ABZ, outras 19 amostras resistentes foram analisadas para o códon 167, e nenhum SNP foi encontrado. De acordo com resultados obtidos na análise anterior, não pesquisamos a presença de SNPs no códon 167 do gene da β -tubulina para a cepa selvagem, uma vez que para a cepa resistente, um total de 29 amostras foram sequenciadas e não foi observada nenhuma mutação neste códon. A pesquisa para a cepa selvagem foi realizada para os códons 198 e 200 em 14 vermes de *A. ceylanicum* e nenhuma mutação foi observada.

No total, para pesquisa de SNPs nos códons 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 do *A. ceylanicum* foram analisados 182 vermes distribuídos entre os 5 ciclos para obtenção da cepa resistente (168) e 14 vermes do grupo da cepa selvagem. No grupo selvagem não foi observada a presença de mutação para nenhum dos três códons. Para o grupo resistente foi verificada o aumento gradual da presença de mutações homozigóticas, redução de mutação heterozigótica e redução do número de indivíduos sem mutações para o códon 198 ao decorrer do experimento. Em análise dos cromatogramas do sequenciamento de amostras do quarto ciclo de infecção, cinco amostras (5,5% do total de vermes do grupo 3.2.2.1) apresentaram um SNP na terceira base nitrogenada do códon 200, a trinca TTC (homozigótica), que codifica o aminoácido Fenilalanina, foi substituída pela trinca (heterozigótica) TTM (TTA/TTC), que codifica uma leucina.

No Gráfico 1 é apresentada a evolução de mutações para o códon 198 no decorrer do experimento para obtenção da cepa resistente.

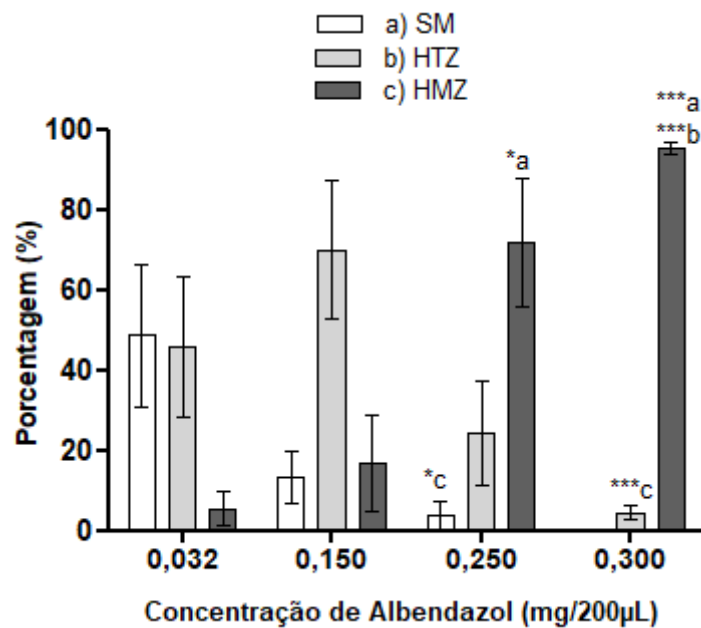


Gráfico 01: Evolução da presença de polimorfismos (SNPs) para o códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *Ancylostoma ceylanicum* durante procedimentos para obtenção da cepa resistente ao albendazol. SM: Sem Mutação, HTZ: Mutação Heterozigótica, HMZ: Mutação Homozigótica. Número de vermes para cada tratamento. 0,032=24; 0,150= 25; 0,250=25; 0,300= 94. ANOVA 2way, "Bonferroni posttests". Cada barra representa a média \pm erro padrão do grupo (n = 168). *p<0,05; *** p<0,001.

Nenhuma amostra da cepa selvagem apresentou SNPs nos códons avaliados. Durante as passagens para obtenção da cepa resistente ao ABZ a presença de SNPs no códon 198 foi aumentando de acordo com a dosagem do fármaco utilizada. DNA de vermes resistentes a 0,032

mg apresentaram 45,8% de mutações em heterozigose; 5,5% de mutações em homozigose e 48,6% não apresentaram mutações (total de 24 amostras). Vermes resistentes a 0,15 mg apresentaram 13,3% de DNA sem mutação, 16% com mutação em homozigose e 70% em heterozigose (25 amostras). Vermes resistentes a 0,25 mg apresentaram 3% das amostras sem mutação, 72% com mutação em homozigose e 24% em heterozigose (25 amostras). As amostras de DNA de vermes resistentes a 0,3 mg de ABZ 95,7% das amostras apresentaram mutação em homozigose, 4,3% em heterozigose, todos os vermes deste grupo tinham SNPs no códon 198 do gene da β -tubulina (94 amostras).

Na Figura 09 (A, B, C, D e E) estão representados cromatogramas referentes a presença ou não de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 do *A. ceylanicum*.

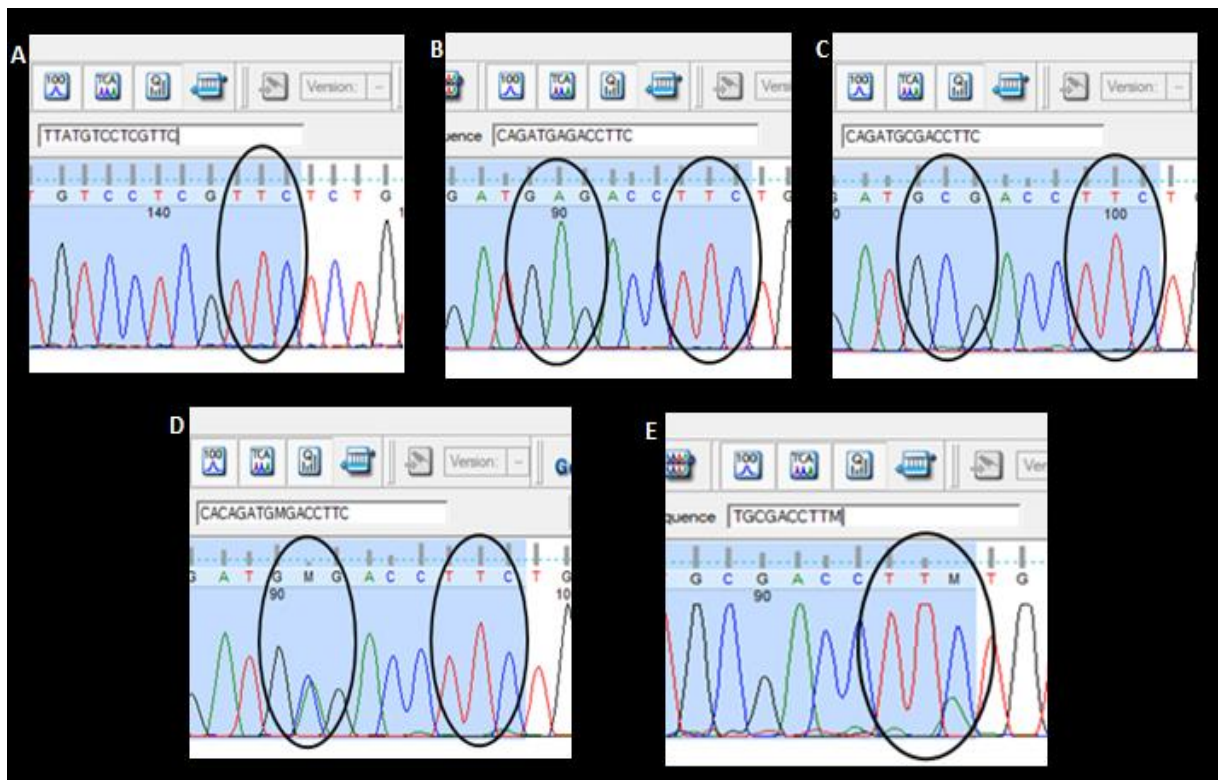


Figura 09: Cromatogramas dos sequenciamentos dos codons 167, 198 e 200 para a cepa resistente de *A. ceylanicum*. **A:** Cromatograma cepa resistente, códon 167 TTC do *A. ceylanicum*, a presença de apenas um pico na segunda base em destaque significa a ausência de Mutação; **B:** Cromatograma cepa resistente, códon 198 GAG e 200 TTC a presença de apenas um pico na segunda base dos destaques significa a ausência de Mutação; **C:** Cromatograma cepa resistente, códon 198 GCG (C/C) primeiro destaque Mutação Homozigótica, segundo destaque códon 200 TTC sem Mutação; **D:** Cromatograma cepa resistente, códon 198 GCG/GAC (GMG), a presença de dois picos na segunda base da primeira trinca em destaque significa a presença de Mutação Heterozigótica. Segundo destaque códon 200 TTC sem Mutação; **E:** Cromatograma cepa resistente, códon 200 TTC, SNP na terceira base TTM (A/C), Mutação Heterozigótica.

5.3 Comparação entre as infecções com as cepas Selvagem e Resistente

5.3.1 Análise do eritrograma

O eritrograma foi realizado no 27º DPI com os grupos infectados com as cepas de *A. ceylanicum* Selvagem e Resistente ao ABZ, e o grupo Controle não infectado. Os parâmetros analisados foram o número de hemácias sanguíneas, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), distribuição da largura das células vermelhas (RDW) e contagem de plaquetas.

Houve uma diferença significativa entre o grupo infectado com a cepa Selvagem e o grupo Controle para os parâmetros: contagem do número de hemácias, porcentagem do hematócrito e CHCM, sendo que o grupo infectado com a cepa Selvagem apresentou um índice inferior nesses parâmetros avaliados. Para o grupo infectado com a cepa Resistente, não ocorreu diferença significativa nestes parâmetros em comparação ao grupo Controle ou ao grupo infectado com a cepa Selvagem. A concentração de hemoglobina para os grupos infectados com as cepas Selvagem e Resistente foi bem menor em relação ao grupo Controle. Para os parâmetros VCM e HGM não houve diferença significativa entre os grupos. Não houve diferença significativa na contagem de plaquetas entre os grupos infectados e o grupo Controle. O RDW foi maior para o grupo infectado com a cepa Selvagem em relação ao grupo Controle, não houve diferença entre o grupo infectado com a cepa Resistente e os demais grupos. Após a eutanásia dos animais, um número bem maior de vermes foi recuperado dos hamsters infectados com a cepa Selvagem, em relação ao grupo infectado com a cepa Resistente (Veja Gráfico 10). Os resultados comparativos do eritrograma dos três grupos encontram-se no Gráfico 02.

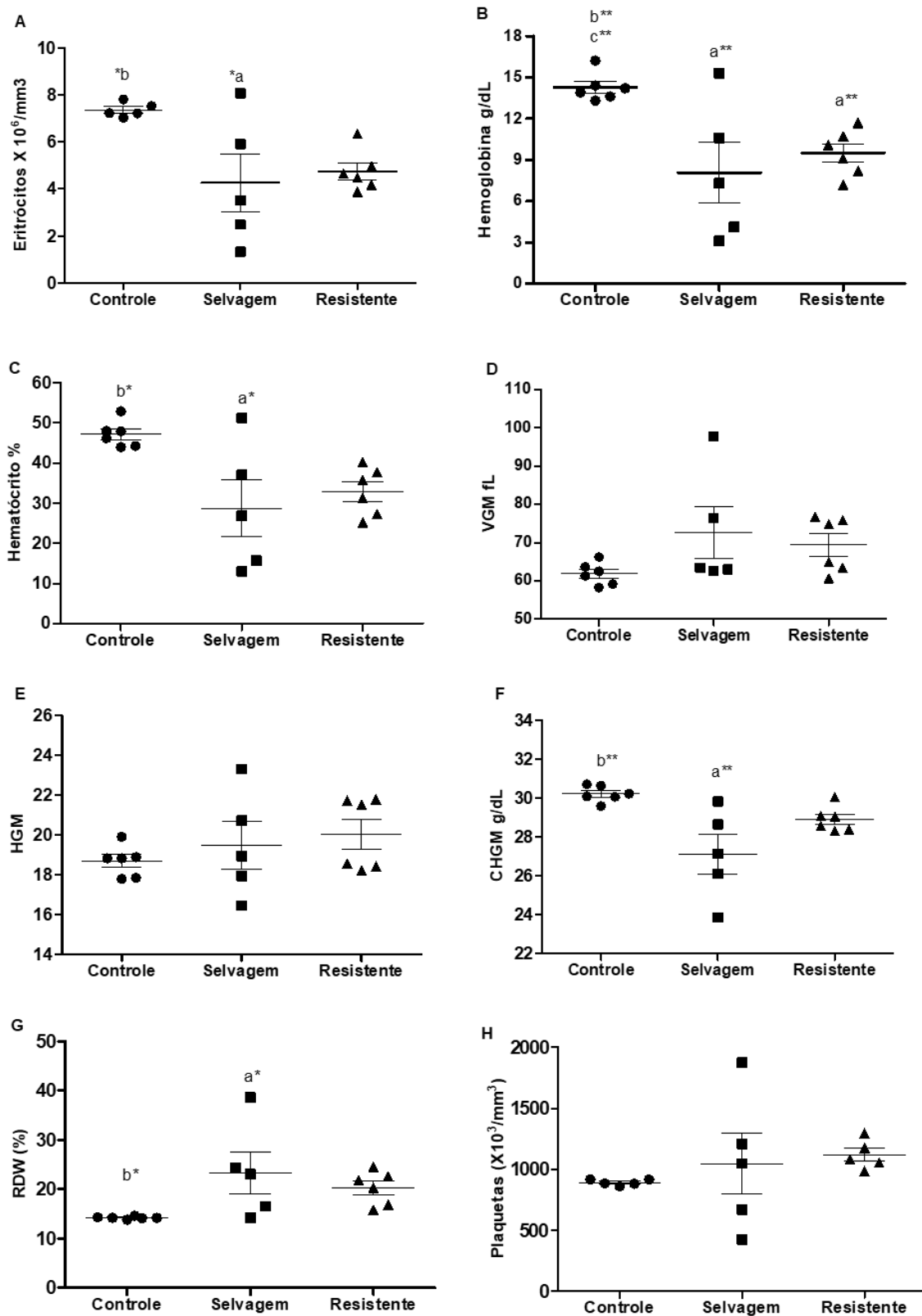


Gráfico 02: Comparação do Eritrograma realizado no 27º DPI com os grupos infectados com a cepa selvagem e resistente de *A. ceylanicum* e o grupo Controle não infectado: **A:** N° de hemácias, * $P=0,0191$; **B:** Hemoglobina, ** $P=0,0077$; **C:** Hematócrito, * $P=0,0128$; **D:** Volume Corpuscular Médio (VCM), $P=0,1749$; **E:** Hemoglobina Globular Média HGM, $P=0,4610$; **F:** Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), ** $P=0,0059$; **G:** Distribuição da Largura das Células Vermelhas (RDW), * $P=0,0421$; **H:** Plaquetas, $P=0,5565$. Anova one-way, Bonferroni's Multiple Comparison. As linhas horizontais representam a média \pm erro padrão do grupo, $n=6$.

5.3.2 Dosagens de Ferro sérico e Proteínas totais

Na comparação do valor do nível sérico de ferro entre os grupos, demonstrado no Gráfico 3, é possível observar uma diferença significativa entre o grupo Controle não infectado e os grupos infectados com as cepas Selvagem e Resistente ao ABZ, sendo que o grupo infectado com a cepa Selvagem apresentou a maior deficiência de ferro ao ser comparado com o grupo Resistente e o grupo Controle.

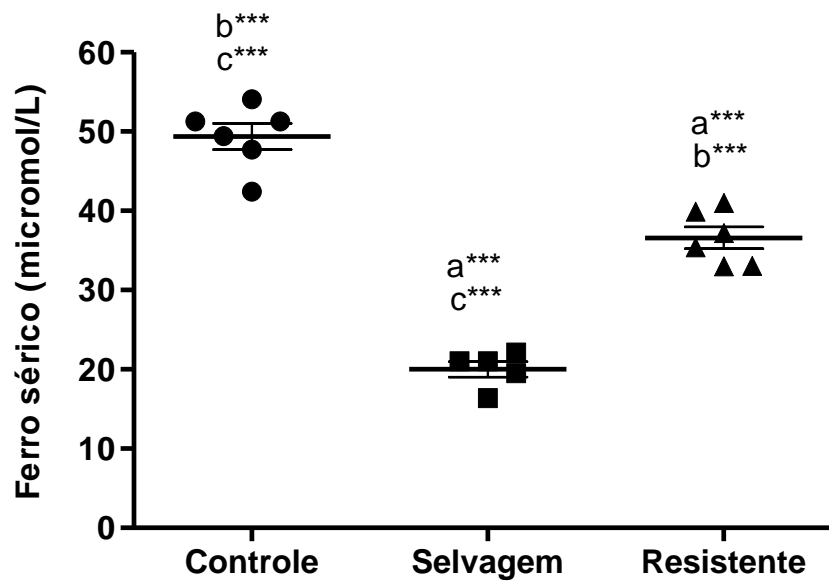


Gráfico 03: Comparação da dosagem de Ferro Sérico realizado no 27º DPI nos grupos: a) ● Controle não infectado; b) ■ infectado com a cepa Selvagem de *A. ceylanicum*; c) ▲ infectado com a cepa Resistente de *A. ceylanicum*. Anova one-way, "Bonferroni's Multiple Comparison Test", ***P < 0.0001

O Gráfico 4 apresenta a comparação dos resultados da dosagem das proteínas totais entre os três grupos. É possível observar que os níveis de proteínas séricas nos grupos infectados com as cepas Selvagem e Resistente foram significativamente inferiores em relação ao grupo Controle não infectado.

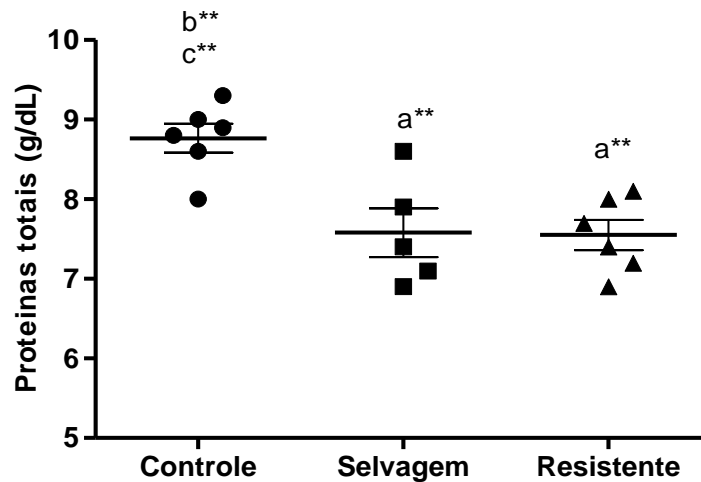


Gráfico 04: Comparação da dosagem de Proteínas totais realizado no 27º DPI nos grupos: a) ● Controle não infectado; b) ■ infectado com a cepa Selvagem de *A. ceylanicum*; c) ▲ infectado com a cepa Resistente de *A. ceylanicum*. Anova one-way, "Bonferroni's Multiple Comparison Test", **P=0,0020.

5.3.3 Teste de Eclodibilidade de Larvas (EHT)

O teste apresentou uma diferença significativa na porcentagem de larvas que eclodiram quando os ovos foram incubados com as concentrações de 1,25; 2 e 5 µg/mL de ABZ, sendo que o grupo Resistente apresentou porcentagem bem maior de eclosão de larvas. No Gráfico 5 é apresentada a porcentagem de eclodibilidade de larvas de cada cepa na ausência do fármaco e na incubação com as diferentes concentrações de albendazol. Todas as amostras dos poços de controle positivo (sem ABZ) mostraram uma taxa de eclosão maior que 75%.

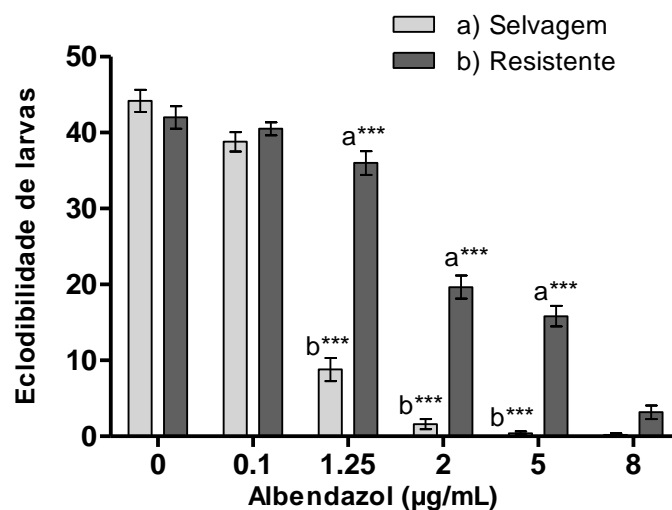


Gráfico 05: Comparação do Teste de eclodibilidade de larvas de *A. ceylanicum* da cepa selvagem e resistente ao albendazol em diferentes concentrações do fármaco. Cada barra representa a média ± erro padrão do grupo (n = 50). a: Selvagem; b: Resistente. Teste 2way ANOVA, "Bonferroni posttests", ***p< 0,0001"

5.3.4 Taxa de Fertilidade das fêmeas

Não foi observado diferença estatística entre os grupos. No Gráfico 6 é representado a taxa de fertilidade das fêmeas de *A. ceylanicum* das cepas Selvagem e Resistente ao ABZ.

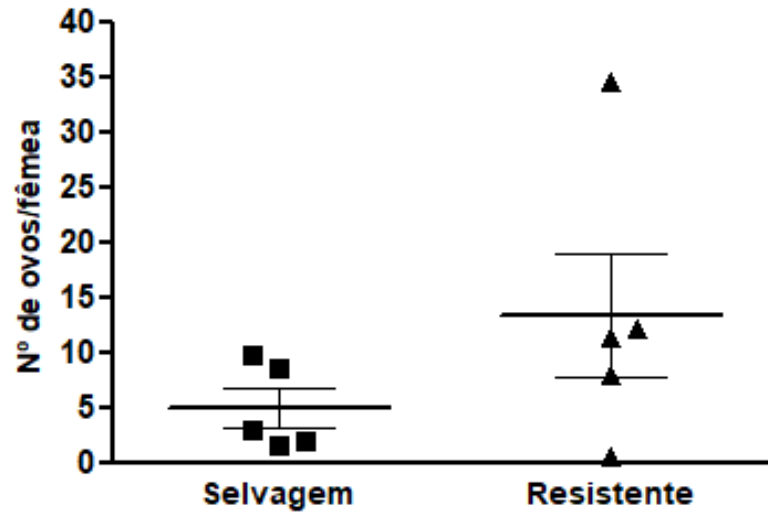


Gráfico 06: Comparação da Taxa de fertilidade em 24 horas das fêmeas recuperadas para os grupos da cepa de *A. ceylanicum* Selvagem e Resistente ao albendazol. Cada ponto se refere ao total de fêmeas recuperadas para cada animal. A linha representa a média \pm erro padrão do grupo (n=06), "Unpaired t test", $p=0,1955$.

5.3.5 Comparação da massa dos hamsters dos grupos Controle e dos grupos infectados com as cepas de *A. ceylanicum* Selvagem e Resistente ao ABZ

Foi possível observar durante o período da infecção que até o 14º DPI, os três grupos ganharam peso, porém a partir do 14º DPI, até o momento da eutanásia (28º DPI), os grupos infectados com as cepas de *A. ceylanicum* Selvagem e Resistente ao ABZ começaram a perder peso, enquanto o grupo Controle teve um ligeiro aumento em relação ao seu peso inicial.

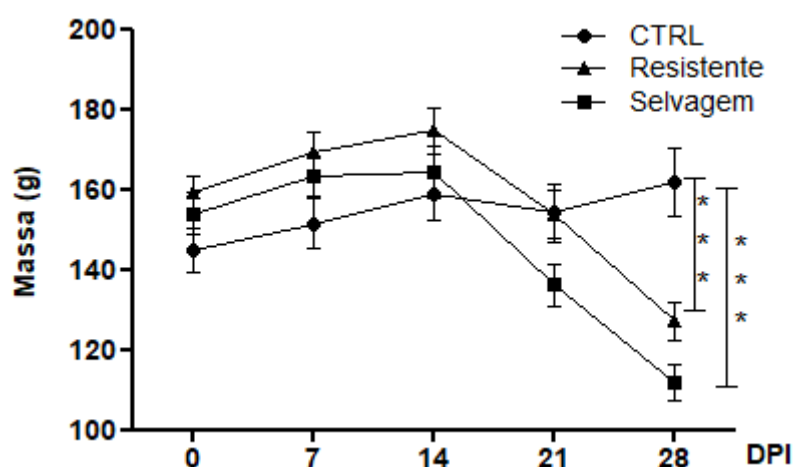


Gráfico 07: Comparação da massa individual dos grupos infectados com a cepa de *Ancylostoma ceylanicum* selvagem e resistente ao albendazol e grupo controle não infectado, durante o período de 28 dias da infecção. ●CTRL, ■Selvagem, ▲Resistente, DPI Dias pós Infecção. Cada linha representa a média \pm erro padrão do grupo (n=06), Teste 2way ANOVA, "Bonferroni posttests", ***p<0,001."

5.3.6 Comprimento do intestino delgado

Para avaliar se a patogênese decorrente da infecção, poderia causar alguma alteração morfológica, como o desenvolvimento de atrofia e encurtamento do intestino delgado, estes foram recuperados dos animais após a eutanásia e medidos, conforme descrito no item 4.3.5. Foi realizada a comparação estatística dos comprimentos dos intestinos entre os grupos infectados com as cepas Selvagem, Resistente e o grupo Controle não infectado. De acordo com os dados analisados no Gráfico 08, não houve diferença estatística nos comprimentos dos intestinos entre os grupos.

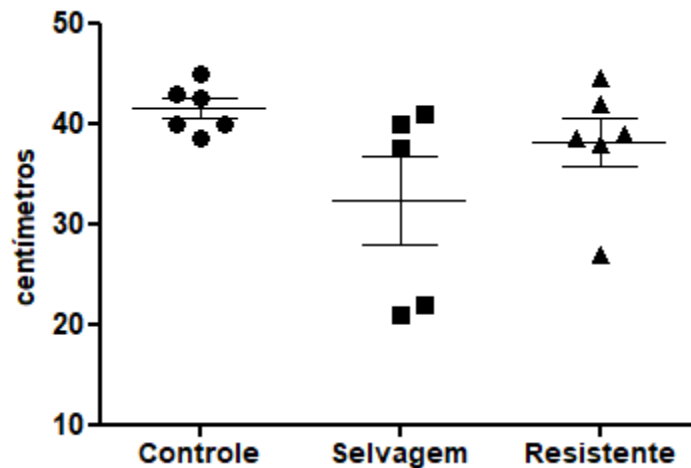


Gráfico 08: Comparação do comprimento do intestino delgado dos hamsters realizado no dia da eutanásia nos grupos Controle não infectado, infectados com as cepas de *Ancylostoma ceylanicum* Selvagem e Resistente ao albendazol. As linhas representam a média \pm erro padrão do grupo (n=06), Anova One-way, "Bonferroni's Multiple Comparison Test", $p=0,1017$.

5.3.7 Estimativa da carga parasitária

Durante a infecção para comparação das cepas Selvagem e Resistente foram realizadas quantificações de OPG por grupo e OPG individual com fezes coletadas diretamente da porção final do intestino grosso no dia da eutanásia. A patência para o grupo Selvagem ocorreu no 14º DPI e para o grupo Resistente no 16º DPI. A contagem de ovos por grama de fezes durante todo o período da infecção e no dia da eutanásia (OPG individual) foi maior para o grupo Selvagem ao ser comparada com o grupo Resistente, de acordo com o Gráfico 09.

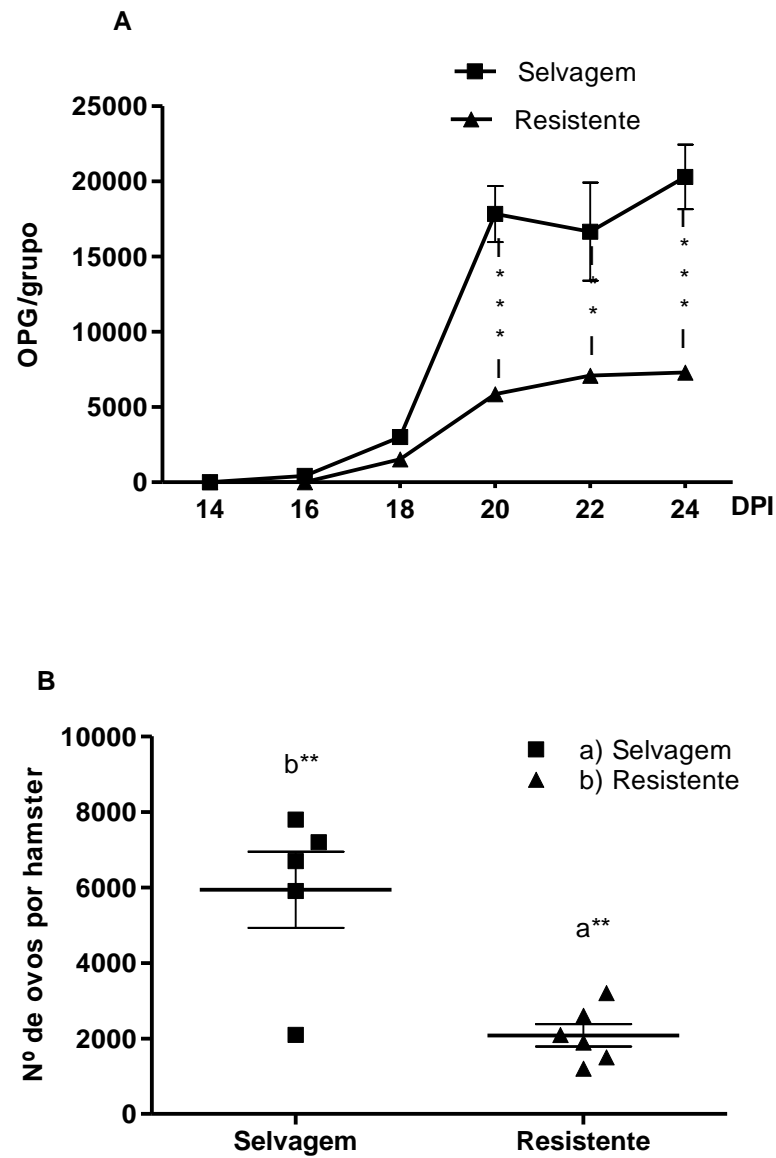


Gráfico 09: A- Quantificação de ovos por grama de fezes (OPG-Grupo) durante infecção para comparação das cepas de *Ancylostoma ceylanicum*; Os pontos destacados das linhas do gráfico indicam a média da contagem de ovos por grupo em determinados dias pós infecção \pm erro padrão do grupo (n=06), Dias Pós Infecção (DPI), "2way ANOVA, "Bonferroni posttests", **p< 0,01 ***p< 0,001. B- Quantificação de ovos por grama de fezes (OPG individual) realizada no dia da eutanásia (material obtido do reto dos animais). As linhas horizontais representam média \pm erro padrão do grupo (n=06), "Unpaired t test", **p=0, 0,0032.

5.3.8 Recuperação de vermes no experimento de comparação de infecção com as cepas de A. ceylanicum Selvagem e Resistente ao ABZ

Após eutanásia dos grupos infectados com as cepas Selvagem e Resistente, os vermes adultos de *A. ceylanicum* foram recuperados do intestino delgado dos hamsters, separados por sexo e contabilizados. O número de vermes recuperados do grupo da cepa Selvagem foi significativamente maior, tanto em relação aos espécimes machos, quanto fêmeas, em comparação à cepa Resistente. No Gráfico 10 (A, B, C) são apresentados os resultados detalhados da recuperação de vermes machos, fêmeas e o total para os dois grupos de infecção.

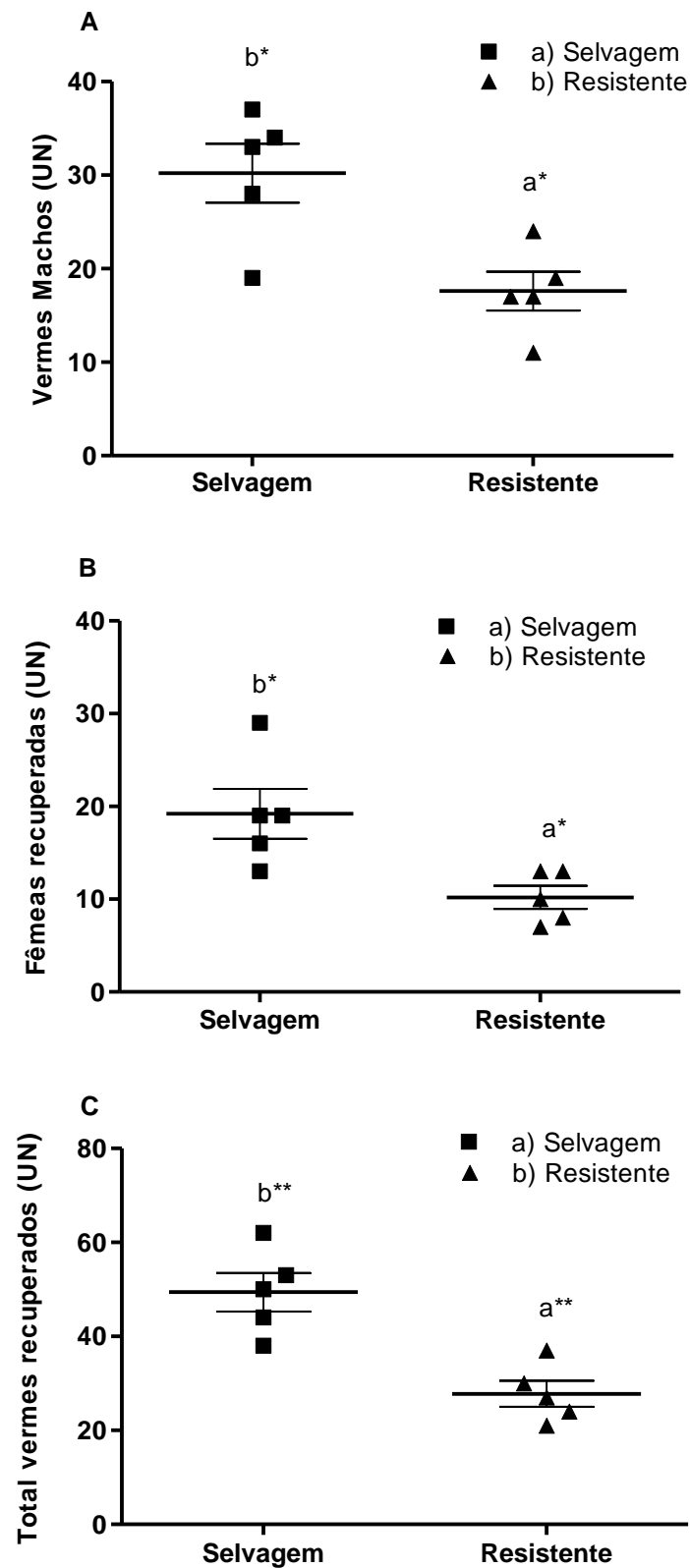


Gráfico 10: Comparação do número de vermes recuperados entre as cepas de *A. ceylanicum* Selvagem e Resistente ao albendazol. **A:** Recuperação de vermes Machos; "Unpaired t test", *p= 0,0104. **B:** Recuperação de vermes Fêmeas; "Unpaired t test", p=0,0161. **C:** Recuperação total de vermes (Machos + Fêmeas), "Unpaired t test", p= 0,0023. As linhas representam média ± erro padrão do grupo (n=06).

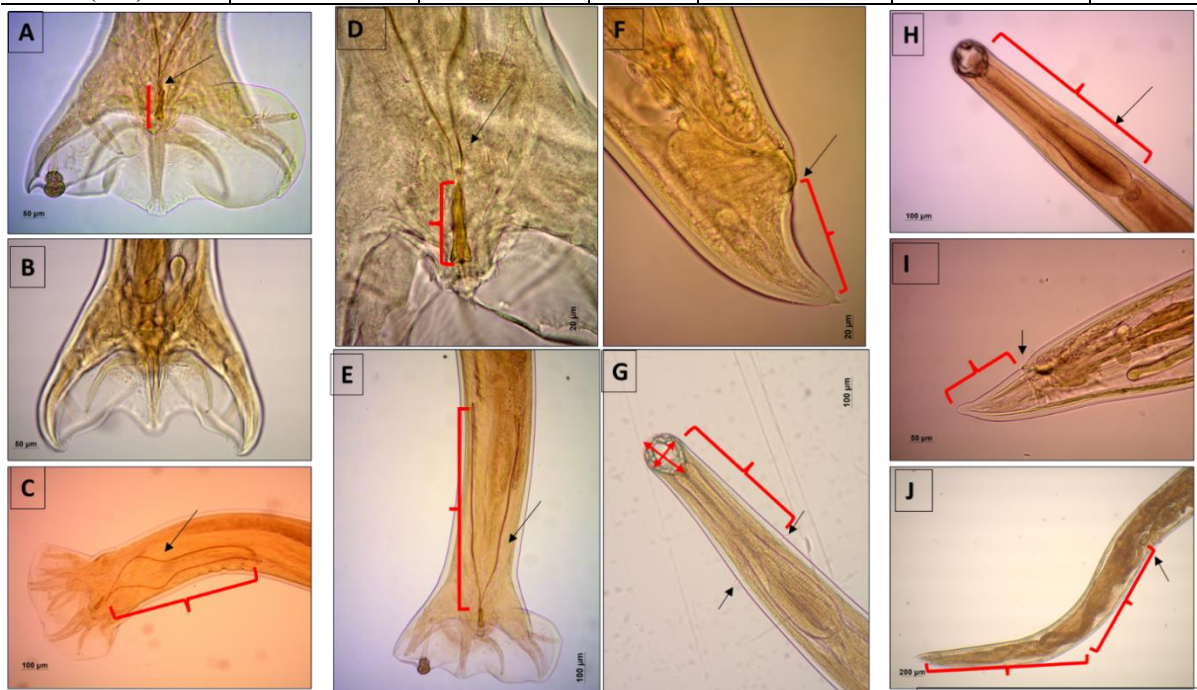
5.3.9 Análises morfométricas

O comprimento total dos vermes machos e fêmeas da cepa resistente ao ABZ foi maior que os vermes da cepa tipo selvagem, e não houve diferença entre a largura dos vermes das duas cepas. O comprimento da cavidade bucal das fêmeas do grupo selvagem foi maior do que o mesmo parâmetro no grupo da cepa resistente enquanto entre os machos não houve diferença. Em relação a largura da cavidade bucal não houve diferença significativa entre os grupos. O comprimento e largura dos dentes dos vermes fêmeas da cepa resistente ao ABZ foram maiores que os das fêmeas da cepa tipo selvagem, já as larguras dos dentes dos vermes machos da cepa resistente foram maiores que o da cepa tipo selvagem e não houve diferença entre os comprimentos. O comprimento do esôfago dos vermes machos da cepa resistente foi maior do que o da cepa selvagem, porém entre os vermes fêmeas não houve diferença significativa. Em relação a largura do esôfago não houve diferença entre machos e fêmeas dos dois grupos. A distância da cabeça até as papilas cervicais dos vermes machos do grupo resistente foi maior do que o grupo da cepa selvagem e entre as fêmeas não houve diferença. Não foram encontradas diferenças significativas entre as medidas dos espículos 1 e 2, e os gubernáculos dos machos das duas cepas. Entre as fêmeas as medidas entre a vulva e o ânus até a extremidade posterior foram maiores para o grupo resistente ao ABZ. Os resultados foram agrupados e estão representados na Tabela 02.

Na Figura 10 é exemplificado algumas estruturas morfológicas medidas na análise morfométrica.

Tabela 02: Análise morfométrica de vermes adultos machos e fêmeas de *Ancylostoma ceylanicum* em comparação de infecção entre cepas Selvagem e Resistente ao albendazol. Dados apresentados na forma de média, desvio padrão e p, obtidos pelo programa Prisma, teste T Student.

Parâmetros	Machos			Fêmeas		
	Selvagem	Resistente	p	Selvagem	Resistente	P
Comprimento Total (mm)	5,916+/-0,5452	6,78+/-0,2060	*0,0106	6,876+/-0,4222	7,610+/-0,2492	*0,0101
Largura Total (mm)	0,2520+/-0,0576	0,3120+/-0,013	0,0528	0,3220+/-0,0327	0,356+/-0,0207	0,0853
Larg. Cavidade bucal (µm)	97,30+/-6,031	99,20+/-12,43	0,7661	107,1+/-6,272	109,0+/-5,058	0,623
Comp. Cavidade bucal (µm)	98,04+/-7,848	104,4+/-12,98	0,3789	113,1+/-5,901	103,1+/-2,398	**0,0082
Comp. Dentes (µm)	40,02+/-1,857	43,21+/-3,975	0,1426	44,11+/-2,174	48,79+/-3,329	*0,0299
Larg. Dentes (µm)	9,886+/-0,5191	11,74+/-1,329	*0,0197	11,14+/-0,8123	12,71+/-1,118	*0,0349
Comp. Esôfago (mm)	0,610+/-0,04743	0,670+/-0,0187	*0,0301	0,6700+/-0,0339	0,6960+/-0,0207	0,1817
Larg. Esôfago (mm)	0,116+/-0,0114	0,140+/-0,0224	0,065	0,1380+/-0,01095	0,1400+/-0,01225	0,7924
Papilas Cervicais extrem. ant. (mm)	0,482+/-0,0192	0,550+/-0,0292	**0,0024	0,5440+/-0,03782	0,540+/-0,03240	0,8619
Espículo 1 (mm)	0,658+/-0,0259	0,684+/-0,0467	0,3079			
Espículo 2 (mm)	0,662+/-0,0295	0,686+/-0,0428	0,3319			
Gubernáculo (µm)	65,51+/-3,898	63,14+/-1,453	0,2381			
Vulva (ext. post.) (mm)				2,186+/-0,1851	2,608+/-0,1481	**0,0041
Ânus (ext. post.) (mm)				0,1440+/-0,01342	0,1660+/-0,01517	*0,0412



Fotos: Dra Lara Ribeiro

Figura 10: Exemplos de estruturas morfológicas que foram medidas na comparação de vermes das cepas de *A. ceylanicum* Selvagem e Resistente ao ABZ. Letras A, B, C, D, E: Bolsa copuladora do macho com setas indicando espículos (2) e gubernáculo; D: Imagem ampliada comprimento do gubernáculo; C e E: Comprimento dos espículos; F e I: Cauda e detalhe do Ânus da fêmea (medidas entre ânus e extremidade posterior); G: Detalhe da capsula bucal e setas indicando papilas cervicais (medidas entre papilas e cavidade anterior, largura e comprimento da cavidade bucal); H: Capsula bucal e comprimento do esôfago; J: Distância da vulva à extremidade posterior (fêmea). Setas indicam estruturas e chaves distâncias. Fotos: Dra Lara Ribeiro (2022).

5.4 Verificação da presença de Resistência Cruzada

Os fármacos ABZ, MBZ, Ivermectina e Nitazoxanida foram utilizados para verificação da presença de resistência cruzada à cepa de *A. ceylanicum* resistente ao fármaco ABZ previamente selecionada. O resultado revelou que não houve a presença de resistência cruzada para os grupos da cepa resistente tratados com Ivermectina ou Nitazoxanida, uma vez que nenhum verme foi recuperado do intestino delgado dos hamsters após a eutanásia, mas ocorreu a presença de resistência lateral para o grupo resistente tratado com MBZ. No Gráfico 11 são representados os resultados de recuperação de vermes por hamster, após eutanásia no 30º DPI, em cada grupo infectado com as cepas Selvagem e Resistente ao ABZ, e os grupos Controles infectados e não tratados.

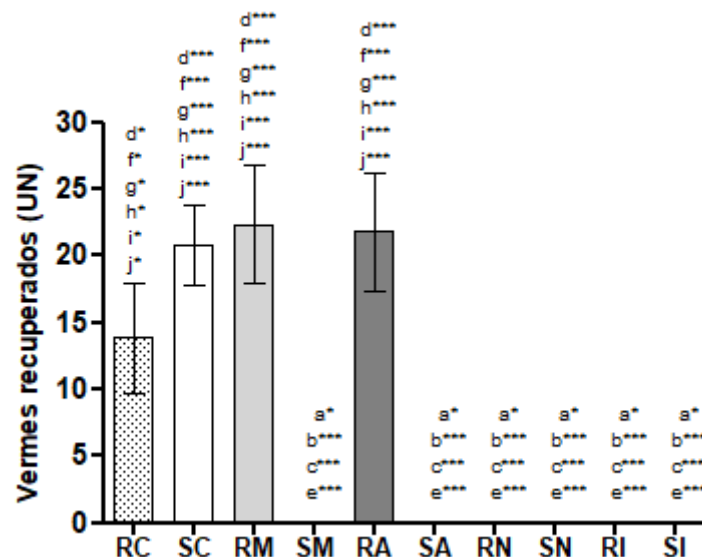


Gráfico 11: Avaliação da presença de resistência cruzada ou lateral na cepa de *A. ceylanicum* resistente ao ABZ exposta a outros fármacos. O Gráfico mostra a média do número de vermes adultos recuperados por hamster em cada grupo nas cepas Selvagem e Resistente de *A. ceylanicum* exposta aos outros fármacos. RC: Controle infectado por cepa resistente, mas não tratado; SC: Controle infectado pela cepa selvagem, mas não tratado; RM: Grupo infectado pela cepa resistente e tratado com mebendazol; SM: Grupo infectado pela cepa selvagem e tratado com mebendazol; RA: Grupo infectado pela cepa resistente e tratado com albendazol; SA: Grupo infectado pela cepa selvagem e tratado com albendazol; RN: Grupo infectado pela cepa resistente e tratado com nitazoxanida; SN: Grupo infectado pela cepa selvagem e tratado com nitazoxanida; RI: Grupo infectado pela cepa resistente e tratado com ivermectina; SI: Grupo infectado pela cepa selvagem e tratado com ivermectina. As barras representam a média \pm erro padrão por hamster, n=06 (hamsters/por grupo); ANOVA One way, Tukey's Multiple Comparison Test; N=6. *p<0,05; ***p<0.001.

6 DISCUSSÃO

Considerando a patogenia que os ancilostomídeos podem causar em seus hospedeiros como anemia ferropriva, dor abdominal, náusea, vômito e diarreia, é necessário estabelecer estratégias profiláticas. A principal estratégia indicada pela OMS para o controle de infecções causadas por esses parasitos é a administração do fármaco em massa (MDA) com uso de BZs, duas a três vezes ao ano, em moradores de áreas endêmicas (DUNN *et al.*, 2019). O tratamento profilático (MDA) é um dos mais utilizados, uma vez que os fármacos de desparasitação têm um registro de segurança comprovado, geralmente barato e com facilidade de administração (HALDEMAN *et al.*, 2020).

Apesar dos muitos benefícios que a estratégia do tratamento periódico em massa pode trazer, reduzindo a prevalência e a intensidade da infecção, é extremamente importante considerar a possibilidade do estabelecimento de cepas resistentes ao mesmo, as quais estão muito bem caracterizadas em tricostrongilídeos de importância veterinária (PRICHARD, 2001; LOURDES MOTTIER; PRICHARD, 2008; BALTRUŠIS *et al.*, 2018; ATANÁSIO-NHACUMBE *et al.*, 2019). A utilização excessiva e irracional de anti-helmínticos tem se tornado comum por várias razões, seja para o benefício da saúde animal, para melhor produtividade em ruminantes, ou melhor desempenho em equinos, porém as consequências nem sempre são favoráveis, principalmente quando se estabelece a resistência anti-helmíntica (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012; CASTRO *et al.*, 2021).

O *A. ceylanicum* é um excelente modelo para o estudo de ancilostomídeos e análises *in vivo*, uma vez que é possível reproduzir de forma satisfatória em hamsters, patogenia similar a infecção em outros hospedeiros definitivos (PACANARO *et al.*, 2014; SERAFIM *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2019; MEDEIROS *et al.*, 2022). Neste estudo, foi selecionada em laboratório, uma cepa de *A. ceylanicum* resistente ao ABZ através de infecções e tratamentos consecutivos, corroborando a definição de que a pressão seletiva por um fármaco pode selecionar organismos resistentes. Os dados aqui apresentados são suficientes para fazer uma extrapolação: a alta frequência de tratamento de *A. ceylanicum* com ABZ sem associação com outras medidas de controle e sem alternância de fármacos pode levar à seleção de cepas de ancilostomídeos resistentes.

Existem vários estudos que buscaram possíveis genótipos relacionados à resistência em ancilostomídeos (SCHWENKENBECHER *et al.*, 2007; FURTADO *et al.*, 2016b, 2018; ZUCCHERATO *et al.*, 2019; ORR *et al.*, 2019; CASTRO *et al.*, 2021) e há vários relatos de falha no tratamento desses parasitos usando diferentes tipos de fármacos, pamoato de pirantel,

milbemicina e especialmente BZs (DE CLERCQ *et al.*, 1997; ALBONICO *et al.*, 2004; KOPP *et al.*, 2008; HUMPHRIES *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2021; COLELLA *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2022).

Furtado *et al.*, (2019a) selecionaram uma cepa de *A. ceylanicum* resistente ao ABZ através de ciclos de infecção em hamsters seguidos de tratamento, o estudo buscou associação entre causa e efeito em ambiente controlado. Embora tenham conseguido selecionar uma cepa resistente, não foi possível determinar os mecanismos envolvidos nesse processo e, por ser menos adaptada para ser mantida em laboratório, essa cepa foi perdida.

Anteriormente no estudo de Furtado *et al.*, (2019a) foi determinada a dosagem de 0,2 mg de ABZ como letal para eliminar 100% da infecção de *A. ceylanicum* em hamsters. Neste estudo atual, com apenas três ciclos seriados de infecção seguidos de tratamento, foi isolada uma cepa que sobreviveu à dose letal (0,2 mg). No quarto ciclo, a cepa apresentou um nível de resistência ainda maior (0,3 mg), e embora tenha se mostrado resistente, não sobreviveu às overdoses (0,35 mg e 0,4 mg) administradas no quinto ciclo. Os vermes podem ter morrido possivelmente devido aos mecanismos secundários de ação dos BZs, como a redução do transporte de glicose (KEYSTONE; MURDOCH, 1979), o desacoplamento da fosforilação oxidativa (JONES; WATSON, 1965) e inibição da ação da enzima fumarato redutase mitocondrial (PRICHARD, 1973), que podem se tornar mais relevantes em uma overdose de ABZ.

No estudo atual, devemos destacar que ao final do processo conseguimos isolar uma cepa com maior nível de resistência se comparado ao estudo de Furtado *et al.* (2019a). Possivelmente este resultado está relacionado à mudança no desenho experimental, em que no novo processo, um número muito maior de larvas (+/-5000) da cepa selvagem passou por um tratamento *in vitro* prévio antes do início da infecção *in vivo*. Ao tratar previamente as larvas, conseguimos selecionar os espécimes que já apresentavam algum nível de resistência. Isso foi importante considerando o baixo percentual dos SNPs em populações que não foram expostas ao tratamento anterior. De fato, em trabalhos analisando diferentes espécies de nematódeos, principalmente parasitos em humanos e cães, que se espera serem menos expostos a tratamentos periódicos do que ruminantes, a frequência de SNPs encontrada foi baixa (DIAWARA *et al.*, 2013b; FURTADO *et al.*, 2014; ORR *et al.*, 2019).

As diferenças significativas observadas nas três concentrações de ABZ (1,25; 2,0 e 5,0 µg/mL) no bioensaio do teste de eclodibilidade de larvas (EHT) reforça o sucesso da metodologia no processo de isolamento da cepa resistente, onde o número de larvas recuperadas foi consideravelmente maior em relação a cepa selvagem. O EHT corresponde ao ensaio *in*

in vitro mais utilizado para avaliar a eficácia dos BZs, cuja incubação pode interferir na embriogênese e na eclosão das larvas, dependendo das concentrações do fármaco e do estado de suscetibilidade do verme. Essa metodologia de verificação de resistência a fármacos tem sido frequentemente utilizada em trabalhos de campo (VÁRADY *et al.*, 2007; CEBALLOS *et al.*, 2019; KÖNIGOVÁ *et al.*, 2021), principalmente em locais onde o teste molecular para pesquisa de genótipos relacionados à resistência não é acessível.

Na análise molecular, não foi detectada nenhuma alteração no códon 167 das amostras de cepas resistentes. De fato, essa mutação nunca foi encontrada em populações brasileiras de *A. caninum* (FURTADO; RABELO, 2015ab), *A. braziliense* (FURTADO *et al.*, 2018b) ou *N. americanus* (FURTADO *et al.*, 2020); entretanto, é importante ressaltar que esses estudos citados não relatam o histórico de tratamento do hospedeiro. Este SNP já foi descrito por Orr *et al.* (2019) em *N. americanus* parasitando crianças em Gana, com aumento da frequência de mutações nos códons 167 e 200 em amostras pós-tratamento de indivíduos não curados por albendazol.

Jiménez Castro *et al.* (2019) demonstraram pela primeira vez a presença de resistência múltipla a BZs, lactonas macrocíclicas e pirantel em *A. caninum*, com provável associação com o códon 167. D'Ambroso Fernandes *et al.* (2022) relataram resistência do nematódeo *A. caninum* ao pamoato de pirantel combinado com praziquantel, bem como ao fenbendazol, utilizando o teste de redução da contagem de ovos fecais (FECRT), não foi realizada análise molecular para pesquisa de SNP relacionado à resistência. A presença da mutação no códon 167 já foi descrita para vários outros helmintos de importância médica e/ou veterinária como *A. lumbricoides* (DIAWARA *et al.*, 2013a), *H. contortus* (BARRÈRE *et al.*, 2012) e trichostrongilídeos de bovinos e bisões (AVRAMENKO *et al.*, 2020). No entanto, considerando nossos resultados, acreditamos que, se presente, o SNP no códon 167 tem baixa frequência na cepa resistente e, portanto, não corresponde ao principal mecanismo de resistência neste isolado selecionado de *A. ceylanicum*.

Não foram detectados SNPs no códon 198 na cepa selvagem. Entretanto, foi observado um aumento diretamente proporcional entre a presença da mutação no códon 198 e a dosagem de ABZ utilizada nos diferentes ciclos de infecções para obtenção da cepa resistente. Houve um aumento gradativo da presença da mutação nos vermes dos grupos utilizados para o isolamento da cepa resistente (Grupo 3 → Grupo 3.2 → Grupo 3.2.2 → Grupo 3.2.2.1), de modo que quase 100% dos vermes tratados com dose superior à considerada letal (Grupos 3.2.2 e 3.2.2.1) apresentaram mutações no códon 198. Essa mutação também já foi descrita em diversos helmintos de importância humana e/ou veterinária, como *H. contortus* (GHISI *et al.*,

2007), *N. americanus* (RASHWAN *et al.*, 2016), *T. trichiura* (DIAWARA *et al.*, 2013a) e *T. circumcincta* (REDMAN *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-VALLADARES *et al.*, 2020). Neste estudo, em relação ao SNP no códon 198, observou-se que desde o tratamento da cepa resistente com uma primeira overdose (Grupo 3.2.2 tratado com 0,25 mg), houve diminuição do percentual de heterozigotos, passando para um aumento na porcentagem de indivíduos mutantes homozigotos; ou seja, indivíduos com dois alelos mutados apresentaram maior nível de resistência do que indivíduos com um único alelo mutado. Mutações no códon 198, em formas homozigotas ou heterozigotas já foram relatadas em outros ancilostomídeos, como *A. braziliense* (FURTADO *et al.*, 2018b) e *N. americanus* (ZUCCHERATO *et al.*, 2018), mas sem uma correlação exata entre sua presença e o estabelecimento de uma cepa resistente. Até onde sabemos, essa forte correlação entre vermes mutados homozigotos e aumento do nível de resistência já foi observada nos códons 167 e/ou 200 para outros helmintos (ELARD; HUMBERT, 1999; BARRÈRE *et al.*, 2012), mas nunca relatada no códon 198 de qualquer espécie.

O SNP canônico no códon 200, comumente descrito como o mais frequente entre os três principais SNPs, não estava presente na cepa resistente isolada, embora já tenha sido descrito em populações de *A. caninum* coletadas em campo no Brasil (FURTADO *et al.*, 2014), e para os nematódeos *N. americanus* e *T. trichiura* (DIAWARA *et al.*, 2013a). Mohanraj *et al.* (2017) observaram que 100% das larvas de *H. contortus* de uma população que não respondeu mais ao tratamento apresentavam mutações no códon 200. Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos (PALCY *et al.*, 2010; DIXIT *et al.*, 2017). Nossos dados revelam que este SNP canônico não tem relevância no processo de resistência na cepa isolada.

Uma mutação nunca descrita para nematódeos infectando humanos foi encontrada em 5 amostras de vermes machos recuperados da cepa resistente no quarto ciclo de infecção (Grupo 3.2.2.1). O sequenciamento mostrou uma mutação na terceira base do códon 200 (TTC/fenilalanina → TTA/leucina) F200L, todas na forma de heterozigose. Este SNP e o SNP F167L foram bem documentados em espécies de nematódeos trichostrongilídeos infectando bovinos nos EUA, Canadá e Brasil e em bisões no Canadá, na maioria dos casos em baixa frequência (Avramenko *et al.*, 2020). Embora este SNP nunca tenha sido associado à resistência ao ABZ em ancilostomídeos, ele já foi associado à resistência ao ABZ em fungos (ZOU *et al.*, 2006; MISISKA; MORTON., 2009). No entanto, como a frequência desta mutação foi baixa (5,5% do total de vermes do Grupo 3.2.2.1), sugerimos que este SNP corresponde a um mecanismo auxiliar de resistência.

O fato de todas as 5 amostras, vermes resistentes a 0,3 mg ABZ, também apresentarem mutações no códon 198 (em homozigose ou heterozigose) reforça a hipótese da natureza secundária deste SNP recentemente descrito. Embora esse tipo de achado não seja comum, já foram relatadas mutações não silenciosas em outras bases no códon 198 (**GA A** → **TT A**). Em estudo realizado por Mohammedsalih *et al.* (2020), analisando larvas L3 e vermes adultos de *H. contortus* em busca por SNPs para o códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1, demonstraram a presença de mutações na primeira e segunda base nitrogenada deste códon em 82% das amostras, pós-tratamento com ABZ, ocorrendo a substituição de um glutamato (**GAA**) por uma leucina (**TTA**).

Orr *et al.* (2019) em estudo que avaliou a eficácia do ABZ em ancilostomídeos, identificou polimorfismos duplos nos códons 198 e 200 do gene da β -tubulina de *N. americanus*. Nossos resultados também apresentaram mutações duplas nestes códons, porém o SNP no códon 200 do trabalho de Orr codificava uma tirosina e em nossos resultados o códon 200 mutado codifica uma leucina, SNP ainda não descrito para ancilostomídeos.

A substituição do aminoácido GAA Glutamato por uma Leucina TTA no códon 198 foi descrita anteriormente por Redman *et al.* (2015), em amostras do nematódeo *T. circumcincta*. Martínez Valladares *et al.* (2020) também relataram uma alteração nas duas primeiras bases nitrogenadas no códon 198 ácido glutâmico (GAA) codificando uma leucina (CTA) em *T. circumcincta*, sendo que, aproximadamente 90% das amostras pós-tratamento codificavam uma leucina no códon 198, o que levou a conclusão de que a presença deste SNP pode conferir resistência ao BZ.

Em fungos que também são comumente tratados com BZs, diferentes mutações têm sido relatadas com mais frequência e estão implicadas no fenótipo de resistência do organismo. No estudo de Duan *et al.*, (2019), mutações nos códons 163, 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina foram relacionadas à resistência, e a presença de mutações duplas e triplas diminuíram significativamente a sensibilidade aos BZs. De acordo com nossos resultados, as mutações duplas para os códons 198 e 200 também apareceram nos vermes com maior nível de resistência.

No estudo anterior de Furtado *et al.*, (2019a), nas análises moleculares realizadas com a cepa resistente não foi encontrado nenhum SNP canônico no gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*. Uma minibiblioteca de cDNA do gene da β -tubulina isotipo 1 foi construída e foram detectadas algumas mutações aleatórias que não foram reproduzíveis em mais de uma amostra. No estudo atual conseguimos selecionar uma cepa de *A. ceylanicum* resistente ao ABZ

e correlacionar a presença do SNP no códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 e a resistência do parasito ao fármaco.

Após a caracterização molecular da cepa resistente ao ABZ, além da sobrevivência ao fármaco, buscamos avaliar as características dos helmintos em comparação parasitológica, morfométrica e patogênica da infecção em hamsters, com as cepas selvagem e resistente ao ABZ. Os estudos de comparação de infecções com helmintos são pouco explorados em experimentos controlados, e a maioria dos trabalhos abordando esse tema, foram publicados há mais de duas décadas (KELLY *et al.*, 1978; LEIGNEL; CABARET, 2001; PRICHARD, 2001). Aqui procuramos correlacionar algumas características relacionadas à morfologia, adaptabilidade, infectividade, patogenicidade, taxa de fertilidade das fêmeas e eclodibilidade de larvas.

No estudo comparando as infecções entre as cepas selvagem e resistente ao ABZ, para os parâmetros parasitológicos, houve diferença no período pré-patente entre o isolado tipo selvagem (14° DPI) e o isolado resistente, a partir de agora denominado AceyBZR2 (16° DPI). No entanto, com base em nossa experiência com a infecção por *A. ceylanicum* em um modelo experimental, essa variação do período pre-patência já é esperada, podendo ocorrer de 13 a 21 DPI (DIAS *et al.*, 2013; PACANARO *et al.*, 2014; SERAFIM *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2019; FURTADO *et al.*, 2019a).

Desde o 20° DPI até o dia da eutanásia, a cepa do tipo selvagem apresentou maior produção de ovos, no entanto, a taxa de fertilidade das fêmeas, determinada pelo número de ovos divididos pelo número de fêmeas, não mostrou diferença significativa entre as duas cepas. Maingi *et al.* (1990) observaram que a cepa *H. contortus* suscetível ao tiabendazol apresentou maior produção de ovos quando comparada a algumas cepas resistentes a este fármaco. Em relação a taxa de fertilidade das fêmeas, nossos dados diferem do estudo de Prichard (2001), no qual ele relata que as fêmeas de cepas resistente de *H. contortus* podem apresentar disfunção na postura de ovos, e com base nos nossos resultados, não ocorreu diferença significativa entre os dois grupos.

A infecção foi melhor sucedida nos animais infectados com a cepa tipo selvagem. Essa conclusão pôde ser constatada pelo maior número de vermes machos e fêmeas recuperados no dia da eutanásia e, conseqüentemente, do maior número total de vermes recuperados do grupo infectado pela cepa do tipo selvagem quando comparado ao isolado resistente AceyBZR2. Esses resultados contradizem os dados de Leignel e Cabaret (2001) para *T. circumcincta*, onde na comparação de infecções, não ocorreu diferença significativa na sobrevivência de vermes adultos resistentes e selvagens.

Segundo Morand (1996), o tamanho do corpo de um nematódeo é um indicador indireto da fertilidade, pois são duas variáveis que estão positivamente correlacionadas. No entanto, é importante ressaltar que outros fatores podem influenciar a fertilidade dos vermes, como o efeito de aglomeração (*crowding*) e fatores ambientais, como as estações do ano (AUSTIN *et al.*, 2017). Nossos resultados revelaram que os vermes machos e fêmeas do grupo resistente AceyBZR2 eram maiores do que os isolados do tipo selvagem, mas não ocorreu diferença na taxa de fertilidade das fêmeas. Acreditamos que os vermes do tipo selvagem isolados foram menores devido ao efeito de aglomeração ou *crowding*, consequência da competição por espaço e alimentação, como já relatado em outros estudos (ROBERTS, 2000; SERAFIM *et al.*, 2014). A infecção pelo isolado AceyBZR2 pareceu ser menos adaptada ao hospedeiro, o número de vermes recuperados foi muito menor em comparação ao isolado do tipo selvagem, e consequentemente, o número de ovos liberados durante o período de infecção também foi menor.

Elard *et al.*, (1998) não observaram diferenças na produção de ovos, taxa de eclodibilidade, estabelecimento da infecção, ou sobrevivência de vermes adultos entre infecções com cepas suscetível e resistente de BZs no nematódeo *T. circumcincta*. Esses dados diferem do presente estudo onde a cepa selvagem apresentou uma maior produção de ovos e recuperação de vermes, e a taxa de eclodibilidade de larvas da cepa selvagem foi menor em relação a cepa resistente ao ABZ.

Quanto à patogenicidade dos parasitos e o peso corporal dos hospedeiros, os grupos infectados não diferiram entre si, mas diferiram do grupo controle. Apesar de uma maior recuperação de vermes no grupo da cepa selvagem, essa diferença não foi suficiente para causar uma perda significativa de peso em relação ao grupo isolado AceyBZR2. Serafim *et al.* (2014) observaram diferenças de peso entre os grupos de hamsters infectados com diferentes quantidades de larvas de *A. ceylanicum*, os inóculos variaram entre 25, 75, 125 e 250 L3, sendo que os grupos infectados com 125 e 250 L3 foram os que perderam maior peso em relação ao grupo controle e os demais grupos. Em nossos resultados os grupos experimentais foram infectados com o mesmo número de larvas (75L3), não ocorrendo diferença significativa na perda de peso entre os grupos infectados, somente em relação ao grupo controle não infectado.

Na avaliação do eritrograma, ocorreu uma diferença significativa entre o grupo infectado com a cepa Selvagem e o grupo Controle, para os parâmetros: contagem do número de hemácias, porcentagem do hematócrito e CHCM, sendo que o grupo Selvagem apresentou um índice inferior nesses parâmetros avaliados. Para o grupo infectado com a cepa AceyBZR2, não ocorreu diferença significativa nestes parâmetros, isto pode ter ocorrido devido a uma

menor recuperação de vermes após eutanásia neste grupo, o resultado sugere que a infecção causou menos espoliação ao hospedeiro, para o grupo infectado com a cepa AceyBZR2.

Os grupos infectados apresentaram menor concentração de hemoglobina quando comparados com o grupo Controle não infectado, isto se justifica principalmente devido ao fato do *A. ceylanicum* ser um nematódeo hematófago. Embora exista uma tendência de queda no grupo do tipo Selvagem, a hemoglobina entre os grupos infectados não difere. Os níveis de hematócrito e contagem de hemácias foram significativamente menores no grupo infectado com a cepa Selvagem em relação ao grupo Controle, indicando anemia, devido a perda crônica de sangue no intestino (HOTEZ *et al.*, 2004), apesar desses valores se apresentarem menores para a cepa AceyBZR2, não houve diferença estatística entre os demais grupos.

Em um estudo realizado por Hernández-Cruz *et al.*, (2022) foram comparados resultados de exames hematológicos de cinco animais (macacos-pregos barbudos do Brasil, espécie *Sapajus libidinosus*) infectados com *Ancylostoma* spp, com outros animais coespecíficos com exames parasitológicos negativos. As concentrações de hemoglobina e CHCM foram menores para o grupo infectado, e estão de acordo com nossos resultados, esses achados são consistentes com os processos patogênicos associados à infecção por *Ancylostoma* spp, pois esses parasitos promovem perda sanguínea e consequente anemia por fixação na parede intestinal do hospedeiro (HOTEZ *et al.*, 2004). Porém, os resultados dos números de eritrócitos divergem dos encontrados no presente trabalho, onde o grupo controle de hamsters não infectado apresentou valores significativamente mais elevados de eritrócitos em comparação ao grupo infectado com a cepa Selvagem, e o trabalho cujo hospedeiro era o macaco-prego, no grupo positivo para *Ancylostoma* spp a contagem de eritrócitos foi ligeiramente maior em comparação ao grupo não infectado, sendo considerado não significativo clinicamente.

Para os parâmetros VCM e HGM não ocorreu diferença significativa entre os grupos. Não houve diferença significativa na contagem de plaquetas entre os grupos infectados e o grupo Controle, porém devido a presença da anemia e diminuição do número de eritrócitos nos grupos infectados, ocorre uma hiperestimulação da medula óssea pela produção de células sanguíneas, principalmente hemácias, o que pode justificar um aumento moderado no número de plaquetas. O RDW foi maior para o grupo infectado com a cepa Selvagem em relação ao grupo Controle porque a infecção provoca a deficiência de ferro e a formação de hemácias menores, ou defeitos na forma dessas células, o que aumenta o índice de variação nesses tamanhos (MATOS *et al.*, 2008). Após a eutanásia dos grupos, um número bem maior de vermes foi recuperado em hamsters infectados com a cepa Selvagem, em relação ao grupo

infectado com a cepa AceyBZR2, o que pode justificar a diferença significativa em alguns parâmetros (nº eritrócitos, hematócrito, CHGM, RDW) somente entre a infecção do grupo Selvagem e o grupo Controle.

Apesar de não ser o melhor marcador para determinar a anemia ferropriva (CAPPELLINI *et al.*, 2020), a dosagem de ferro sérico foi o único parâmetro que mostrou diferença entre as duas cepas infectadas, com o menor valor para o grupo tipo Selvagem, provavelmente devido a maior espoliação de ferro, uma vez que na ancilostomose ocorre muita perda sanguínea (HOTEZ *et al.*, 2004), e o grupo infectado com a cepa Selvagem apresentou um número maior de recuperação de vermes após eutanásia.

Embora a infecção induza a perda de albumina e outras proteínas devido aos processos inflamatórios e hemorrágicos intestinais (PACANARO *et al.*, 2014), não observamos diferenças entre os grupos infectados com as cepas Selvagem e a cepa AceyBZR2, provavelmente devido ao estágio inicial de infecção, houve diferença apenas entre os grupos infectados em relação ao grupo Controle.

Após análise da comparação entre as infecções com as cepas suscetíveis e resistentes ao ABZ foi verificado se o isolado AceyBZR2 poderia ser resistente a outras drogas do mesmo grupo (com mecanismos de ação semelhantes) e de outros grupos (com diferentes mecanismos de ação). Considerando relatos publicados de resistência em ancilostomídeos (KITCHEN *et al.*, 2019; JIMENEZ CASTRO *et al.*, 2019) e os principais fármacos utilizados comercialmente, selecionamos para avaliação ivermectina (do grupo de lactona macrocíclica), nitazoxanida (do grupo nitrotiazol) e MBZ (do grupo BZ).

Os resultados revelaram que as doses de ivermectina e nitazoxanida determinadas como esterilizadores para a cepa do tipo Selvagem também foram capazes de eliminar a infecção causada pelo isolado AceyBZR2, ou seja, o isolado resistente ao ABZ não tem resistência cruzada a esses fármacos, uma vez que nenhum verme foi recuperado do intestino delgado dos hamsters após a eutanásia. Jimenez Castro *et al.*. (2019) relataram evidências convincentes usando análises *in vitro*, *in vivo* e genéticas de que os casos de tratamento refratário em cães infectados com *A. caninum* ocorreram devido à resistência múltipla aos BZs, lactonas macrocíclicas e pirantel. Considerando a proximidade filogenética e os diversos relatos de falha no tratamento (ALBONICO *et al.*, 2003; FLOHR *et al.*, 2007; ORR *et al.*, 2019), o estabelecimento de resistência em populações de parasitos de importância humana pode ser um problema iminente.

Quando animais infectados com cepa AceyBZR2 foram tratados com MBZ, foi observado o efeito de resistência lateral. Esse resultado era esperado uma vez que o MBZ tem

o mesmo mecanismo de ação que o ABZ, ambos fazem parte do grupo dos BZs (LACEY, 1988). Provavelmente se o isolado AceyBZR2 fosse tratado com outros fármacos da classe BZ, continuaríamos a observar o efeito de resistência lateral. Extrapolando o que acontece no campo, isso pode representar um problema, uma vez que a rotatividade do uso de anti-helmínticos com o mesmo mecanismo de ação pode continuar exercendo forte pressão de seleção sobre os parasitos.

Nas análises moleculares dos resultados deste estudo, alterações no gene da β -tubulina isótipo 1 foram caracterizadas como responsáveis pelas manifestações do fenótipo de resistência no isolado AceyBZR2. Embora ivermectina atue na junção neuromuscular dos nematódeos, especificamente nos canais de cloreto dependentes de glutamato (WOLSTENHOLME; ROGERS, 2005) há relato de que o uso periódico deste fármaco em *H. contortus* aumentou a frequência de mutações nos códons 167, 198 e 200 do gene do isótipo-1 da β -tubulina (MOTTIER; PRICHARD, 2008). Jimenez Castro *et al.* (2019) também mencionaram a possível participação da mutação do códon 167 de uma cepa de *A. caninum* resistente à ivermectina, praziquantel e benzimidazóis. No entanto, os dados aqui obtidos não suportam esses resultados, uma vez que não recuperamos ovos ou vermes dos grupos tratados com ivermectina.

Embora não haja dados sobre resistência a nitazoxanida, cujo mecanismo de ação não é exatamente compreendido, acredita-se que sua ação contra protozoários seja devida a sua interferência na enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR), a qual é essencial para o seu metabolismo energético anaeróbico. Entretanto, em relação aos nematódeos, nada se sabe sobre o modo de ação da nitazoxanida, mas o envolvimento de enzimas relacionadas ao transporte de elétrons é especulado (SOMVANSHI *et al.*, 2014; SHAKYA *et al.*, 2018). A nitazoxanida é um fármaco sintético da classe tiazolida, de amplo espectro, utilizado como antiprotozoário, antiviral, bactericida e anti-helmíntico, por isso incluímos este fármaco na avaliação, ele tem sido amplamente utilizado nos últimos anos, mas também não vimos resistência cruzada. Embora não tenhamos observado a resistência cruzada com as doses esterilizadoras testadas de ivermectina e nitazoxanida, não podemos descartar a hipótese de que os vermes poderiam ter sido recuperados após a subdosagem dos fármacos. Sugerimos que novos experimentos sejam realizados com uma maior diversidade de fármacos, incluindo praziquantel, e uma maior diversidade de doses testadas, para uma melhor compreensão da situação.

Nossos dados demonstram que o isolado AceyBZR2 é menos adaptado à infecção, portanto menos patogênico quando comparado a cepa do tipo selvagem e com menor produção

de ovos, como consequência do menor número de vermes sobreviventes. A caracterização aqui realizada permitiu avançarmos um pouco na relação parasito-hospedeiro e na biologia da cepa Resistente. Garside e Behnke (1989) utilizaram infecção em hamsters com *A. ceylanicum* para estudar a relação parasita-hospedeiro, uma vez que os modelos caninos são mais trabalhosos para reproduzir uma infecção experimental em laboratório. Nesse trabalho foi observado os estádios de desenvolvimento das larvas infectantes até a forma de vermes adultos e o tempo de sobrevivência dos nematódeos durante o período da infecção, que durou aproximadamente 200 dias. Porém os resultados encontrados não se comparam aos nossos, uma vez que em nosso experimento não houve diferença na data de infecções para comparação das cepas, e o período da infecção foi menor em relação ao estudo de Garside.

Os altos índices da presença de infecção em cães pelo *A. caninum* têm se tornado preocupantes, uma vez que estes compartilham o ambiente urbano doméstico com o homem (FURTADO *et al.*, 2014). Estudo realizado por Ngcamphalala *et al.*, (2019) na África do Sul, confirmou a infecção patente por *A. caninum* em humanos, evidenciada pela presença de ovos nas fezes, e confirmada através de biologia molecular das larvas oriundas das coproculturas. Até então, apenas a espécie zoonótica *A. ceylanicum* era considerada capaz de realizar infecção patente em humanos (STRACKE *et al.*, 2020). Este fato é preocupante devido as evidências moleculares da presença de polimorfismos nos códons 167 e 198 do gene da β -tubulina relacionados à resistência em *A. caninum* e *A. Ceylanicum*, respectivamente. Estudos sobre a baixa eficácia dos BZs sugere que a monoterapia com uso do ABZ será insuficiente para atingir e manter a meta da OMS de eliminação de infecções dos STH até 2030, e estratégias de terapias alternativas serão necessárias para amenizar esse problema de saúde pública (OMS, 2020; WALKER *et al.*, 2021).

Para finalizar, ressaltamos a importância de mais estudos relativos às infecções pelos nematódeos transmitidos pelo solo, e o aprimoramento do diagnóstico molecular para diferenciação das espécies e reconhecimento precoce dos casos de resistência anti-helmíntica. De acordo com discussões na 8ª reunião do Consórcio para Resistência e Suscetibilidade Anti-helmíntica (CARS) de 2019 em Wisconsin, EUA, grupo este que se reúne a cada dois anos com objetivo de promover pesquisas visando o desenvolvimento de marcadores moleculares para o diagnóstico da resistência anti-helmíntica, e auxiliar no desenvolvimento de novos medicamentos, vários problemas foram identificados, como a falta de financiamento para pesquisa básica em helmintos e descoberta de novos fármacos, tendo em vista a baixa visibilidade das doenças helmínticas dentre as doenças negligenciadas (KOTZE *et al.*, 2014; NIXON *et al.*, 2020). O controle de helmintos é um desafio fundamental para a medicina

humana e veterinária, e na ausência de vacinas eficazes e saneamento adequado, a profilaxia e tratamento dependem dos anti-helmínticos, e para melhor solução destes problemas é primordial a consciência política e interesse científico para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. De acordo com o CARS, apenas três classes de medicamentos chegaram ao mercado animal desde o ano 2000, e nenhuma para humanos (NIXON *et al.*, 2020).

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

No presente trabalho, o desenho experimental de um estudo prévio realizado por Furtado *et al.* (2019a) foi alterado, e foi possível selecionar com sucesso uma cepa de *A. ceylanicum* com elevado nível de resistência ao ABZ. Por sequenciamento, foi possível determinar que o SNP no códon 198, comumente associado à resistência, corresponde ao principal mecanismo de resistência da cepa isolada AceyBZR2. Além disso, uma nova alteração no códon 200, nunca descrita em nematódeos que infectam humanos, foi relatada aqui como um provável mecanismo secundário de resistência. Mais estudos serão necessários para melhor compreensão deste SNP recém descrito em ancilostomídeo no processo de resistência aos BZs.

Os dados mostraram que a cepa de *A. ceylanicum* AceyBZR2 é menos adaptada ao hospedeiro, menos patogênica quando comparada à cepa Selvagem e com menor produção de ovos. A avaliação de resistência múltipla revelou que a cepa resistente ao ABZ só apresentou resistência, dentre os fármacos testados, ao mebendazol, composto da mesma classe que o albendazol. Extrapolando os resultados aqui encontrados e sugerindo novos capítulos no estudo do tratamento da ancilostomose, o perfil do genótipo da cepa resistente será melhor avaliado após três anos de isolamento. É de se supor que as alterações decorrentes da pressão seletiva ao albendazol, não estejam limitadas às alterações no gene da β -tubulina. Dessa forma, outros marcadores moleculares, mitocondriais e nucleares serão analisados. Outros trabalhos serão também realizados para a avaliação da reversibilidade desse novo genótipo, em função do tempo decorrido ou após infecções mistas das duas cepas. Idealmente essas comparações deveriam ser feitas com cepas de *A. ceylanicum* isoladas de ambiente natural, sem passar por novo tratamento.

Os dados aqui apresentados além de trazerem contribuições ao estudo dos mecanismos de resistência envolvidos para ancilostomídeos, também podem servir de base para o estabelecimento de futuras estratégias de controle para helmintos transmitidos pelo solo.

REFERÊNCIAS

- ALBONICO, M. *et al.* Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. **Bull World Health Organ.** 2003; 81:343-352.
- ALBONICO, M.; WRIGHT, V.; BICKLE, Q. Molecular analysis of the beta-tubulin gene of human hookworms as a basis for possible benzimidazole resistance on Pemba Island. **Mol. Biochem. Parasitol.** 2004;134(2):281-284.
- ATANÁSIO-NHACUMBE, A.; LAMBERT, S. M.; DA SILVA SOUZA, B. M. P. Molecular detection of benzimidazole resistance levels associated with F167Y and F200Y polymorphisms in *Haemonchus contortus* of goats from Mozambique. **Parasitol Res** 118, 245–253 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6162>
- AULA, O. P. *et al.* Molecular identification of *Ancylostoma ceylanicum* in the Philippines. **Parasitology.** 2020 Dec;147(14):1718-1722. doi: 10.1017/S0031182020001547. Epub 2020 Aug 24. PMID: 32829714.
- AUNG, W. *et al.* First Molecular Identifications of *Necator americanus* and *Ancylostoma ceylanicum* Infecting Rural Communities in Lower Myanmar. **Am J Trop Med Hyg.** 2017 Jan 11;96(1):214-216. doi: 10.4269/ajtmh.16-0610. Epub 2016 Oct 24. PMID: 28077747; PMCID: PMC5239696.
- AUSTIN, L. V. *et al.* A comparison of two methods for quantifying parasitic nematode fecundity. **Parasitol Res.** 116(5), 1597-1602 (2017).
- AVRAMENKO, R. W. *et al.* Deep amplicon sequencing as a powerful new tool to screen for sequence polymorphisms associated with anthelmintic resistance in parasitic nematode populations. **Int J Parasitol.** 2019 Jan;49(1):13-26. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.10.005. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30471287.
- AVRAMENKO, R. W. *et al.* Assessing anthelmintic resistance risk in the post-genomic era: a proof-of-concept study assessing the potential for widespread benzimidazole-resistant gastrointestinal nematodes in North American cattle and bison. **Parasitology.** 2020 Jul;147(8):897-906. doi: 10.1017/S0031182020000426. Epub 2020 Mar 6. Erratum in: *Parasitology.* 2020 Jul;147(8):907. PMID: 32138794; PMCID: PMC7391874.
- BALTRUŠIS, P.; HALVARSSON, P.; HÖGLUND, J. Exploring benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* by next generation sequencing and droplet digital PCR. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.** 2018 Dec;8(3):411-419. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.09.003. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30266023; PMCID: PMC6159336.
- BARRÈRE, V. *et al.* Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. **Vet Parasitol.** 2012 May 25;186(3-4):344-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.068. Epub 2011 Nov 28. PMID: 22192770.

BARRÈRE, V. *et al.* Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. **Parasitol Int.** 2013 Oct;62(5):464-70. doi: 10.1016/j.parint.2013.06.001. Epub 2013 Jun 14. PMID: 23773905.

BETHONY, J. *et al.* Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet.** 2006 May 6;367(9521):1521-32. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68653-4. PMID: 16679166.

Biocca, E. On *Ancylostoma braziliense* (de Faria, 1910) and its morphological differentiation from *A. ceylanicum* (Looss, 1911). **J Helminthol** 25:1-10; (1951)

BLACKHALL, W. J.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology**, v. 152(1-2):101-107, 2008.

BRADBURY, R. S. *et al.* *Ancylostoma ceylanicum* hookworm in the Solomon Islands. **Emerg Infect Dis** 23: 252, (2017).

Brunton *et al.* **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 12^a Ed, McGraw-Hill, 2012.

BUI, K. L. *et al.* *Ancylostoma ceylanicum* infections in humans in Vietnam. **Parasitol Int.** 2021 Oct; 84:102405. doi: 10.1016/j.parint.2021.102405. Epub 2021 Jun 15. PMID: 34139361.

CAPPELLINI, M. D.; MUSALLAM, K. M.; TAHER, A. T. Iron deficiency anaemia revisited. **J Intern Med.** 2020 Feb;287(2):153-170. doi: 10.1111/joim.13004. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31665543.

CEBALLOS, L. *et al.* The egg hatch test: A useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. **Vet Parasitol.** 2019 Jul; 271:7-13. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.06.001. Epub 2019 Jun 3. PMID: 31303208.

CLARK, H. J. *et al.* Isolation and characterisation of a beta tubulin isotype 2 gene from two species of cyathostomin. **Int J Parasitol.** 2005 Apr 1;35(4):349-58. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.12.010. PMID: 15777911.

COLELLA, V. *et al.* Risk profiling and efficacy of albendazole against the hookworms *Necator americanus* and *Ancylostoma ceylanicum* in Cambodia to support control programs in Southeast Asia and the Western Pacific. **Lancet Reg Health West Pac.** 2021 Aug 26; 16:100258. doi: 10.1016/j.lanwpc.2021.100258. PMID: 34590062; PMCID: PMC8403762.

CONLAN, J. V. *et al.* Soil-transmitted helminthiasis in Laos: a community-wide cross-sectional study of humans and dogs in a mass drug administration environment. **Am J Trop Med Hyg.** 2012 Apr;86(4):624-34. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0413. PMID: 22492147; PMCID: PMC3403769.

CROLL, N. A.; BLAIR, A. Inherent movement patterns of larval nematodes, with a stochastic model to simulate movement of infective hookworm larvae. **Parasitology.** 67(1), 53-66; (1973)

DA SILVA, V. J. *et al.* Hookworm infection aggravates metabolic disorder in obesity. **Mol Biochem Parasitol.** 2019 Sep; 232:111200. doi: 10.1016/j.molbiopara.2019.111200. Epub 2019 Jul 12. PMID: 31306675.

D'AMBROSO FERNANDES, F. *et al.* Gastrointestinal helminths in dogs: occurrence, risk factors, and multiple antiparasitic drug resistance. **Parasitol Res.** 2022 Jul 22. doi: 10.1007/s00436-022-07599-0. Epub ahead of print. PMID: 35867158.

DE CLERCQ, D. *et al.* Failure of mebendazole in treatment of human hookworm infections in the southern region of Mali. **Am J Trop Med Hyg.** 1997 Jul;57(1):25-30. doi: 10.4269/ajtmh.1997.57.25. PMID: 9242313.

DEMBELE, B. *et al.* Use of high-dose, twice-yearly albendazole and ivermectin to suppress *Wuchereria bancrofti* microfilarial levels. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 11, p. 1229-35, 2010.

DIAS, S. R. *et al.* Prednisolone and cyclosporine A: effects on an experimental model of ancylostomiasis. **Exp Parasitol.** 2013 Jan;133(1):80-8. doi: 10.1016/j.exppara.2012.10.008. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23142084.

DIAWARA, A. *et al.* Assays to detect beta-tubulin codon 200 polymorphism in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. **PLoS Negl Trop Dis.** 2009;3(3): e 397. doi: 10.1371/journal.pntd.0000397. Epub 2009 Mar 24. PMID: 19308251; PMCID: PMC2654341.

DIAWARA, A. *et al.* Association between response to albendazole treatment and β -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. **PLoS Negl Trop Dis.** 2013a May 30;7(5): e 2247. doi: 10.1371/journal.pntd.0002247. PMID: 23738029; PMCID: PMC3667785.

DIAWARA, A. *et al.* Molecular and biological diagnostic tests for monitoring benzimidazole resistance in human soil-transmitted helminths. **Am J Trop Med Hyg.** 2013b Jun;88(6):1052-61. doi: 10.4269/ajtmh.12-0484. Epub 2013 Mar 4. PMID: 23458960; PMCID: PMC3752802.

DIXIT, A. K. *et al.* An assessment of benzimidazole resistance against caprine nematodes in Central India. **Trop Anim Health Prod.** 2017 Oct;49(7):1471-1478. doi: 10.1007/s11250-017-1349-x. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28717849.

DUAN, Y. *et al.* Benzimidazole- and QoI-resistance in *Corynespora cassiicola* populations from greenhouse-cultivated cucumber: An emerging problem in China. **Pestic Biochem Physiol.** 2019 Jan; 153:95-105. doi: 10.1016/j.pestbp.2018.11.006. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30744902.

DUNN, J. C. *et al.* Soil-transmitted helminth reinfection four and six months after mass drug administration: results from the delta region of Myanmar. **PLoS Negl Trop Dis.** 2019 Feb 15;13(2): e0006591. doi: 10.1371/journal.pntd.0006591. PMID: 30768602; PMCID: PMC6395004.

ELARD, L.; SAUVE, C.; HUMBERT, J. F. Fitness of benzimidazole-resistant and -susceptible worms of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. **Parasitology.** 1998 Dec;117 (Pt 6):571-8. doi: 10.1017/s0031182098003436. PMID: 9881382.

ELARD, L.; HUMBERT, J. F. Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. **Parasitol Res.** 1999 Jun;85(6):452-6. doi: 10.1007/s004360050577. PMID: 10344538.

ENG, J. K. *et al.* Ivermectin selection on beta-tubulin: evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*. **Mol Biochem Parasitol.** 2006 Dec;150(2):229-35. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.08.007. Epub 2006 Sep 8. PMID: 17007942.

FLOHR, C. *et al.* Low efficacy of mebendazole against hookworm in Vietnam: two randomized controlled trials. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 76, 732-736; (2007)

FURTADO, L. F. *et al.* First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. **Vet Parasitol.** 2014 Dec 15;206(3-4):313-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.10.021. PMID: 25468029.

FURTADO, L. F.; RABELO, É. M. Development of a new amplification-refractory mutation system for detection of a single nucleotide polymorphism linked to drug resistance in *Ancylostoma caninum*. **Genet Mol Res.** 2015a May 12;14(2):5103-11. doi: 10.4238/2015.May.12.13. PMID: 26125702.

FURTADO, L. F.; RABELO, É. M. Molecular analysis of the F167Y SNP in the β -tubulin gene by screening genotypes of two *Ancylostoma caninum* populations. **Vet Parasitol.** 2015b May 30;210(1-2):114-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.03.018. Epub 2015 Mar 30. PMID: 25865406.

FURTADO, L. F.; DE PAIVA BELLO, A. C. P.; RABELO, É. M. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. **Acta Trop.** 2016a Oct; 162:95-102. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.06.021. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27338184.

FURTADO, L. F. *et al.* Standardization and application of the tetraprimer ARMS-PCR technique for screening of the E198A SNP in the β -tubulin gene of hookworm populations in Brazil. **Vet Parasitol.** 2016b Jul 15; 224:65-67. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.05.013. Epub 2016 May 13. PMID: 27270392.

FURTADO, L. F. **Polimorfismos envolvidos no processo de resistência aos benzimidazóis em ancilostomídeos.** Tese Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, p 193, 2018a.

FURTADO, L. F.; MAGALHÃES, J. G. S.; RABELO, É. M. Standardization and application of a modified RFLP-PCR methodology for analysis of polymorphisms linked to treatment resistance in *Ancylostoma braziliense*. **Parasit Vectors.** 2018b Oct 9;11(1):540. doi: 10.1186/s13071-018-3125-9. PMID: 30301454; PMCID: PMC6178248.

FURTADO, L. F. *et al.* Albendazole resistance induced in *Ancylostoma ceylanicum* is not due to single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at codons 167, 198, or 200 of the beta-tubulin gene, indicating another resistance mechanism. **Parasitol Res.** 2019a Mar;118(3):837-849. doi: 10.1007/s00436-019-06218-9. Epub 2019 Jan 29. PMID: 30697644.

FURTADO, L. F. *et al.* First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the beta-tubulin gene in *Ascaris lumbricoides*. **PLoS One**. 2019b Oct 17;14(10): e0224108. doi: 10.1371/journal.pone.0224108. PMID: 31622428; PMCID: PMC6797262.

FURTADO, L. F. *et al.* Genotypic profile of benzimidazole resistance associated with SNP F167Y in the beta-tubulin gene of *Necator americanus* helminths obtained from Brazilian populations. **Infect Genet Evol**. 2020 Dec; 86:104594. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104594. Epub 2020 Oct 17. PMID: 33080381.

GARSIDE, P.; BEHNKE, J. M. *Ancylostoma ceylanicum* in the hamster: observations on the host-parasite relationship during primary infection. **Parasitology**. 1989 Apr;98 Pt 2:283-9. doi: 10.1017/s003118200006220x. PMID: 2762039.

GEORGE, S. *et al.* Identification of *Ancylostoma ceylanicum* in children from a tribal community in Tamil Nadu, India using a semi-nested PCR-RFLP tool. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2015 Apr;109(4):283-5. doi: 10.1093/trstmh/trv001. Epub 2015 Jan 24. PMID: 25618132.

GHISI, M.; KAMINSKY, R.; MÄSER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Vet Parasitol**. 2007 Mar 31;144(3-4):313-20. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.10.003. Epub 2006 Nov 13. PMID: 17101226.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J Counc Sci Ind Res** 12:50-52; (1939)

HALDEMAN, M. S.; NOLAN, M. S.; NG'HABI, K. R. N. Human hookworm infection: Is effective control possible? A review of hookworm control efforts and future directions. **Acta Trop**. 201, 105214; 2020

HASSLINGER, M. A. Praxisrelevante Helminthen der Fleischfresser [Helminths of carnivores relevant to veterinary practice]. **Tierarztl Prax**. 1986;14(2):265-73. German. PMID: 3526635.

HERNÁNDEZ-CRUZ, G. *et al.* Haematology, physiological parameters, morphometry and parasitological status of rescued bearded capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*). **J Med Primatol**. 2022 Aug;51(4):213-222. doi: 10.1111/jmp.12584. Epub 2022 Apr 5. PMID: 35383937.

HOTEZ, P. J. *et al.* Hookworm infection. **N. Engl. J. Med**. 351(8), 799-807; 2004

HOTEZ, P. J. *et al.* New technologies for the control of human hookworm infection. **Trends Parasitol**, v. 22, p.327-331, 2006.

HUMPHRIES, D. *et al.* Epidemiology of hookworm infection in Kintampo North Municipality, Ghana: patterns of malaria coinfection, anemia, and albendazole treatment failure. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 84(5), 792-800; 2011

HUMPHRIES, D. *et al.* Hookworm infection among school age children in Kintampo north municipality, Ghana: nutritional risk factors and response to albendazole treatment. **Am J Trop Med Hyg**. 2013 Sep;89(3):540-8. doi: 10.4269/ajtmh.12-0605. Epub 2013 Jul 8. PMID: 23836564; PMCID: PMC3771297.

HUMPHRIES, D. *et al.* Effectiveness of Albendazole for Hookworm Varies Widely by Community and Correlates with Nutritional Factors: A Cross-Sectional Study of School-Age Children in Ghana. **Am J Trop Med Hyg.** 2017 Feb 8;96(2):347-354. doi: 10.4269/ajtmh.16-0682. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27895280; PMCID: PMC5303035.

INPANKAEW *et al.* High prevalence of *Ancylostoma ceylanicum* hookworm infections in humans, Cambodia, 2012. **Emerg Infect Dis** 20: 976. 2014.

Jenkins, H.G., 1969. Hookworm infection. **Br. Med. J.** 1(5639), 318.

JIMENEZ CASTRO, P. D. *et al.* Multiple drug resistance in the canine hookworm *Ancylostoma caninum*: an emerging threat? **Parasit Vectors.** 2019 Dec 9;12(1):576. doi: 10.1186/s13071-019-3828-6. PMID: 31818311; PMCID: PMC6902405.

JIMENEZ CASTRO, P. D. *et al.* Efficacy evaluation of anthelmintic products against an infection with the canine hookworm (*Ancylostoma caninum*) isolate Worthy 4.1F3P in dogs. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.** 2020 Aug; 13:22-27. doi: 10.1016/j.ijpddr.2020.04.003. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32403053; PMCID: PMC7214830.

JIMENEZ CASTRO, P. D. *et al.* Multiple drug resistance in hookworms infecting greyhound dogs in the USA. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.** 2021 Dec; 17:107-117. doi: 10.1016/j.ijpddr.2021.08.005. Epub 2021 Sep 2. PMID: 34492564; PMCID: PMC8426179.

JIRAANANKUL, V. *et al.* Incidence and risk factors of hookworm infection in a rural community of central Thailand. **Am J Trop Med Hyg** 84: 594–598. 2011.

JONES, O. T.; WATSON, W. A. Activity of 2-trifluoromethylbenzimidazoles as uncouplers of oxidative phosphorylation. **Nature.** 1965 Dec 18;208(5016):1169-70. doi: 10.1038/2081169a0. PMID: 5870313.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. **Vet Parasitol.** 2012 May 4;186(1-2):70-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.048. Epub 2011 Nov 20. PMID: 22154968.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintos.** Belo Horizonte: CPqRR, 2018.

KEISER, J.; UTZINGER, J. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 299(16), p.1937-1948, 2008.

KELLY, J. D. *et al.* Physiological characteristics of free-living and parasitic stages of strains of *Haemonchus contortus*, susceptible or resistant to benzimidazole anthelmintics. **Res. Vet. Sci.** 25(3), 376-385.; 1978

KEYSTONE, J. S.; MURDOCH, J. K. Mebendazole. **Ann Intern Med.** 1979 Oct;91(4):582-6. doi: 10.7326/0003-4819-91-4-582. PMID: 484964.

KITCHEN, S. *et al.* Isolation and characterization of a naturally occurring multidrug-resistant strain of the canine hookworm, *Ancylostoma caninum*. **Int. J. Parasitol.** 49:397-406; 2019

KOEHLER, A. V. *et al.* Genetic characterization of selected parasites from people with histories of gastrointestinal disorders using a mutation scanning-coupled approach. **Electrophoresis** 34: 1720–1728; 2013.

KOIKE, Y. The mode of infection of hookworms: experimental studies on oral infection of the infective larvae to the human host. **Journal of the Chiba Medical Society** 36, 11 33-1 149.; 1960

KÖNIGOVÁ, A. *et al.* Experimental evidence for the lack of sensitivity of in vivo faecal egg count reduction testing for the detection of early development of benzimidazole resistance. **Parasitol Res.** 2021 Jan;120(1):153-159. doi: 10.1007/s00436-020-06965-0. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33174071.

KOPP, S. R. *et al.* Application of in vitro anthelmintic sensitivity assays to canine parasitology: detecting resistance to pyrantel in *Ancylostoma caninum*. **Vet. Parasitol.** 152(3-4), 284-293; 2008

KOPP, S. R. *et al.* Acetylcholine receptor subunit genes from *Ancylostoma caninum*: altered transcription patterns associated with pyrantel resistance. **Int J Parasitol.** 2009 Mar;39(4):435-41. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.08.005. Epub 2008 Sep 13. PMID: 18823982.

KOTZE, A. C. *et al.* Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.** 2014 Aug 13;4(3):164-84. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.07.007. PMID: 25516826; PMCID: PMC4266812.

KWA, M. S.; VEENSTRA, J. G.; ROOS, M. H. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. **Mol Biochem Parasitol.** 1994 Feb;63(2):299-303. doi: 10.1016/0166-6851(94)90066-3. PMID: 7911975.

LACEY E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **Int J Parasitol.** 1988 Nov;18(7):885-936. doi: 10.1016/0020-7519(88)90175-0. Erratum in: Int J Parasitol 1989 May;19(3):359. PMID: 3066771.

LACEY E. Mode of action of benzimidazoles. **Parasitol Today.** 1990 Apr;6(4):112-5. doi: 10.1016/0169-4758(90)90227-u. PMID: 15463312.

LEIGNEL, V.; CABARET, J. 2001. Massive use of chemotherapy influences life traits of parasitic nematodes in domestic ruminants. **Funct. Ecol.** 15, 569-574. doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00567.x; 2001

LOUKAS, A. *et al.* Hookworm infection. **Nat Rev Dis Primers.** 2016 Dec 8; 2:16088. doi: 10.1038/nrdp.2016.88. PMID: 27929101.

LOURDES MOTTIER, M.; PRICHARD, R. K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenet Genomics.** 2008 Feb;18(2):129-40. doi: 10.1097/FPC.0b013e3282f4711d. PMID: 18192899.

MAINGI, N.; SCOTT, M. E.; PRICHARD, R. K. Effect of selection pressure for thiabendazole resistance on fitness of *Haemonchus contortus* in sheep. **Parasitology**. 100 Pt 2, 327-335; 1990

MARTÍNEZ-VALLADARES, M. *et al.* *Teladorsagia circumcincta* beta tubulin: the presence of the E198L polymorphism on its own is associated with benzimidazole resistance. **Parasit Vectors**. 2020 Sep 7;13(1):453. doi: 10.1186/s13071-020-04320-x. PMID: 32894163; PMCID: PMC7487696.

MATOS, J. F. *et al.* Índice de anisocitose eritrocitária (RDW): diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** [online]. 2008, v. 30, n. 2 [Acessado 24 setembro 2022], pp. 120-123. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-84842008000200009>>. Epub 21 Out 2008. ISSN 1806-0870.

MEDEIROS, C. D. S. **Varredura molecular de polimorfismos associados à resistência aos benzimidazóis em *Ascaris lumbricoides***. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, p 63, 2018.

MEDEIROS, C. D. S. *et al.* Moving beyond the state of the art of understanding resistance mechanisms in hookworms: confirming old and suggesting new associated SNPs. **Acta Trop**. 2022 Sep; 233:106533. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106533. Epub 2022 May 20. PMID: 35598651.

MENDES DE OLIVEIRA, V. N. G. *et al.* Detection of Benzimidazole Resistance-Associated Single-Nucleotide Polymorphisms in the Beta-Tubulin Gene in *Trichuris trichiura* from Brazilian Populations. **Am J Trop Med Hyg**. 2022 Jul 25;107(3):640–8. doi: 10.4269/ajtmh.22-0157. Epub ahead of print. PMID: 35895340; PMCID: PMC9490667.

MISISKA, Z.; MORTON, J. B. Phylogenetic analysis of the Glomeromycota by partial beta-tubulin gene sequences. **Mycorrhiza**. 2009 Apr;19(4):247-254. doi: 10.1007/s00572-008-0216-z. Epub 2008 Dec 23. PMID: 19104848.

MOHAMMEDSALIH, K. M. *et al.* New codon 198 β -tubulin polymorphisms in highly benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* from goats in three different states in Sudan. **Parasit Vectors**. 2020 Mar 2;13(1):114. doi: 10.1186/s13071-020-3978-6. PMID: 32122383; PMCID: PMC7053126.

MOHANRAJ, K. *et al.* Genotyping of benzimidazole resistant and susceptible isolates of *Haemonchus contortus* from sheep by allele specific PCR. **J Parasit Dis**. 2017 Mar;41(1):282-288. doi: 10.1007/s12639-016-0793-2. Epub 2016 Jun 20. PMID: 28316426; PMCID: PMC5339215.

MORAND, S. Life-history traits in parasitic nematodes: a comparative approach for the search of invariants. **Funct. Ecol**. 10, 210-218; 1996

MOTTIER, L; LANUSSE, C. Bases moleculares de la resistencia fármacos anti-helmínticos. **Rev. Med. Vet.**, v.82, p.74-85, 2001.

MOTTIER, M. L.; PRICHARD, R. K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenet Genomics**, v. 18(2), p. 129-140, 2008.

NGCAMPHALALA, P. I.; LAMB, J.; MUKARATIRWA, S. Molecular identification of hookworm isolates from stray dogs, humans and selected wildlife from South Africa. **J Helminthol.** 2019 Feb 21;94: e39. doi: 10.1017/S0022149X19000130. PMID: 30789121.

NGUI, R. *et al.* Molecular identification of human hookworm infections in economically disadvantaged communities in Peninsular Malaysia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 86, 837–842; 2012a

NGUI, R. *et al.* Epidemiological and genetic data supporting the transmission of *Ancylostoma ceylanicum* among human and domestic animals. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 6, e1522; 2012b

NGUI, R. *et al.* Genetic characterization of the partial mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I (Cox 1) gene of the zoonotic parasitic nematode, *Ancylostoma ceylanicum* from humans, dogs and cats. **Acta Tropica** 128, 154–157; 2013

NGUI, R. *et al.* Zoonotic *Ancylostoma ceylanicum* infection detected by endoscopy. **Am J Trop Med Hyg** 91: 86–88; 2014

NICIURA, S. C. *et al.* F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. **Vet Parasitol.** 2012 Dec 21;190(3-4):608-12. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.07.016. Epub 2012 Jul 20. PMID: 22858226.

NIXON, S. A. *et al.* Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new anthelmintics. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.** 2020 Dec; 14:8-16. doi: 10.1016/j.ijpddr.2020.07.001. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32814269; PMCID: PMC7452592.

NOGALES, E. Structural insights into microtubule function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 277-302. 2000.

O'CONNELL, E. M. *et al.* *Ancylostoma ceylanicum* Hookworm in Myanmar Refugees, Thailand, 2012-2015. **Emerg Infect Dis.** 2018 Aug;24(8):1472–81. doi: 10.3201/eid2408.180280. PMID: 30014834; PMCID: PMC6056130.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Soil-transmitted Helminthiases: STH: Eliminating Soil-transmitted Helminthiases as a Public Health Problem in Children: Progress Report 2001–2010 and Strategic Plan 2011–2020.** OMS 2012

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases: number of people treated in 2016 Weekly epidemiological record.** 2016, http://www.who.int/neglected_diseases/resources/who_wer9249/en/. Data de acesso: 5 de maio de 2018.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **2030 metas para programas de controle de helmintíases transmitidas pelo solo.** Genebra: OMS 2020.

ORR, A. R. *et al.* Genetic Markers of Benzimidazole Resistance among Human Hookworms (*Necator americanus*) in Kintampo North Municipality, Ghana. **Am J Trop Med Hyg.** 2019 Feb;100(2):351-356. doi: 10.4269/ajtmh.18-0727. PMID: 30734697; PMCID: PMC6367626.

PACANARO, C. P. *et al.* Evaluation of biochemical, hematological and parasitological parameters of protein-deficient hamsters infected with *Ancylostoma ceylanicum*. **PLoS Negl Trop Dis**. 2014 Sep 25;8(9):e3184. doi: 10.1371/journal.pntd.0003184. PMID: 25254370; PMCID: PMC4177863.

PALCY, C. *et al.* Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. **Vet J**. 2010 Jan;183(1):68-74. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.09.012. Epub 2008 Nov 5. PMID: 18980850.

PAPAIKOVOU, M. *et al.* A novel, species-specific, real-time PCR assay for the detection of the emerging zoonotic parasite *Ancylostoma ceylanicum* in human stool. **PLoS Negl Trop Dis**. 2017 Jul 10;11(7):e0005734. doi: 10.1371/journal.pntd.0005734. PMID: 28692668; PMCID: PMC5519186.

PHOSUK, I. *et al.* Molecular detection of *Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma ceylanicum*, and *Necator americanus* in humans in northeastern and southern Thailand. **Korean J Parasitol**. 2013 Dec;51(6):747-9. doi: 10.3347/kjp.2013.51.6.747. Epub 2013 Dec 31. PMID: 24516284; PMCID: PMC3916468.

PRICHARD, R. K. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. **Int J Parasitol**. 1973 May;3(3):409-17. doi: 10.1016/0020-7519(73)90121-5. PMID: 4732036.

PRICHARD, R. K. *et al.* The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Aust Vet J**. 1980 May;56(5):239-51. doi: 10.1111/j.1751-0813.1980.tb15983.x. PMID: 7002142.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends Parasitol**. 2001 Sep;17(9):445-53. doi: 10.1016/s1471-4922(01)01983-3. PMID: 11530357.

PRICHARD, R. K. Markers for benzimidazole resistance in human parasitic nematodes? **Parasitology**, v. 134(8), p.1087-1092, 2007.

PROCIV, P.; CROESE, J. Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*: hookworms reappraised in the light of a "new" zoonosis. **Acta Trop** 62(1):23-44; 1996

PULLAN, R. L. *et al.* Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasites & Vectors**, 7:37. doi:10.1186/1756-3305-7-37, 2014.

RAMÜNKE, S. *et al.* Benzimidazole resistance survey for *Haemonchus*, *Teladorsagia* and *Trichostrongylus* in three European countries using pyrosequencing including the development of new assays for *Trichostrongylus*. **The International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 3, p. 230-240, 2016.

RASHWAN, N. *et al.* Isothermal Diagnostic Assays for Monitoring Single Nucleotide Polymorphisms in *Necator americanus* Associated with Benzimidazole Drug Resistance. **PLoS Negl Trop Dis**. 2016 Dec 8;10(12): e0005113. doi: 10.1371/journal.pntd.0005113. PMID: 27930648; PMCID: PMC5145137.

RASHWAN, N; SCOTT, M.; PRICHARD, R. Rapid Genotyping of β -tubulin Polymorphisms in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. **PLoS Negl Trop Dis**. 2017 Jan 12;11(1): e0005205. doi: 10.1371/journal.pntd.0005205. PMID: 28081124; PMCID: PMC5230752.

REDMAN, E. *et al*. The emergence of resistance to the benzimidazole anthelmintics in parasitic nematodes of livestock is characterised by multiple independent hard and soft selective sweeps. **PLoS Negl Trop Dis**. 2015 Feb 6;9(2): e0003494. doi: 10.1371/journal.pntd.0003494. PMID: 25658086; PMCID: PMC4319741.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. "Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle." **Australian Journal of Agricultural Research** 1.1 (1950): 99-102.

ROBERTS, L. S. The "crowding" effect revisited. **J. Parasitol**. 86(2), 209-211; 2000

ROOSE, S. *et al*. Characterization of the β -tubulin gene family in *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* and its implication for the molecular detection of benzimidazole resistance. **PLOS Neglected Tropical Diseases** | <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009777> September 27, 2021.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes; modificação do método de Baermann [A new technic for the isolation of nematode larvae from feces; modification of Baermann's method]. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 1954;14(1):5-8. Portuguese. PMID: 14372416.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. *et al*. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. **Parasitol Res**. 2009 Sep;105(3):825-34. doi: 10.1007/s00436-009-1466-1. Epub 2009 May 12. PMID: 19452165.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1977 Dec;74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463. PMID: 271968; PMCID: PMC431765.

SANGSTER, N. C; GILL, J. Pharmacology of anthelmintic resistance. **Parasitology Today**, v. 15, n. 4, p. 141-146, 1999.

SCHWENKENBECHER, J. M. *et al*. Characterization of beta-tubulin genes in hookworms and investigation of resistance-associated mutations using real-time PCR. **Mol Biochem Parasitol**. 2007 Dec;156(2):167-74. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.07.019. Epub 2007 Aug 3. PMID: 17850900.

SCHWENKENBECHER, J. M.; KAPLAN, R. M. Real-time PCR assays for monitoring benzimidazole resistance-associated mutations in *Ancylostoma caninum*. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 6-10, 2009.

SERAFIM, L. R. *et al*. The crowding effect in *Ancylostoma ceylanicum*: density-dependent effects on an experimental model of infection. **Parasitol Res**. 2014 Dec;113(12):4611-21. doi: 10.1007/s00436-014-4151-y. Epub 2014 Oct 9. PMID: 25293765.

SHAKYA, A.; BHAT, H. R.; GHOSH, S. K. Update on Nitazoxanide: A Multifunctional Chemotherapeutic Agent. **Curr Drug Discov Technol.** 2018;15(3):201-213. doi: 10.2174/1570163814666170727130003. PMID: 28748751.

SOMVANSHI, V. S. *et al.* Nitazoxanide: nematicidal mode of action and drug combination studies. **Mol Biochem Parasitol.** 2014 Jan;193(1):1-8. doi: 10.1016/j.molbiopara.2013.12.002. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24412397; PMCID: PMC3972318.

SOULSBY, E. J. L. **Textbook of Veterinary Clinical Parasitology.** Volume I Helminths. Oxford, Blackwell, 1965.

STRACKE, K.; JEX, A. R.; TRAUB, R. J. Zoonotic Ancylostomiasis: An Update of a Continually Neglected Zoonosis. **Am J Trop Med Hyg.** 2020 Jul;103(1):64-68. doi: 10.4269/ajtmh.20-0060. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32342850; PMCID: PMC7356431.

SWANSON, S. J. *et al.* Albendazole therapy and enteric parasites in United States-bound refugees. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 16, p. 1498-507, 2012.

TRAUB *et al.*, 2008. PCR-based coprodiagnostic tools reveal dogs as reservoirs of zoonotic ancylostomiasis caused by *Ancylostoma ceylanicum* in temple communities in Bangkok. **Veterinary Parasitology** 155 (2008) 67–73

TRAUB, R. J. *Ancylostoma ceylanicum*, a re-emerging but neglected parasitic zoonosis. **Int J Parasitol.** 2013 Nov;43(12-13):1009-15. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.07.006. Epub 2013 Aug 19. PMID: 23968813.2013.

VÁRADY, M.; CUDEKOVÁ, P.; CORBA, J. In vitro detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: egg hatch test versus larval development test. **Vet Parasitol.** 2007 Oct 21;149(1-2):104-10. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.07.011. Epub 2007 Aug 13. PMID: 17697753.

VERA, J. H. S. **Resistência anti-helmíntica em equinos na Região Oeste do Estado de São Paulo.** 2014. 65 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Engenharia, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/116002>>

VERA, J. H. S. *et al.* Efficacy of ivermectin, moxidectin and febendazole in equine in Brazil. **Vet Parasitol Reg Stud Reports.** 2020 Apr; 20:100374. doi: 10.1016/j.vprsr.2020.100374. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32448518.

WALKER, M. *et al.* Individual responses to a single oral dose of albendazole indicate reduced efficacy against soil-transmitted helminths in an area with high drug pressure. **PLoS Negl Trop Dis.** 2021 Oct 19;15(10): e0009888. doi: 10.1371/journal.pntd.0009888. PMID: 34665810; PMCID: PMC8555840.

WHITTAKER, J. H. *et al.* Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. **J Vet Pharmacol Ther.** 2017 Apr;40(2):105-115. doi: 10.1111/jvp.12330. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27302747.

WILKINSON, R. *et al.* An amino acid substitution in *Fasciola hepatica* P-glycoprotein from triclabendazole-resistant and triclabendazole-susceptible populations. **Mol Biochem Parasitol.**

2012 Nov;186(1):69-72. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.08.008. Epub 2012 Sep 12. PMID: 22982092.

WOLSTENHOLME, A. J.; ROGERS, A. T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. **Parasitology**. 131 Suppl, S85-S95; 2005.

ZHANG, Z. Q. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (Addenda 2013). **Zootaxa**. 2013; 3703:1-82. doi: 10.11646/zootaxa.3703.1.1. PMID: 26146682.

ZUCCHERATO, L. W. *et al.* PCR-RFLP screening of polymorphisms associated with benzimidazole resistance in *Necator americanus* and *Ascaris lumbricoides* from different geographical regions in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. 2018 Sep 17;12(9):e0006766. doi: 10.1371/journal.pntd.0006766. PMID: 30222749; PMCID: PMC6141064.

ZOU, G. *et al.* multi-sited mutations of beta-tubulin are involved in benzimidazole resistance and thermotolerance of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. **Environ Microbiol**. 2006 Dec;8(12):2096-105. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01086.x. PMID: 17107551.

APÊNDICE A – PRODUÇÕES RESULTANTES DA EXECUÇÃO DA TESE

Acta Tropica 233 (2022) 106533



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Moving beyond the state of the art of understanding resistance mechanisms in hookworms: confirming old and suggesting new associated SNPs

Celi da Silva Medeiros^a, Luis Fernando Viana Furtado^{b,*}, Guilherme Silva Miranda^a, Vivian Jordania da Silva^a, Talita Rodrigues dos Santos^a, Élide Mara Leite Rabelo^a

^a Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Passos, Avenida Jaca Stockler, 1130, CEP 37900-106, Nossa Senhora das Graças, Passos, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Ancylostoma ceylanicum
 Drug resistance
 Benzimidazoles
 SNP
 Beta-tubulin isotype-1 gene

ABSTRACT

Hookworms represent a serious problem for human and animal health in different parts of the world. One of the suggested control strategies for parasitosis caused by members of the Ancylostomatidae family is mass drug administration with benzimidazole compounds. This strategy has been proven to lead to the establishment of resistant strains in several nematodes related to SNPs at codons 167, 198 and 200 of the beta-tubulin isotype-1 gene. Through bioassay and *in vivo* analysis, we successfully isolated an albendazole-resistant *A. ceylanicum* strain by drug selective pressure. We observed a strong correlation between the presence of SNPs at codon 198 and drug resistance. We also described for the first time, in hookworms, the presence of SNP A200L, already described at low frequencies in ruminant nematodes. The results presented here are important for updating the current knowledge about anthelmintic resistance in hookworms. The answers and the new questions raised may provide a basis for the establishment of more effective control strategies.

1. Introduction

Hookworms affect about 470 million people worldwide, especially in developing countries (Tomoda et al., 2020). Human hookworm infection are mainly due to the species *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus*; however, *Ancylostoma ceylanicum* can cause patent human infections, for which dogs and cats are reservoirs (Papaioakovou et al., 2017; O'Connell et al., 2018; Ayla et al., 2020). Infections caused by these helminths can result in anemia, nausea, vomiting, diarrhea, tiredness and abdominal pain (Loukas et al., 2016).

phenylalanine → TAC/tyrosine) have been linked to benzimidazole resistance in helminths (Kwa et al., 1994; Prichard, 2001; Ghisi et al., 2007). This association is already very well characterized in trichostrongylid nematodes of veterinary importance, such as *Haemonchus contortus* (Baltrušis et al., 2018; Atanásio-Nhacumbe et al., 2019). Our group has extensively studied this topic in the last decade, detecting several of these mutations in STH of human and animal importance (Furtado et al., 2014; Furtado and Rabelo, 2015a; Furtado and Rabelo, 2015b; Furtado et al., 2016a; Furtado et al., 2016b; Furtado et al., 2018; Zaccherato et al., 2018; Furtado et al., 2019a; Furtado et al., 2019b;



Phenotypic characterization and multiple resistance analysis in an experimentally selected albendazole-resistant hookworm isolate

Celi da Silva Medeiros^a, Lara Ribeiro de Almeida^a, Élide Mara Leite Rabelo^a,
Luis Fernando Viana Furtado^{b,*}

^a Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Hookworms
Drug resistance
Multiple resistance

ABSTRACT

For some nematodes, alterations that leads to a resistance genotype may be accompanied by other modifications, causing changes in the biology of the parasite, although the exact mechanisms of this relationship are still not very clear. These alterations can have deleterious effects on their survival or even potentiate their pathogenicity. In this study a phenotypic characterization was carried out to compare two *Ancylostoma ceylanicum* isolates, a wild type one, kept in the laboratory and an albendazole selected resistant isolate (AceyBZR2). Differences in some analyzed parameters, between the two strains, were registered, as patency period, number and size of the recovered worms, including differences in the body structures. The AceyBZR2 isolate showed to be less adapted to the host, leading to a smaller number of recovered worms. However, no difference on the female egg content was observed between the two isolates. Concerning blood evaluation, no differences were found between the wild type and AceyBZR2 isolates, related to hemoglobin and hematocrit levels. However, animals in the group infected with the wild type isolate had lower serum iron concentrations than animals in the AceyBZR2 group. The possibility that the AceyBZR2 isolate might be resistant to other drugs was evaluated and it was demonstrated that it does not present cross-resistance to ivermectin and nitazoxanide. However, when animals infected with the AceyBZR2 were treated with another drug from the benzimidazoles group (mebendazole), the cross-resistance effect was observed. Morphometric analyses were performed comparing female and male adult worms from the two isolates. The results presented here allow a better understanding of the parasite-host relationship and may constitute a useful basis for establishing future control strategies for soil-transmitted helminths.

1. Introduction

programs; water, sanitation, and hygiene (WASH) programs; and Mass Drug Administration (MDA), mainly with benzimidazole compounds

APÊNDICE B – COLABORAÇÕES RESULTANTES DA EXECUÇÃO DA TESE

RESEARCH ARTICLE

PCR-RFLP screening of polymorphisms associated with benzimidazole resistance in *Necator americanus* and *Ascaris lumbricoides* from different geographical regions in Brazil

Luciana Werneck Zuccherato^{1‡}, Luis Fernando Furtado^{1‡}, Celi da Silva Medeiros¹, Carina da Silva Pinheiro², Éliada M. Rabelo^{1*}

1 Department of Parasitology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Instituto de Ciências da Saúde - ICS, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

‡ These authors contributed equally to this work.

* rabelo@jcb.ufmg.br



OPEN ACCESS

Citation: Zuccherato LW, Furtado LF, Medeiros CsS, Pinheiro CsS, Rabelo EM (2018) PCR-RFLP screening of polymorphisms associated with benzimidazole resistance in *Necator americanus* and *Ascaris lumbricoides* from different geographical regions in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 12(9): e0005766. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005766>

Editor: Timothy G. Geary, McGill University, CANADA

Received: June 18, 2018

Accepted: August 17, 2018

Published: September 17, 2018

Copyright: © 2018 Zuccherato et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work received financial support from Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq; <https://www.ufmg.br/prpq/>); received by EMLR, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Grant number 470968/2014-1; <http://cnpq.br/>).

Abstract

Ascaris lumbricoides and *Necator americanus* are soil-transmitted parasites with global geographic distribution, and they represent some of the most common and neglected infections in the world. Periodic treatment with mass drug administration (MDA) in endemic areas is the recommended action put forth by the World Health Organization. However, MDA can cause the selection of subpopulations that possess the genetic ability to overcome the mechanism of drug action. In fact, beta-tubulin gene mutations (codons 167, 198 and 200) are correlated with benzimidazole resistance in nematodes of veterinary importance. It is possible that these SNPs also have strong correlation with treatment resistance in the human geohelminths *A. lumbricoides*, *Trichuris trichiura* and hookworms. Here, we aimed to investigate the presence of some of these canonical molecular markers associated with parasite resistance to benzimidazole in *N. americanus* and *A. lumbricoides* collected from six Brazilian states. Nested-PCR and PCR-RFLP were used to detect mutations at codons 167 and 198 in 601 individual eggs of *A. lumbricoides* collected from 62 human stool samples; however, no mutations were found. Codons 198 and 200 were tested in 552 *N. americanus* eggs collected from 48 patients using the same methodology, which presented a relative frequency of 1.4% and 1.1%, respectively. The presence of these SNPs in *N. americanus* eggs is an important finding, indicating that with high benzimidazole drug pressure there is potential for benzimidazole resistance to be selected in this hookworm. However, at these low frequencies it does not indicate that there is at present any benzimidazole resistance problem. This is the first systematic study performed in South America, and the study yielded a landscape of the genetic variants in the beta-tubulin gene and anthelmintic resistance to soil-transmitted parasites detected by a simple, rapid and affordable genotyping assay of individual eggs.

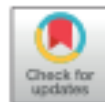
RESEARCH ARTICLE

First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the beta-tubulin gene in *Ascaris lumbricoides*

Luiz Fernando Viana Furtado, Celi da Silva Medeiros, Luciana Wemack Zuccherato, William Pereira Alves, Valéria Nayara Gomes Mendes de Oliveira, Vivian Jordania da Silva, Guilherme Silva Miranda, Ricardo Toshiro Fujiwara, Éilda Mara Leite Rabelo*

Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

* rabelo@icb.ufmg.br



OPEN ACCESS

Citation: Furtado LFV, Medeiros GS, Zuccherato LW, Alves WP, de Oliveira VGM, da Silva VJ, et al. (2019) First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the beta-tubulin gene in *Ascaris lumbricoides*. PLOS ONE 14(10): e0224108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224108>

Editor: Thomas S. Churcher, Imperial College London, UNITED KINGDOM

Received: April 14, 2019

Accepted: October 4, 2019

Published: October 17, 2019

Copyright: © 2019 Furtado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work received financial support from Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPG; <https://www.ufmg.br/prpg/>); received by EMLR) and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG; Grant number APQ-02417-18; <http://www.fapemig.br/>); received by EMLR). The funders had no role in

Abstract

The main control strategy for *Ascaris lumbricoides* is mass drug administration (especially with benzimidazoles), which can select strains of parasites resistant to treatment. Mutations in the beta-tubulin isotype-1 gene at codons 167, 198 and 200 have been linked to benzimidazole resistance in several nematodes. The mutation in codon 200 is the most frequent in different species of parasites, as previously observed in *Necator americanus* and *Trichuris trichiura*; however, this mutation has never been found in populations of *A. lumbricoides*. This study aimed to screen for single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the beta-tubulin isotype-1 gene at codon 200 in *A. lumbricoides*. We developed a technique based on an amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) for the analysis of 854 single *A. lumbricoides* eggs collected from 68 human stool samples from seven Brazilian states. We detected the mutation in codon 200 at a frequency of 0.5% (4/854). This is the first report of this mutation in *A. lumbricoides*. Although the observed frequency is low, its presence indicates that these parasite populations have the potential to develop high levels of resistance in the future. The methodology proposed here provides a powerful tool to screen for the emergence of anthelmintic resistance mutations in parasitic nematode populations.

Introduction

Ascaris lumbricoides, *Trichuris trichiura* and hookworms are soil-transmitted helminths (STH) closely related to precarious living conditions. More than a quarter of the world's population is at risk of infection with these nematodes, which can cause serious damage to human health [1]. Among these helminths, *A. lumbricoides* usually has the highest prevalence, infecting 820 million people worldwide, especially in developing countries [2]. *A. lumbricoides* may cause an asymptomatic infection or lead to different clinical manifestations, such as acute abdomen, so that the mortality accounts for approximately one-sixth of the disease burden [3].

According to the World Health Organization [1], mass drug administration (MDA) is the main strategy to control the continued occurrence of STH infection, especially with



Development of allele-specific PCR methodology (AS-PCR) to screening *A. lumbricoides* and *A. suum*

Talita Rodrigues dos Santos¹ · Luis Fernando Viana Furtado² · Andreina de Carvalho Araujo¹ · Celi da Silva Medeiros¹ · Pedro Henrique Vieira Germano¹ · Valéria Nayara Gomes Mendes de Oliveira¹ · Elida Mara Leite Rabelo¹

Received: 21 February 2022 / Accepted: 3 June 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Ascaris lumbricoides and *Ascaris suum* are described as helminths that infect humans and pigs, respectively. It is estimated that infection by *A. lumbricoides* affects about 447 million individuals living in tropical regions of developing countries. However, there is an increasing number of cases of human ascariasis in countries with no recent history of autochthonous infection by *A. lumbricoides*. In these places, pigs have been incriminated as the main source of human infection. Conventional parasitological diagnosis does not allow species-specific identification, and the real epidemiological scenario of human and swine ascariasis is still uncertain. Therefore, this work presents the application of a species-specific molecular diagnosis, based on the allele-specific PCR methodology (AS-PCR), using the Internal Transcript Space 1 (ITS-1) of the ribosomal DNA, as a target for differentiating between the two species, using DNA obtained from eggs. To validate the methodology, stool samples positive for *Ascaris* spp, were obtained from 68 humans from seven Brazilian states and from six pigs from the state of Minas Gerais. All samples obtained from humans were genotyped as *A. lumbricoides* and all samples obtained from swine were genotyped as *A. suum*. These results are in agreement with the literature, which demonstrates that in most endemic regions, transmission cycles are separate. Therefore, the execution of this work allowed the availability of a useful methodology for the differential diagnosis of the species, which may contribute to the characterization of the real epidemiological profile of human and swine ascariasis, and to the implementation of future control strategies.

Keywords *Ascaris suum* · *Ascaris lumbricoides* · Species-specific PCR · ITS-1

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ANÁLISE DE GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AOS BENZIMIDAZÓIS EM UMA CEPA DE *Ancylostoma ceylanicum* SELECIONADA EM MODELO EXPERIMENTAL", protocolo do CEUA: 25/2019 sob a responsabilidade de Elida Mara Leite Rabelo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 29/04/2019.

Vigência da Autorização	29/04/2019 a 28/04/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Hamster / <i>Mesocricetus auratus</i>
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / <i>Mesocricetus auratus</i>
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / <i>Mesocricetus auratus</i>
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / <i>Mesocricetus auratus</i>
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino

Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino

Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	BCHG-Biotério de Criação de Hamster e Gerbil do Depto de Parasitologia-ICB-UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	6
Peso/Idade	90g / 4(semanas)
Sexo	feminino

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DA PATENTE

NOTIFICAÇÃO DE INVENÇÃO

Data do envio: 06 / 04 / 2022

Seção 1: Invenção**Título sugerido para a invenção**Kit e método para diagnóstico molecular de mutações relacionadas à resistência aos benzimidazóis em *Ancylostoma ceylanicum***1.1 - Área do conhecimento da Tecnologia:**

Área predominante				
<input checked="" type="checkbox"/> Biotecnologia	<input type="checkbox"/> Engenharia	<input type="checkbox"/> Química	<input type="checkbox"/> Farmácia	<input type="checkbox"/> Outra
Áreas do conhecimento abrangidas:				
Ciências Biológicas	<input type="checkbox"/> Biologia Geral <input checked="" type="checkbox"/> Genética <input type="checkbox"/> Botânica <input type="checkbox"/> Zoologia <input type="checkbox"/> Ecologia	<input type="checkbox"/> Morfologia <input type="checkbox"/> Fisiologia <input type="checkbox"/> Bioquímica <input type="checkbox"/> Biofísica <input type="checkbox"/> Farmacologia	<input type="checkbox"/> Imunologia <input type="checkbox"/> Microbiologia <input checked="" type="checkbox"/> Parasitologia	
Engenharias	<input type="checkbox"/> Engenharia Civil <input type="checkbox"/> Engenharia de Minas <input type="checkbox"/> Engenharia de Materiais e Metalúrgica <input type="checkbox"/> Engenharia Elétrica <input type="checkbox"/> Engenharia Mecânica	<input type="checkbox"/> Engenharia Química <input type="checkbox"/> Engenharia Sanitária <input type="checkbox"/> Engenharia de Produção <input type="checkbox"/> Engenharia Nuclear <input type="checkbox"/> Engenharia de Transportes	<input type="checkbox"/> Engenharia Naval e Oceânica <input type="checkbox"/> Engenharia Aeroespacial <input type="checkbox"/> Engenharia Biomédica	
Ciências da Saúde	<input type="checkbox"/> Medicina <input type="checkbox"/> Odontologia <input checked="" type="checkbox"/> Farmácia	<input type="checkbox"/> Enfermagem <input type="checkbox"/> Nutrição <input type="checkbox"/> Saúde Coletiva	<input type="checkbox"/> Fonoaudiologia <input type="checkbox"/> Fisioterapia e Terapia Ocupacional <input type="checkbox"/> Educação Física	
Ciências Agrárias	<input type="checkbox"/> Agronomia <input type="checkbox"/> Recursos Florestais e Engenharia Florestal <input type="checkbox"/> Engenharia Agrícola	<input type="checkbox"/> Zootecnia <input type="checkbox"/> Medicina Veterinária <input type="checkbox"/> Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca	<input type="checkbox"/> Ciência e Tecnologia de Alimentos	
Ciências Sociais Aplicadas	<input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Administração <input type="checkbox"/> Economia <input type="checkbox"/> Arquitetura e Urbanismo <input type="checkbox"/> Comunicação	<input type="checkbox"/> Planejamento Urbano e Regional <input type="checkbox"/> Demografia <input type="checkbox"/> Ciência da Informação <input type="checkbox"/> Museologia	<input type="checkbox"/> Serviço Social <input type="checkbox"/> Economia Doméstica <input type="checkbox"/> Desenho Industrial <input type="checkbox"/> Turismo	
Outros	<input type="checkbox"/> Administração Hospitalar <input type="checkbox"/> Administração Rural <input type="checkbox"/> Carreira Militar <input type="checkbox"/> Carreira Religiosa <input type="checkbox"/> Ciências	<input type="checkbox"/> Desenho de Moda <input type="checkbox"/> Desenho de Projetos <input type="checkbox"/> Diplomacia <input type="checkbox"/> Engenharia de Agrimensura	<input type="checkbox"/> Engenharia Mecatrônica <input type="checkbox"/> Engenharia Têxtil <input type="checkbox"/> Estudos Sociais <input type="checkbox"/> História Natural <input type="checkbox"/> Química Industrial	

Seção 1: Invenção

Título sugerido para a invenção

Processo de seleção de um isolado de ancilostomídeo resistente aos benzimidazóis

1.1 - Área do conhecimento da Tecnologia:

Área predominante				
<input checked="" type="checkbox"/> Biotecnologia	<input type="checkbox"/> Engenharia	<input type="checkbox"/> Química	<input type="checkbox"/> Farmácia	<input type="checkbox"/> Outra
Áreas do conhecimento abrangidas:				
Ciências Biológicas	<input type="checkbox"/> Biologia Geral <input checked="" type="checkbox"/> Genética <input type="checkbox"/> Botânica <input type="checkbox"/> Zoologia <input type="checkbox"/> Ecologia	<input type="checkbox"/> Morfologia <input type="checkbox"/> Fisiologia <input type="checkbox"/> Bioquímica <input type="checkbox"/> Biofísica <input type="checkbox"/> Farmacologia	<input type="checkbox"/> Imunologia <input type="checkbox"/> Microbiologia <input checked="" type="checkbox"/> Parasitologia	
Engenharias	<input type="checkbox"/> Engenharia Civil <input type="checkbox"/> Engenharia de Minas <input type="checkbox"/> Engenharia de Materials e Metalúrgica <input type="checkbox"/> Engenharia Elétrica <input type="checkbox"/> Engenharia Mecânica	<input type="checkbox"/> Engenharia Química <input type="checkbox"/> Engenharia Sanitária <input type="checkbox"/> Engenharia de Produção <input type="checkbox"/> Engenharia Nuclear <input type="checkbox"/> Engenharia de Transportes	<input type="checkbox"/> Engenharia Naval e Oceânica <input type="checkbox"/> Engenharia Aeroespacial <input type="checkbox"/> Engenharia Biomédica	
Ciências da Saúde	<input type="checkbox"/> Medicina <input type="checkbox"/> Odontologia <input checked="" type="checkbox"/> Farmácia	<input type="checkbox"/> Enfermagem <input type="checkbox"/> Nutrição <input type="checkbox"/> Saúde Coletiva	<input type="checkbox"/> Fonoaudiologia <input type="checkbox"/> Fisioterapia e Terapia Ocupacional <input type="checkbox"/> Educação Física	
Ciências Agrárias	<input type="checkbox"/> Agronomia <input type="checkbox"/> Recursos Florestais e Engenharia Florestal <input type="checkbox"/> Engenharia Agrícola	<input type="checkbox"/> Zootecnia <input type="checkbox"/> Medicina Veterinária <input type="checkbox"/> Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca	<input type="checkbox"/> Ciência e Tecnologia de Alimentos	
Ciências Sociais Aplicadas	<input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Administração <input type="checkbox"/> Economia <input type="checkbox"/> Arquitetura e Urbanismo <input type="checkbox"/> Comunicação	<input type="checkbox"/> Planejamento Urbano e Regional <input type="checkbox"/> Demografia <input type="checkbox"/> Ciência da Informação <input type="checkbox"/> Museologia	<input type="checkbox"/> Serviço Social <input type="checkbox"/> Economia Doméstica <input type="checkbox"/> Desenho Industrial <input type="checkbox"/> Turismo	
Outros	<input type="checkbox"/> Administração Hospitalar <input type="checkbox"/> Administração Rural <input type="checkbox"/> Carreira Militar <input type="checkbox"/> Carreira Religiosa <input type="checkbox"/> Ciências	<input type="checkbox"/> Desenho de Moda <input type="checkbox"/> Desenho de Projetos <input type="checkbox"/> Diplomacia <input type="checkbox"/> Engenharia de Agrimensura	<input type="checkbox"/> Engenharia Mecatrônica <input type="checkbox"/> Engenharia Têxtil <input type="checkbox"/> Estudos Sociais <input type="checkbox"/> História Natural <input type="checkbox"/> Química Industrial	