

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE
POLIMORFISMOS ASSOCIADOS AO PROCESSO DE RESISTÊNCIA AOS
BENZIMIDAZÓIS EM *Trichuris trichiura*

ORIENTADA: Valéria Nayara Gomes Mendes de Oliveira

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

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

Dr. Luis Fernando Viana Furtado

BELO HORIZONTE

Fevereiro - 2020

VALÉRIA NAYARA GOMES MENDES DE OLIVEIRA

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE
POLIMORFISMOS ASSOCIADOS AO PROCESSO DE RESISTÊNCIA AOS
BENZIMIDAZÓIS EM *Trichuris trichiura*

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Genética da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

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

Dr. Luis Fernando Viana

Furtado

Belo Horizonte

2020

043 Oliveira, Valéria Nayara Gomes Mendes de.
Padronização e validação de uma metodologia para detecção de polimorfismos associados ao processo de resistência aos benzimidazóis em *Trichuris trichiura* [manuscrito] / Valéria Nayara Gomes Mendes de Oliveira. - 2020.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado. Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Élide Mara Leite Rabelo; Dr. Luis Fernando Viana Furtado.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. *Trichuris*. 3. Benzimidazóis. 4. Resistência a Medicamentos. 5. Tubulina (Proteína). I. Machado, Carlos Renato. II. Rabelo, Élide Mara Leite. III. Furtado, Luis Fernando Viana. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título

CDU: 575



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Valéria Nayara Gomes Mendes de
Oliveira

297/2020
entrada
1º/2018
CPF:
102.666.576-80

As nove horas e trinta minutos do dia 27 de fevereiro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "Padronização e validação de uma metodologia para detecção de polimorfismos associados ao processo de resistência aos benzimidazóis em *Trichuris trichiura*", requisito para obtenção do grau de Mestre em Genética. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Carlos Renato Machado, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Carlos Renato Machado	UFMG	71055886-2	APROVADA
Elida Mara Leite Rabelo	UFMG	448589906-30	APROVADA
Maurício Roberto Viana Sant'Anna	UFMG	930178166-59	APROVADA
Maria Raquel Santos Carvalho	UFMG	34965173015	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2020.

Carlos Renato Machado Carlos R. Machado
Elida Mara Leite Rabelo Elida Mara L. Rabelo
Maurício Roberto Viana Sant'Anna Maurício Roberto Viana Sant'Anna
Maria Raquel Santos Carvalho Maria Raquel Santos Carvalho

AGRADECIMENTOS

Ao Carlos Renato Machado pela orientação e à Élide Rabelo pela coorientação. Eu agradeço pela confiança e por permanecerem, como profissionais comprometidos e éticos, inspirando a tantos outros;

Ao Fernando Furtado pela coorientação, amizade e cumplicidade. Gratidão, meu amigo leal, por este teu coração tão amável e generoso;

Ao Programa de Pós-graduação em Genética pela minha formação;

Aos professores que contribuíram com tantos ensinamentos no percurso árduo, contudo, engrandecedor, até aqui. Minha gratidão e admiração a estes que tanto representam para mim;

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Genética, em especial à Raíssa Campos pela cordialidade, solicitude e empatia;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto;

Aos meus amigos que fizeram deste desafio acadêmico tão mais agradável e feliz, compartilhando as aventuras e desventuras desta vida: Alaíde de Matos, Alexandre Costa, Ana Cristina, Andreina Carvalho, Brayan Lucca, Celi Medeiros, Ceres Luciana, Danimar Danilia, Eduardo Pulido, Érica Munhoz, João Scarpelli, Julia Dias, Júlia Silveira, Letícia Estevam, Lucas Dias, Luciana Serafim, Pedro Aguiar, Talita Guimarães, Talita Rodrigues, Thaís Oliveira, Thayse Batista, Vivian Jordânia e Yasmin Rocha;

À Luciana Werneck, colaboradora deste trabalho. Muito obrigada por toda contribuição;

À Élide Rabelo, à Bruna Silvestre e ao William Alves que me conduziram com zelo e dedicação em meus passos iniciais na iniciação científica e plantaram em mim uma semente de encanto por este mundo da pesquisa. Muita admiração e respeito por vocês;

À minha família, fonte de amor, paz e felicidade; em especial aos meus pais, Sérgio e Cida, minha base; à minha irmã Luana, meu exemplo de coragem e força; e às minhas sobrinhas, Vitória e Ana Clara, meu desejo é ser a principal referência de vocês;

Aos meus amigos que sonharam este sonho comigo, gratidão pelo amor demonstrado através das suas orações, as quais me fortaleceram até o fim;

Por último, porém não menos importante, agradeço a Jesus, o autor e consumidor da minha fé; muito obrigada por tudo e por tanto, Abba.

“Para tudo há uma ocasião certa; há um tempo certo para cada propósito debaixo do céu.”

Eclesiastes 3:1

RESUMO

Geo-helmintoses humanas podem ser causadas, principalmente, por quatro espécies de nematódeos gastrointestinais, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*. A quimioterapia preventiva é recomendada pela Organização Mundial de Saúde como a principal estratégia para controle das infecções causadas por nematódeos em humanos e tem como objetivo eliminar a morbidade associada a essas infecções. Tal estratégia consiste na administração periódica de anti-helmínticos. Os fármacos albendazol e mebendazol são os mais comumente usados devido ao seu amplo espectro de atividade, baixo custo e facilidade de administração. Embora esses fármacos sejam eficazes, diminuindo a intensidade das infecções, eles têm o potencial de exercer uma pressão de seleção que pode resultar no estabelecimento de resistência. Entre os nematódeos de importância veterinária há comprovações de que o uso constante de benzimidazóis tem selecionado populações de parasitos resistentes. Existem evidências na literatura de resistência a estes fármacos em nematódeos que infectam humanos, principalmente para a espécie *T. trichiura*. A ocorrência de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) dentro de três códons específicos, 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina, são associados ao mecanismo de resistência aos benzimidazóis em nematódeos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi padronizar e validar uma metodologia para a detecção de polimorfismos associados ao processo de resistência aos benzimidazóis em *T. trichiura*. Controle não mutado e controles mutados foram construídos por meio de PCR convencional e pela técnica de mutagênese sítio dirigida, respectivamente. A metodologia ARMS-PCR foi estabelecida com sucesso para avaliação dos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina. Inicialmente foram analisadas 462 amostras a partir de ovos individuais obtidos de 37 pacientes de cinco estados brasileiros. A mutação no códon 198 foi observada em uma frequência de 4,8% (20/462), enquanto para os outros dois códons nenhum polimorfismo foi observado. Um total de 20 amostras foram submetidas a sequenciamento para validação da técnica padronizada. Conclui-se que há frequência moderada da mutação no códon 198 do gene da β -tubulina na população de *T. trichiura* analisada. Esse é o primeiro relato da presença dessa mutação em populações dessa espécie no Brasil, tal fato e a emergência já observada do problema em outras espécies reforça a necessidade de monitoramento regular de SNPs relacionados à resistência aos benzimidazóis com técnicas que sejam altamente sensíveis e específicas.

Palavras-chave: *Trichuris trichiura*; Resistência; Benzimidazóis; β -tubulina.

ABSTRACT

Human geo-helminthiasis can be caused, mainly, by four species of gastrointestinal nematodes, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*. Preventive chemotherapy is recommended by World Health Organization as the main strategy to control infections caused by nematodes in humans and aims to eliminate the morbidity associated with these infections. Such a strategy consists of the periodic administration of anthelmintics. The drugs albendazole and mebendazole are the most commonly used due to their broad spectrum of activity, low cost and ease of administration. Although these drugs are effective, decreasing the intensity of infections, they have the potential to exert a selection pressure that can result in the establishment of resistance. Among nematodes of veterinary importance there is evidence that the constant use of benzimidazoles has selected populations of resistant parasites. There is evidence in the literature of resistance to these drugs in nematodes that infect humans, mainly for the species *T. trichiura*. The occurrence of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) within three specific codons, 167, 198 and 200 of the β -tubulin gene, are associated with the mechanism of resistance to benzimidazoles in nematodes. Therefore, the objective of this work was to standardize and validate a methodology for the detection of polymorphisms associated with the process of resistance to benzimidazoles in *T. trichiura*. Non-mutated and mutated controls were constructed using conventional PCR and site-directed mutagenesis, respectively. The ARMS-PCR methodology was successfully established to evaluate codons 167, 198 and 200 of the β -tubulin gene. Initially, 462 samples were analyzed from individual eggs obtained from 37 patients from five Brazilian states. The codon 198 mutation was observed at a frequency of 4.8% (20/462), while for the other two codons no polymorphism was observed. A total of 20 samples were submitted to sequencing for validation of the standardized technique. It is concluded that there is a moderate frequency of mutation in codon 198 of the β -tubulin gene in the population of *T. trichiura* analyzed. This is the first report of the presence of this mutation in populations of this species in Brazil, this fact and the already observed emergence of the problem in other species reinforces the need for regular monitoring of SNPs related to benzimidazole resistance with techniques that are highly sensitive and specific.

Keywords: *Trichuris trichiura*; Resistance; Benzimidazoles; β -tubulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da prevalência da infecção por <i>T. trichiura</i> em 2010. Baseada em modelos geoestatísticos para a África Subsaariana e, para todas as outras regiões, dados empíricos disponíveis.....	17
Figura 2 – Esquema representativo do ciclo biológico de <i>T. trichiura</i>	19
Figura 3 – Esquema do mecanismo de ação dos compostos benzimidazólicos.....	23
Figura 4 – Modelo comparativo da estrutura da β -tubulina a partir da sobreposição de estruturas tridimensionais de β -tubulina.....	24
Figura 5 – Representação tridimensional do provável local de ligação do benzimidazol e a proteína β -tubulina.....	24
Figura 6 – Esquema do mecanismo molecular proposto para resistência aos compostos benzimidazólicos.....	28
Figura 7 – Representação esquemática da metodologia Tetraprimer ARMS-PCR.....	34
Figura 8 – Sequência parcial utilizada do gene da β -tubulina de <i>T. trichiura</i> para desenho dos iniciadores (AF034219.1).....	41
Figura 9 – Esquema da síntese do controle sem mutação para análise de polimorfismos no gene da β -tubulina de <i>T. trichiura</i>	43
Figura 10 – Esquema da síntese dos controles com mutação no códon 167 (A) e nos códons 198 e 200 (B) para análise de polimorfismos nestes respectivos códons do gene da β -tubulina de <i>T. trichiura</i>	45
Figura 11 – Esquema da digestão empregada para análise do códon 198 do gene da β -tubulina de <i>T. trichiura</i>	48
Figura 12 – Esquema relativo à adição da segunda incompatibilidade de iniciadores na análise do códon 167 do gene da β -tubulina de <i>T. trichiura</i>	50
Figura 13 – Esquema relativo à adição da segunda incompatibilidade de iniciadores na análise do códon 198 do gene da β -tubulina de <i>T. trichiura</i>	51
Figura 14 – Esquema relativo à adição da segunda incompatibilidade de iniciadores na análise do códon 200 do gene da β -tubulina de <i>T. trichiura</i>	52
Figura 15 – Cromatograma correspondente ao sequenciamento do controle mutado para os códons 198 e 200.....	58
Figura 16 – Géis de agarose 1% com produtos da padronização da técnica PCR-RFLP utilizando plasmídeos controles.....	60

Figura 17 – Representação esquemática da distribuição das amostras mutadas, com seus respectivos genótipos, para o códon 198 entre as cinco regiões brasileiras.....	62
Figura 18 – Gel de agarose 2% representativo das análises do códon 167 do gene da β -tubulina de <i>T. trichiura</i>	63
Figura 19 – Gel de agarose 2% representativo das análises do códon 198 do gene da β -tubulina de <i>T. trichiura</i>	64
Figura 20 – Gel de agarose 2% representativo das análises do códon 200 do gene da β -tubulina de <i>T. trichiura</i>	65
Figura 21 – Cromatogramas representativos do sequenciamento das amostras que apresentaram mutação no códon 198 com perfil homozigoto (A) e heterozigoto (B e C).....	67

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Estrutura química comum e variações nos radicais de componentes do grupo dos benzimidazóis.....20
- Quadro 2** – SNPs no gene da β -tubulina relacionados à resistência aos benzimidazóis em helmintos.....30
- Quadro 3** – Iniciadores utilizados e suas respectivas substituições quando necessário. As bases que foram alteradas encontram-se em negrito e sublinhadas.....41
- Quadro 4** – Iniciadores utilizados na reação de PCR e nested-PCR para amplificação da região da β -tubulina de *T. trichiura*.....43
- Quadro 5** – Iniciadores utilizados para a síntese de controles mutados referentes aos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. A reação I, na qual foram empregados os iniciadores A e B, compreende a síntese do megaprimer que, após processamento, foi utilizado como iniciador na reação II, juntamente com o primer C.....44
- Quadro 6** – Iniciadores utilizados para análise de SNPs relacionados à resistência aos benzimidazóis no gene da β -tubulina de *T. trichiura* com suas devidas alterações destacadas em negrito.....49
- Quadro 7** – Iniciadores utilizados na técnica ARMS-PCR, para a genotipagem dos códons 167, 198 e 200. Os iniciadores para a primeira e segunda reação são apresentados, bem como o peso molecular do produto final amplificado.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de pacientes por estado, número mínimo e máximo de ovos analisados entre pacientes de um estado e o número total de ovos analisados.....59

Tabela 2 – Número total de amostras analisadas por cada estado com o respectivo número daquelas que amplificaram, bem como o número total de amostras mutadas referentes à análise do códon 198 e as porcentagens correspondentes.....61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Adenina

Ala: Alanina

ARMS-PCR: Sistema de reação de amplificação refratária – reação em cadeia da polimerase, do inglês “*Amplification Refractory Mutation System – Polymerase Chain Reaction*”

BZ: Benzimidazol

C: Citosina

COEP: Comitê de Ética em Pesquisa

DNA: Ácido desoxirribonucleico, do inglês “*Deoxyribonucleic Acid*”

dNTP: Desoxirribonucleotídeo fosfatado, do inglês “*Nucleoside Triphosphate*”

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês “*Ethylenediaminetetraacetic Acid*”

EHA: Teste de eclodibilidade de larva, do inglês “*Egg Hatch Assay*”

FECRT: Teste de redução de contagem de ovos nas fezes, do inglês “*Faecal Egg Count Reduction Test*”

G: Guanina

Glu: Ácido glutâmico

IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

KCl: Cloreto de Potássio

MgCl₂: Cloreto de magnésio

NaCl: Cloreto de sódio

OMS: Organização Mundial de Saúde, do inglês “*World Health Organization*”

pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”

PEG: Polietilenoglicol

pH: potencial de hidrogênio

Phe: Fenilalanina

PM: Peso molecular

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês “*Real Time - Polymerase Chain Reaction*”

RFLP-PCR: Polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição – reação em cadeia da polimerase, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase Chain Reaction*

SmartAmp2: Processo de amplificação inteligente, do inglês “*Smart Amplification Process*”

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês “*Single Nucleotide Polymorphism*”

TAE: Tris-acetato-EDTA

T: Timina

Tyr: Tirosina

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

xg: Força centrífuga relativa

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Geo-helmintos.....	15
1.1.1. <i>Trichuris trichiura</i>	16
1.1.2. Ciclo biológico.....	18
1.2. Benzimidazóis.....	19
1.3. Mecanismo de ação dos benzimidazóis.....	22
1.4. O problema da resistência a anti-helmínticos.....	25
1.5. Eficácia dos anti-helmínticos contra <i>T. trichiura</i>	26
1.6. Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos BZs.....	28
1.7. Técnicas moleculares.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	37
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. METODOLOGIA.....	39
4.1. Considerações éticas.....	39
4.2. Amostragem e extração de DNA.....	39
4.3. Desenho dos iniciadores.....	40
4.4. Síntese de controles.....	42
4.4.1. Clonagem.....	46
4.4.2. Recuperação do DNA plasmidial.....	47
4.5. PCR-RFLP.....	47
4.6. Amplificação das regiões-alvo.....	49
4.6.1. Tetraprimer ARMS-PCR.....	53
4.6.2. ARMS-PCR.....	55
4.7. Sequenciamento.....	56
5. RESULTADOS.....	58
5.1. Síntese de controles.....	58
5.2. Amplificação de fragmentos do gene da β -tubulina a partir de ovos únicos.....	58
5.3. PCR-RFLP.....	59
5.4. Tetraprimer ARMS-PCR.....	60
5.5. ARMS-PCR.....	60

5.6. Validação da técnica molecular padronizada através do sequenciamento.....	66
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÃO.....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
PRODUÇÃO RESULTANTE DA EXECUÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	84
PRODUÇÕES RESULTANTES DAS COLABORAÇÕES.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Geo-helmintos

Geo-helmintoses humanas podem ser causadas, principalmente, por quatro espécies de nematódeos gastrointestinais, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*, os quais apresentam ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais do mundo em desenvolvimento, encontrando-se entre os parasitos mais prevalentes (DE SILVA et al., 2003; BETHONY et al., 2006; VERCRUYSSSE et al., 2011; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS, 2019a). A transmissão destes geo-helmintos acontece, dependendo da espécie, através da ingestão de ovos larvados, de larvas e/ou pela penetração cutânea das mesmas, sobretudo, em locais carentes em saneamento básico e fornecimento adequado de água potável, os quais caracterizam-se como fatores importantes para a infecção (BETHONY et al., 2006; BARTRAM & CAIRNCROSS, 2010; ALBONICO et al., 1999, DE SILVA et al., 2003; OMS, 2012).

Considera-se o ser humano o principal hospedeiro definitivo para geo-helmintos destes gêneros, os quais apresentam a capacidade de sobreviverem por muitos anos no trato gastrointestinal humano, desenvolvendo mecanismos de escape que permitem sua permanência no hospedeiro (BETHONY et al., 2006). De acordo com as estimativas da OMS (2019b) mais de 1,5 bilhão de indivíduos, o que representa 24% da população mundial, são acometidos com pelo menos um dos geo-helmintos, sendo comum a infecção múltipla, particularmente entre as crianças que vivem em países em desenvolvimento (BETHONY et al., 2006). As infecções por tais parasitos são responsáveis por níveis de morbidade significativos e, mesmo quando apresentam intensidade moderada, podem estar associadas com deficiências no desenvolvimento físico e mental. Estima-se que, dentre a população infectada, 450 milhões de indivíduos, os quais são principalmente crianças, apresentam morbidade significativa (BENNETT et al., 1999; VERCRUYSSSE et al., 2011).

As geo-helmintoses são doenças negligenciadas, apresentando fatores importantes que estão diretamente relacionados ao cenário educacional, econômico e de saúde pública (BETHONY et al., 2006). De fato, as doenças tropicais negligenciadas podem significar um grande desafio para a saúde e o desenvolvimento econômico dos países subdesenvolvidos, quando são consideradas a incapacidade e a pobreza correlacionadas a essas doenças (HOTEZ et al., 2007). De acordo com de Silva et al. (2003), a alta prevalência de geo-helmintoses pode não ter resultado diretamente em menor crescimento econômico, contudo, é notoriamente um dos vários fatores que contribuem para isso. No que concerne aos indivíduos que se encontram

nos locais mais carentes do mundo, o impacto da propagação de infecções helmínticas intestinais tem sérios efeitos em relação à desnutrição e morbidade (HORTON, 2003). Portanto, atingir metas determinadas para o controle e eliminação de tais doenças resultará em melhorias na saúde humana e, conseqüentemente, reduções no sofrimento dos indivíduos infectados (DE VLAS et al., 2016).

A Assembleia Mundial de Saúde pela resolução WHA54.19 (OMS, 2002) estabeleceu objetivos comuns para prevenção e controle de geo-helmintoses e esquistossomose em áreas de alta transmissão, aprovando como o meio ideal para redução da mortalidade e morbidade, como também para melhoria da saúde e desenvolvimento dos indivíduos infectados, o tratamento de forma regular dos grupos de alto risco, particularmente as crianças em idade escolar, e a garantia ao acesso a fármacos de dose única em conjunto com outras medidas relacionadas a projetos para saneamento básico e fornecimento de água potável. Na Lista Modelo de Fármacos Essenciais estabelecida em 1999 para tratamento de infecções por nematódeos intestinais encontram-se albendazol, mebendazol, levamisol e pirantel. Contudo, no que concerne a implementação em larga escala dos benzimidazóis na quimioterapia preventiva, há uma preocupação crescente com o uso intensivo e inadequado destes fármacos, fator que pode contribuir para o estabelecimento de resistência (KEISER & UTZINGER, 2010; AGUAYO-ORTIZ et al., 2013).

1.1.1. *Trichuris trichiura*

T. trichiura, agente causal da tricuriase, pertence ao filo Nematoda, ordem Trichocephalida e família Trichuridae (Hodda, 2011). Tal nematódeo apresenta uma distribuição mundial, sendo mais comum em áreas tropicais caracterizadas por um clima quente e úmido, embora seja também encontrado em regiões temperadas (STEPHENSON et al., 2000). Segundo de Silva et al. (2003) a maior prevalência para as infecções por *T. trichiura* foi observada na África Central, sul da Índia e sudeste da Ásia. O número estimado de indivíduos infectados com tal nematódeo em 2002, conforme o *Centers for Disease Control and Prevention*, foi de 1 bilhão e, em 2010, foi de 464,6 milhões com as maiores prevalências em países da Ásia, bem como em grande parte da África Central e América Central (Figura 1) (PULLAN et al., 2014). Em 2017, a prevalência da tricuriase foi de 289.617,7 com maior proporção de indivíduos assintomáticos em comparação aos sintomáticos (JAMES et al., 2018).

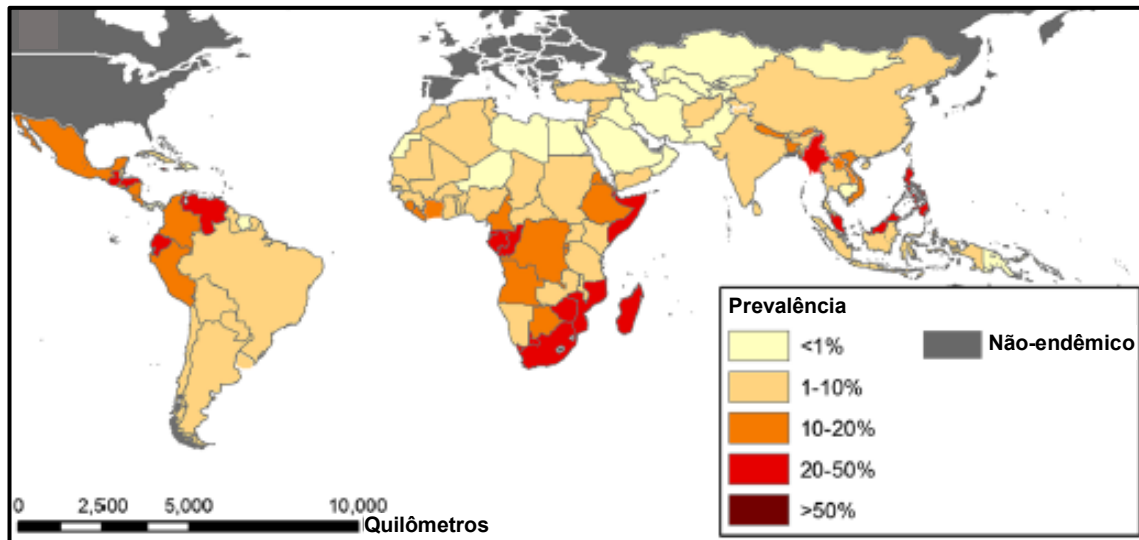


Figura 1 – Distribuição da prevalência da infecção por *T. trichiura* em 2010. Baseada em modelos geoestatísticos para a África Subsaariana e, para todas as outras regiões, dados empíricos disponíveis. Adaptado de Pullan et al. (2014).

O verme adulto apresenta a extremidade anterior longa e fina, esta contém o esôfago. A extremidade posterior é mais espessa do que a porção anterior e, assim, contém os órgãos reprodutivos e o intestino. Tais características concedem ao nematódeo a forma de um chicote e resultaram na denominação *whipworm* (BUNDY & COOPER, 1989; STEPHENSON, 2000). O macho apresenta a extremidade caudal tipicamente enrolada com uma espícula, utilizada na cópula, enquanto na região posterior a fêmea possui o útero repleto de ovos. Estes são caracteristicamente em formato de barril e apresentam uma estrutura denominada opérculo polar em cada extremidade (BUNDY & COOPER, 1989).

A tricuriase é normalmente considerada como uma infecção inócua, a qual apresenta sinais clínicos quando a carga de vermes é grande, logo, os sintomas estão diretamente relacionados com a intensidade da infecção (BUNDY, 1986). Na maioria das situações a carga de vermes é baixa, assim, a intensidade da infecção é leve, a qual, em muitos casos, parece não estar relacionada à morbidade perceptível, haja vista que os indivíduos com tal infecção apresentam poucos sinais clínicos ou são assintomáticos (GILMAN, 1983; BUNDY, 1986; STEPHENSON et al., 2000). Por outro lado, o parasito pode desencadear doença significativa em indivíduos que apresentem infecção de alta intensidade, as infecções crônicas podem estar associadas a sintomas característicos como dor abdominal, anemia, colite, prolapso retal e baqueteamento dos dedos (GILMAN, 1983; STEPHENSON et al., 2000; CROWE et al., 2014).

Considerando que geo-helmintoses propagam via transmissão fecal-oral, a exposição às precárias condições de saneamento e práticas não higiênicas são importantes determinantes para a infecção (BUNDY, 1986; BETHONY et al., 2006). Infecções múltiplas com *T. trichiura*,

ancilostomídeos ou *A. lumbricoides* são comuns, com a maior intensidade de infecção por *T. trichiura* entre 5 a 15 anos (BETHONY et al., 2006). O mebendazol e o albendazol são dois fármacos da classe de compostos benzimidazólicos comumente utilizados para o tratamento de tais infecções. No entanto, o tratamento deve ser monitorado pela eficácia limitada apresentada por estes anti-helmínticos contra *T. trichiura* (JOURDAN et al., 2018).

1.1.2. Ciclo biológico

Nas infecções de baixa intensidade, os vermes são encontrados no ceco, onde vivem preferencialmente, enquanto em infecções de alta intensidade podem também ser observados em outros locais, particularmente no reto, mas também no apêndice ou mesmo na parte mais distal do íleo (GILMAN et al., 1983; STEPHENSON et al., 2000). A fêmea deposita de 3.000 a 20.000 ovos diariamente, os quais são liberados para o exterior por meio das fezes do hospedeiro. Neste estágio eles não são infecciosos, pois ainda, apresentam apenas um zigoto (BUNDY & COOPER, 1989). No meio externo, estes ovos não embrionados passam pelo processo de clivagem sob solo quente e úmido e assim, sujeitos às condições ideais, desenvolverão uma larva infectante (BUNDY & COOPER, 1989; STEPHENSON et al., 2000).

Indivíduos tornam-se infectados ao ingerirem ovos embrionados, através de alimentos ou água contaminados, os quais após ingestão liberam uma larva infectante completamente desenvolvida (BUNDY & COOPER, 1989; STEPHENSON et al., 2000). As larvas fixam-se nas vilosidades do intestino delgado, aonde experimentam um processo de amadurecimento, contudo, tal fase duodenal ainda requer mais estudo (DAVIS et al., 1986; BUNDY, 1989). Posteriormente, elas migram para a região cecal, onde aderem à mucosa e desenvolvem maturidade sexual, tornando-se vermes adultos. Tais vermes inserem a parte anterior, afilada, contendo o esôfago na camada epitelial, enquanto a sua extremidade posterior fica livre no lúmen, a qual permite que a fertilização ocorra com produção de ovos que serão subsequentemente expelidos com as fezes, dando continuidade ao ciclo (Figura 2) (BUNDY & COOPER, 1989; BETHONY et al., 2006;).

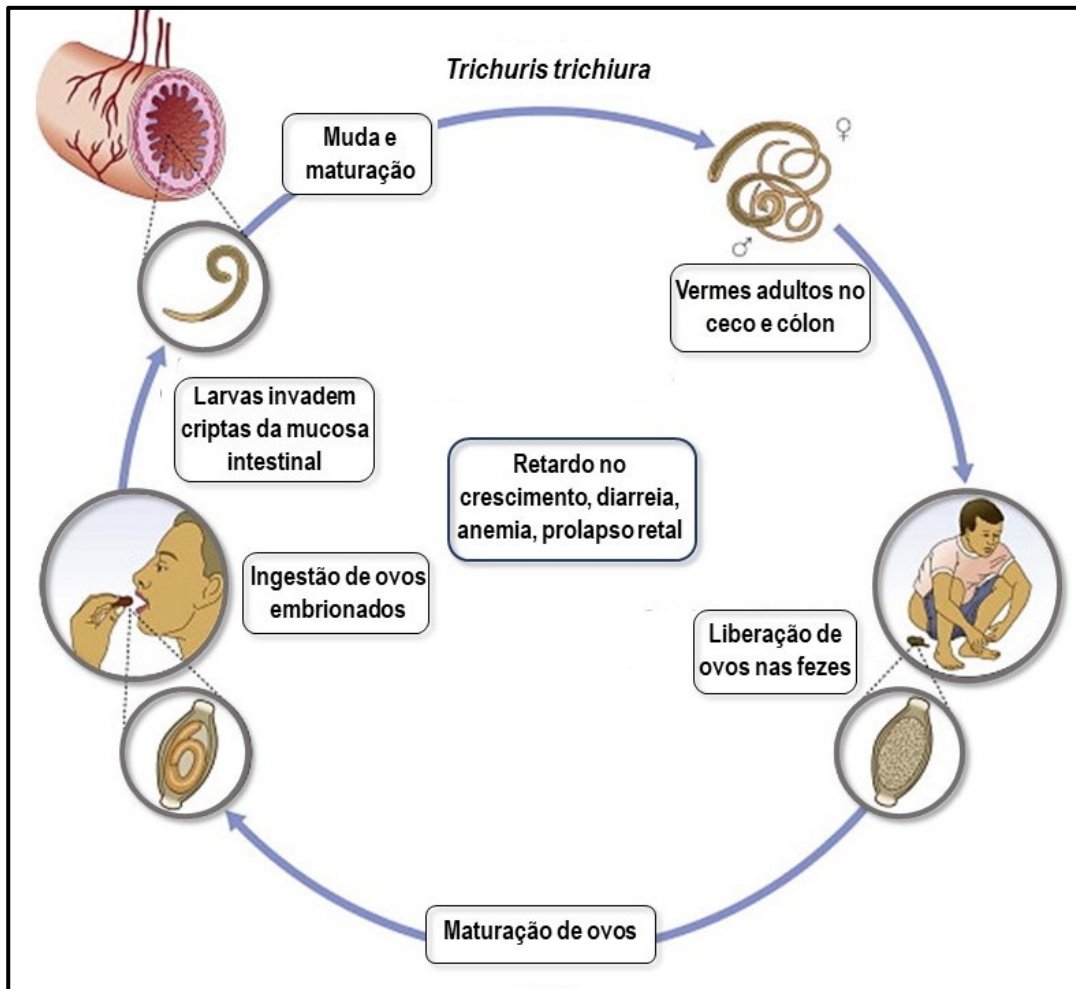


Figura 2 – Esquema representativo do ciclo biológico de *T. trichiura*. Adaptado de Silva e Cooper (2011).

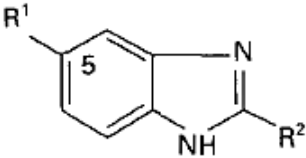
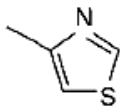
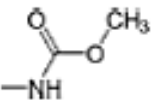
1.2. Benzimidazóis

Na década de 1950 foram desenvolvidos os primeiros anti-helmínticos seguros, contudo eles tinham que ser administrados durante vários dias e, além disso, apresentavam um espectro de atividade limitado (HORTON, 2003). As investigações subsequentes, que aconteceram nas décadas de 60 e 70, direcionaram ao desenvolvimento de diversos anti-helmínticos pertencentes ao grupo dos benzimidazóis, os quais eram superiores aos outros tanto na eficácia, quanto no espectro de ação. Em 1961 o primeiro benzimidazol foi introduzido, sendo denominado genericamente de tiabendazol (TBZ), um composto bem tolerado, eficaz no tratamento de inúmeras infecções por nematódeos em humanos e animais. Tal fármaco, inicialmente, foi considerado com baixa toxicidade em mamíferos e significativamente ativo contra os parasitos gastrointestinais ao atuar inibindo a produção de ovos e interferindo no desenvolvimento de formas larvais. A partir de então, outros fármacos, baseados nos mesmos padrões, amplo

espectro e baixa toxicidade, foram desenvolvidos (BROWN et al., 1961; LACEY, 1988; LACEY & GILL, 1994; TADA et al., 1996).

Apesar da diversidade, a classe dos compostos benzimidazólicos é quimicamente simples (Quadro 1). Os fármacos tiabendazol, fenbendazol, parbendazol, oxfendazol, oxibendazol, albendazol e mebendazol são representantes desse grupo (LACEY & GILL, 1994). Tais fármacos têm uma estrutura química comum, conforme demonstrado no Quadro 1, apresentando variações apenas em seus grupos radicais, os quais estão diretamente relacionados à toxicidade do anti-helmíntico (BRUNTON et al., 2012). O tiabendazol, por exemplo, apresenta um anel do tipo tiazol na posição do radical 2 e apresenta efeitos tóxicos a humanos e animais (TADA et al., 1966; FURTADO et al., 2016a), enquanto todos os benzimidazóis da "segunda geração" contêm um grupo metilcarbamato, o qual substituiu o anel tiazol na posição 2 (LACEY & GILL, 1994).

Quadro 1 – Estrutura química comum e variações nos radicais de componentes do grupo dos benzimidazóis. Adaptado de Lacey e Gill (1994).

Nome genérico (Abreviação)		
	R1	R2
Tiabendazol (TBZ)	H-	
Mebendazol (MBZ)	PhCO-	
Parbendazol (PBZ)	C ₄ H ₉ -	
Oxibendazol (OBZ)	C ₃ H ₇ O-	
Albendazol (ABZ)	C ₃ H ₇ S-	
Fenbendazol (FBZ)	PhS-	
Oxfendazol (OFZ)	PhSO-	

O desenvolvimento dos anti-helmínticos como mebendazol e albendazol, cuja classe pertencente é a dos benzimidazóis, promoveu a ampliação do espectro de atividade. Tais fármacos são efetivos contra os helmintos intestinais frequentes, incluindo os ancilostomídeos e tricurídeos, em contraposição aos primeiros anti-helmínticos como piperazine, o qual era efetivo somente contra *Enterobius vermicularis* e *A. lumbricoides*. A partir deste aspecto, este grupo se caracterizou como o principal anti-helmíntico dentro do arsenal quimioterapêutico para o controle das infecções helmínticas (LACEY, 1988; HORTON, 2003). Tais fármacos, mebendazol e albendazol, conjuntamente com levamisol e pirantel, encontram-se entre os anti-helmínticos recomendados pela OMS, no entanto, somente os dois primeiros apresentam um papel relevante na quimioterapia preventiva (OMS, 2006).

A quimioterapia preventiva é recomendada pela OMS como a principal estratégia para controle das infecções causadas por nematódeos em humanos e tem como objetivo eliminar a morbidade associada a essas infecções. Tal estratégia consiste na administração periódica de anti-helmínticos, principalmente às crianças entre 1 a 15 anos que vivem em áreas onde a estimativa para prevalência de geo-helmintoses é acima de 20% (OMS, 2012; OMS, 2010). Os fármacos albendazol e mebendazol são os mais comumente usados, como mencionado anteriormente, devido ao seu amplo espectro de atividade, baixo custo e facilidade de administração (GEARY et al., 2010; VERCRUYSSSE et al., 2011; KEISER & UTZINGER, 2010; OMS, 2012). Os programas de administração em massa são eficazes, haja vista que diminuem a prevalência e intensidade de infecções controlando a morbidade. Entretanto, os fármacos utilizados têm o potencial de exercer uma pressão de seleção que pode resultar no estabelecimento de resistência, o que já é um problema significativo na veterinária (KEISER & UTZINGER, 2008; DIAWARA et al., 2009; CAMPBELL et al., 2016; JOURDAN et al., 2018).

Considerando que doenças parasitárias, como as geo-helmintoses, representam um problema global que afeta tanto a saúde humana, quanto a animal, diversas estratégias de controle sanitário e biológico foram implementadas em diversos países. No entanto, a quimioterapia preventiva continua sendo considerada, não só a estratégia fundamental para combater essas infecções, como a principal estratégia de controle (AGUAYO-ORTIZ et al., 2013; DE VLAS et al., 2016). De acordo com a OMS, no ano de 2016, mais de 517 milhões de crianças receberam quimioterapia preventiva para o tratamento de geo-helmintoses, o que corresponde a uma cobertura global de 63% (OMS, 2019a). Contudo, poucos são os estudos disponíveis que correlacionam propriedades farmacocinéticas com a eficácia dos fármacos usados pelos programas de administração em massa para o controle de infecções helmínticas,

logo, incompreensões permanecem no que concerne à farmacologia de tais fármacos (GEARY et al., 2010; KEISER & UTZINGER, 2010).

1.3. Mecanismo de ação dos benzimidazóis

Os microtúbulos são polímeros citoesqueléticos formados pela associação paralela de protofilamentos. Estas estruturas são compostas por repetições de um heterodímero, o qual é constituído por monômeros da proteína tubulina que são denominados α e β -tubulina. O dímero α - β -tubulina é o principal componente dos microtúbulos e estão ligados entre si de uma extremidade até a outra (LACEY, 1988; LACEY & GILL, 1994; NOGALES, 2000). Os microtúbulos, em conjunto com os outros polímeros celulares, controlam a forma e processos celulares eucarióticos, para tanto eles estão organizados em estruturas que resistem à deformação. Contudo, eles são capazes de se reorganizar em resposta a estímulos externos, desempenhando papéis intracelulares fundamentais a fim de garantir o funcionamento normal de todas as células eucarióticas (LACEY, 1988; LACEY & GILL, 1994; FLETCHER & MULLINS, 2010).

Dentro da célula o microtúbulo encontra-se em equilíbrio dinâmico, com a adição e remoção dos heterodímeros α - β -tubulina ocorrendo em extremidades opostas da estrutura em desenvolvimento. Este processo é coordenadamente equilibrado entre montagem e desmontagem, sendo determinado pelas alterações nas taxas de adição e remoção da subunidade (LACEY, 1990; LACEY & GILL, 1994). A sequência e a estrutura da tubulina apresenta as informações necessárias para a automontagem de protofilamentos em microtúbulos polares dinâmicos, os quais interagem com diferentes fatores celulares (NOGALES, 2000).

O mecanismo primário de ação dos compostos benzimidazólicos é determinado por sua interação com o heterodímero α - β -tubulina. Tais compostos promovem os efeitos antiparasitários ao interagir especificamente com a β -tubulina, o que foi corroborado pelos estudos de modelagem molecular, interrompendo o equilíbrio tubulina-microtúbulos e, assim, desestruturando tais estruturas por bloquearem a sua polimerização (Figura 3) (LACEY, 1988; LACEY & GILL, 1994; PRICHARD, 2001; AGUAYO-ORTIZ et al., 2013). Portanto, os fármacos de ligação à tubulina, apresentam a capacidade de interromper drasticamente o comportamento coordenado dos microtúbulos, inibindo uma série de mecanismos celulares como transporte, motilidade, divisão e, também, a estrutura celular, conseqüentemente, comprometendo a sobrevivência do parasito (LACEY & GILL, 1994 e NOGALES, 2000).

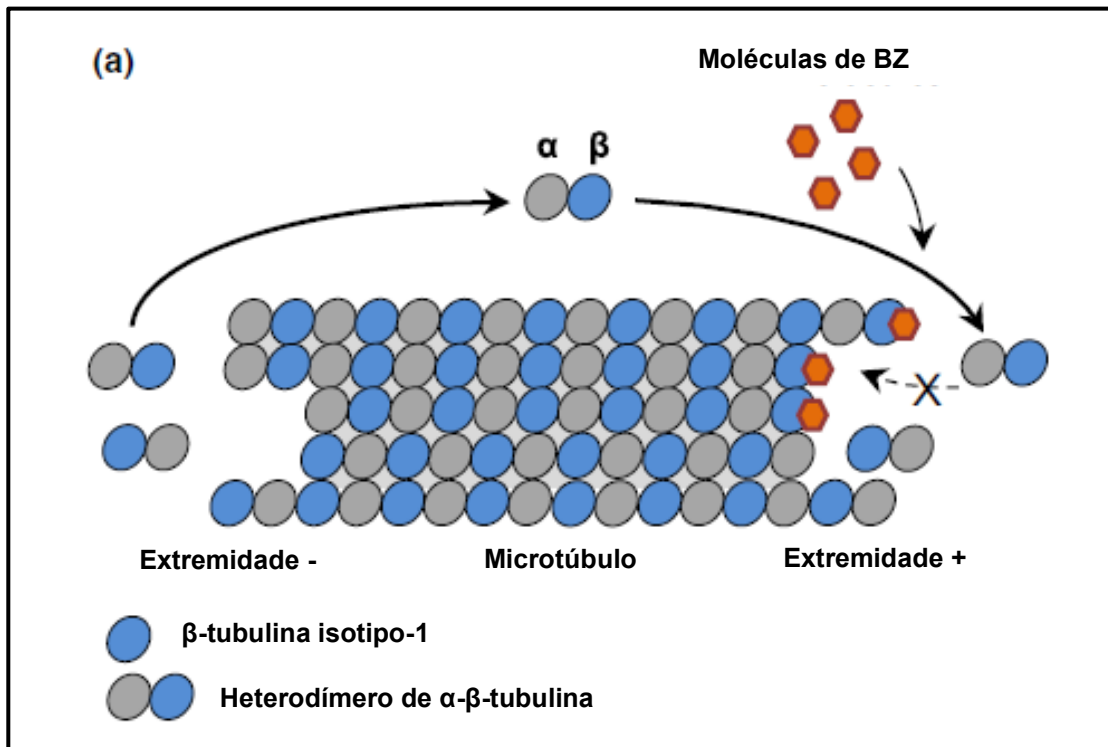


Figura 3 – Esquema do mecanismo de ação dos compostos benzimidazólicos. As moléculas de benzimidazóis (BZ), destacadas em vermelho, se ligam à subunidade da β -tubulina isotipo-1 impedindo a ligação do heterodímero de α - β -tubulina, concomitantemente a perda de um heterodímero na extremidade oposta, interrompendo, assim, o equilíbrio tubulina-microtúbulo. Adaptado de Whittaker et al. (2017).

No estudo de Aguayo-Ortiz et al. (2013) a estrutura tridimensional da proteína foi representada a partir de uma comparação da estrutura da β -tubulina de três organismos com a estrutura do mamífero *Ovis aries*, sem diferenças significativas na estrutura terciária das proteínas modeladas (Figura 4). No mesmo estudo a partir de um alinhamento múltiplo de diferentes sequências da β -tubulina de organismos susceptíveis, não susceptíveis e resistentes, foi possível confirmar que as principais diferenças relacionadas à susceptibilidade nas cadeias de aminoácidos são identificadas nas posições 165, 167, 198 e 200. Modelos da β -tubulina isotipo-1 de *Haemonchus contortus* contendo as mutações nos códons 167, 198 e 200 foram construídos e as diferenças estruturais resultantes dessas mutações são demonstradas na Figura 5.

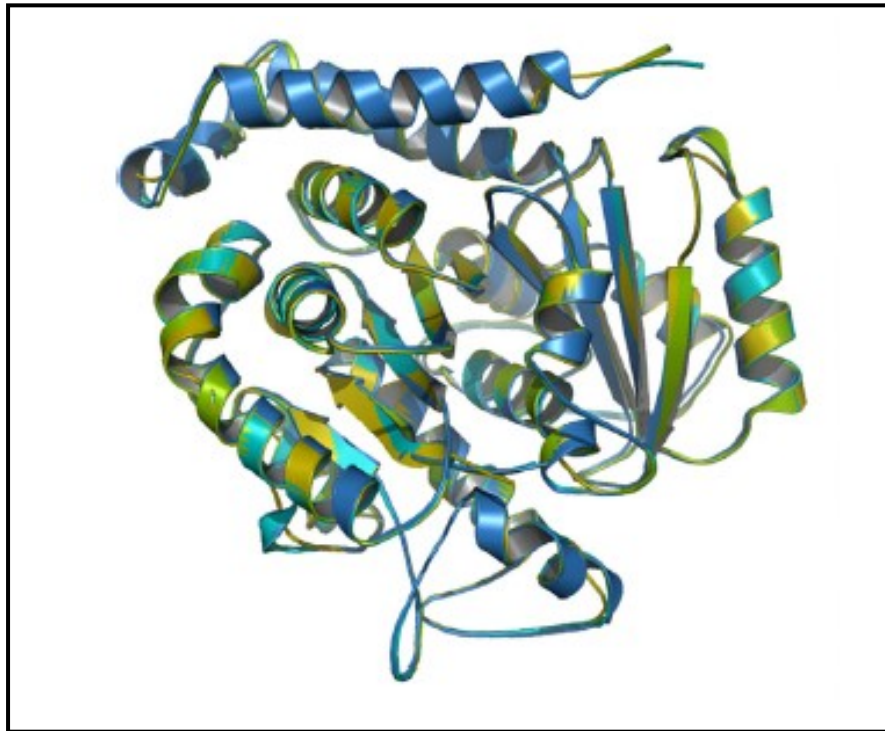


Figura 4 – Modelo comparativo da estrutura da β -tubulina a partir da sobreposição de estruturas tridimensionais de β -tubulina modelada de *H. contortus*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* com a estrutura de *O. aries*. Retirado de Aguayo-Ortiz et al. (2013).

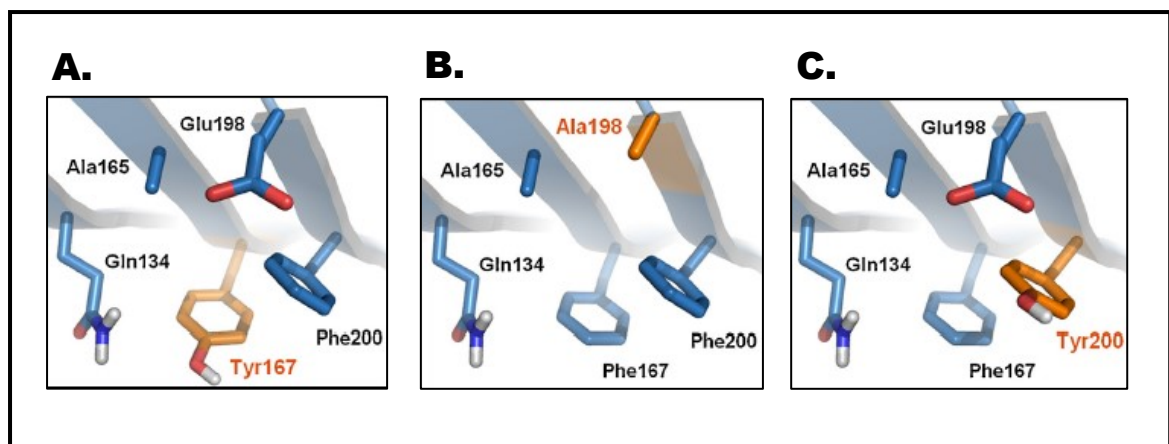


Figura 5 – Representação tridimensional do provável local de ligação do benzimidazol e a proteína β -tubulina com demonstração dos aminoácidos mutados, os quais estão destacados e coloridos em laranja: (A) Phe167Tyr, (B) Glu198Ala e (C) Phe200Tyr. Retirado de Aguayo-Ortiz et al. (2013).

De acordo com o estudo de Bennett et al. (1999), β -tubulina pertencente ao nematódeo *T. trichiura* é uma proteína cuja cadeia de aminoácidos é resultado de uma sequência de 444 códons com uma predição de peso molecular de 49,73 kDa. A análise a partir de *Southern blotting* sugere que tal parasito tem um único isotipo de β -tubulina presente em um único locus, enquanto para *Trichostrongylus colubriformis*, assim como para *H. contortus*, parece que tanto o isotipo-1 quanto o isotipo-2 contribuem para a resistência a benzimidazóis (PRICHARD, 2001).

1.4. O problema da resistência a anti-helmínticos

Resistência ocorre quando indivíduos em uma população apresentam capacidade de tolerar certa dose de um composto, a qual para uma população susceptível da mesma espécie seria letal (PRICHARD et al., 1980). De acordo com Keiser e Utzinger (2010), quando a maior dose tolerada não é mais efetiva contra uma população de parasito, a resistência ao fármaco é definitivamente estabelecida.

A implementação bem-sucedida dos benzimidazóis como anti-helmínticos induziu uma forte pressão de seleção, particularmente na população de parasitos gastrointestinais de ruminantes, e no estabelecimento da resistência. Tal questão é observada na indústria pecuária, onde a quimioterapia intensa é implementada com os benzimidazóis sendo amplamente utilizados para o controle de helmintos (LACEY & GILL, 1994; BENNETT, 2002). Uma vez que esta classe de anti-helmínticos é amplamente usada na medicina veterinária, a questão da resistência caracterizou-se como um problema de grandes proporções com implicações econômicas em vários países (WOLSTENHOLME et al., 2004; WHITTAKER et al., 2017). No Brasil casos têm sido registrados. De acordo com o estudo de Almeida et al. (2010), os isolados de *H. contortus* e *T. colubriformis* (parasitos de ruminantes) apresentaram resistência múltipla a todos os anti-helmínticos testados, dentre eles fosfato de levamisol, albendazol e ivermectina. De acordo com a revisão de Jaeger e Carvalho-Costa (2017), no Brasil, a maioria dos estudos demonstra que os benzimidazóis apresentam atividade limitada contra nematódeos de importância veterinária, concluindo que a resistência pode ter sido amplamente disseminada entre os animais neste país.

Ao longo dos anos a experiência com o controle de parasitos em animais mostrou que a resistência aos fármacos se estabeleceu quando medidas intensivas de controle foram implementadas (HORTON, 2003). Um dos principais determinantes, por meio do qual as populações resistentes podem ser selecionadas, indubitavelmente, é a frequência do tratamento.

A seleção de populações resistentes ocorre conforme a pressão exercida pelo fármaco, logo, quanto maior a pressão, mais rápido a seleção de cepas resistentes. No entanto, há possibilidade de mesmo frequências menores de tratamento selecionarem resistência, particularmente quando o anti-helmíntico é usado por períodos prolongados, como é o caso dos benzimidazóis no controle de infecções humanas por geo-helmintos (GEERTS & GRYSEELS, 2000; VERCRUYSSSE et al., 2011). Segundo Horton (2003), na medicina veterinária, tais medidas intensivas resultaram em um cenário onde a maioria dos anti-helmínticos eficazes, incluindo os benzimidazóis, tornaram-se praticamente sem utilidade devido à baixa eficácia. Sugere-se que os programas de controle de helmintos humanos podem estar enfrentando desafios de forma semelhante.

O grupo alvo, que é determinado pela proporção de indivíduos da população exposta aos fármacos, é outro fator relevante que pode influenciar a pressão de seleção. Em programas de controle de helmintos humanos o tratamento é geralmente restrito a um grupo específico como as crianças em idade escolar e grupos com maior risco de morbidade, a fim de diminuir os riscos do uso difundido de anti-helmínticos. A subdosagem é outro parâmetro que pode contribuir para o estabelecimento de cepas resistentes sob algumas condições pré-estabelecidas, como frequências alélicas iniciais para resistência (GEERTS & GRYSEELS, 2000; GEARY et al., 2010; VERCRUYSSSE et al., 2011).

No que concerne ao desenvolvimento de programas de controle adequados, compreender os mecanismos e a dinâmica da resistência, tanto no nível molecular quanto no genético da população é fundamental (KWA et al., 1995). Na saúde humana, o conhecimento sobre as variáveis que governam a seleção e propagação da resistência a fármacos anti-helmínticos é mínimo. Há inconclusões quanto a farmacologia dos anti-helmínticos o que interfere na compreensão do surgimento de resistência aos fármacos. Logo, tal questão representa um desafio para o uso contínuo e bem-sucedido desses fármacos. A detecção inicial da resistência, empregando ensaios de diagnóstico molecular adaptáveis ao campo, é o ideal para o sucesso a longo prazo de programas de controle e garantia dos benefícios destes (GEARY et al., 2010; OMS, 2012; RASHWAN et al., 2016).

1.5. Eficácia dos anti-helmínticos contra *T. trichiura*

A eficácia dos anti-helmínticos pode ser determinada pela diferença na produção de ovos liberados nas fezes, identificada através de análise anterior e posterior ao tratamento. Os dados, conforme as alterações observadas, podem ser expressos como taxa de redução de ovos

(redução de ovos por grama de fezes) e taxa de cura (ausência de ovos nas fezes), medidas amplamente aplicadas para monitoramento da eficácia de fármacos (GEARY et al., 2010; VERCRUYSSE et al., 2011).

Conforme a revisão de Olsen (2007) quando as infecções por *T. trichiura* são tratadas com albendazol, tanto a taxa de cura, quanto a taxa de redução de ovos são insatisfatoriamente baixas. De acordo com o estudo de Speich et al. (2012), o fármaco albendazol, administrado em dose única, demonstrou baixa eficácia contra tal nematódeo com taxa de cura de 14,5% e, mesmo quando administrado em combinação com nitazoxanida, não houve melhora significativa, com taxa de cura de 16%. As taxas de redução de ovos também foram baixas, 45,6% para albendazol sozinho e 54,9% para a combinação.

Conforme o estudo de Swanson et al. (2012), nas infecções por *A. lumbricoides*, foi observada uma taxa de redução na prevalência de 93%, 4,1% para 0,3%, e nas infecções por ancilostomídeos uma taxa de redução de 96%, 9,2% para 0,4%, os quais se apresentaram como nematódeos mais suscetíveis ao albendazol. Enquanto, contra as infecções por *T. trichiura*, albendazol em dose única demonstrou menor eficácia com uma taxa de redução de 54%, 8,5% para 3,9%. Análise da eficácia do mebendazol contra tricuriase em 33 estudos, usando os dados de todos eles, resultou em uma taxa geral de cura de 63%, enquanto as taxas de redução de ovos no mesmo agrupamento variaram de 38% a 99% (KEISER & UTZINGER, 2010). No tratamento de crianças com infecções brandas, de acordo com Speich et al. (2014), as taxas de cura para mebendazol e albendazol foram de 21,1% e 4,5%, respectivamente. Ainda conforme este estudo, a taxa de redução de ovos no tratamento com albendazol (45%) foi, de modo significativo, menor que a taxa no tratamento com mebendazol (75%).

De acordo com Adegnika et al. (2014), uma única dose de albendazol não apresenta eficácia satisfatória contra *T. trichiura*, logo são requeridas doses múltiplas para uma alta taxa de cura. Contudo, isso não foi observado, mesmo em um tratamento de três doses contra infecções por *T. trichiura*, no qual a taxa de cura foi de apenas 83% em comparação a 92% e 93% para *A. lumbricoides* e ancilostomídeos, respectivamente. No estudo desenvolvido por Müller et al. (2016), uma única dose de albendazol (400mg) apresentou taxa de cura de 1,1% contra *T. trichiura*, a qual foi significativamente baixa em comparação a taxa de cura de *A. lumbricoides* de 97,2%.

1.6. Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos BZs

Em qualquer organismo a resistência a um fármaco é demonstrada por alteração na farmacodinâmica, cujos processos são absorção, metabolismo, distribuição, mecanismo de ação e excreção. Genes associados à resistência podem estar relacionados diretamente ao mecanismo de ação de um anti-helmíntico, haja vista que o mecanismo de resistência pode determinar modificações no receptor do fármaco. Embora, também, existam genes associados à resistência que desempenham outros papéis farmacodinâmicos, como por exemplo, genes que expressam proteínas relacionadas ao transporte ou metabolismo, em vista disso, a resistência não obrigatoriamente correlaciona-se com o local de ação (LACEY, 1990; PRICHARD, 2001).

Conforme Niciura et al. (2012), o surgimento de alterações no gene ou proteína alvo é considerado o principal mecanismo de resistência. Tal processo resulta em redução na afinidade de ligação ao fármaco como demonstrado na Figura 6. Por exemplo, na população de parasitos gastrointestinais do gênero *Strongyloides*, geralmente é aceito que a resistência aos compostos benzimidazólicos está relacionada, principalmente, a alteração na conformação estrutural da proteína β -tubulina isotipo-1 (WHITTAKER et al., 2017).

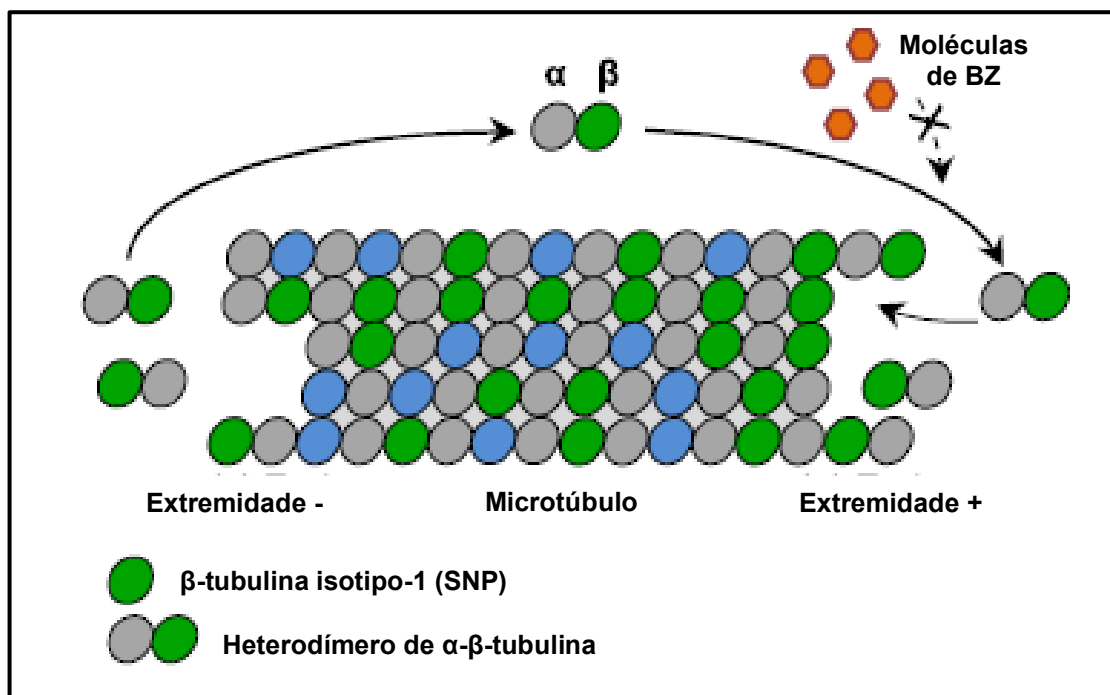


Figura 6 – Esquema do mecanismo molecular proposto para resistência aos compostos benzimidazólicos. As moléculas de benzimidazóis (BZ) não se ligam à subunidade da β -tubulina isotipo-1, destacada em verde, devido à redução da afinidade causada pela alteração estrutural resultado de um SNP, logo, o equilíbrio tubulina-microtúbulo não é interrompido. Adaptado de Whittaker et al. (2017).

Conforme os resultados apresentados por Kwa et al. (1994) há uma forte correlação entre a mutação no códon 200 (TTC, TTT/Fenilalanina → TAC, TAT/Tirosina) da β -tubulina em *H. contortus*, nematódeo de importância veterinária, e a resistência a benzimidazóis. De acordo com Kwa et al. (1995), uma única alteração de Fenilalanina para Tirosina no códon 200 do gene da β tubulina isotipo-1 pode conferir resistência a benzimidazóis em tal parasito. Ghisi et al. (2007) relatou que isolados resistentes de *H. contortus* apresentavam mutação no códon 200 ou no códon 198 (GAG, GAA/Ácido glutâmico → GCG, GCA/Alanina), indicando assim que polimorfismo neste último códon pode também atuar conferindo resistência aos benzimidazóis. Prichard (2001) demonstrou que populações resistentes deste mesmo parasito apresentavam mutação no códon 167 (TTC, TTT/Fenilalanina → TAC, TAT/Tirosina), o qual, posteriormente, foi associado à resistência aos derivados benzimidazólicos.

De acordo com Whittaker et al. (2017), estes SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) característicos têm sido observados no gene da β -tubulina isotipo-1 em populações de espécies de nematódeos gastrointestinais resistentes aos compostos benzimidazólicos. Nos códons 167 e 200, o polimorfismo é o mesmo, determinando uma alteração de uma timina por uma adenina, a qual resulta na substituição de aminoácido Phe167Tyr e Phe200Tyr, enquanto que no códon 198 é identificado a alteração de uma adenina por uma citosina, a qual resulta em uma substituição de aminoácido Glu198Ala. É importante ressaltar que, como o código genético é degenerado, essas alterações no DNA podem variar de acordo com a espécie, mas a substituição do aminoácido será sempre a mesma. A ocorrência desses SNPs dentro dos três códons específicos, relacionados a possível mecanismo de resistência aos benzimidazóis, tem sido demonstrada em outros estudos moleculares (Quadro 2) (SILVESTRE & CABARET, 2002; DIAWARA et al., 2009; DIAWARA et al., 2013a; FURTADO et al., 2014; RASHWAN et al., 2016; FURTADO et al., 2018; FURTADO et al., 2019).

Quadro 2 – SNPs no gene da β -tubulina relacionados à resistência aos benzimidazóis em helmintos.

Número do códon	Substituição	Helminto	Referência
167	Phe → Tyr	<i>Haemonchus contortus</i>	Prichard (2001)
		<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Silvestre e Cabaret (2002)
		<i>Trichuris trichiura</i>	Diawara et al. (2013a)
		<i>Ascaris lumbricoides</i>	Diawara et al. (2013a)
198	Glu → Ala	<i>Haemonchus contortus</i>	Gishi et al. (2007)
		<i>Necator americanos</i>	Rashwan et al. (2016)
		<i>Trichuris trichiura</i>	Diawara et al. (2013a)
		<i>Ancylostoma braziliense</i>	Furtado et al. (2018)
		<i>Necator americanos</i>	Zuccherato et al. (2018)
200	Phe → Tyr	<i>Haemonchus contortus</i>	Kwa et al. (1994)
		<i>Haemonchus contortus</i>	Gishi et al. (2007)
		<i>Trichuris trichiura</i>	Diawara et al. (2009)
		<i>Ancylostoma caninum</i>	Furtado et al. (2014)
		<i>Necator americanos</i>	Zuccherato et al. (2018)
		<i>Ascaris lumbricoides</i>	Furtado et al. (2019)

De acordo com Lacey e Gill (1994), a resistência aos benzimidazóis em nematódeos é caracterizada por uma diminuição da afinidade nas interações da tubulina do parasito e benzimidazóis, o que é determinado pela conformação da proteína, conforme a explicação mais provável proposta. Contudo, ainda há inconclusão quanto as alterações na sequência de aminoácidos associadas com resistência, estas poderiam ocorrer tanto no próprio local de ligação dos benzimidazóis, quanto em locais distantes, o que resultaria em mudanças conformacionais no local de ligação do fármaco a proteína.

Autores sugerem que a falha ao tratamento, observada em geo-helmintos de importância humana, pode ter correlação com os SNPs identificados nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina e descritos em parasitos de importância veterinária, como *H. contortus*, evidenciando que os mecanismos moleculares podem ser similares. De acordo com Diawara et al. (2013a), no Haiti, antes do tratamento com albendazol, o SNP no códon 200 apresentava-se em baixa frequência, entretanto, houve um aumento significativo na frequência do perfil homozigoto resistente após o tratamento. Esta mesma tendência foi observada no respectivo códon em cepas de tricurídeos no Quênia. A eficácia de albendazol demonstrou-se intermediária, em ambos os países, com um aumento significativo da frequência da mutação no códon 200. Logo, os dados

apresentados neste estudo sugerem que o tratamento com albendazol pode ter selecionado cepas polimórficas para este códon (DIAWARA et al., 2013a).

De acordo com Vlaminck et al. (2018), os poucos estudos que avaliam SNPs em geo-helminthos que acometem os humanos indicam que o códon 200 é o mais predominantemente polimórfico e que as mutações associadas à resistência, no caso de *T. trichiura* tornaram-se mais frequentes após a administração do fármaco, contudo, sem elucidar a correlação com a eficácia reduzida do mesmo. Interpretação de tais resultados deve ser realizada com cautela já que estes estudos são baseados em um pequeno número de indivíduos pertencentes a um número limitado de áreas, além do uso de metodologias variadas (VLAMINCK et al., 2018).

Os dados observados no campo da saúde animal não podem ser diretamente extrapolados para a saúde humana, embora, seja possível o desenvolvimento de uma situação semelhante com mecanismos similares aos observados entre geo-helminthos de importância veterinária (GEERTS & GRYSEELS, 2001; VERCRUYSSSE et al., 2011). Portanto, tendo como base a experiência com nematódeos no campo veterinário, os códons 167, 198 e 200 no gene da β -tubulina, provavelmente, são três posições críticas para a resistência aos benzimidazóis entre as principais geo-helminthoses humanas, as quais inclui infecção por *T. trichiura* (DIAWARA et al., 2013b).

1.7. Técnicas moleculares

Os métodos de estudo de resistência aos benzimidazóis são divididos em dois grupos principais: métodos *in vivo* e *in vitro*. Estes ensaios, no entanto, podem ter baixa sensibilidade e ser dispendiosos (TAYLOR et al., 2002). Na medicina veterinária, metodologias para a identificação da resistência estão bem determinadas e padronizadas. Por outro lado, na saúde humana, os métodos *in vitro* não foram validados (KEISER & UTZINGER, 2010).

O Teste *in vivo* de Redução da Contagem de Ovos Fecais (*Faecal Egg Count Reduction Test* - FECRT) é o principal método para a detecção e monitoramento da resistência. FECRT se resume em contagens dos ovos pré e pós-tratamento realizadas em momentos definidos de acordo com o fármaco avaliado. Embora tal teste parasitológico seja amplamente utilizado e possa ser aplicado a todos os grupos de anti-helmínticos, ele detecta resistência somente quando esta se encontra em um nível acima de 25%, ou seja, quando mais de 25% dos parasitos são resistentes (MARTIN et al., 1989; TAYLOR et al., 2002; COLES, 2006). O Teste de Eclodibilidade de Larva (*Egg Hatch Assay* - EHA) é um método *in vitro* que também é utilizado para detecção de resistência aos benzimidazóis. Os ensaios são realizados partindo do

pressuposto que tais anti-helmínticos impedem o desenvolvimento do embrião e a eclosão das larvas, portanto, o objetivo é incubar ovos não desenvolvidos em concentrações seriadas do anti-helmíntico com posteriores avaliações. Como é o caso do FECRT, o EHA parece não ter sensibilidade para detectar níveis de resistência abaixo de 25% (TAYLOR et al., 2002).

Ensaio biológico *in vitro* no formato atual, como o Teste de Eclodibilidade de Larva e o Ensaio de Desenvolvimento Larval, requerem o isolamento de ovos ou de larvas de estágio infeccioso, logo, em parasitos de importância humana, são aplicáveis apenas aos ancilostomídeos, cujas larvas eclodem rapidamente após o isolamento das fezes, tal fato, entretanto, não é observado entre outros geo-helmintos humanos, como *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, os quais se desenvolvem em estágio infeccioso dentro do ovo e eclodem somente após ingestão pelo hospedeiro. Pesquisas adicionais serão necessárias para desenvolver ensaios aplicáveis a essas outras populações (VERCRUYSSSE et al., 2011).

Os ensaios biológicos empregados para monitoramento da resistência, como testes de desenvolvimento larval e testes de redução de ovos, apresentam-se limitados no que concerne à sensibilidade, uma vez que estes métodos são sensíveis quando a potencial resistência já é um problema estabelecido (PRICHARD, 2001). Além disso, ensaios baseados em caracterização fenotípica são trabalhosos e exigem habilidades específicas (WHITTAKER et al., 2017). Em contraposição, os ensaios baseados em teste molecular, através do uso de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são altamente sensíveis, mesmo quando a frequência de alelos relacionados a resistência é baixa (PRICHARD, 2001; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009). O desenvolvimento de ensaios moleculares, que apresentem rapidez e sensibilidade, para detecção de possíveis SNPs associados à resistência nos genes da β -tubulina em geo-helmintos de importância para a saúde humana é fundamental, a fim de garantir um monitoramento eficiente da presença de parasitos resistentes aos benzimidazóis (DIAWARA et al., 2009; RASHWAN et al., 2017).

Segundo Vlaminc et al. (2018), um ensaio molecular baseado em mutações associadas à resistência em genes-alvo é uma metodologia mais sensível. Um conjunto amplo de técnicas moleculares pode ser empregado para a varredura de possíveis SNPs relacionados a resistência, como PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), pirosequenciamento, qPCR (*real time PCR*) e SmartAmp2 (*Smart Amplification Process*) (DIAWARA et al., 2009; RASHWAN et al., 2017; ZUCCHERATO et al., 2018).

Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição é um método usual para identificar mutações, a partir da ação de enzimas de restrição, em populações de parasitos resistentes aos fármacos, a fim de analisar associações entre diferentes loci e resistência

(PRICHARD, 2001). Entretanto, a PCR-RFLP é uma estratégia limitada, uma vez que a análise só é possível se o polimorfismo cria ou elimina um sítio para a enzima de restrição, ou se um sítio é introduzido artificialmente através da combinação da sequência existente e a adição de uma alteração de base por meio de mutação sítio-dirigida. No entanto, tal técnica ou sua variação tem sido empregada com êxito para detectar SNPs relacionados à resistência, apresentando-se sensível, específica, de fácil reprodução com resultado rápido, a partir da observação em gel do produto da digestão (MEDRANO & OLIVEIRA, 2014; FURTADO et al., 2018). Métodos padrão como este têm a vantagem de não requerer equipamentos complexos, mas exigem muito trabalho e podem resultar em baixo rendimento (WILSON et al., 2005). De acordo com o estudo de Zuccherato et al. (2018), PCR-RFLP se apresentou como uma técnica de fácil reprodução e alto rendimento para varredura de polimorfismos em amostras de ovos de *A. lumbricoides* e *N. americanus*. Conforme Furtado et al. (2018), PCR-RFLP modificada foi padronizada com êxito e se apresentou sensível e específica para a detecção de SNPs nos códons 198 e 200 de *A. braziliense*.

Diawara et al. (2009) desenvolveram um ensaio genético, baseado na técnica denominada pirosequenciamento, para a identificação de mutação no códon 200 do gene da β -tubulina de *A. lumbricoides* e *T. trichiura*. Esta técnica, que sequencia fragmentos de amostras de DNA em um período curto de tempo, garante uma análise altamente precisa de SNPs. O desenvolvimento de ensaios como este permite uma varredura confiável, fácil e rápida para a detecção de alelos que possivelmente conferem resistência em parasitos humanos. No entanto, o pirosequenciador é caro, portanto, desde que não esteja amplamente disponível, uma das principais limitações para aplicação dessa técnica molecular seria o custo do equipamento requerido (DIAWARA et al., 2009; DIAWARA et al., 2013b; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009).

Rashwan et al. (2016) desenvolveu um ensaio, baseado na técnica denominada SmartAmp2, para a genotipagem de SNPs no gene da β -tubulina em *N. americanus*. Tal ensaio apresentou alta reprodutibilidade e sensibilidade para a detecção, tanto em pools de ovos, quanto em larvas ou ovo único, apenas em uma única amplificação, entretanto, uma validação adicional com um número expressivo de amostras de campo é requerida. Em suma, SmartAmp2 é uma técnica de amplificação de DNA em uma única etapa, sob condições isotérmicas, que utiliza a enzima polimerase específica Aac, altamente resistente a contaminantes, e a proteína MutS de ligação ao mismatch. A detecção de polimorfismo acontece durante o processo de amplificação utilizando um corante intercalante fluorescente, eliminando assim a necessidade de eletroforese (MITANI et al., 2009). De acordo com Rashwan et al. (2017), o ensaio de

genotipagem baseado nesta técnica caracterizou-se como sensível, específico, simples e rápido, entretanto, é limitado por detectar somente um SNP por vez.

ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica molecular amplamente utilizada para a detecção desses polimorfismos (FURTADO et al., 2015). Este método compreende duas reações separadas para amplificação de cada alelo e, assim, requer que a base terminal da extremidade 3' do iniciador seja específica. A partir desta estratégia, um iniciador se anela ao DNA não mutado, porém é refratário ao DNA mutado, o outro iniciador se anela ao DNA mutado, porém é refratário ao DNA não mutado. Entretanto, em certos casos, uma única base incompatível permite amplificação inespecífica, desse modo, uma incompatibilidade adicional, próxima a extremidade 3', aumenta a especificidade da reação (NEWTON et al., 1989; YE et al., 1992; YE et al., 2001). Uma exigência dessa técnica é a ausência da atividade de revisão 3' para 5' exercida por algumas enzimas DNA polimerase (NEWTON et al., 1989). ARMS-PCR é uma técnica simples, rápida, confiável e de baixo custo, um termociclador convencional é suficiente para sua implementação, o qual é um equipamento amplamente disponível, e os resultados podem ser obtidos diretamente, sendo assim menos sujeitos a erros de interpretação (NEWTON et al., 1989; MEDRANO & OLIVEIRA, 2014; FURTADO & RABELO, 2015).

A técnica Tetraprimer ARMS-PCR acontece em uma única reação e, apesar de tal técnica utilizar quatro iniciadores na mesma PCR (dois externos e dois internos), apresenta o mesmo princípio, com um iniciador para se anelar especificamente ao DNA não mutado e outro iniciador para se anelar ao DNA mutado (NEWTON et al., 1989; YE et al., 2001). Amplicons correspondentes aos alelos são produzidos a partir do anelamento específico dos iniciadores: um amplicon corresponde ao controle da reação, um segundo amplicon é produzido quando a amostra é homocigota e, se a amostra é heterocigota, mais dois amplicons são produzidos. Pela posição dos iniciadores externos a diferentes distâncias da posição do SNP, estes amplicons apresentam tamanhos diferentes e, dessa forma, são diferenciados a partir de eletroforese em gel (YE et al., 1992; YE et al., 2001). A técnica Tetraprimer ARMS-PCR apresenta uma metodologia rápida e econômica para genotipagem de SNPs, podendo produzir um resultado direto, no entanto, sua padronização pode ser complexa, uma vez que quatro iniciadores diferentes atuam juntos em uma mesma reação (YE et al., 2001; FURTADO & RABELO, 2015). A Figura 7 apresenta o esquema dessa técnica.

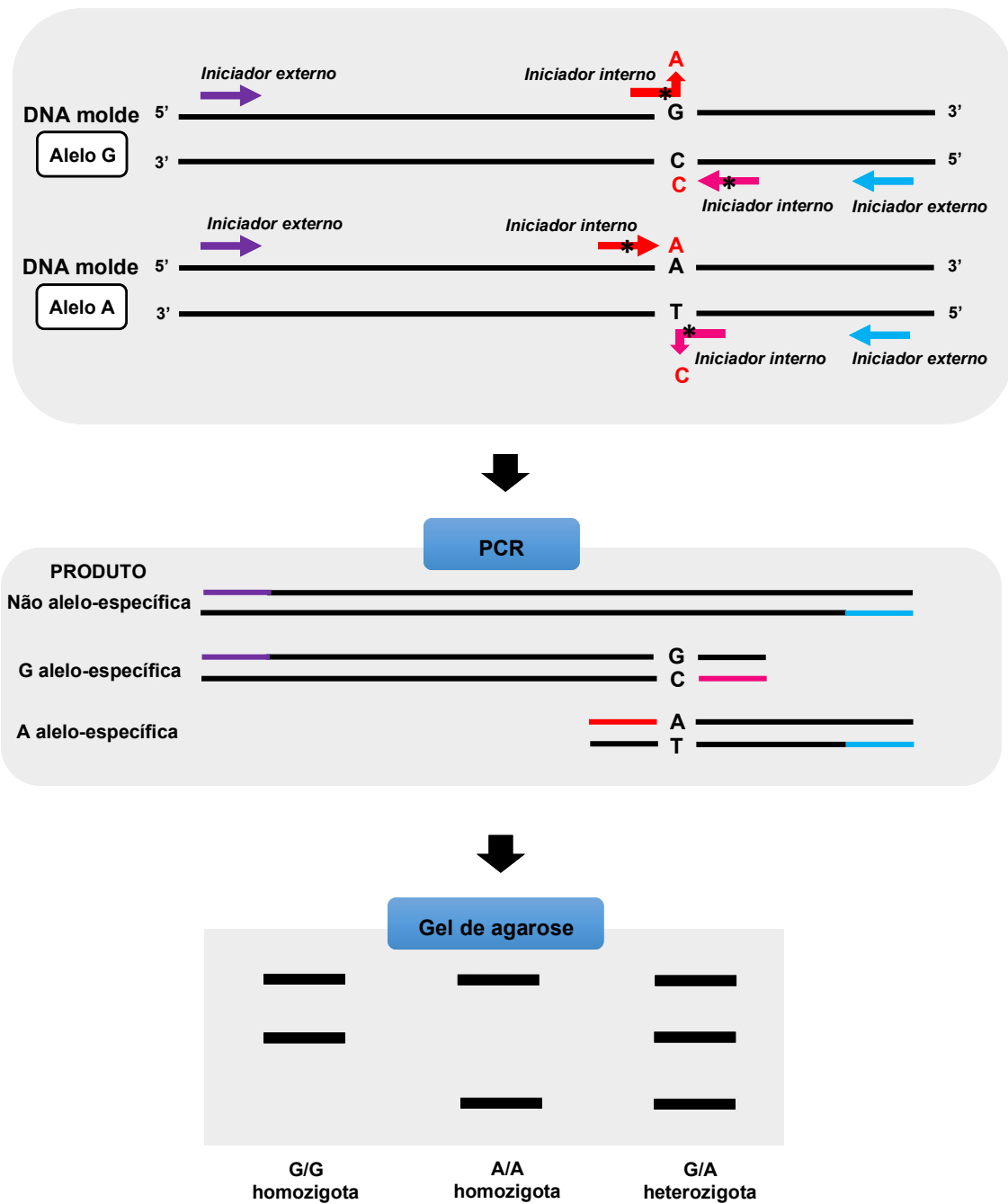


Figura 7 – Representação esquemática da metodologia Tetraprimer ARMS-PCR. No exemplo, a substituição $G \rightarrow A$ é apresentada como um SNP. Dois amplicons específicos são produzidos utilizando dois pares de iniciadores em uma mesma reação, um par (iniciadores representados pelas setas lilás e rosa) produz um amplicon referente ao alelo G e o outro par (iniciadores representados pelas setas vermelho e azul) produz um amplicon referente ao alelo A. Um terceiro amplicon, denominado controle, é produzido pelos iniciadores externos (representados pelas setas lilás e azul). A especificidade dos iniciadores internos é garantida por duas incompatibilidades, uma entre a base terminal da extremidade 3' de um iniciador interno e o DNA, e a segunda na posição 2 da mesma extremidade (identificada por um asterisco). Adaptado de Ye et al. (2001).

A especificidade alélica é garantida por uma incompatibilidade entre a base na extremidade 3' de um iniciador interno e o DNA molde. Para aumentá-la, uma segunda incompatibilidade da mesma extremidade é acrescentada no iniciador (YE et al., 2001). De acordo com o estudo de Furtado et al. (2014), os iniciadores sem a segunda incompatibilidade foram inespecíficos e aqueles com esta incompatibilidade na posição 2 foram incapazes de se anelarem. Enquanto, de acordo com Wang et al. (2014), assim como no estudo desenvolvido por Ye et al. (2001), os iniciadores internos com a segunda incompatibilidade na posição 2 da extremidade 3' foram específicos. Conforme Furtado et al. (2014) somente uma segunda incompatibilidade localizada na posição 3 ou 4 garantiu resultados satisfatórios com anelamento específico.

De acordo com Álvarez-Sánchez et al. (2005), qPCR é um ensaio sensível, rápido e altamente reprodutível para detecção de resistência a benzimidazóis nas principais espécies dentre a população de tricostrongilídeos. Tal metodologia permite o cálculo da proporção de cada variante alélica e não requer processamento após PCR. De acordo com os autores esta técnica apresentou melhora, particularmente, em relação ao tempo e sensibilidade quando comparada com a PCR específica para alelos e os bioensaios, como FECRT e EHA, respectivamente. Schwenkenbecher et al. (2007) demonstrou o desenvolvimento e aplicação da qPCR, definida como uma ferramenta rápida e confiável, para monitoramento de polimorfismos em códons que são relacionados à resistência aos benzimidazóis. De acordo Schwenkenbecher & Kaplan (2009), os ensaios de qPCR que foram desenvolvidos para detecção de alelos associados a resistência fornecem ferramentas úteis para análise rápida e eficiente no isotipo-1 da β -tubulina de ancilostomídeos.

Tendo em vista que a iniciativa de saúde pública da quimioterapia preventiva concede benefícios ao indivíduo, particularmente crianças, o estabelecimento da resistência é considerado uma ameaça a estes programas. Adicionalmente, o cenário atual é caracterizado por um limitado arsenal de fármacos disponíveis, por produção mínima de novos fármacos especificamente direcionados às helmintíases humanas e pela ausência de vacinas, logo, é fundamental garantir um monitoramento efetivo para assegurar que a resistência seja rapidamente detectada e estratégias para controle sejam implementadas a fim de manter a eficácia dos tratamentos anti-helmínticos atuais (JAMES et al., 2009, DIAWARA et al., 2009; GEARY et al., 2010; KEISER & UTZINGER, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

A OMS recomenda a administração periódica de anti-helmínticos, particularmente, albendazol e mebendazol, como uma intervenção pública de saúde contra as geo-helmintoses. Entre nematódeos de importância veterinária há evidências que o uso constante de benzimidazóis, os quais podem exercer uma pressão de seleção, tem selecionado populações resistentes de parasitos. Enquanto, em humanos, tais fármacos têm demonstrado eficácia limitada no que concerne aos tratamentos contra *T. trichiura*, bem como taxas de cura subótimas em indivíduos com altas cargas parasitárias. Diante desse cenário, é necessário avaliar constantemente a eficácia de tais tratamentos monitorando precisamente, dentre outros parâmetros, a frequência de SNPs relacionados à resistência aos anti-helmínticos. Para tanto, técnicas moleculares que sejam rápidas, sensíveis, específicas e que não apresentem aplicação limitada para a investigação de tais SNPs, são requeridas, de modo a garantir planejamento de estratégias que retardam o estabelecimento de uma população de parasitos resistentes e irreversivelmente predominante que não responda mais aos tratamentos. No Brasil não existem estudos que avaliam a frequência de SNPs correlacionados com a resistência aos benzimidazóis em *T. trichiura*, os quais já foram descritos para este parasito em outros locais no mundo. Portanto, esse trabalho é o primeiro que objetiva uma varredura de tais SNPs na América do Sul.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Padronizar e validar uma metodologia para a detecção de polimorfismos associados ao processo de resistência aos benzimidazóis em *T. trichiura*.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar controles mutados e não mutados para as regiões dos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*;
- Estabelecer as metodologias de PCR-RFLP e de Tetraprimer ARMS-PCR, para análise dos códons 198, e códons 167 e 200, respectivamente;
- Realizar uma varredura em ovos provenientes de diferentes estados brasileiros para a detecção de mutações nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*.

4. METODOLOGIA

4.1. Considerações éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - COEP (CAAE 61047216.7.0000.5149) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Conforme autorizado pelo COEP nenhum documento de consentimento foi requerido aos indivíduos que apresentaram amostras positivas, as quais foram analisadas anonimamente.

4.2. Amostragem e extração de DNA

Os ovos analisados neste estudo foram provenientes de diversas localidades do Brasil. Amostras fecais positivas para *T. trichiura* foram coletadas de pacientes dos estados da Bahia (7), Maranhão (7), Minas Gerais (2), Piauí (10) e Tocantins (11), totalizando 37 pacientes, as quais foram encaminhadas por laboratórios que realizam análises crotoparasitológicas ao Laboratório de Parasitologia Molecular (UFMG). As amostras foram identificadas com a respectiva sigla para o nome do estado, número do paciente daquele estado, seguido da numeração referente aos ovos coletados por cada paciente como, por exemplo, BA 1-1, BA 1-2, BA 1-3 e assim sucessivamente, de modo que a sigla BA refere-se a amostras da Bahia, MA a amostras do Maranhão, MG a amostras de Minas Gerais, PI a amostras do Piauí e TO a amostras do Tocantins. Tais amostras foram armazenadas em formaldeído a 10% para posterior processamento e, subsequentemente, análise molecular.

A recuperação dos ovos de *T. trichiura* foi realizada por meio de processamento destas amostras com éter de acordo com Ritchie (1948). Inicialmente, a suspensão de fezes com formol foi homogeneizada e filtrada através de gaze. Então, a partir deste produto filtrado, foi transferido um volume de 2 mL para um tubo Falcon de 15 mL. Em seguida, 5 mL de éter sulfúrico foi adicionado ao produto, o qual foi agitado vigorosamente. Este material foi centrifugado por 1 minuto a 14.000 xg com o posterior descarte do sobrenadante. Uma nova etapa de lavagem foi realizada adicionando 500 µl de hipoclorito de sódio 1,0%. Posteriormente, o material foi centrifugado a 14.000 xg por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Os ovos foram lavados novamente com 500 µl de água ultrapura, seguida de centrifugação sob os mesmos parâmetros citados anteriormente e o sobrenadante foi então descartado.

O sedimento foi ressuspensão em 100 µl de água ultrapura e observado ao microscópio óptico para recuperação de ovos. Estes foram pipetados individualmente em um volume de 1

μl e transferidos para um microtubo de 0,2 mL que continha 10 μl de tampão de lise, cuja descrição foi feita por Lake et al. (2009) e modificações por Diawara et al. (2013a) (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 2,5 mM MgCl₂, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween 20, 0,01% de gelatina, 100 μg de proteinase K, 10% β-mercaptoetanol). Então, iniciou-se o processo de extração de DNA de ovo único a partir da incubação do material a 57 °C por 2 h com a subsequente inativação da proteinase K a 80 °C por 20 min. Os microtubos contendo o DNA extraído foram armazenados a -20 °C até as posteriores genotipagens por PCR.

4.3. Desenho dos iniciadores

Os iniciadores utilizados foram desenhados através do programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) baseando-se na sequência do gene da β-tubulina de *T. trichiura* disponível no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) sob o número de acesso AF034219.1 e parcialmente representada na Figura 8. As substituições das bases ocorreram de acordo com a descrição de Ye et al. (2001). Pelo princípio da técnica Tetraprimer ARMS-PCR foram desenhados iniciadores que apresentam a base da extremidade 3' pareando exatamente na posição da presença ou não da mutação no DNA. O Quadro 3 apresenta os iniciadores desenhados para este estudo e, conforme a exigência da técnica empregada, a alteração das bases.

Quadro 3 – Iniciadores utilizados e suas respectivas substituições quando necessário. As bases que foram alteradas encontram-se em negrito e sublinhadas.

Iniciador	Sequência (5' para 3')
Tt_tub_F	5' TGC TTG ATG TAG TCC GCA AG 3'
Tt_tub_R	5' CAG CAT TCA ACT GAC CAG GA 3'
Tt_167_F	5' <i>GTAAAACGACGGCCAG</i> GGG AAG AGT ATC CTG ACC GAA TT 3'
Tt_200_R	5' <i>CAGGAAACAGCTATGAC</i> TCA ACT GAC CAG GAA AGC GTA GGC ATG T 3'
Fs_Tt_167	5' TCC TGA CCG AAT TAT GAC <u>AAG</u> TTT 3'
Rc_Tt_167	5' CTC CAG ACA TGGTT GCC GAA 3'
Fc_Tt_167	5' CGA CTG CCT GCA AGG GTT T 3'
Rr_Tt_167	5' CGG AGA CGG AAC GAC <u>AGT</u> <u>AT</u> 3'
Fs200Tt	5' AGA GAA CAC GGA CGA <u>AAG</u> ATT 3'
Rr200Tt	5' GCG CTT CAT TAT CTA <u>TGG</u> <u>AGT</u> 3'
Fs_Tt_198	5' TTG GTA GAG AAC ACG <u>GGC</u> GA 3'
Rr_Tt_198	5' GCT TCA TTA TCT ATG CAG AAT <u>ATT</u> <u>G</u> 3'

* As bases marcadas em itálico representam as sequências de M13. Iniciadores com cauda M13 são utilizados para melhores resultados no sequenciamento.

GGAAGGTGCCGAAGTAGTTGACAATGTGCTTGATGTAGTCCGCAAGGAAATCGGAAAGCTGCG
ACTGCCTGCAAGGGTTTCAGTTGACTCATTCCCTCGGCGGCGGAAGTGGGAGTGGAATGGGT
ACGCTTCTGATATCTAAAATTCGGGAAGAGTATCCTGACCGAATTATGACAACTTTTAGTGT
CGTTCCGTCTCCGAAGGCAAGTTGTTTGATACTGTTACGTCGTGAACTATCGCCTTTTGTAG
GTTTCAGATACAGTTGTAGAACCATATAATGCAACTCTGTCAGTCCACCAGTTGGTGAGAA
CACGGACGAAACATTCTGCATAGATAATGAAGCGCTTTACGATATTTGTTTCCGAACTTTGA
AGTTAACAACACCAACTTACGGAGACTTAAATCATTTGGTTTCCGCAACCATGTCTGGAGTA
ACGACATGCCTACGCTTTCCTGGTCAGTTGAATGCTGA

Figura 8 – Sequência parcial utilizada do gene da β -tubulina de *T. trichiura* para desenho dos iniciadores (AF034219.1). Os iniciadores em lilás são Tt_tub_F e Tt_tub_R; os iniciadores em vermelho são Tt_167_F e Tt_200_R; os iniciadores em azul claro são Fs_Tt_167 e Rc_Tt_167; os iniciadores em azul escuro são Fc_Tt_167 e Rr_Tt_167; os iniciadores em verde são Fs200Tt e Rr200Tt; os iniciadores em rosa são Fs_Tt_198 e Rr_Tt_198. Os iniciadores destacados nesta sequência com suas respectivas cores estão demonstrados no Quadro 3.

4.4. Síntese de controles

Controles não mutado e mutado, para os códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina, foram sintetizados anteriormente à padronização da técnica para genotipagem de SNPs. Para a síntese do controle não mutado, DNA genômico de *T. trichiura* foi amplificado a partir de uma primeira reação de PCR que apresentou um volume final de 10 μ l contendo 1X *GoTaq*[®] *G2 Master Mix* (Promega, Estados Unidos), 0,2 μ l de cada iniciador (concentração final de 0,2 μ M/iniciador), representados no Quadro 4, e 5 μ l de DNA (não dosado para evitar perda de material), proveniente da extração de ovo único, o qual foi utilizado como molde. As amplificações ocorreram em termociclador *Mastercycler*[®] (Eppendorf, Alemanha) com as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 5 min para desnaturação inicial da dupla fita de DNA, 30 ciclos com um passo inicial a 95 °C por 30 s, temperatura de anelamento de 60°C por 45 s, seguida por uma temperatura de 72 °C por 45 s e um passo final de extensão a 72 °C por 8 min. A partir de 1 μ l do produto obtido desta primeira reação, uma reação de *nested*-PCR foi realizada em um volume final de 10 μ l contendo 1x *GoTaq*[®] *G2 Master Mix* (Promega, Estados Unidos) e 0,3 μ l de cada iniciador (concentração final de 0,3 μ M/iniciador), descritos no Quadro 4 com seus respectivos amplicons. Estes iniciadores se anelam em regiões que flanqueiam os códons 167, 198 e 200, simultaneamente, logo um único controle não mutado foi construído para os três códons. As condições de ciclagem foram as mesmas especificadas para a PCR anterior. O fragmento obtido foi clonado com o kit *pGEM*[®]-*T Easy Vector Systems* (Promega, Estados Unidos). O produto resultante da recombinação transformado em células pertencentes à linhagem *XL1-blue* (Phonutria, Brasil) e recuperado pelo procedimento de minipreparação com *Wizard*[®] *Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, Estados Unidos). A ausência dos alelos mutados nas posições 167, 198 e 200 foi determinada por sequenciamento do controle. Na Figura 9 é apresentado um esquema para síntese do controle sem mutação.

Quadro 4 – Iniciadores utilizados na reação de PCR e *nested*-PCR para amplificação da região da β -tubulina de *T. trichiura*.

Reação	Iniciador	Produto	Sequência (5 para 3)
I	Tt_tub_F	445 pb	5' TGC TTG ATG TAG TCC GCA AG 3'
	Tt_tub_R		5' CAG CAT TCA ACT GAC CAGGA 3'
II	Tt_167_F	352 pb	5' <i>GTAAAACGACGGCCAG</i> GGG AAG AGT ATC CTG ACC GAA TT 3'
	Tt_200_R		5' <i>CAGGAAACAGCTATGAC</i> TCA ACT GAC CAG GAA AGC GTA GGC ATG T 3'

*As bases marcadas em itálico representam as sequências de M13. Iniciadores com cauda M13 são utilizados para melhores resultados no sequenciamento.

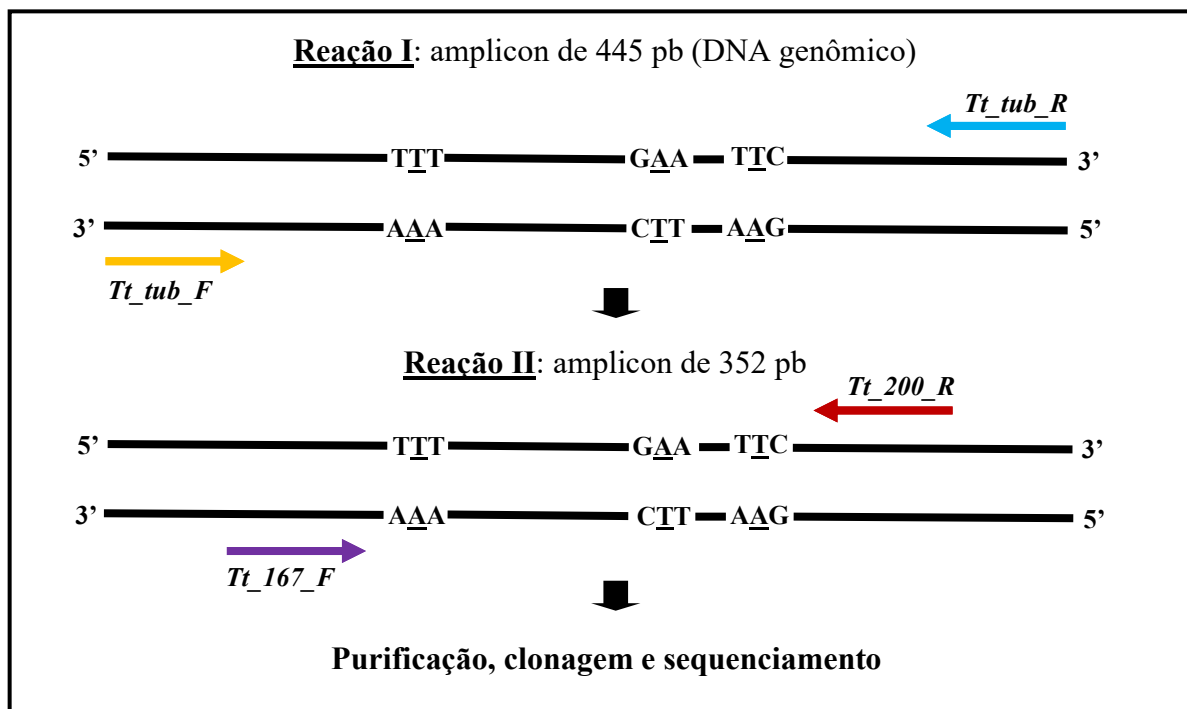


Figura 9 – Esquema da síntese do controle sem mutação para análise de polimorfismos no gene da β -tubulina de *T. trichiura*. A ponta triangular de cada seta que representa um iniciador corresponde a extremidade 3'.

A síntese dos controles mutados para os códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina foi realizada por mutagênese sitio-dirigida seguida da técnica Megaprimer-PCR. Dois controles mutados foram construídos, um para o códon 167 e um único para os códons 198 e 200, valendo-se da proximidade destes códons. Os iniciadores que foram utilizados em cada etapa, bem como suas respectivas combinações e amplicons correspondentes, estão sumarizados no Quadro 5. Para a construção de cada controle mutado foi realizada uma primeira PCR, na qual o plasmídeo sem mutação foi utilizado como molde. Iniciadores específicos dessa reação,

representados como A no Quadro 5, foram desenhados apresentando uma alteração proposital, a qual está em negrito, para mimetizar o alelo mutado. O produto dessa reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v) (Midsci, Estados Unidos) com tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 0,5x e, então, corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos). Em seguida, o fragmento foi excisado do gel e purificado com o kit *GFX® PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Reino Unido) conforme protocolo do fabricante. A concentração de tal produto foi determinada a partir da dosagem em espectrofotômetro Epoch (Biotek, Estados Unidos).

O produto da reação, aproximadamente 25,0 ng, foi utilizado como um megaprimer direto na segunda reação, em combinação com outro iniciador, como representando no Quadro 5. As condições da PCR e semi *nested*-PCR foram as mesmas determinadas para a síntese do controle não mutado, exceto a temperatura de anelamento que foi alterada de 60 °C para 50 °C a fim de favorecer a reação, considerando a incompatibilidade adicionada aos iniciadores. O produto final amplificado foi purificado, submetido ao processo de clonagem, posteriormente, recuperado sob as mesmas condições do controle não mutado e sequenciado para confirmação da presença da mutação. Na Figura 10 estão apresentadas, de forma esquemática, as sínteses dos controles mutados.

Quadro 5 – Iniciadores utilizados para a síntese de controles mutados referentes aos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. A reação I, na qual foram empregados os iniciadores A e B, compreende a síntese do megaprimer que, após processamento, foi utilizado como iniciador na reação II, juntamente com o primer C.

Reação I			Reação II	
Iniciador A	Iniciador B	Produto	Iniciador C	Produto
<i>Mega167R</i> 5' ACG GAA CGA CAC TAT AAG TTG T 3'	Tt_tub_F	168 pb	Tt_tub_R	445 pb
<i>Tt198_200both</i> 5' CGG ACG CAA CAT ACT GCA T 3'	Tt_tub_R	159 pb	Tt_tub_F	445 pb

* As bases em negrito representam as mutações a serem inseridas.

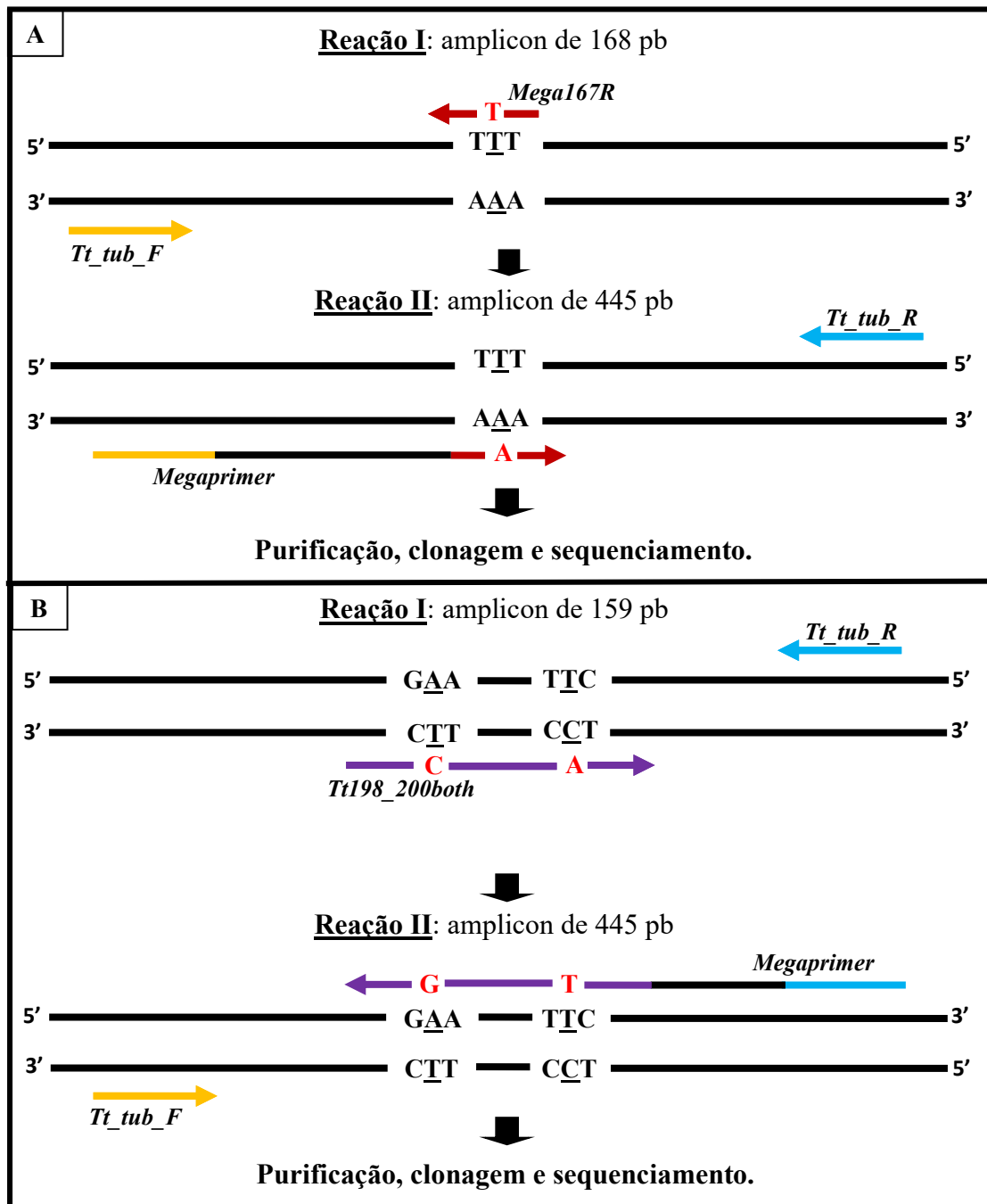


Figura 10 – Esquema da síntese dos controles com mutação no códon 167 (A) e nos códons 198 e 200 (B) para análise de polimorfismos nestes respectivos códons do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. A ponta triangular de cada seta que representa um iniciador corresponde a extremidade 3’.

4.4.1. Clonagem

Os controles sintetizados foram clonados com o kit *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega, Estados Unidos). Inicialmente, o volume de 1,5 µl do produto de PCR (50 ng) foi incubado overnight a 4 °C, por aproximadamente 16 h, com 2,5 µl do tampão de ligação (*2X Rapid Ligation Buffer*), 0,5 µl de vetor (*pGEM®-T Easy Vector*) e 0,5 µl de DNA ligase (*T4 DNA Ligase*). O período de incubação foi estendido com o objetivo de aumentar o número de colônias. Posteriormente, foi realizado o processo de termotransformação, no qual o volume de 2 µl do produto de ligação foi submetido a transformação em 30 µl de células quimiocompetentes *E. coli* pertencentes a linhagem *XL1-blue* (Phoneutria, Brasil). As amostras foram transformadas sob condições de choque térmico com incubação em gelo por 10 min, seguida de incubação no banho maria a 42 °C por 1,5 min e, novamente, no gelo por mais 2 min. Então, as células bacterianas potencialmente transformadas foram homogeneizadas e incubadas por 1 h a 37 °C com 500 µl de meio líquido circlegrow (MP Biomedicals, Estados Unidos) pH 7,0, com posterior plaqueamento destas em meio sólido seletivo circlegrow (MP Biomedicals, Estados Unidos), o qual continha ampicilina (100 µg/mL), IPTG (100 mM) e X-gal (500 µg/mL).

Posteriormente as placas foram incubadas overnight a 37 °C por aproximadamente 16h. A confirmação da presença dos insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foi realizada por meio de uma PCR de colônia. Na reação utilizou-se diretamente uma amostra de algumas colônias brancas, as quais foram transferidas, com o auxílio de um palito de madeira estéril, para um tubo contendo 5 µl de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega, Estados Unidos), 0,2 µl de cada iniciador M13 direto (5' CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3') e reverso (5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3'), com concentração final de 0,2 µM/iniciador e 4,6 µl de água ultrapura. A PCR de colônia ocorreu sob as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 5 min, seguido de 29 ciclos a 95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e um passo final de extensão a 72 °C por 8 min. Posteriormente, os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v), com tampão TAE 0,5x e corados com GelRed® (Biotium, Estados Unidos). Para o inóculo, após a confirmação da presença dos recombinantes, fragmentos das colônias foram transferidos, com o auxílio de palitos de madeira estéreis, para tubos de 15 mL do tipo Falcon, cada um destes continha 3 mL de meio de cultura líquido circlegrow® (MP Biomedicals, Estados Unidos) com 1:10 de ampicilina (100 µg/mL). Em seguida, estes tubos foram incubados overnight por cerca de 22 h, a 37 °C, sob agitação constante na estufa (5.000 xg).

4.4.2. Recuperação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi recuperado através do kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, Estados Unidos). A cultura bacteriana foi centrifugada em microtubo de 1,5 mL a 10.000 xg por 5 min com o posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, a cultura foi novamente centrifugada e o sobrenadante foi então removido por inversão. O pellet bacteriano foi completamente ressuspensão em 250 µl de Solução de Ressuspensão de Células. Então, 250 µl de Solução de Lise Celular foi adicionado com incubação por, aproximadamente, 5 min para o rompimento da membrana das bactérias. Posteriormente, 10 µl de Solução de Protease Alcalina foi adicionado para quebra de ligações peptídicas. O produto foi incubado por 5 min a temperatura ambiente com a posterior adição de 350 µl de Solução de Neutralização e subsequente homogeneização. O lisado bacteriano foi centrifugado a 14.000 xg por 10 min a temperatura ambiente e, então, o sobrenadante foi transferido por inversão, aproximadamente 850 µl, para a coluna inserida em um tubo. Este sobrenadante foi centrifugado a 14.000 xg por 1 min a temperatura ambiente com o posterior descarte do líquido do tubo e, então, a coluna foi lavada pela adição de 750 µl de Solução de Lavagem da Coluna com centrifugação a 14.000 xg por 1 min. O líquido do tubo coletor foi descartado. Esse procedimento de lavagem foi repetido usando 250 µl de Solução de Lavagem da Coluna, centrifugado a 14.000 xg por 2 min a temperatura ambiente. A coluna foi inserida em um novo microtubo 1,5 mL e o DNA plasmidial foi eluído por meio da adição de 40 µl de água ultrapura na coluna. Esse volume foi novamente centrifugado a 14.000 xg por 1 min a temperatura ambiente e estocado a -20 °C.

4.5. PCR-RFLP

A técnica PCR-RFLP, cujo processo resume-se a digestão do produto de PCR pela ação de endonucleases de restrição, foi escolhida para a genotipagem de SNP no códon 198. A enzima de restrição *HgaI* foi determinada, para a diferenciação dos alelos não mutado e mutado deste respectivo códon, a partir do programa online NEB V2.0 (New England Biolabs, Estados Unidos) (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). A enzima *HgaI* na presença de alelo mutado, o qual cria um sítio específico para esta enzima, cliva o DNA amplificado neste sítio, produzindo dois fragmentos, um com 298 pb e outro com 147 pb (Figura 11). Contudo, quando não há mutação, a enzima não corta o DNA. Utilizando o mesmo programa foi observado que os SNPs nos

códons 167 e 200 da β -tubulina de *T. trichiura* não criam ou desfazem sítio para nenhuma enzima de restrição.

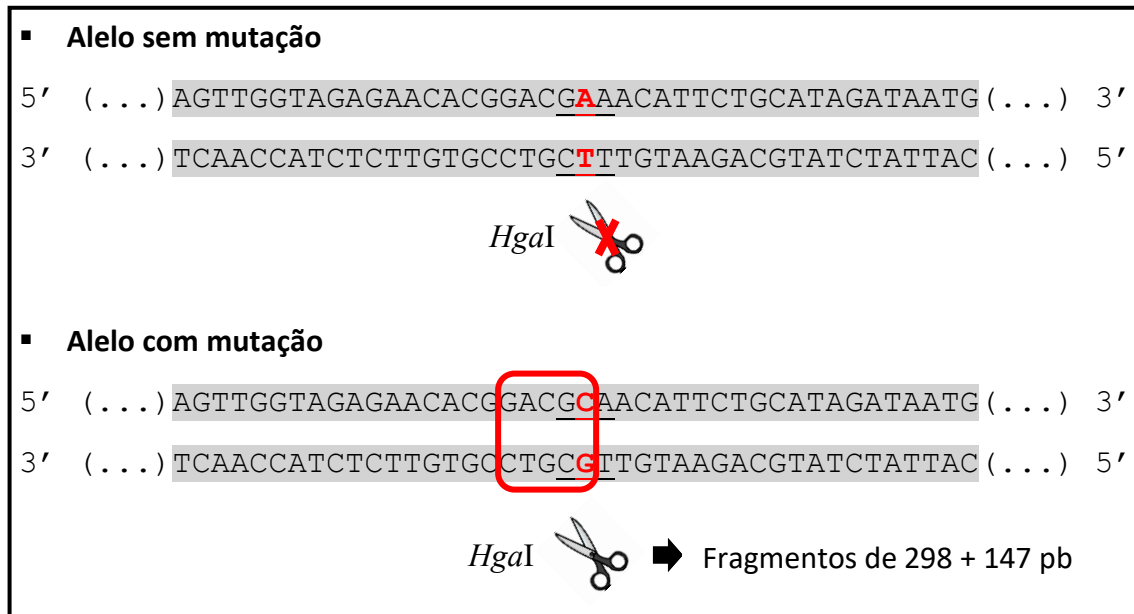


Figura 11 – Esquema da digestão empregada para análise do códon 198 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. A mutação cria um sítio para a enzima *Hga*I. O códon 198 encontra-se sublinhado com a base de interesse destacada em vermelho. A caixa vermelha representa o sítio da enzima.

Inicialmente, tentativas de padronização foram feitas apenas com controle não mutado e mutado referente ao códon 198. O volume de 2 μ l do produto de amplificação dos plasmídeos foi digerido com 1 unidade (0,5 μ l) de enzima *Hga*I (Promega, Estados Unidos), 1 μ l de tampão 10x e 6,5 μ l de água ultrapura, totalizando um volume final de 10 μ l. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 3 h e os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v) (Midsci, Estados Unidos) com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed (Biotium, Estados Unidos). Para a padronização da técnica, uma reação foi feita com alteração no volume do produto dos controles de 2 μ l para 5,0 μ l. Em outra reação, este volume foi mantido com um aumento na quantidade da enzima de 1 para 2 unidades (1 μ l), entretanto, ambas as reações sem resultados satisfatórios. Uma quarta reação foi feita com 5 unidades de enzima (2,5 μ l) para 5,0 μ l do produto dos controles, 1 μ l de tampão 10x e 1,5 μ l de água ultrapura, totalizando um volume final de 10 μ l, os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose sob as mesmas condições descritas acima.

4.6. Amplificação das regiões-alvo

Para garantir um anelamento específico e, conseqüentemente, amplificação específica, foi adicionada uma segunda incompatibilidade na posição 4 da extremidade 3' dos iniciadores utilizados, conforme descrito por Furtado e Rabelo (2015) e demonstrado no Quadro 6. Em suma, caso o gene da β -tubulina não apresentasse mutação nos códons 167, 198 e 200, somente uma incompatibilidade de pareamento na última base do iniciadores *Rr_Tt_167*, *Rr_Tt_198*, *Rr200Tt*, respectivamente, poderia não ser o bastante para bloquear o anelamento na ausência da mutação, resultando em amplificação inespecífica. Contudo, duas incompatibilidades garantem tal bloqueio e, assim, aumentam a especificidade destes iniciadores. Entretanto, caso o parasito não apresentasse a mutação, apenas uma incompatibilidade na posição 4 desses mesmos iniciadores não bloquearia o anelamento deles na presença da mutação. Tais propriedades e conclusões também são aplicadas para os iniciadores *Fs_Tt_167*, *Fs_Tt_198* e *Fs200Tt*. No Quadro 6 são representados os iniciadores com suas respectivas alterações. Nas Figuras 12, 13 e 14 são mostrados esquemas evidenciando a segunda incompatibilidade adicionada aos iniciadores e seus amplicons correspondentes.

Quadro 6 – Iniciadores utilizados para análise de SNPs relacionados à resistência aos benzimidazóis no gene da β -tubulina de *T. trichiura* com suas devidas alterações destacadas em negrito.

Iniciador	Sequência (5' para 3')	Alteração
<i>Fs_Tt_167</i>	5' TCC TGA CCG AAT TAT GAC AAG TTT 3'	C → G
<i>Rc_Tt_167</i>	5' CTC CAG ACA TGG TTG CCG AA 3'	-
<i>Fc_Tt_167</i>	5'CGA CTG CCT GCA AGG GTT T 3'	-
<i>Rr_Tt_167</i>	5'CGG AGA CGG AAC GAC AGT AT 3'	C/A → G/T
<i>Fs200Tt</i>	5'AGA GAA CAC GGA CGA AAG ATT3'	C → G
<i>Rr200Tt</i>	5'GCG CTT CAT TAT CTA TGG AGT 3'	C/A → G/T
<i>Fs_Tt_198</i>	5'TTG GTA GAG AAC ACG GGC GA 3'	A → G
<i>Rr_Tt_198</i>	5'GCT TCA TTA TCT ATG CAG AAT ATT G 3'	G/T → A/G

* As bases em negrito e sublinhadas são correspondentes a incompatibilidade adicional localizada na posição 4 da extremidade 3'

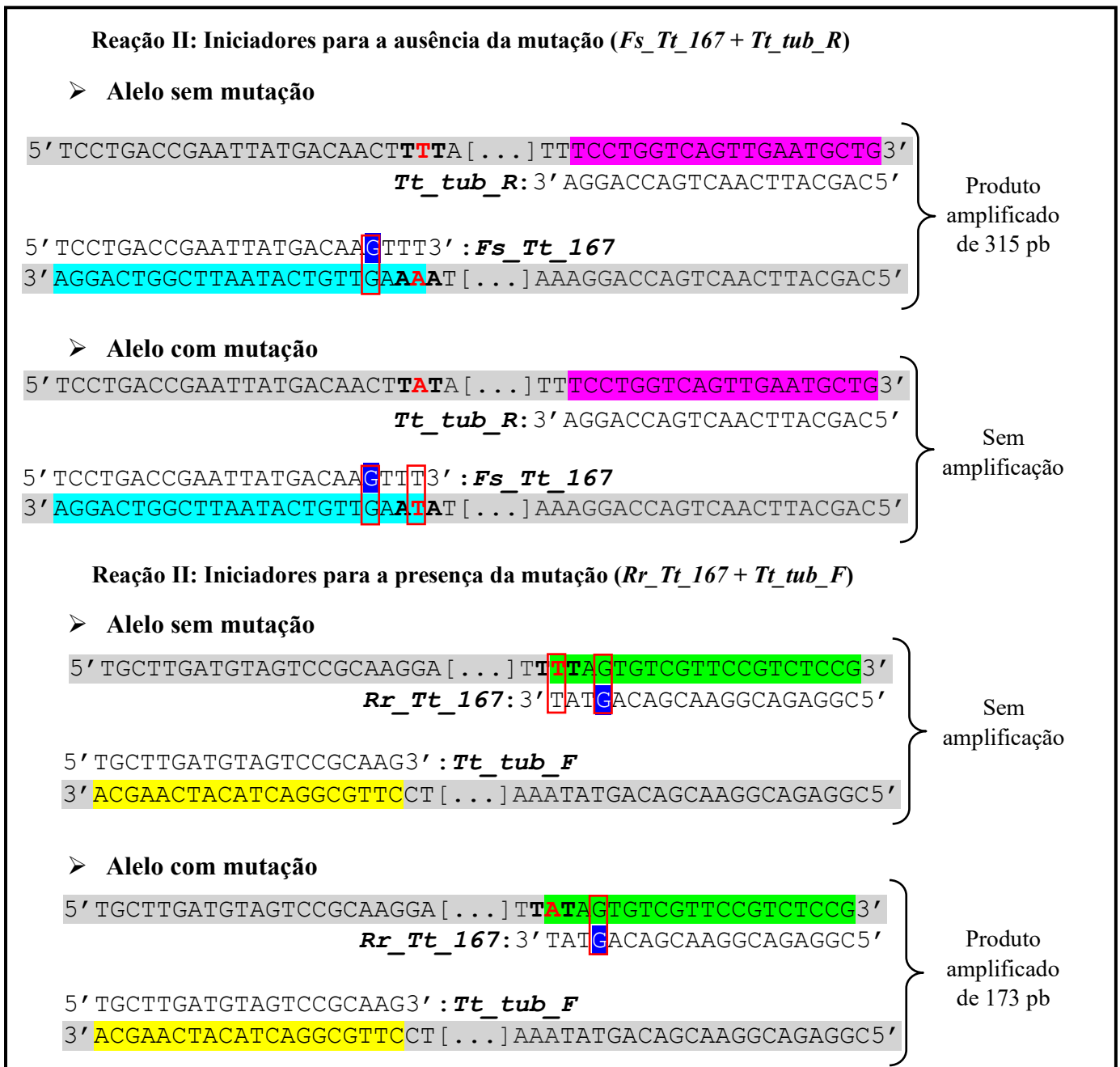


Figura 12 – Esquema relativo à adição da segunda incompatibilidade de iniciadores na análise do códon 167 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. O iniciador *Fs_Tt_167* foi desenhado para se anelar somente na ausência da mutação e o respectivo local de anelamento encontra-se marcado com a cor azul claro, enquanto que o iniciador *Rr_Tt_167* foi desenhado para se anelar na presença da mesma e o respectivo local de anelamento encontra-se em verde. Os locais de anelamento dos iniciadores *Tt_tub_R* e *Tt_tub_F* estão marcados, respectivamente, com as cores rosa e amarelo. O códon 167 encontra-se em negrito, com a base de interesse em vermelho. Nos iniciadores, a base marcada com a cor azul corresponde ao local da segunda incompatibilidade e as caixas em vermelho representam a não complementaridade.

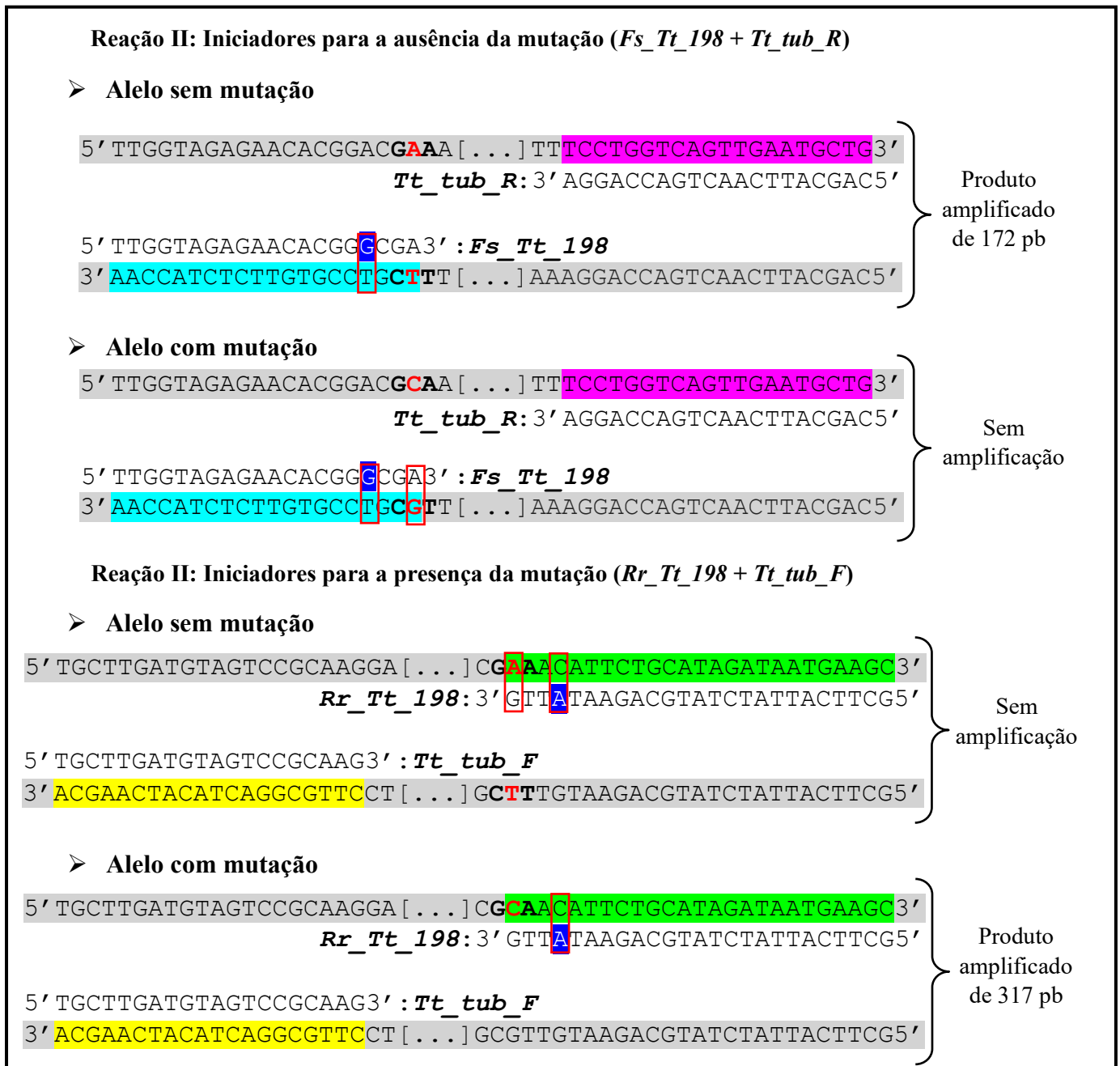


Figura 13 – Esquema relativo à adição da segunda incompatibilidade de iniciadores na análise do códon 198 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. O iniciador *Fs_Tt_198* foi desenhado para se anelar somente na ausência da mutação e o respectivo local de anelamento encontra-se marcado com a cor azul claro, enquanto que o iniciador *Rr_Tt_198* foi desenhado para se anelar na presença da mesma e o respectivo local de anelamento encontra-se em verde. Os locais de anelamento dos iniciadores *Tt_tub_R* e *Tt_tub_F* estão marcados, respectivamente, com as cores rosa e amarelo. O códon 198 encontra-se em negrito, com a base de interesse em vermelho. Nos iniciadores, a base marcada com a cor azul corresponde ao local da segunda incompatibilidade e as caixas em vermelho representam a não complementaridade.

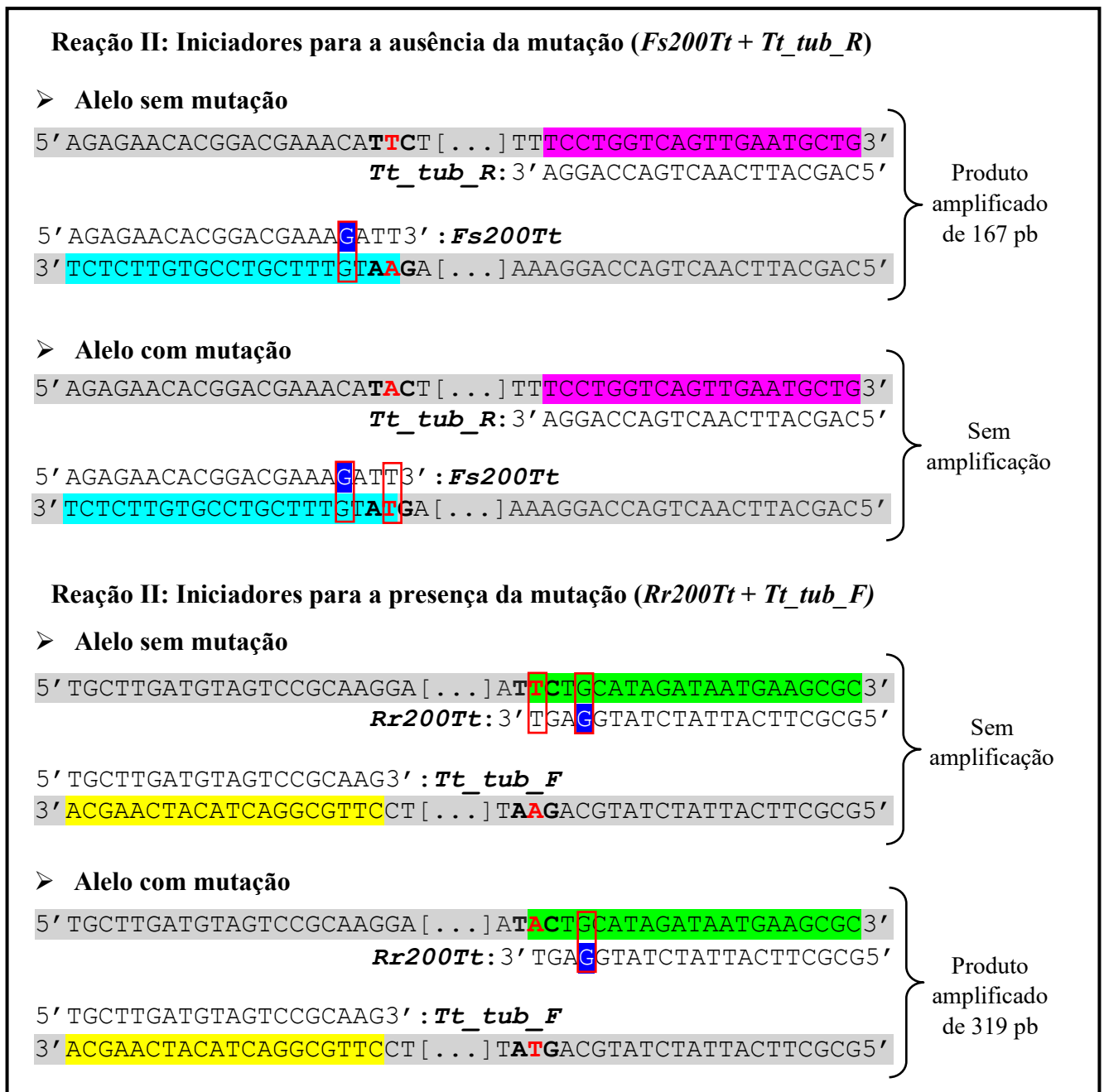


Figura 14 – Esquema relativo à adição da segunda incompatibilidade de iniciadores na análise do códon 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. O iniciador *Fs200Tt* foi desenhado para se anelar somente na ausência da mutação e o respectivo local de anelamento encontra-se marcado com a cor azul claro, enquanto que o iniciador *Rr200Tt* foi desenhado para se anelar na presença da mesma e o respectivo local de anelamento encontra-se em verde. Os locais de anelamento dos iniciadores *Tt_tub_R* e *Tt_tub_F* estão marcados, respectivamente, com as cores rosa e amarelo. O códon 200 encontra-se em negrito, com a base de interesse em vermelho. Nos iniciadores a base marcada com a cor azul corresponde ao local da segunda incompatibilidade e as caixas em vermelho representam a não complementariedade.

4.6.1. Tetraprimer ARMS-PCR

Tentativas de padronizações de reações de Tetraprimer ARMS-PCR foram realizadas para genotipagem de SNPs nos códons 167, 198 e 200. A vantagem desta técnica em comparação a outras é que, a partir de uma única reação, pode-se concluir se o parasito é homozigoto sem mutação, homozigoto mutado ou heterozigoto para o respectivo códon analisado. Para padronização de tal técnica, quatro mix foram produzidas, três destas apresentavam apenas um par de iniciadores, enquanto uma quarta mix apresentava dois pares de iniciadores. Elas foram identificadas como mix I, II e III, as quais continham um par de iniciadores controles, um par de iniciadores para detectar a ausência da mutação e um par de iniciadores para detectar a presença da mutação, respectivamente. A mix IV apresentou tanto uma combinação de iniciadores para detectar DNA mutado, quanto uma combinação de iniciadores para detectar DNA não mutado, assim, ao utilizar os quatro iniciadores numa mesma reação, a combinação dos iniciadores controles resulta na formação de um amplicon, independentemente de haver mutação ou não, o qual é denominado fragmento controle. Portanto, as amostras heterozigotas apresentariam três fragmentos, enquanto as amostras homozigotas apresentariam dois fragmentos.

Para o códon 167, o iniciador *Fs_Tt_167* foi desenhado para se anelar somente na ausência de mutação combinando com *Tt_tub_R* (315 pb), enquanto o iniciador *Rr_Tt_167* foi desenhado para se anelar somente na presença de mutação combinando com *Tt_tub_F* (173 pb). Assim, como explicado anteriormente, foi adicionada uma segunda incompatibilidade na posição 4 da extremidade 3' nos iniciadores *Fs_Tt_167* e *Rr_Tt_167* para garantir um anelamento específico. Portanto, para cada amostra analisada existia a possibilidade de três perfis de resultados: homozigoto sem mutação ($Tt_tub_F + Tt_tub_R = 445\text{pb}$; $Fs_Tt_167 + Tt_tub_R = 315\text{ pb}$), homozigoto com mutação ($Tt_tub_F + Tt_tub_R = 445\text{pb}$; $Tt_tub_F + Rr_Tt_167 = 173\text{ pb}$) e heterozigoto ($Tt_tub_F + Tt_tub_R = 445\text{pb}$; $Fs_Tt_167 + Tt_tub_R = 315\text{ pb}$; $Tt_tub_F + Rr_Tt_167 = 173\text{ pb}$). A reação inicial apresentou um volume final de 10 μl , o qual continha 2,0 μl de Tampão 5x (Promega, Estados Unidos), 0,2 μl de Taq (Phoneutria, Brasil), 0,8 μl de dNTP (concentração final de 0,2 μM), 0,2 μl de cada iniciador (concentração final de 0,2 μM /iniciador) e 1 μl de DNA. Para aumentar a estríngência da PCR, primeiramente, a temperatura de anelamento foi alterada para 55°C e, posteriormente, a concentração dos iniciadores foi aumentada para 0,4 μM .

Para o códon 198, o iniciador *Fs_Tt_198* foi desenhado para se anelar somente na ausência de mutação combinando com *Tt_tub_R* (172 pb), enquanto o iniciador *Rr_Tt_198* foi desenhado para se anelar somente na presença de mutação combinando com *Tt_tub_F* (317 pb). Assim, como explicado anteriormente, foi adicionada uma segunda incompatibilidade na posição 4 da extremidade 3' nos iniciadores *Fs_Tt_198* e *Rr_Tt_198* para garantir um anelamento específico. Portanto, para cada amostra analisada existia a possibilidade de três perfis de resultados: homozigoto sem mutação ($Tt_tub_F + Tt_tub_R = 445$ pb; $Fs_Tt_198 + Tt_tub_R = 172$ pb), homozigoto com mutação ($Tt_tub_F + Tt_tub_R = 445$ pb; $Tt_tub_F + Rr_Tt_198 = 317$ pb) e heterozigoto ($Tt_tub_F + Tt_tub_R = 445$ pb; $Fs_Tt_198 + Tt_tub_R = 172$ pb; $Tt_tub_F + Rr_Tt_198 = 317$ pb). A reação inicial apresentou um volume final de 10 μ l, o qual continha 2,0 μ l de Tampão 5x (Promega, Estados Unidos), 0,2 μ l de Taq (Phoneutria, Brasil), 0,8 μ l de dNTP (concentração final de 0,2 μ M), 0,2 μ l de cada iniciador (concentração final de 0,2 μ M/iniciador) e 1 μ l de DNA. Para aumentar a estringência da PCR, primeiramente, a concentração dos primers foi alterada para 0,6 μ M, e, posteriormente, a temperatura de anelamento foi aumentada para 60°C.

Para o códon 200, o iniciador *Fs200Tt* foi desenhado para se anelar somente na ausência de mutação combinando com *Tt_tub_R* (167 pb), enquanto o iniciador *Rr200Tt* foi desenhado para se anelar somente na presença de mutação combinando com *Tt_tub_F* (319 pb). Assim como explicado anteriormente, foi adicionada uma segunda incompatibilidade na posição 4 da extremidade 3' nos iniciadores *Fs200Tt* e *Rr200Tt*, para garantir um anelamento específico. Portanto, para cada amostra analisada existia a possibilidade de três perfis de resultados: homozigoto sem mutação ($Tt_tub_F + Tt_tub_R = 445$ pb; $Fs200Tt + Tt_tub_R = 167$ pb), homozigoto com mutação ($Tt_tub_F + Tt_tub_R = 445$ pb; $Tt_tub_F + Rr200Tt = 319$ pb) e heterozigoto ($Tt_tub_F + Tt_tub_R = 445$ pb; $Fs200Tt + Tt_tub_R = 167$ pb; $Tt_tub_F + Rr200Tt = 319$ pb). A reação inicial apresentou um volume final de 10 μ l, o qual continha 2,0 μ l de Tampão 5x (Promega, Estados Unidos), 0,2 μ l de Taq (Phoneutria, Brasil), 0,8 μ l de dNTP (concentração final de 0,2 μ M), 0,2 μ l de cada iniciador (concentração final de 0,2 μ M/iniciador) e 1 μ l de DNA.

4.6.2. ARMS-PCR

A técnica ARMS-PCR foi selecionada para genotipagem dos SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina, haja vista que a técnica Tetraprimer ARMS-PCR se apresentou inviável para esta análise. Assim, uma primeira PCR foi realizada com iniciadores *Tt_tub_F* e *Tt_tub_R* que flanqueiam todos os três códons, produzindo um fragmento de 445 pb e, a partir dessa reação, foram realizadas duas ARMS-PCRs independentes para cada códon: uma para detectar a ausência da mutação e outra para detectar a presença da mutação. Uma reação com as combinações *Fs_Tt_167* e *Tt_tub_R*, *Fs_Tt_198* e *Tt_tub_R*, *Fs200Tt* e *Tt_tub_R* para detectar DNA não mutado nos códons 167, 198 e 200, respectivamente. Outra reação com as combinações *Rr_Tt_167* e *Tt_tub_F*, *Rr_Tt_198* e *Tt_tub_F*, *Rr200Tt* e *Tt_tub_F* para detectar DNA mutado nos códons 167, 198 e 200, respectivamente (Quadro 7).

Para o códon 167, caso a amostra seja homocigota sem mutação, ocorrerá amplificação apenas da reação com a combinação *Fs_Tt_167* e *Tt_tub_R* (315 pb), caso seja homocigota com mutação, ocorrerá amplificação apenas da reação com a combinação *Tt_tub_F* e *Rr_Tt_167* (173 pb) e caso seja heterocigota, ocorrerá amplificação nas duas reações. Para o códon 198, caso a amostra seja homocigota sem mutação, ocorrerá amplificação apenas da reação com a combinação *Fs_Tt_198* e *Tt_tub_R* (172 pb), caso seja homocigota com mutação, ocorrerá amplificação apenas da reação com a combinação *Tt_tub_F* e *Rr_Tt_198* (317 pb) e caso seja heterocigota, ocorrerá amplificação nas duas reações. Para o códon 200, caso a amostra seja homocigota sem mutação, ocorrerá amplificação apenas da reação com a combinação *Fs200Tt* e *Tt_tub_R* (167 pb), caso seja homocigota com mutação, ocorrerá a amplificação apenas da reação com a combinação *Tt_tub_F* e *Rr200Tt* (319 pb) e caso seja heterocigota, ocorrerá amplificação nas duas reações. As combinações de iniciadores utilizados nas PCRs são descritas no Quadro 7, como também o tamanho dos fragmentos produzidos.

Tanto a primeira PCR, quanto a reação de semi-nested, realizadas para a genotipagem dos códons 167, 198 e 200 das amostras apresentaram um volume final de 10 μ l, o qual continha 1,0 μ l de Tampão 1x (Promega, Estados Unidos), 0,2 μ l de Taq (Phoneutria, Brasil), 0,8 μ l de dNTP (concentração final de 0,2 μ M), 0,2 μ l dos iniciadores (concentração final de 0,2 μ M/iniciador) e 1 μ l de DNA. As amplificações foram realizadas no termociclador *Mastercycler*[®] (Eppendorf, Alemanha) conforme programa determinado pelas mesmas condições de ciclagem descritas anteriormente para a síntese dos controles. Em ambas as reações foi incluído um controle negativo, denominado também de “branco”, no qual o DNA foi substituído por água para detectar a presença de contaminantes. Os produtos dessas reações

foram submetidos a eletroforese em géis de agarose a 2,0% (m/v) (Midsci, Estados Unidos) com tampão TAE 0,5x e foram corados com GelRed® (Biotium, Estados Unidos).

Quadro 7 – Iniciadores utilizados na técnica ARMS-PCR, para a genotipagem dos códon 167, 198 e 200. Os iniciadores para a primeira e segunda reação são apresentados, bem como o peso molecular do produto final amplificado.

Iniciadores da reação I	Peso molecular	Códon	Iniciadores da reação II	Peso molecular
Tt_tub_F e Tt_tub_R	445 pb	167	Fs_Tt_167 e Tt_tub_R	315 pb
		167	Tt_tub_F e Rr_Tt_167	173 pb
		198	Fs_Tt_198 e Tt_tub_R	172 pb
		198	Tt_tub_F e Rr_Tt_198	317 pb
		200	Fs200Tt e Tt_tub_R	167 pb
		200	Tt_tub_F e Rr200Tt	319 pb

4.7. Sequenciamento

Para validação da técnica molecular padronizada para análise de SNPs no gene da β -tubulina de *T. trichiura* foram sequenciadas 20 amostras. O sequenciamento foi realizado conforme o método originalmente descrito por Sanger et al. (1977). Para tanto, a partir do primeiro produto de PCR (*Tt_tub_F* + *Tt_tub_R* = 445 pb), foi realizada uma *semi-nested* PCR com os iniciadores *Tt_tub_F* + *Rr_Tt_198* (317 pb) em um volume final maior de 40 μ l, sob as mesmas condições descritas acima. O produto da reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v) (Midsci, Estados Unidos) com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed (Biotium, Estados Unidos). O fragmento amplificado foi então excisado do gel e, posteriormente, purificado.

Os produtos da PCR foram purificados com solução de PEG (polietilenoglicol) (Promega, Estados Unidos), apresentando resultados tão satisfatórios quanto os kits industrializados. Um volume de 40 μ l de cada amostra foi transferido para microtubos de 500 μ l e, a cada microtubo, foi adicionado o mesmo volume de solução de PEG 20% (20% polietileno glicol 8.000 em solução de NaCl 2,5M). Estes microtubos foram vortexados para homogeneização e incubados em banho-maria a 37 °C por 15 min. Posteriormente, eles foram centrifugados por ~25 min a 12.000 xg. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com pipeta e, em seguida, adicionados 125 μ l de etanol 80%. Então, os microtubos foram centrifugados

por 5 min a 13.000 xg e, novamente, o sobrenadante foi retirado. Os passos anteriores foram repetidos, assim, cada amostra foi lavada com 125 µl de etanol 80% e centrifugada por 5 min a 13.000 xg com posterior descarte do sobrenadante, objetivando descartar o máximo possível do etanol restante. Os microtubos foram invertidos e incubados à temperatura ambiente até não restarem vestígios de etanol. As amostras de DNA foram ressuspensas em 12 µl de água milli-Q e a concentração determinada por dosagem em espectrofotômetro Epoch (Biotek, Estados Unidos).

Tais amostras com produto de PCR purificado foram encaminhadas ao laboratório Myleus para sequenciamento. Conforme orientações prévias, a concentração do DNA de 30 ng é determinada para cada 100 pares de bases, portanto, como o tamanho do fragmento a ser sequenciado era de 445 pb foram determinados para o sequenciamento 133,5 ng do produto amplificado e o volume a ser pipetado de cada amostra foi de acordo com a concentração dessa amostra, utilizando 1 µl de iniciador (10 µM) e água ultrapura para completar um volume total de 7,5 µl. As amostras foram preparadas em microtubos apenas com o iniciador *foward* e sequenciadas por eletroforese em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP e BigDye v3.1. A análise do cromatograma foi realizada usando o software FinchTV (Geospiza, Estados Unidos).

5. RESULTADOS

5.1. Síntese de controles

Um controle mutado foi construído para o códon 167 e outro controle mutado foi construído para os códon 198 e 200, assim, como demonstrado na Figura 15, este controle apresentou ambos os códon alterados. A presença de dois códon mutados no mesmo plasmídeo pode ser útil para distinguir entre amostra de campo e possível resultado decorrente de contaminação com o controle mutado.

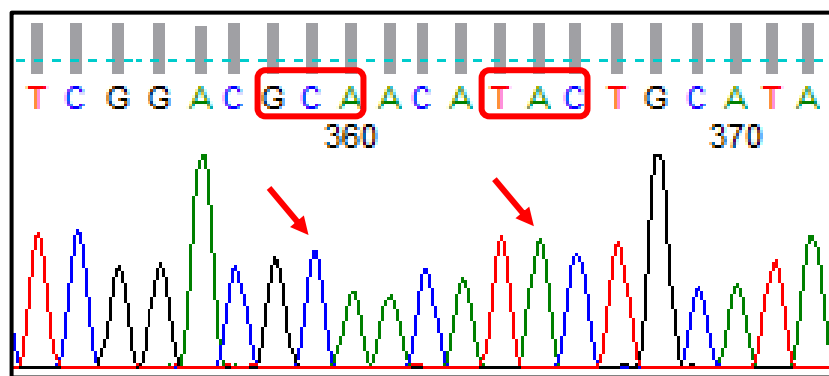


Figura 15 – Cromatograma correspondente ao sequenciamento do controle mutado para os códon 198 e 200. Este apresenta base alterada, tanto no códon 198, quanto no códon 200, os quais estão delimitados pelo quadrado vermelho. As setas indicam os picos que representam a base alterada, adenina para citosina (GAA → GCA) e timina para adenina (TTC → TAC), nos códon 198 e 200, respectivamente.

5.2. Amplificação de fragmentos do gene da β -tubulina a partir de ovos únicos

As amostras de fezes contendo os ovos de *T. trichiura* analisados neste trabalho, provenientes dos estados da Bahia (n=7), Maranhão (n=7), Minas Gerais (n=2), Piauí (n=10) e Tocantins (n=11), totalizando 37 amostras fecais de pacientes de cinco estados do Brasil, foram processadas com recuperação de ovos e extração de DNA, de maneira geral, bem sucedidas, conforme metodologia já descrita anteriormente. Inicialmente, 462 amostras de ovo único foram recuperadas e analisadas, através de PCR e semi-nested PCR, para identificação de SNPs nos códon 167, 198 e 200. A Tabela 1 sumaria os estados de origem dos pacientes e a quantidade das respectivas amostras de ovos de *T. trichiura*.

Tabela 1 – Número de pacientes por estado, número mínimo e máximo de ovos analisados entre pacientes de um estado e o número total de ovos analisados.

Estado	Pacientes	Quantidade mínima e máxima de ovos por paciente	Número total de amostras analisadas
Bahia	7	8 – 21	89
Maranhão	7	3 – 11	55
Minas Gerais	2	29 – 38	67
Piauí	10	2 – 18	93
Tocantins	11	6 – 28	158
Total	37	-	462

5.3. PCR-RFLP

A técnica não apresentou resultados satisfatórios, mesmo após as alterações realizadas tanto no volume do produto dos plasmídeos controles, quanto na quantidade de enzima, como representado nos géis de agarose na Figura 16. O gel A corresponde a reação na qual foi utilizado 2 unidades de enzima e 5 µl do produto da amplificação dos controles, enquanto o gel B corresponde à reação na qual foi usado 5 unidades de enzima e 5 µl do produto da amplificação dos controles. Em ambas, não foram observadas as duas bandas de interesse que seriam visualizadas nas canaletas do produto amplificado referente ao controle mutado. Dentre os possíveis motivos para o não funcionamento da enzima, poderia ser que a enzima já estava fora do prazo de validade. Portanto, o códon 198 não foi analisado por meio dessa técnica. Os outros códons, 167 e 200, não possuem sítios para enzimas de restrição, para nenhum dos alelos, mutado ou não mutado, e, portanto, não foi possível a avaliação desta técnica para estes códons.

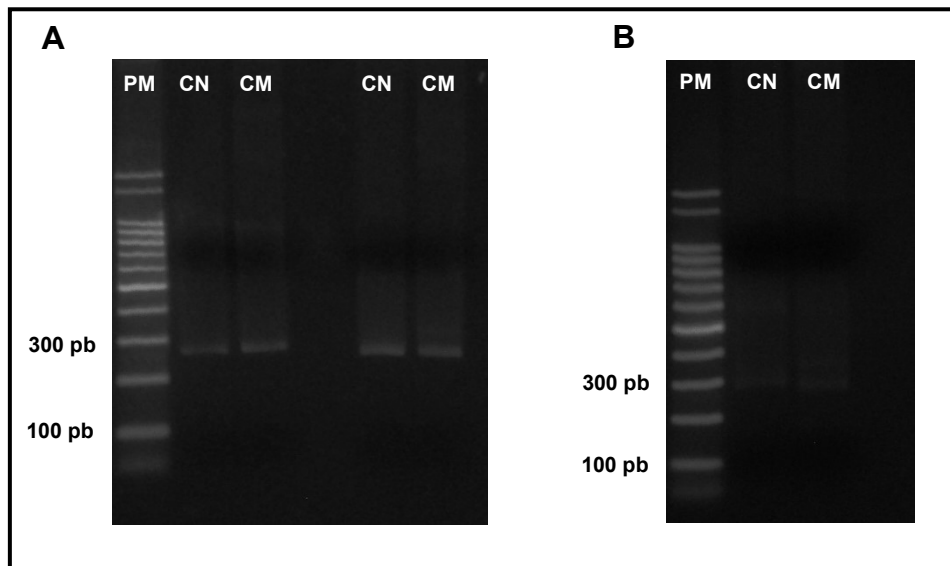


Figura 16 – Géis de agarose 1% com produtos da padronização da técnica PCR-RFLP utilizando plasmídeos controles. O gel A corresponde a reação na qual foi utilizado 2 unidades da enzima *HgaI*, enquanto o gel B corresponde à reação na qual foi usado 5 unidades da mesma enzima. A sigla CN corresponde ao controle não mutado e a sigla CM ao controle mutado. PM = padrão de peso molecular (100 pb).

5.4. Tetraprimer ARMS-PCR

A padronização da técnica Tetraprimer ARMS-PCR para a genotipagem de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*, apesar das alterações realizadas, com o objetivo de otimizar as reações, não apresentou resultados satisfatórios para qualquer códon. As reações foram inespecíficas, sem a visualização dos fragmentos esperados (resultados não mostrados). Portanto, optamos pela realização da ARMS-PCR, para varredura dos três códons, no formato de duas reações individuais com a combinação de apenas um par de iniciadores para cada reação.

5.5. ARMS-PCR

ARMS, no formato de duas PCRs independentes, produziu resultados satisfatórios para a genotipagem de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*, anulando a presença de bandas inespecíficas observadas na Tetraprimer-PCR. Esta técnica apresentou-se sensível, específica e de fácil execução para análise desses códons. Na população analisada, em relação ao códon 167 e 200, nenhuma amostra mutada foi identificada, enquanto que para o códon 198, 20 apresentaram mutação. Tais amostras, primeiramente, apresentaram banda de tamanho compatível com o controle mutado (317 pb), observada em géis de agarose,

com subsequente confirmação da mutação por sequenciamento. Elas representam 4,8% do total de amostras amplificadas (20/420). Mutação no códon 198 do gene da β -tubulina de *T. trichiura* foi observada em amostras de quatro localidades do Brasil: Bahia, Minas Gerais, Piauí e Tocantins. Uma amostra dentre 87 ovos recuperados e amplificados de sete pacientes da Bahia, uma amostra dentre 44 ovos de Minas Gerais de dois pacientes, 10 amostras dentre 86 ovos do Piauí de 10 pacientes e oito amostras dentre 148 ovos do Tocantins de 11 pacientes, o que representa 1,1%, 2,3%, 11,6% e 5,4%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Número total de amostras analisadas por cada estado com o respectivo número daquelas que amplificaram, bem como o número total de amostras mutadas referentes à análise do códon 198 e as porcentagens correspondentes.

Estado	Amostras analisadas	Amostras amplificadas Códon 198	Amostras mutadas Códon 198 (%)
Bahia	89	87	1 (1,1%)
Maranhão	55	55	0
Minas Gerais	67	44	1 (2,3%)
Piauí	93	86	10 (11,6%)
Tocantins	158	148	8 (5,4%)
Total	462	420	20 (4,8%)

A varredura realizada no códon 198 resultou, dentre os ovos recuperados de pacientes da Bahia, em 1 amostra homocigota proveniente de um paciente com 15 ovos avaliados. Dentre os ovos recuperados de pacientes de Minas Gerais, 1 amostra homocigota proveniente de um paciente que teve 26 ovos avaliados. Piauí, 4 ovos heterocigotos e 4 ovos homocigotos provenientes de um paciente que teve 9 ovos avaliados, 1 ovo heterocigoto e 1 ovo homocigoto de outro paciente com 10 ovos avaliados. Dentre os ovos recuperados de pacientes do Tocantins, 4 amostras heterocigotas e 1 amostra homocigota provenientes de um paciente que teve 14 ovos avaliados, 1 amostra homocigota de um paciente com 12 ovos avaliados e 2 amostras heterocigotas de um paciente com 6 ovos avaliados. Dados apresentados na Figura 17.

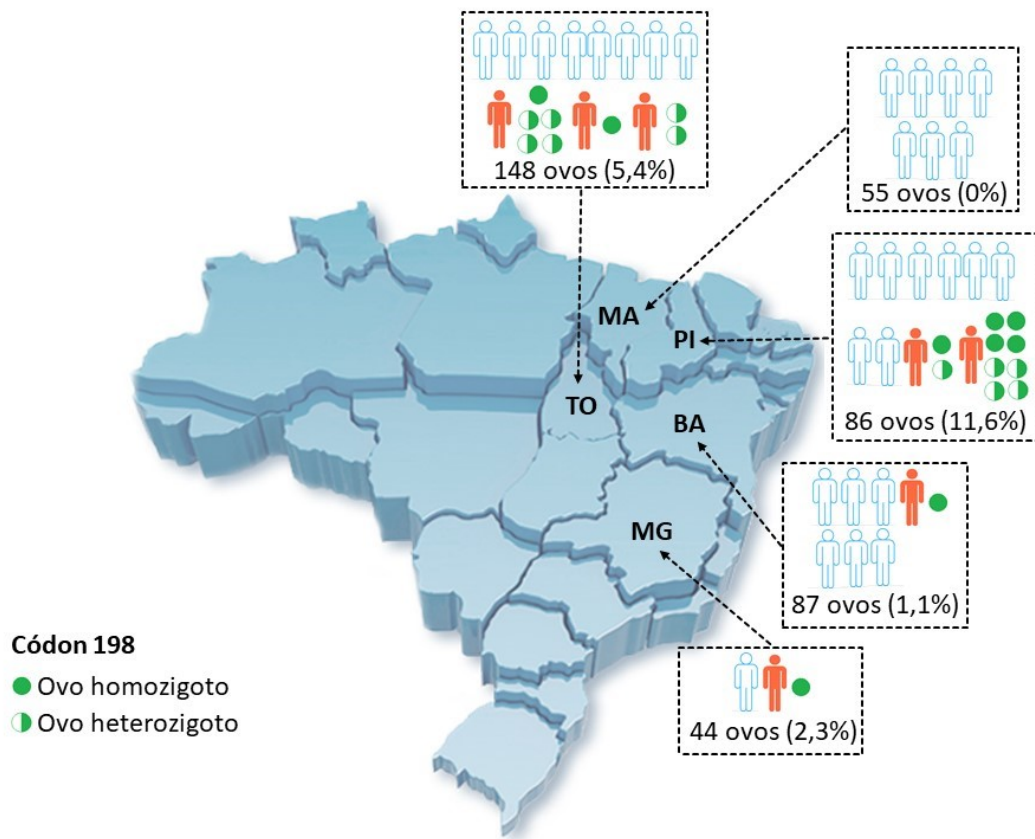


Figura 17 – Representação esquemática da distribuição das amostras mutadas, com seus respectivos genótipos, para o códon 198 entre as cinco regiões brasileiras. Quatro localidades apresentaram SNP neste códon, o que corresponde a 4,8% do total de ovos analisados.

Nas Figuras 18, 19 e 20 são apresentados géis demonstrativos da varredura das mutações para os códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*, respectivamente. Na Figura 21 são apresentados cromatogramas representativos referentes ao sequenciamento da região do códon 198 de parasitos homocigotos mutados e heterocigotos para o códon nesta posição.

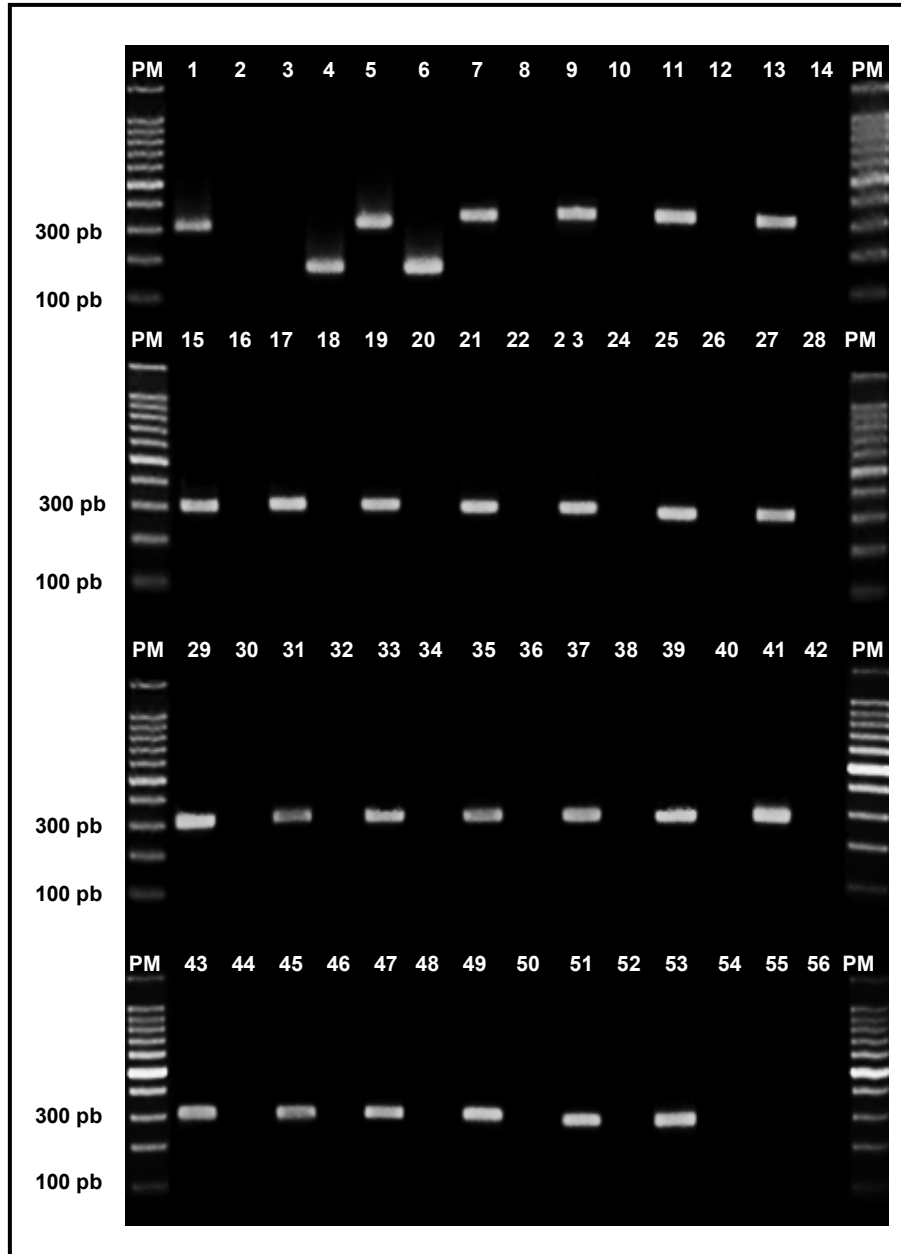


Figura 18 – Gel de agarose 2% representativo das análises do códon 167 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. Nas canaletas ímpares foram aplicados produtos de PCR para a detecção de fragmento sem mutação ($Fs_Tt_167 + Tt_tub_R = 315$ pb) e nas canaletas pares foram aplicados produtos de PCR para a detecção de fragmento com mutação ($Tt_tub_F + Rr_Tt_167 = 173$ pb). Nas canaletas 1 a 6 foram aplicados produtos de PCR utilizando plasmídeos controles (1 e 2: plasmídeo sem mutação; 3 e 4: plasmídeo com mutação; 5 e 6: mix de plasmídeos sem e com mutação). Nos produtos de PCR das canaletas 7 a 54 foram utilizados DNA genômico. As canaletas 55 e 56 correspondem aos brancos da 1^o e 2^o reação, respectivamente. PM = padrão de peso molecular (100 pb).

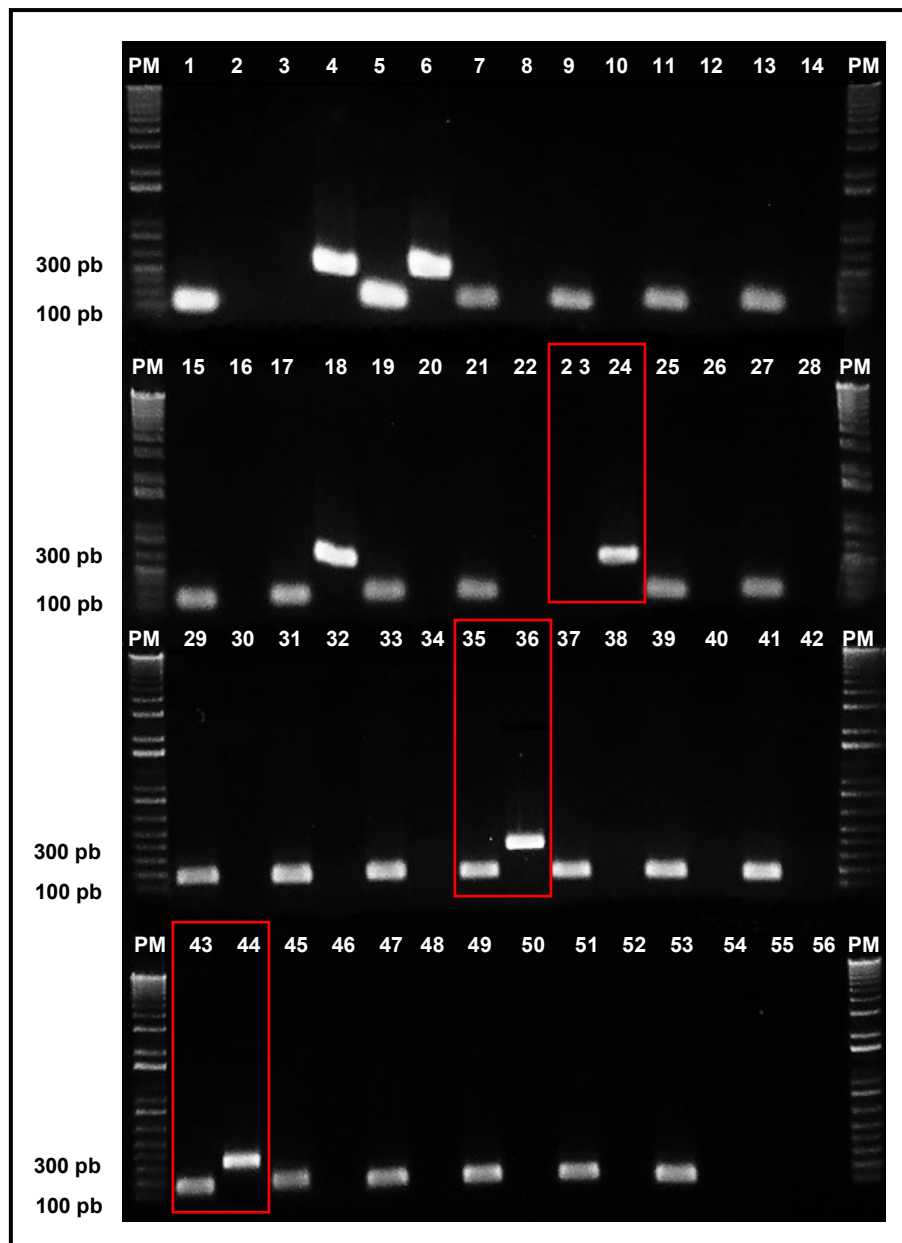


Figura 19 – Gel de agarose 2% representativo das análises do códon 198 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. Nas canaletas ímpares foram aplicados produtos de PCR para a detecção de fragmento sem mutação ($Fs_Tt_198 + Tt_tub_R = 172$ pb) e nas canaletas pares foram aplicados produtos de PCR para a detecção de fragmento com mutação ($Tt_tub_F + Rr_Tt_198 = 317$ pb). Nas canaletas 1 a 6 foram aplicados produtos de PCR utilizando plasmídeos controles (1 e 2: plasmídeo sem mutação; 3 e 4: plasmídeo com mutação; 5 e 6: mix de plasmídeos sem e com mutação). Nos produtos de PCR das canaletas 7 a 54 foram utilizados DNA genômico. As canaletas 55 e 56 correspondem aos brancos da 1^o e 2^o reação, respectivamente. As canaletas destacadas em vermelho são referentes às amostras que apresentaram mutação. PM = padrão de peso molecular (1 kb).

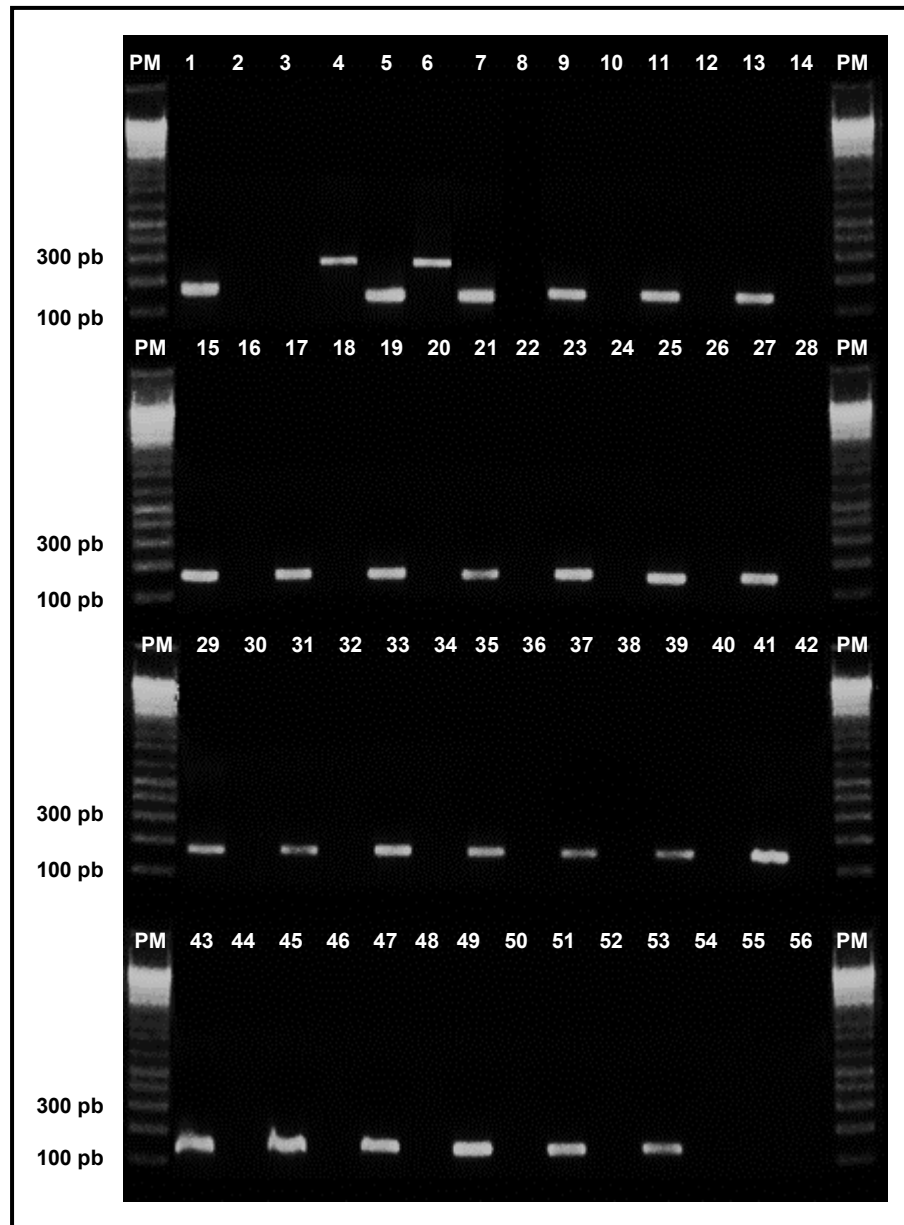


Figura 20 – Gel de agarose 2% representativo das análises do códon 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. Nas canaletas ímpares foram aplicados produtos de PCR para a detecção de fragmento sem mutação ($Fs200Tt + Tt_tub_R = 167$ pb) e nas canaletas pares foram aplicados produtos de PCR para a detecção de fragmento com mutação ($Tt_tub_F + Rr200Tt = 319$ pb). Nas canaletas 1 a 6 foram aplicados produtos de PCR utilizando plasmídeos controles (1 e 2: plasmídeo sem mutação; 3 e 4: plasmídeo com mutação; 5 e 6: mix de plasmídeos sem e com mutação). Nos produtos de PCR das canaletas 7 a 54 foram utilizados DNA genômico. As canaletas 55 e 56 correspondem aos brancos da 1ª e 2ª reação, respectivamente. PM = padrão de peso molecular (100 pb).

5.6. Validação da técnica molecular padronizada através do sequenciamento

O sequenciamento da região do códon 198 do gene da β -tubulina de 20 parasitos, cujos estados pertencentes são Bahia (1), Belo Horizonte (1), Piauí (10) e Tocantins (8) permitiu a validação da técnica padronizada, corroborando a eficácia da mesma. A Figura 21 apresenta um cromatograma correspondente a três amostras, dentre as vinte que apresentaram mutação, as quais são uma amostra homocigota mutada e duas amostras heterocigotas. Na Figura 21 (B e C), os dois picos na posição do códon 198 correspondem aos dois alelos, um mutado e um não mutado. No sequenciamento foi possível observar que não há polimorfismo para o códon 200, o que confirma que as amostras polimórficas para o códon 198 (GCA) são realmente mutadas, uma vez que, se este resultado fosse decorrente de contaminação com o plasmídeo controle, tais amostras mutadas para este códon também apresentariam o códon 200 polimórfico (TAC), não obstante, todas estas amostras apresentaram códon 200 não mutado (TTC).

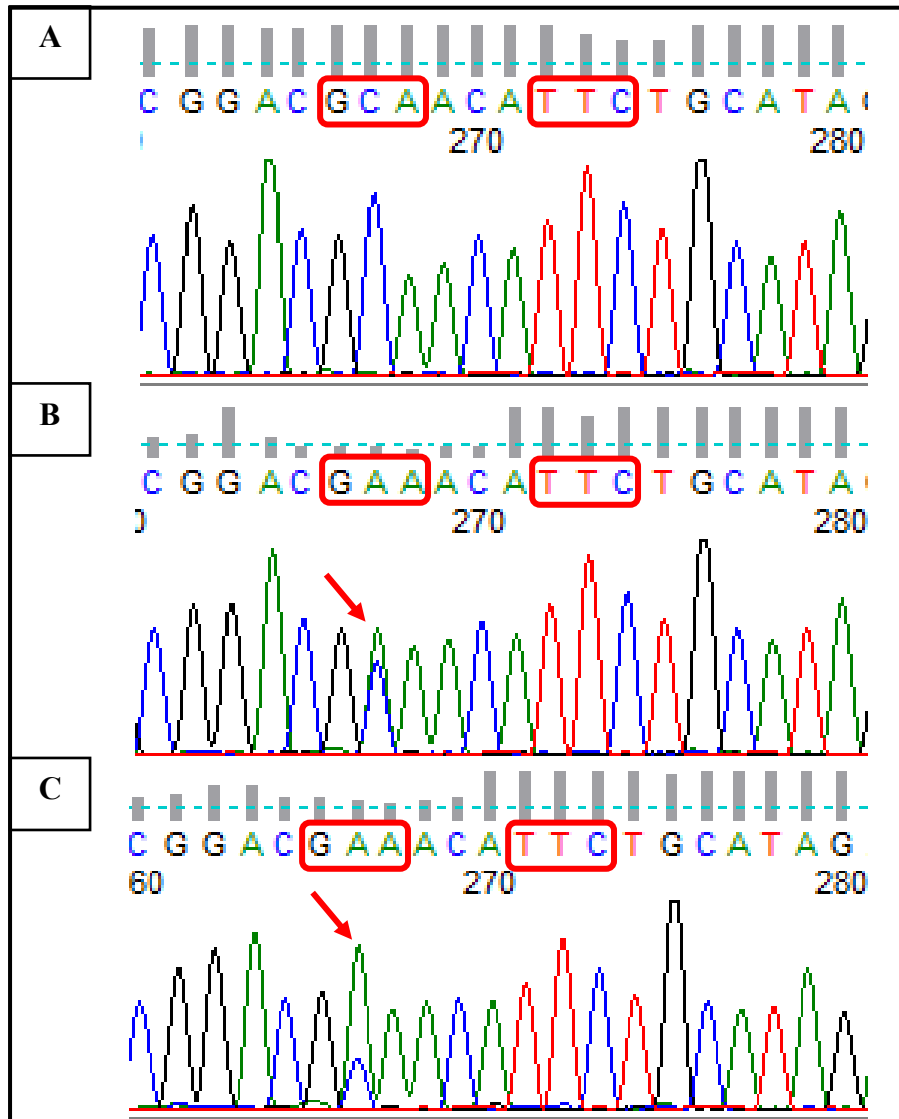


Figura 21 – Cromatogramas representativos do sequenciamento das amostras que apresentaram mutação no códon 198 com perfil homocigoto (A) e heterocigoto (B e C). As setas indicam os dois picos que correspondem aos dois alelos, um mutado e um não mutado (GAA → GCA).

6. DISCUSSÃO

Os programas de administração de fármacos em massa têm como objetivo principal reduzir a intensidade e prevalência da infecção causada por geo-helmintos. Para tanto, os benzimidazóis são um dos grupos de anti-helmínticos mais utilizados por apresentarem características como amplo espectro, baixo custo e facilidade de administração (Jourdan, 2018; Furtado et al., 2016). No entanto, estudos têm relatado eficácia reduzida dos compostos benzimidazólicos, baseando-se em parâmetros como a taxa de cura (CR) e a taxa de redução de ovos (ERR), principalmente contra *T. trichiura* (Olsen, 2007; Speich et al., 2012; Swanson et al., 2012; Moser et al., 2014). Os estudos, apesar de descreverem a eficácia limitada dos anti-helmínticos, ainda não forneceram evidências válidas da resistência aos fármacos entre as geo-helmintoses humanas, a qual tem sido abordada como um problema potencial.

Tendo como base a experiência com nematódeos de importância veterinária, nos quais os SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina estão relacionados com resistência aos benzimidazóis, especula-se que esses polimorfismos poderiam também estar relacionados à resistência aos benzimidazóis entre as principais geo-helmintoses humanas, incluindo a infecção por *T. trichiura* (Diawara et al., 2013b). Pesquisas têm descrito a presença destes SNPs no gene da β -tubulina em populações de nematódeos de importância para saúde humana (Diawara et al., 2009; Diawara et al., 2013; Rashwan et al., 2016; Zuccherato et al., 2018; Furtado et al., 2019).

No presente trabalho, empregando a técnica ARMS-PCR, foi realizada uma varredura dos SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. Aqui, foi descrita pela primeira vez na América do Sul a presença da mutação no códon 198 no gene da β -tubulina de populações de *T. trichiura* recuperados de humanos do Brasil.

Contudo, a frequência encontrada para o códon 198 não é consistente com os resultados observados em alguns estudos. Conforme o estudo de Hansen et al. (2013a) nenhum polimorfismo foi encontrado no códon 198, apesar da análise de 27 vermes adultos de *T. trichiura* obtidos de 17 indivíduos após tratamento com mebendazol e 39 ovos obtidos de 7 indivíduos possivelmente expostos aos anti-helmínticos. No estudo de Matamoros et al. (2019) foram obtidas 45 sequências do gene da β -tubulina de vermes adultos recuperados de oito crianças, no entanto, SNP associado à resistência não foi identificado no códon 198 em nenhuma dessas sequências. No estudo de Diawara et al. (2013a) nenhuma amostra analisada do Quênia apresentou polimorfismo no códon 198 dentre as 40 amostras de ovos de *T. trichiura* de 20 indivíduos não tratados e 90 amostras de 31 indivíduos tratados.

Em contraposição aos resultados observados nos estudos acima, mas em conformidade com a frequência observada para o códon 198 no presente estudo, de acordo com Diawara et al. (2013a), amostras de *T. trichiura* do Haiti e Panamá apresentaram polimorfismo neste respectivo códon. No Haiti, 65 amostras de ovos de 30 indivíduos não tratados e 38 amostras de 14 indivíduos tratados foram analisadas, antes do tratamento com anti-helmínticos foi observada uma frequência de 3,1% do perfil homocigoto mutado e, após o tratamento, uma frequência de 13,2%. No Panamá, não foi possível determinar a frequência de SNP no pré-tratamento para o códon nesta posição, já no pós-tratamento o perfil heterocigoto apresentou uma frequência de 2,4%.

Os resultados observados neste estudo para os códons 167 e 200, onde nenhuma das amostras analisadas apresentou polimorfismo nestes códons, são condizentes com os resultados encontrados para estas mesmas posições em outros estudos. De acordo com o estudo de Hansen et al. (2013a), no qual foram analisados 27 vermes adultos e 39 ovos de *T. trichiura*, nenhum polimorfismo foi encontrado nos códons 167 ou 200. No estudo de Yuliana et al. (2018) a única amostra de *T. trichiura* analisada, obtida de uma criança em idade escolar após tratamento com pamoato de pirantel, também não apresentou SNP no códon 200. No estudo de Matamoros et al. (2019), das 45 sequências do gene da β -tubulina de vermes adultos recuperados de oito crianças, nenhum SNP associado a resistência nos códons 167 e 200 foi identificado.

De acordo com Diawara et al. (2013a), em contraposição aos resultados deste presente estudo, no qual não foi identificada mutação nos códons 167 e 200, polimorfismos foram encontrados no códon 167 em amostras do Panamá e no códon 200 em amostras do Haiti, Quênia e Panamá. No Haiti, antes do tratamento, SNP no códon 200 foi observado em uma frequência de 3,1% para o perfil homocigoto mutado e 23,1% para o perfil heterocigoto. Um aumento significativo para 55,3% foi detectado para o perfil homocigoto mutado após o tratamento, enquanto o códon 167 não apresentou mutação. No Quênia, polimorfismo foi encontrado apenas no códon 200 com um aumento significativo do perfil homocigoto mutado de 51,3% para 68,5% após o tratamento. No Panamá, para o códon 167, uma frequência de 78,9% foi encontrada para o perfil homocigoto mutado, a qual diminuiu para 16,3%. Para o códon 200, após o tratamento, uma frequência de 2,4% foi observada para amostras heterocigotas e 9,5% para amostras homocigotas mutadas.

Já para códon 198, foram encontrados polimorfismos com frequências de 3,1% antes do tratamento e 13,2% após o tratamento no Haiti e de 2,4% no Panamá. Tendo como base as frequências, os autores sugerem que polimorfismos nos códons 167 e 198 são menos comuns que o polimorfismo observado no códon 200. De acordo com estudo de Diawara et al. (2009),

a partir da análise do códon 200 em pool de ovos uma frequência de 37% foi observada para amostras heterozigotas e 63% para amostras homozigotas. Estes dados contrapõem-se ao resultado desta pesquisa, na qual observou-se o códon 198 como o único códon polimórfico. Tanto o códon 167, quanto o códon 200, de todas as amostras analisadas, não apresentaram mutação. Entretanto, a não detecção de polimorfismos no códon 167 e 200 não implica na ausência de SNPs nestes respectivos códons em *T. trichiura* nas regiões do país cujas amostras são pertencentes. Contudo, pode ser justificada pelo tamanho da amostragem, o qual pode não ter sido grande o bastante para a identificação de SNPs.

Conforme observado neste estudo, outros trabalhos que analisaram amostras de parasito do mesmo gênero também não observaram polimorfismos no códon 167 e 200. Entretanto, contrariamente ao que foi observado aqui para o códon 198, também não foi detectado polimorfismo neste respectivo códon. No estudo de Hansen et al. (2013a), 49 vermes adultos de *Trichuris* spp. que infectavam primatas foram analisados sem a identificação de mutação nos códons 167, 198 ou 200. Em outro estudo de Hansen et al. (2013b), 121 vermes adultos de *Trichuris* spp., de 6 espécies diferentes de hospedeiros, foram avaliados, embora mutação sinônima tenha sido encontrada no códon 167 e 198, não houve a identificação de qualquer SNP que promova a substituição de aminoácido nestes códons e no códon 200.

Alguns estudos para outros nematódeos, como ancilostomídeos, têm relatado baixa frequência ou ausência dos SNPs nos códons 167, 198 e 200, resultados que diferem daquele observado neste estudo para o códon 198 das amostras de *T. trichiura* analisadas. Segundo Schwenkenbecher et al. (2007) o percentual médio geral de polimorfismo de 0,24% identificado para o códon 167 em amostras de ancilostomídeos, embora seja relativamente alto quando comparado ao percentual de polimorfismo de 0,05% observado para o códon 200, foi muito baixo. No entanto, como ressaltado, tais porcentagens podem ser decorrentes de variação experimental. De acordo com Diawara et al. (2013a), não foi observada mutação para o códon 167 e 198 em amostras de ancilostomídeos do Haiti, Quênia e Panamá. Neste estudo, polimorfismo foi identificado apenas no códon 200 em amostras do Quênia com uma frequência de 2,3%. No estudo de Rashwan et al. (2016), mutação no códon 198 em *N. americanus* foi detectada pela primeira vez. Dentre as 110 amostras analisadas pela técnica SmartAmp2, 12 amostras foram heterozigotas e 8 foram homozigotas mutadas, contudo as análises foram realizadas em pool de 20 larvas por amostra, não sendo determinada assim uma frequência baseada em larvas individuais. Para este mesmo nematódeo foi observado polimorfismos nos códons 198 e 200 em uma frequência de 1,4% e 1,1%, respectivamente (ZUCCHERATO et al., 2018).

Alguns estudos também têm relatado baixa frequência ou ausência dos SNPs nos códons 167, 198 e 200 em *A. lumbricoides*. De acordo com Diawara et al. (2013a), não foi observado polimorfismo nos códons 198 e 200 nas populações de *A. lumbricoides* analisadas, já para o códon 167 em amostras de *A. lumbricoides* coletadas de indivíduos, tanto tratados quanto não tratados, do Haiti, Quênia e Panamá, foi observado polimorfismo. Apesar deste estudo, outros sugerem que polimorfismo nestes códons também são infrequentes entre as populações de *A. lumbricoides*. Segundo o estudo de Zuccherato et al. (2018), nenhuma mutação foi encontrada no códon 167 e 198 neste parasito e, conforme o estudo de Furtado et al. (2019), uma frequência de mutação de 0,5% foi observada para o códon 200.

No estudo desenvolvido por Diawara et al. (2009) não foi possível uma conclusão quanto à resistência com base nas frequências observadas, uma vez que o número de amostras analisadas foi pequeno, 39 vermes e 8 amostras de pool de ovos de *T. trichiura*, e a eficácia anti-helmíntica não foi avaliada. Em contraposição, neste presente estudo, as varreduras não foram realizadas em pools e cada amostra de ovo foi analisada individualmente, a fim de garantir mais precisão às frequências polimórficas observadas. Além disso, o pool de amostras pode diluir a concentração do DNA e, assim, resultar em não detecção de mutação.

Assim como Diawara et al. (2009), a eficácia anti-helmíntica também não foi avaliada neste estudo, haja vista que não houve qualquer contato com os pacientes que cederam amostras e nenhum acesso ao histórico de tratamento dos pacientes, cujas análises moleculares foram realizadas anonimamente. Sendo assim, não há informação sobre o acesso destes pacientes a programas de administração de anti-helmínticos em massa. Logo, foi inviável determinar se foram utilizados anti-helmínticos, a eficácia dos mesmos e, conseqüentemente, estabelecer uma correlação entre o polimorfismo identificado e a potencial resistência aos fármacos.

Embora eficácia anti-helmíntica não tenha sido avaliada neste estudo, outros estudos têm apresentado dados relatando uma ação intermediária e, por vezes, de baixa eficácia, apresentada por fármacos, como os benzimidazóis, contra infecções por *T. trichiura*. De acordo com a revisão de Bennett e Guyatt (2000), tanto albendazol quanto mebendazol, em doses únicas, apresentam baixos níveis de eficácia no tratamento da tricuriase em relação à taxa de cura. Conforme explicitado por Keiser e Utzinger (2008) os anti-helmínticos atuais, por suas baixas taxas de curas, não são considerados satisfatórios contra *T. trichiura*. Neste trabalho os autores realizaram uma metanálise onde foi demonstrado que uma dose oral de albendazol (400 mg) e de mebendazol (500 mg) apresentaram taxas de cura de 28% e 36%, respectivamente. De acordo com Speich et al. (2014), no tratamento de crianças com infecções brandas por *Trichuris*, as taxas de cura para mebendazol e albendazol foram de 21,1% e 4,5%,

respectivamente. Ainda conforme este estudo, a taxa de redução de ovos no tratamento com albendazol (45,0%) foi, de modo significativo, menor que a taxa no tratamento com mebendazol (75,0%). De acordo com Jourdan et al. (2018), doses únicas de albendazol e mebendazol têm demonstrado eficácia limitada nos tratamentos contra tricurídeos, principalmente quando a carga parasitária é alta. Tais estudos demonstram que o fármaco mebendazol apresenta taxa de cura e taxa de redução de ovos maiores do que albendazol, contudo, ainda assim subótimas, as quais corroboram com a hipótese que estes fármacos não apresentam bons perfis terapêuticos contra infecções humanas por tricurídeos.

Geary et al. (2010) acreditam que polimorfismo no gene da β -tubulina (Y200F) seja possivelmente um parâmetro relevante que pode influenciar a baixa e variável eficácia apresentada por benzimidazóis contra *T. trichiura* em humanos. Os resultados apresentados por Diawara et al. (2009), nos quais SNP no códon 200 foi encontrado em vermes e em pool de ovos de indivíduos não tratados e tratados, respectivamente, apresentam-se como uma possível explicação para a eficácia, às vezes baixa, dos benzimidazóis contra os tricurídeos em infecções humanas. Além disso, os resultados podem apoiar a ideia que a diferença de sensibilidade entre *T. trichiura* e *A. lumbricoides*, o qual é mais susceptível aos anti-helmínticos, possa ser devida à ocorrência de diferentes alelos, incluindo uma alternância entre TTC ou TAC no códon 200, no gene da β -tubulina de *T. trichiura*. De acordo com Diawara et al. (2013a), a capacidade da população de *T. trichiura* de sobreviver ao tratamento com albendazol pode estar associada aos SNPs identificados nas amostras. Neste presente estudo, o códon 200 não apresentou polimorfismo, nem o códon 167, contudo, mutação foi identificada no códon 198 e a frequência desta foi relativamente maior do que aquelas observadas para outros nematódeos neste respectivo códon, como *A. lumbricoides* e *N. americanus* (DIAWARA et al., 2013a; ZUCCHERATO et al., 2018), e é um indicativo que, sob alta pressão de anti-helmínticos, há um potencial para a seleção e estabelecimento da resistência. Entretanto, apesar dessas hipóteses a imprecisão em se determinar a eficácia de anti-helmínticos, reflete na detecção da resistência, fazendo com que haja urgência para o desenvolvimento de estudos que correlacionem a eficácia dos fármacos a genótipos (GEARY et al., 2010). Tal correlação não foi determinada em nosso estudo, possibilitando apenas suposições a partir dos resultados.

De acordo com Keiser e Utzinger (2010), não há evidências, até o momento, que esteja surgindo resistência dentre as populações de helmintos de importância para a saúde humana a qualquer um dos fármacos anti-helmínticos que são amplamente utilizados. Estudos adicionais são necessários para caracterizar populações de parasitos que não respondem mais ao tratamento. Outros fatores, conforme ressaltado por Geary et al. (2010), podem contribuir para

a eficácia variável dos benzimidazóis. Os tricurídeos, por exemplo, têm uma preferência em abrigaram-se no cólon inferior, compartimento de acesso limitado para a maioria dos fármacos. No que concerne à variação da eficácia de fármacos contra *T. trichiura* e *A. lumbricoides*, os parâmetros relacionados não são realmente definidos. No entanto, ao invés do polimorfismo, outro fator como a farmacocinética pode estar associado, haja vista a diferença na localização destes parasitos no hospedeiro (DIAWARA et al., 2009). Segundo Diawara et al. (2009), mais pesquisas devem ser desenvolvidas para definir o papel de polimorfismos, no gene da β -tubulina de *T. trichiura*, no processo de resistência e, para posterior monitoramento é fundamental determinar a correlação da frequência de SNPs com a eficácia dos benzimidazóis.

De acordo com Vercruysse et al. (2011), a ausência de dados conclusivos no que concerne a resistência a fármacos em humanos é, possivelmente devido à escassez de investigação, mas também à carência de ferramentas confiáveis para análise da frequência de alelos mutados, que provavelmente conferem esta resistência. Para a detecção desses SNPs já foram padronizadas algumas técnicas, tais como Tetraprimer ARMS-PCR, pirosequenciamento, qPCR, SmartAmp2 e PCR-RFLP (DIAWARA et al., 2009; RASHWAN et al., 2017; FURTADO et al., 2018).

O presente estudo teve como objetivo padronizar a melhor metodologia para a possível detecção de SNPs para os códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura*. A primeira metodologia a ser testada foi a PCR-RFLP. Esta metodologia já havia sido estabelecida com sucesso por nosso grupo para a detecção de SNPs em *A. braziliense* (FURTADO et al., 2018), para *A. lumbricoides* e *N. americanus* (ZUCCHERATO et al., 2018). Entretanto, embora o polimorfismo presente no códon 198 do gene da β -tubulina de *T. trichiura* criasse um sítio de clivagem para uma enzima, a padronização da técnica não se mostrou efetiva, provavelmente por problemas técnicos.

A Tetraprimer ARMS-PCR, embora seja uma técnica econômica com resultado direto para genotipagem de SNPs, pode apresentar uma padronização complexa já que dois pares de iniciadores são usados em uma mesma reação, um par interno e um par externo (YE et al., 2001; FURTADO & RABELO, 2015). Em trabalhos prévios do nosso grupo a Tetraprimer ARMS-PCR foi estabelecida com sucesso para a busca de SNP no códon 198 do gene da β -tubulina de *A. caninum* (FURTADO et al., 2016b). Já no presente estudo uma das limitações foi a padronização desta técnica. Em um estudo desenvolvido por Furtado e Rabelo (2015) para a análise de SNP associado à resistência a fármacos em *A. caninum*, foi objetivado a otimização da Tetraprimer ARMS-PCR para o códon 200 desse nematódeo, entretanto, a reação apresentou baixa especificidade e, por isso, optou-se por realizar a ARMS-PCR em duas reações

individuais. No estudo desenvolvido por Furtado et al. (2019), a técnica Tetraprimer ARMS-PCR foi também testada, no entanto, apresentou resultados insatisfatórios com a visualização de muitos amplicons inespecíficos. As reações para Tetraprimer ARMS-PCR, neste presente estudo, assim como observado por Furtado e Rabelo (2015) e Furtado et al. (2019), também se apresentaram inespecíficas para os três códons e, mesmo com as modificações que objetivaram a otimização da técnica, a sua aplicação para genotipagem de qualquer códon foi inviável.

ARMS-PCR é uma metodologia alternativa, na qual é proposto o uso de iniciadores separados, um par por reação de PCR, logo, a padronização pode ser mais simples. No entanto, as análises baseadas nesta técnica requerem o dobro de reações em comparação à tetraprimer ARMS-PCR, logo, são mais trabalhosas e dispendiosas (YE et al., 2001; FURTADO et al., 2016b). Neste estudo, ARMS-PCR foi o método utilizado para a genotipagem e, como o esperado e relatado em outros estudos, tal técnica foi padronizada com sucesso, apresentando-se específica e sensível com reações separadas para cada alelo completamente reproduzíveis. Niciura et al. (2012) e Furtado et al. (2019) também utilizaram com sucesso ARMS-PCR para genotipagem de polimorfismo no códon 200 no gene da β -tubulina em isolados de *H. contortus* e no gene da β -tubulina isotipo-1 de *A. lumbricoides*, respectivamente. No estudo desenvolvido por Furtado et al. (2014), o qual objetivou a identificação de polimorfismo no códon 200 do gene da β -tubulina de *A. caninum*, a ARMS-PCR foi a técnica molecular empregada para tal varredura com uma padronização bem-sucedida, demonstrando-se específica e sensível.

De acordo com a OMS (2010), dentre outras doenças tropicais negligenciadas, geohelmintoses têm sido controladas, principalmente, por meio da quimioterapia preventiva, a qual foi implementada mundialmente e é usada no tratamento de mais de meio bilhão de indivíduos a cada ano. Tal estratégia é econômica e fácil de ser implementada com a capacidade de reduzir a morbidade e diminuir a transmissão (OMS, 2010; OMS, 2012). A principal limitação do presente estudo foi não ter acesso ao histórico de tratamento dos indivíduos cujas amostras apresentaram códon 198 polimórfico. Logo, não há qualquer conclusão se estes indivíduos foram submetidos a quimioterapia preventiva e, se caso foram submetidos, não há informações sobre a periodicidade do uso de anti-helmínticos. Tendo em vista o resultado percentual de amostras com mutação baseando-se nas análises das amostras do Piauí (11,6%) e Tocantins (5,4%) em comparação àquele dentre as amostras da Bahia (1,1%) e Minas Gerais (2,3%), é possível que os indivíduos dos dois primeiros estados tenham sido submetidos ao tratamento da quimioterapia preventiva e, talvez, o uso frequente dos anti-helmínticos resultou nas porcentagens de mutação observadas para o códon 198 entre as amostras do Piauí e Tocantins. Contudo, a presença de mutação no códon 198 e 200 em amostras de *N. americanus*

pertencentes a indivíduos da Bahia, mutação no códon 198 em amostras dos mesmos nematódeos pertencentes a indivíduos de Minas Gerais (ZUCCHERATO et al., 2018) e mutação no códon 200 em *A. lumbricoides*, cujas amostras eram de indivíduos de Minas Gerais (FURTADO et al. 2019), reforça a hipótese que indivíduos da Bahia e Minas Gerais também podem ter sido submetidos a quimioterapia preventiva. Entretanto, pela própria limitação de amostragem e frequência observada, não é possível fazer esta afirmação.

Os pacientes que apresentaram ovo de *T. trichiura* mutado no gene de interesse, também apresentaram ovo sem mutação, tendo em vista que estes pacientes são oriundos de áreas endêmicas, os quais provavelmente mantêm hábitos de higiene precários, logo, podem estar expostos à várias infecções por diferentes amostras de ovos de diferentes indivíduos. Além disso, os vermes são organismos diploides, logo podem produzir ovos não mutado e mutado de acordo com o seu genótipo.

Algumas amostras não resultaram em amplificação quando foram submetidas à PCR, logo, não participaram do cálculo para determinar o percentual de amostras mutadas. Algumas hipóteses podem justificar tal questão: durante a recuperação de ovos não ocorreu a transferência para o microtubo que continha o tampão de lise, uma vez que esta transferência foi feita por pipetagem; o DNA da amostra pode ter sofrido degradação pela ação do formol no qual as amostras fecais foram conservadas (uma vez que não foi obtida informação do tempo de armazenamento de cada amostra, este pode ter sido variável entre as amostras); ou ainda, a presença de polimorfismos em outras regiões nas quais o iniciadores deveriam se anelar, poderiam ter impedido o anelamento destes.

7. CONCLUSÃO

A técnica ARMS-PCR para a genotipagem de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de *T. trichiura* foi padronizada com sucesso, resultando em um depósito de patente para este procedimento, intitulada “Iniciadores, kit e método para diagnóstico molecular de mutações relacionadas a resistência aos benzimidazóis em *Trichuris trichiura*, e usos”.

Mutações foram observadas no códon 198 com uma frequência de 4,8%. Em contraposição não foram encontradas mutações nos códons 167 e 200, o que não elimina a possibilidade da presença de SNPs nestes respectivos códons. Sugere-se, assim, que mais amostras provenientes de indivíduos dos mesmos estados, como também, outras amostras de diferentes regiões do país, sejam analisadas.

Embora as mutações foram observadas em frequência moderada, entre as amostras analisadas neste estudo, um tratamento constante e, além disso, sem alternância de fármacos, apresenta um potencial de selecionar populações de parasitos resistentes, afirmando a necessidade de monitoramento regular de SNPs relacionados à resistência com técnicas que sejam altamente sensíveis e específicas, como a padronizada neste estudo, visando o estabelecimento de estratégias de controle.

Como perspectiva, outras pesquisas devem ser feitas utilizando um modelo animal experimentalmente infectado com tricurídeo sob pressão de seleção exercida por fármacos pertencentes a classe dos benzimidazólicos, para obtenção de uma cepa resistente, a fim de caracterizar os mecanismos genéticos associados ao processo de resistência a estes fármacos neste parasito. Idealmente poderia ser desenvolvido um trabalho em associação com postos de saúde de prefeituras de áreas endêmicas, no qual ovos de pacientes apresentando falha de tratamento com anti-helmínticos fossem analisados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGNIKA, A. A. et al. Randomized, controlled, assessor-blind clinical trial to assess the efficacy of single- versus repeated-dose albendazole to treat *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, and hookworm infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2535–2540, 2014.
- AGUAYO-ORTIZ, R. et al. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β -tubulin binding site model. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 45, p. 26–37, 2013.
- ALBONICO, M.; CROMPTON, D. W.; SAVIOLI, L. Control strategies for human intestinal nematode infections. **Advances in Parasitology**, v. 42, p. 277-341, 1999.
- ALMEIDA, F. A. et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, n. 4, p. 622–625, 2010.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A. et al. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 291–298, 2005.
- BARTRAM, J.; CAIRNCROSS, S. Hygiene, sanitation, and water: forgotten foundations of health. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 11:e1000367, 2010.
- BENNETT, A.B.; BARKER, G.C.; BUNDY, D.A. A beta-tubulin gene from *Trichuris trichiura*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 111–116, 1999.
- BENNETT, A.B. et al. Sequence variation in the *Trichuris trichiura* b-tubulin locus: implications for the development of benzimidazole resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 12, p. 1519–1528, 2002.
- BENNETT, A.; GUYATT, H. Reducing intestinal nematode infection: efficacy of albendazole and mebendazole. **Parasitology Today**, v. 16, n. 2, p. 71-74, 2000.
- BETHONY, J. et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, n. 9521, p. 1521-1532, 2006.
- BROWN, H.D. et al. Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole, a new anthelmintic. **Journal of the America Chemical Society**, v. 83. n. 7, p. 1764-1765, 1961.
- BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed/McGraw-Hill, 2012.
- BUNDY, D.A.; COOPER, E.S. *Trichuris* and trichuriasis in humans. **Advances in Parasitology**, v. 28, n. 107-173, 1989.
- BUNDY, D.A.P. Epidemiological aspects of *Trichuris* and trichuriasis in Caribbean communities. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 5, p. 706-718, 1986.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2013. Epidemiology & Risk Factors: Geographic Distribution. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/whipworm/epi.html>>. Acesso em: 23 de dez. de 2019.

COLES, G.C. Drug resistance and drug tolerance in parasites. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 8, p. 348, 2006.

CAMPBELL, S.J. et al. A critical appraisal of control strategies for soil-transmitted helminths. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 97-107, 2016.

CROWE, A.L. et al. Decreasing prevalence of *Trichuris trichiura* (whipworm) in the Northern Territory from 2002 to 2012. **The Medical Journal of Australia**, v. 200, n. 5, p. 286–289, 2014.

DAVIS, M.; MATTESON, R.; WILLIAMS, W.C. Radiographic and endoscopic findings in human whipworm infection (*Trichuris trichiura*). **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 8, n. 6, p. 700-701. (1986).

DE SILVA, N.R. et al. Soil-transmitted helminth infections: updating the global Picture. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 12, p. 547-551, 2003.

DE SILVA, N.R.; COOPER, E.S. Trichuriasis. In: Guerrant, R.L.; Walker, D.H.; Weller, P.F. **Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens e Practice**. 3. ed. Londres: Elsevier, 2011. p. 791-793.

DE VLAS, S.J. et al. Concerted efforts to control or eliminate neglected tropical diseases: how much health will be gained? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n.2, p. e0004386, 2016.

DIWARA, A. et al. Assays to detect beta-tubulin codon 200 polymorphism in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, p. e397, 2009.

DIWARA, A. et al. Association between response to albendazole treatment and β -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. e2247, 2013a.

DIWARA, A. et al. Molecular and biological diagnostic tests for monitoring benzimidazole resistance in human soil-transmitted helminths. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 1052–1061, 2013b.

FLETCHER, D.A.; MULLINS, R.D. Cell mechanics and the cytoskeleton. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 485–492, 2010.

FURTADO, L.F. et al. First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 3-4, p. 313-316, 2014.

FURTADO, L.F.V.; DE PAIVA BELLO, A.C.P.; RABELO, É.M.L. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. **Acta Tropica**, v. 162, p. 95-102, 2016a.

FURTADO, L.F.V 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. **Veterinary Parasitology**, v. 224, p. 65-67, 2016b.

FURTADO, L.F.V.; MAGALHÃES, J.G.S.; RABELO, É.M.L. Standardization and application of a modified RFLP-PCR methodology for analysis of polymorphisms linked to treatment resistance in *Ancylostoma braziliense*. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 540, 2018.

FURTADO, L.F.V. et al. First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the beta-tubulin gene in *Ascaris lumbricoides*. **PLoS One**, v. 14, n. 10, p. e0224108, 2019.

GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789-1858, 2018.

GEARY, T.G. et al. Unresolved issues in anthelmintic pharmacology for helminthiases of humans. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2010.

GEERTS, S.; GRYSEELS, B. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 207-222, 2000.

GEERTS, S.; GRYSEELS, B. Anthelmintic resistance in human helminths: a review. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 11, p. 915-921, 2001.

GHISI, M.; KAMINSKY, R.; MÄSER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology** v. 144, n. 3-4, p. 313–320, 2007.

GILMAN, R.H. et al. The adverse consequences of heavy *Trichuris* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 432-438, 1983.

HANSEN, T.V. et al. Genetic variations in the beta-tubulin gene and the internal transcribed spacer 2 region of *Trichuris* species from man and baboons. **Parasites & Vectors** v. 6, p. 236, 2013a.

HANSEN, T.V. et al. Genetic variation in codons 167, 198 and 200 of the beta-tubulin gene in whipworms (*Trichuris* spp.) from a range of domestic animals and wildlife. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 141– 149, 2013b.

HODDA, M. “Phylum Nematoda Cobb 1932. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness”. **Zootaxa**, v. 3148, p. 63-95, 2011.

HOTEZ, P.J. et al. Control of neglected tropical diseases. **The New England Journal of Medicine** v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

- HORTON, J. Global anthelmintic chemotherapy programs: learning from history. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 9, p. 405-409, 2003.
- JAMES, C.E.; HUDSON, A.L.; DAVEY, M.W. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? **Trends in Parasitology** v. 25, n. 7, p. 328-335, 2009.
- JAEGER, L.H.; CARVALHO-COSTA, F.A. Status of benzimidazole resistance in intestinal nematode populations of livestock in Brazil: a systematic review. **BMC Veterinary Research**, v. 13, p. 358, 2017.
- JOURDAN, P.M. et al. Soil-transmitted helminth infections. **Lancet** v. 391, n. 10117, p. 252-265, 2018.
- KEISER, J.; UTZINGER, J. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. **JAMA** v. 299, n. 16, p. 1937-1948, 2008.
- KEISER, J.; UTZINGER, J. The drugs we have and the drugs we need against major helminth infections. **Advances in Parasitology**, v. 73, p. 197-230, 2010.
- KWA, M.S. et al. β -tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**, v. 246, n. 4, p. 500–510, 1995.
- 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 β -tubulin isotype 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 63, n. 2, p. 299-303, 1994.
- LACEY, E.; GILL, J.H. Biochemistry of benzimidazole resistance. **Acta Tropica**, v.56, n. 2-3, p. 245-262, 1994.
- LACEY, E. Mode of action of benzimidazoles. **Parasitology Today** v. 6, n. 4, p. 112-115, 1990.
- LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for Parasitology** v. 18, n. 7, p. 885-936, 1988.
- MATAMOROS, G. et al. High endemicity of soil-transmitted helminths in a population frequently exposed to albendazole but no evidence of antiparasitic resistance. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 2, p. pii:E73, 2019.
- MARTIN, P.J.; ANDERSON, N.; JARRETT, R.G. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and *in vitro* assays. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, n. 8, p. 236-240, 1989.
- MEDRANO, R.F.; DE OLIVEIRA, C.A. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 7, p. 599–608, 2014.
- MITANI, Y. et al. Rapid and cost-effective SNP detection method: application of SmartAmp2 to pharmacogenomics research. **Pharmacogenomics** v. 10, n. 7, p. 1187-1197, 2009.

MÜLLER, I. et al. Low efficacy of albendazole against *Trichuris trichiura* infection in schoolchildren from Port Elizabeth, South Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 11, p. 676–678, 2016.

NEWTON, C.R. et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 7, p. 2503-2516, 1989.

NICIURA, S.C.M. 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. **Veterinary parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 608-612, 2012.

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

OLSEN, A. Efficacy and safety of drug combinations in the treatment of schistosomiasis, soil-transmitted helminthiasis, lymphatic filariasis and onchocerciasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 8, p. 747-758, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2019a. Soil-transmitted helminthiasis. Disponível em: <https://www.who.int/gho/neglected_diseases/soil_transmitted_helminthiasis/en/>. Acesso em: 11 de dez. de 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2019b. Soil-transmitted helminth infections. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>>. Acesso em: 11 de dez. de 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Soil-transmitted helminthiasis: eliminating soil-transmitted helminthiasis as a public health problem in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2010.

PULLAN, R.L. et al. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasites & Vectors** v.7, p. 37, 2014.

PRICHARD, R.K. et al. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal** v. 56, n. 5, p. 239-251, 1980.

PRICHARD, R. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 445-453, 2001.

RASHWAN, N. et al. Isothermal diagnostic assays for monitoring single nucleotide polymorphisms in *Necator americanus* associated with benzimidazole drug resistance. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005113, 2016.

RASHWAN, N.; SCOTT, M.; PRICHARD, R. Rapid genotyping of β -tubulin polymorphisms in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005205, 2017.

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the U.S. Army Medical Department**, v. 8, n. 4, p. 326, 1948.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SILVESTRE, A.; CABARET, J. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 2, p. 297-300, 2002.

SPEICH, B. et al. Efficacy and safety of nitazoxanide, albendazole, and nitazoxanide-albendazole against *Trichuris trichiura* infection: a randomized controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1685, 2012.

SPEICH, B. et al. Oxantel pamoate–albendazole for *Trichuris trichiura* infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 7, p. 610-620, 2014.

STEPHENSON, L.S.; HOLLAND, C.V.; COOPER, E.S. The public health significance of *Trichuris trichiura*. **Parasitology**, v. 121, p. S73-S95, 2000.

SWANSON, S.J. Albendazole therapy and enteric parasites in United States–bound refugees. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n.16, p. 1498-1507, 2012.

TADA, Y.; FUJITANI, T.; YONEYAMA, M. Subchronic toxicity of thiabendazole (TBZ) in ICR mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 8, p. 709-716, 1996.

TAYLOR, M.A.; HUNT, K.R.; GOODYEAR, K.L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 183–194, 2002.

VERCRUYSSSE, J. et al. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance** v. 1, n. 1, p. 14-27, 2011.

VLAMINCK, J. et al. Comprehensive evaluation of stool-based diagnostic methods and benzimidazole resistance markers to assess drug efficacy and detect the emergence of anthelmintic resistance: A Starworms study protocol. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. e0006912, 2018.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. et al. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. **Parasitology**, v. 136, n. 3, p. 349–358, 2009.

WHITTAKER, J.H. et al. Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 40, n. 2, p. 105-115, 2017.

WOLSTENHOLME, A.J. et al. Drug resistance in veterinary helminths. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 469-476, 2004.

YE, S.; HUMPHRIES, S.; GREEN, F. Allele specific amplification by tetra-primer PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 5, p. 1152, 1992.

YE, S. et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 17, p. e88-8, 2001.

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 Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006766, 2018.

PRODUÇÃO RESULTANTE DA EXECUÇÃO DA DISSERTAÇÃO



13/05/2019 870190044870
15:25
29409161812025849

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 009706 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): INICIADORES, KIT E MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA AOS BENZIMIDAZÓIS EM *Trichuris trichiura*, E USOS

Resumo: A presente tecnologia trata de iniciadores, um método e um kit, e seu uso para a detecção específica de mutações associadas à resistência aos benzimidazóis, nos códons 167, 198 e 200 do gene da beta-tubulina de *Trichuris trichiura*, preferencialmente através da técnica baseada no sistema de amplificação refratária à mutação (ARMS-PCR).

Figura a publicar: 1

PRODUÇÕES RESULTANTES DAS COLABORAÇÕES


Furtado, L.F.V.; Medeiros, C.D.S.; Zuccherato, L.W.; Alves, W.P.; **de Oliveira, V.N.G.M.**; da Silva, V.J. et al. First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the betatubulin gene in *Ascaris lumbricoides*. **PLoS ONE**, v. 14, n. 10, p. e0224108, 2019.

Furtado, L.F.V.; Dias, L.T.O.; Rodrigues, T.O.; Silva, V.J.D.; **Oliveira, V.N.G.M.**; Rabelo, É.M.L. Egg genotyping reveals the possibility of patent *Ancylostoma caninum* infection in human intestine. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3006, 2020.

Coorientação da aluna Giovanna Rotondo de Araújo em sua monografia de conclusão do Curso de Ciências Biológicas intitulada: “Prevalência de *Leishmania* spp. em morcegos coletados em municípios do estado de Minas Gerais”.

RESEARCH ARTICLE

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

Luis Fernando Viana Furtado, Celi da Silva Medeiros, Luciana Wembeck Zuccherato, William Pereira Alves, Valéria Nayara Gomes Mendes de Oliveira, Vivian Jordania da Silva, Guilherme Silva Miranda, Ricardo Toshio Fujitwara, Elida Mara Leite Rabelo 

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

* mlabelo@icb.ufmg.br



OPEN ACCESS

Citation: Furtado LFV, Medeiros CS, Zuccherato LW, Alves WP, de Oliveira VNGM, 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 (PRPq <https://www.ufmg.br/prp/>; received by EMLR) and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG; Grant number APQ-02417-16; <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

OPEN Egg genotyping reveals the possibility of patent *Ancylostoma caninum* infection in human intestine

Luís Fernando Viana Furtado^{1*}, Lucas Teixeira de Oliveira Dias², Thais de Oliveira Rodrigues², Vivian Jordania da Silva², Valéria Nayara Gomes Mendes de Oliveira² & Éli da Mara Leite Rabelo^{2*}

Hookworms are intestinal parasites that cause major public health problems, especially in developing countries. To differentiate eggs from different hookworm species, it is necessary to use molecular methodologies, since the eggs are morphologically similar. Here, we performed the molecular identification of single hookworm eggs from six Brazilian states. Of the 634 eggs individually analyzed, 98.1% (622/634) represented *Necator americanus*, and surprisingly, 1.9% (12/634 eggs from the same patient) represented *Ancylostoma caninum*. DNA analysis of the *A. caninum*-positive stool sample revealed no contamination with animal feces. This is the first report of the presence of *A. caninum* eggs in human feces, which may have a direct implication for the epidemiology of hookworm infection caused by this species. This suggests the need for special attention regarding prophylaxis, as different reservoirs, previously not described, may have great relevance for the spread of *A. caninum*.

Hookworms affect almost 500 million people worldwide, mainly in developing countries, resulting in a global disease burden of 3.5 million disability-adjusted life years^{1,2}. Human ancylostomiasis is caused mainly by the species *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus*; *A. braziliense* parasitize both canids and felids while *A. tubaeforme* and *A. caninum* parasitize mainly felids and canids, respectively^{3,4}. Among the zoonotic hookworm species, until now, only *A. ceylanicum* have been shown to cause patent human infections, for which dogs and cats can be reservoirs. These parasites indirectly may cause anaemia, diarrhoea, intestinal cramps, and the delayed cognitive and physical development of the host^{5,6}.

Classically, *A. braziliense* and *A. caninum* larvae have been characterized as etiological agents of skin infections in humans known as larva migrans⁷. *Ancylostoma caninum* also has the ability to cause eosinophilic enteritis in humans⁸, and there have been a few reports of the natural parasitism of adult worms of this species in human intestines^{9,10}. However, none of these studies have reported sexually mature worms, so egg production has never been detected. In fact, experimental infections in humans with *A. caninum* resulted in intermittent abdominal pain and eosinophilia, but eggs were not observed in feces at any time¹⁰. Nevertheless, George and coworkers¹¹ detected DNA from *A. caninum* in human feces, suggesting that the role of animals as reservoirs of hookworms in humans may be underestimated and should be investigated.

Since hookworms have morphologically similar eggs, many studies have used standardized molecular techniques for hookworm species differentiation in dogs^{12,13}, cats¹⁴ and humans^{15,16}. Additionally, because the eggs are identical, the true prevalence of the hookworm species that affect humans is undetermined in most regions in the world in areas where these parasites are endemic. Therefore, in this work, we aimed to molecularly identify the species of hookworms parasitizing humans. This is of crucial importance because different populations of parasite species are a factor that may affect the prevention strategies used against parasites, since each species may have its own hosts, routes of transmission and pathogenesis^{17,18}. In addition, such screenings may help to

¹Universidade do Estado de Minas Gerais, Avenida Juca Stockler, 1130, CEP 37900-106, Nossa Sra. das Graças, Passos, Minas Gerais, Brazil. ²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Departamento de Parasitologia, L4 237, Laboratório de Parasitologia Molecular, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *email: Fvfurtado@gmail.com; elidam.rabelo@gmail.com



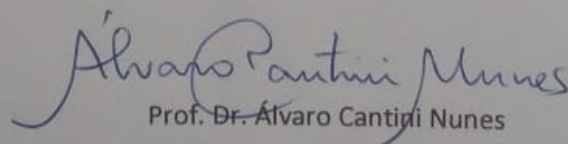
Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Colegiado do Curso de Graduação em Ciências Biológicas
e-mail: colgradc-bio@icb.ufmg.br

05 de Dezembro de 2019

Ilma. **Valéria Nayara Gomes Mendes de Oliveira**

Prezada,

Em nome do Colegiado do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, agradeço sua participação como **co-orientadora** na banca de defesa da monografia de conclusão do Curso de Ciências Biológicas da aluna **GIOVANNA ROTONDO DE ARAUJO** intitulada "Prevalência de *Leishmania* spp. em morcegos coletados em municípios do estado de Minas Gerais".


Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes

Coordenador da disciplina ICB038 -Trabalho de Conclusão de Curso II