

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

CELI DA SILVA MEDEIROS

VARREDURA MOLECULAR DE POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À  
RESISTÊNCIA AOS BENZIMIDAZÓIS EM *Ascaris lumbricoides*

Belo Horizonte – Minas Gerais

2018

CELI DA SILVA MEDEIROS

VARREDURA MOLECULAR DE POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À  
RESISTÊNCIA AOS BENZIMIDAZÓIS EM *Ascaris lumbricoides*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia como requisito para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.  
Área de concentração: Helminologia.

Orientação: Dra. Élide Mara Leite Rabelo.  
Coorientação: Dra. Luciana Werneck Zuccherato.

Belo Horizonte – Minas Gerais

2018

043 Medeiros, Celi da Silva.  
Varredura molecular de polimorfismos associados à resistência aos benzimidazóis em *Ascaris lumbricoides* [manuscrito] / Celi da Silva Medeiros. – 2018.

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

Orientação: Dra. Élide Mara Leite Rabelo. Coorientação: Dra. Luciana Werneck Zuccherato.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Parasitologia. 2. *Ascaris lumbricoides*. 3. Benzimidazóis. 4. Tubulina. I. Rabelo, Élide Mara Leite. II. Zuccherato, Luciana Werneck. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

## AGRADECIMENTOS

Obrigada ao meu Deus que permitiu que eu chegasse até aqui;

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG;

À professora Élide Rabelo, pela orientação, por acreditar que eu seria capaz apesar das minhas dificuldades. Obrigada por respeitar os meus limites, pela paciência, dedicação, presença assídua, disponibilidade, bom humor e convivência harmoniosa nesses dois anos;

À Luciana Werneck, pela coorientação deste projeto, pelo aprendizado, paciência e amizade. Espero que você tenha muito sucesso em sua vida profissional e pessoal;

Ao Fernando, meu segundo coorientador, seu apoio foi muito importante para concretização desse projeto. Prestativo, amigo, sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas, e olha que foram muitas;

À Vivian, pela amizade, pelo carinho e pelas brincadeiras me chamando de “rica”. Sinto muito orgulho de ser sua amiga. Deus abençoe o seu caminho;

À Nayara, pela amizade, companheirismo e bom humor. Obrigada a todos que conviveram comigo nestes últimos dois anos;

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Sumara e Sibeles, por serem sempre tão prestativas;

Ao meu colega de mestrado Guilherme Miranda, que me prestou enorme colaboração trazendo *Ascaris* do Maranhão para enriquecer minhas pesquisas. Obrigada pela amizade e carinho;

À minha família, minha mãe Margarida, meu esposo Medeiros, meus filhos Nathália e Eduardo, os quais tenho abandonado muito nos últimos meses devido aos estudos e trabalho. Obrigada pela compreensão e apoio;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho.

*“A persistência é o caminho do êxito”.*

Charles Chaplin

## RESUMO

O *Ascaris lumbricoides* é um parasito de grande importância médica e possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em quase todos os países do mundo. A ascaridose é uma das parasitoses que está entre as infecções mais comuns e negligenciadas em todo o mundo, afetando comunidades mais pobres e desfavorecidas. Em 2001, foi aprovado pela Assembleia Mundial da Saúde, principal órgão decisório da Organização Mundial de Saúde, uma resolução que incentiva os países endêmicos a desenvolver políticas para o combate de parasitoses. Foi instituído o tratamento periódico de pessoas que vivem em áreas endêmicas, com a administração do tratamento em massa com fármacos anti-helmínticos. O tratamento reduziu a prevalência de infecções de intensidade moderada e alta em crianças. Porém, o tratamento em massa pode selecionar subpopulações com capacidade de sobreviver ao tratamento. Mutações nos códons 167, 198 e 200 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 estão associadas com resistência aos benzimidazóis em alguns nematódeos de importância veterinária. Polimorfismos associados com resistência já foram descritos para as espécies *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos. Entretanto, estes estudos são raros e a pesquisa por esses polimorfismos nesses parasitos nunca foi realizada no Brasil. Assim, esse projeto realizou uma varredura em busca de polimorfismos no gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *Ascaris lumbricoides* em amostras de fezes humanas de pacientes de seis estados brasileiros (Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais, Piauí e Tocantins). Foram realizadas reações de *nested*-PCR em 864 amostras a partir de ovos individuais obtidos de 62 pacientes. A partir dos produtos da *nested*-PCR foram realizadas 601 reações de PCR-RFLP, para cada códon, 167 e 198. Algumas amostras apresentaram perfil sugestivo de mutações para os dois códons, as quais foram submetidas ao sequenciamento de DNA para validação da técnica. Cinquenta e duas amostras foram sequenciadas e foi constatado que nenhum SNP foi detectado para os códons 167 e 198 nas amostras de *Ascaris lumbricoides* analisadas. Estes resultados estão de acordo com dados publicados recentemente em um estudo realizado em Ruanda, o qual também não foi detectado nenhuma mutação nas amostras analisadas e que eram oriundas de pacientes que apresentaram falha no tratamento com albendazol. Os resultados deste trabalho em conjunto com dados da literatura, reforçam a necessidade de mais estudos sobre o tema de resistência a anti-helmínticos de parasitos transmitidos pelo solo, bem como a busca para a elucidação das relações entre a baixa eficácia dos benzimidazóis para o tratamento de alguns nematóides e as possíveis causas envolvidas, moleculares ou metabólicas.

**Palavras-chave:** *Ascaris lumbricoides*; Resistência aos benzimidazóis;  $\beta$ -tubulina.

## ABSTRACT

*Ascaris lumbricoides* is a parasite of great medical importance and has a wide geographical distribution, being found in almost every country in the world. Ascariidosis is one of the parasitic diseases that is among the most common and neglected infections worldwide, affecting poorer and disadvantaged communities. In 2001, the World Health Assembly, World Health Organization's principal decision-making body, adopted a resolution WHA54.19, which encourages endemic countries to develop effective policies to combat parasitic diseases. Periodic treatment of people living in endemic areas, mainly children, with the mass administration of anti-helminthic drugs (MDA) was instituted. The treatment significantly reduced the prevalence of moderate and high intensity infections in children. However, MDA can select subpopulations with genetic ability to survive treatment. Mutations in codons 167, 198 and 200 of the  $\beta$ -tubulin isotype 1 gene are associated with resistance to benzimidazoles in some nematodes of veterinary importance. Polymorphisms associated with resistance have already been described for the species *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* and hookworms. However, these studies are rare, and polymorphism in the  $\beta$ -tubulin gene of these parasites has never been performed in Brazil. Thus, this project carried out a search for polymorphisms in the  $\beta$ -tubulin isotype 1 gene of *Ascaris lumbricoides* in human stool samples from patients from six Brazilian states (Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais, Piauí and Tocantins). Nested-PCR reactions were performed on 864 samples from individual eggs obtained from 62 patients. From the nested-PCR products, 601 PCR-RFLP reactions were performed for each codon, 167 and 198. Some samples presented a suggestive profile of mutations for the two codons and were submitted to DNA sequencing. Fifty-two samples were sequenced and it was found that no SNP was detected for codons 167 and 198 in the *Ascaris lumbricoides* samples analyzed for the six Brazilian states. These results are in line with data recently published in a study in Rwanda, which also found no mutation in the analyzed samples and that came from patients who failed albendazole treatment. The results of this work together with data from the literature reinforce the need for further studies on the subject of anthelmintic resistance to soil transmitted parasites and the search for elucidation of the relationships between the low efficacy of benzimidazoles for the treatment of some nematodes and the possible involved causes, molecular or metabolic.

**Keywords:** *Ascaris lumbricoides*; Resistance; Benzimidazoles;  $\beta$ -tubulin.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> –Distribuição geográfica de geo-helminhos no mundo .....   | 13 |
| <b>Figura 2</b> – Representação esquemática do ciclo biológico de <i>A. lumbricoides</i> .....   | 15 |
| <b>Figura 3</b> – Mecanismo de ação dos BZs.....   | 20 |
| <b>Figura 4</b> – Posição de anelamento dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação da região flanqueando os códons 167, 198 e 200 do gene da $\beta$ -tubulina isotipo 1.....     | 31 |
| <b>Figura 5</b> – Perfil do gel após PCR-RFLP utilizando a enzima <i>RsaI</i> para análise do códon 167 do gene da $\beta$ -tubulina isotipo 1 de <i>A. lumbricoides</i> .....           | 33 |
| <b>Figura 6</b> – Perfil do gel após PCR-RFLP utilizando a enzima <i>BmsI</i> para análise do códon 198 do gene da $\beta$ -tubulina isotipo 1 de <i>A. lumbricoides</i> .....           | 33 |
| <b>Figura 7</b> – Gel de agarose 1% resrepresentativo da <i>nested</i> -PCR para análise de SNPs no gene da $\beta$ -tubulina isotipo 1 de <i>A. lumbricoides</i> .....                  | 38 |
| <b>Figura 8</b> – Resultado demonstrativo da RFLP-PCR para varredura de SNPs no códon 167 do gene da $\beta$ -tubulina isotipo 1 de <i>A. lumbricoides</i> .....                         | 39 |
| <b>Figura 9</b> – Resultado demonstrativo da RFLP-PCR para varredura de SNPs no códon 198 do gene da $\beta$ -tubulina isotipo 1 de <i>A. lumbricoides</i> .....                         | 40 |
| <b>Figura 10</b> – Resultado demonstrativo da PCR-RFLP para varredura de SNPs no códon 198 do gene da $\beta$ -tubulina isotipo 1 de <i>A. lumbricoides</i> com resultados atípicos..... | 41 |
| <b>Figura 11</b> – Cromatograma representativo do sequenciamento das amostras de ovo único de <i>A. lumbricoides</i> .....   | 47 |
| <b>Figura 12</b> – Cromatograma representativo do sequenciamento das amostras de ovo único de <i>A. lumbricoides</i> apresentando mutação no códon 167.....                              | 47 |
| <b>Figura 13</b> – Cromatograma representativo do sequenciamento das amostras de ovo único de <i>A. lumbricoides</i> apresentando mutação no códon 198.....                              | 47 |
| <b>Figura 14</b> – Cromatograma representativo do sequenciamento das amostras de ovo único de <i>A. lumbricoides</i> apresentando mutação no códon 198.....                              | 48 |



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1** – *Primers* utilizados nas reações de PCR e *nested*-PCR. A sequência em negrito representa a adição da cauda de M13..... 29
- Quadro 2** – *Primers* utilizados para a síntese de controles mutados da região de  $\beta$ -tubulina de *A. lumbricoides*, através da técnica de Megaprimer-PCR..... 30
- Tabela 1** – Número de amostras de pacientes e ovos analisados por estado..... 37
- Tabela 2** – Total de reações de PCR-RFLP realizadas e corridas em gel de agarose 1,5%. Compilação de resultados das reações de PCR-RFLP..... 41
- Tabela 3** – Resultados dos sequenciamentos mostrando as alterações encontradas em comparação com as sequências dos controles mutado e não mutado..... 43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**A:** Adenina

**ARMS-PCR:** Sistema de reação de amplificação refratária – reação em cadeia da polimerase, do inglês *amplification refractory mutation system – polymerase chain reaction*

**BA:** Bahia

**BSA:** Soro bovino fetal, do inglês *bovine serum albumin*

**BZ:** Benzimidazol

**C:** Citosina

**CE:** Ceará

**CH:** Controle Heterozigoto

**Cm:** Centímetro

**CM:** Controle Mutado

**CN:** Controle Selvagem Normal

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**CYPs:** Proteínas monooxigenases da classe do citocromo P450

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**dNTP:** Desoxirribonucleotídeo fosfatado, do inglês *nucleoside triphosphate*

**EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético

**G:** Guanina

**ICB:** Instituto de Ciências Biológicas

**L1:** Larva de primeiro estágio

**L2:** Larva de segundo estágio

**L3:** Larva de terceiro estágio

**L4:** Larva de quarto estágio

**LAMP:** Amplificação isotérmica mediada por repetição, do inglês *Loop-mediated isothermal amplification*

**MA:** Maranhão

**MG:** Minas Gerais

**ng:** nanograma

**°C:** grau Celsius

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**pb:** pares de base

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

**PEG:** polietilenoglicol

**Pgp:** Glicoproteína-P

**Phe:** Fenilalanina

**PI:** Piauí

**PM:** Padrão de peso molecular

**RFLP-PCR:** *Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase Chain Reaction*

**SMART AMP2:** Processo de amplificação inteligente, do inglês *smart amplification process*

**SNP:** Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês *single nucleotide polymorphism*

**T:** Timina

**TAE:** Tris/Acetato/EDTA

**TO:** Tocantins

**Tris-HCL:** Tris hidrocloreto

**Tyr:** Tirosina

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**µl:** microlitro

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 12 |
| 1.1. <i>Ascaris lumbricoides</i> .....  | 12 |
| 1.2. Mecanismo de ação dos BZs.....   | 18 |
| 1.3. Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos BZs.....                  | 21 |
| 1.4. Técnicas moleculares para o diagnóstico da resistência.....                                | 22 |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....   | 25 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....   | 26 |
| 3.1. Objetivo geral.....  | 26 |
| 3.2. Objetivos específicos.....   | 26 |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 27 |
| 4.1. Considerações éticas.....  | 27 |
| 4.2. Obtenção de ovos.....  | 27 |
| 4.3. Obtenção do DNA genômico a partir de ovos individuais.....                                 | 28 |
| 4.4. Construção dos controles mutados e selvagens.....  | 28 |
| 4.5. Realização de testes moleculares para detecção de mutações.....                            | 30 |
| 4.6. PCR-RFLP.....  | 32 |
| 4.7. Sequenciamento.....  | 34 |
| <b>5. RESULTADOS</b> .....  | 37 |
| 5.1. Amplificação dos ovos únicos por PCR e <i>Nested-PCR</i> .....                             | 37 |
| 5.2. PCR-RFLP.....  | 38 |
| 5.3. Sequenciamento das amostras apresentando perfil mutado ou perfil distinto do esperado..... | 42 |
| <b>6. DISCUSSÃO</b> .....   | 49 |
| <b>7. CONCLUSÃO</b> .....   | 55 |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 56 |
| <b>ANEXO</b> .....  | 64 |

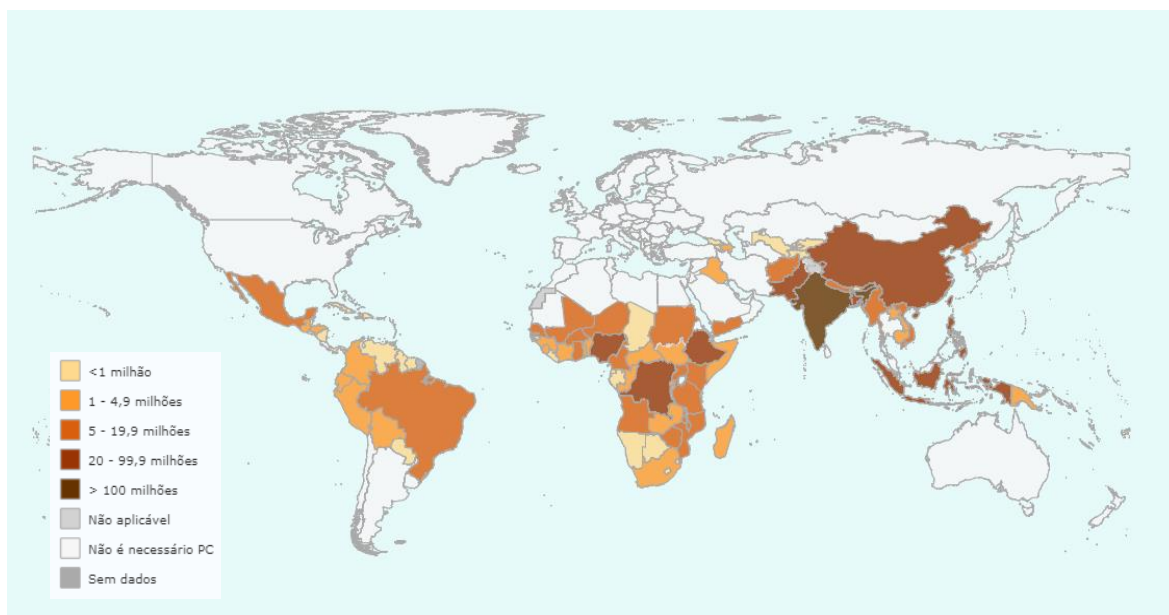
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Ascaris lumbricoides*

A espécie *Ascaris lumbricoides* foi descrita pela primeira vez por Linnaeus em 1758. Esta espécie está incluída no reino Animalia, filo Nematoda, classe Secernentea, subclasse Chromadoria, ordem Ascaridida, família Ascarididae, gênero *Ascaris*, espécie *Ascaris lumbricoides* (ZHANG, 2011). São popularmente conhecidos como lombriga ou bicha, causando a doença denominada ascaridiose, ascaridose ou ascaridíase. É um parasito de grande importância médica e possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em quase todos os países do mundo, principalmente nas regiões mais pobres dos países subdesenvolvidos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS, 2017a).

Existem vários trabalhos na literatura sugerindo que *A. lumbricoides* em seres humanos e *Ascaris suum* (GOEZE, 1782) em porcos sejam a mesma espécie (ANDERSON, 2001; LELES et al., 2012; SOE et al., 2016). A possibilidade de infecção cruzada de humanos e suínos por ambos os parasitos já foi extensivamente demonstrada (BETSON et al., 2014). Trabalhos envolvendo caracterização genômica também dão suporte a esta teoria (LI et al., 2017; NEJSUM et al., 2017).

As infecções estão amplamente distribuídas nas áreas tropicais e subtropicais, sendo que as maiores prevalências ocorrem na África subsaariana, Américas, China e Ásia Oriental. Nestas regiões, mais de 270 milhões de crianças em idade pré-escolar e mais de 600 milhões de crianças em idade escolar vivem em áreas onde estes parasitos são intensamente transmissíveis, caracterizando a necessidade de tratamento e intervenções preventivas. No Brasil, entre os anos de 1995 e 2012, foram detectados, em média, 114.020 indivíduos infectados com *A. lumbricoides*, 72.113 com ancilostomídeos e 47.663 com *Trichuris trichiura*. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; OMS, 2017b). A Figura 1 representa as áreas endêmicas para a presença dos geo-helminthos com o número de indivíduos infectados por país.



**Figura 1** - Distribuição geográfica representativa das áreas endêmicas para geo-helmintos no mundo. A legenda indica o número de pessoas, em milhões, que residem em regiões endêmicas para os geo-helmintos (retirada de [http://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/sth/sth.html](http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sth/sth.html)).

Segundo dados da OMS (2017b), cerca de 1,5 bilhões de pessoas, ou 24% da população mundial, estão infectadas por geo-helmintos em diversos países do mundo. Grande parte da população mundial está infectada com um ou mais desses helmintos transmitidos pelo solo: *A. lumbricoides*, com aproximadamente 807 a 1,121 bilhão de pessoas infectadas; *T. trichiura*, com cerca de 604 a 795 milhões; e ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*), os quais infectam aproximadamente 576 a 740 milhões de pessoas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, 2017).

Os helmintos intestinais transmitidos pelo solo são os parasitos mais prevalentes entre os seres humanos, causando morbidade principalmente nas comunidades mais pobres dos países em desenvolvimento. O tratamento em massa tem sido a principal estratégia para combater as infecções causadas por *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e os ancilostomídeos (*N. americanus* e *A. duodenale*). Nas regiões endêmicas, os fármacos recomendados para o tratamento são os benzimidazóis (BZs): albendazol (400 mg) ou mebendazol (500 mg), administrados em dose oral única (OMS, 2006; RASHWAN et al., 2017).

Os medicamentos recomendados pela OMS são eficazes, baratos, fáceis de administrar, passaram por extensos testes de segurança e oferecem poucos efeitos colaterais. De acordo com a OMS (2016), 638,5 milhões de crianças receberam quimioterapia preventiva para helmintos transmitidos pelo solo, 166 milhões de crianças em idade pré-escolar, 471,5 milhões de crianças

em idade escolar e 127 milhões de mulheres em idade reprodutiva. A maioria das unidades de saúde (66,7%) que implementaram a quimioterapia preventiva para os geo-helmintos atingiram o objetivo da Assembleia Mundial da Saúde de tratar pelo menos 75% das crianças em idade escolar para a doença, com cobertura geográfica de 76,5% das áreas endêmicas (OMS, 2016).

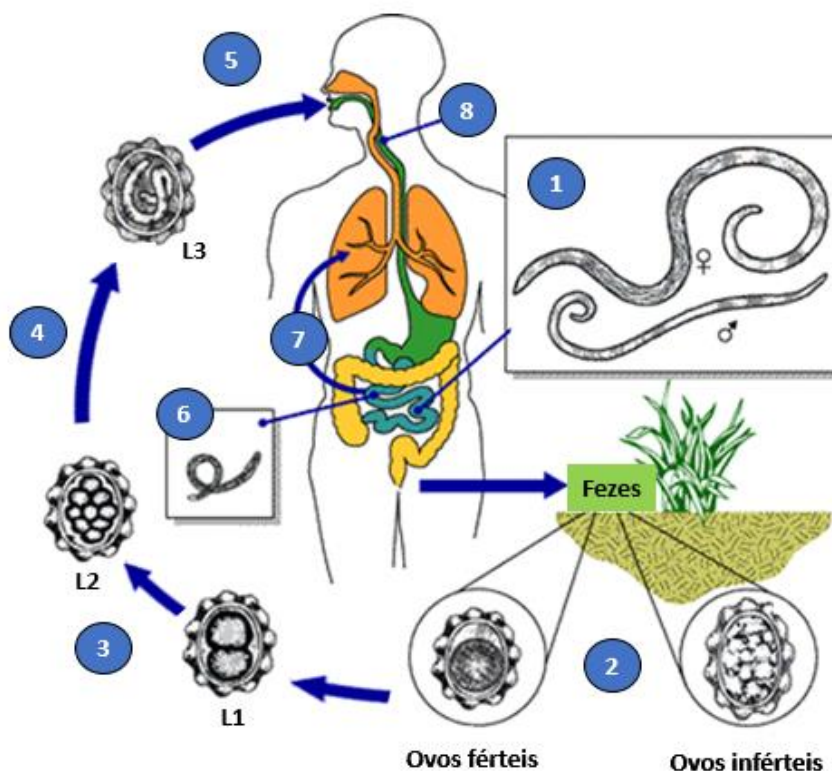
No Brasil, em 2016, o número de crianças em idade escolar e pré-escolar que pelas diretrizes da OMS necessitavam de quimioterapia preventiva foi de 10.448.607 pessoas. Destas, 2.599.633 crianças em idade escolar receberam o tratamento, atingindo uma cobertura nacional de 34,43%. Dados estatísticos para crianças do pré-escolar não foram divulgados. A cobertura geográfica atingiu 92,6% do território brasileiro (OMS, 2016).

A ascarirose é uma das helmintoses dentro do grupo de parasitos considerados geo-helmintos, pois esses requerem uma passagem pelo solo antes de se tornarem infectantes. Essas doenças são transmitidas por ovos presentes nas fezes de humanos infectados, os quais contaminam o solo em áreas onde o saneamento é precário, afetando as comunidades mais pobres e desfavorecidas (BETHONY et al., 2006).

O *A. lumbricoides* é o maior nematódeo que parasita o intestino humano. Estes vermes vivem no lúmen do intestino delgado (jejuno), de modo que as fêmeas adultas medem de 20 a 35 cm e o macho adulto de 15 a 30 cm. O ciclo biológico é do tipo monoxênico e cada fêmea é capaz de produzir cerca de 200.000 ovos por dia, os quais chegam ao exterior junto com as fezes do hospedeiro. Ovos férteis embrionados tornam-se infectantes após aproximadamente 30 dias, dependendo das condições ambientais (umidade, calor e sombra). A larva rabditoide de primeiro estágio (L1), formada dentro do ovo, sofre uma muda em aproximadamente quinze dias e se transforma em L2 (larva de segundo estágio), que por sua vez, após nova muda, se transforma em L3 (larva de terceiro estágio) em duas semanas. A L3 é uma larva do tipo filarioide infectante, a qual permanece ainda dentro do ovo.

Após a ingestão pelo hospedeiro, os ovos contendo L3 atravessam todo o trato digestório e as larvas eclodem no intestino delgado. A eclosão é dependente de estímulos do hospedeiro como pH, temperatura e CO<sub>2</sub>. As larvas liberadas penetram na mucosa do intestino grosso, caem nos vasos linfáticos e veias, invadindo o fígado 18 a 24 h após a infecção. Dois a três dias depois, as larvas invadem o coração, através da veia cava inferior, chegando ao átrio direito. As larvas migram para o pulmão (realizando o ciclo pulmonar, conhecido como Ciclo de Loss) e sofrem muda para a larva de quarto estágio (L4), cerca de oito a nove dias após a ingestão dos ovos. As larvas rompem os capilares e caem nos alvéolos, onde sofrem muda para adultos jovens, sobem pela árvore brônquica e traqueia, chegando até a faringe, onde podem ser expelidas com a expectoração ou ingeridas. Ao atingir o intestino delgado, as larvas se tornam

vermes adultos machos ou fêmeas, as quais 30 dias depois iniciam a oviposição. Assim, são necessários entre 2 e 3 meses desde a ingestão dos ovos infectantes até a oviposição pela fêmea adulta (período pré-patente). Os vermes adultos podem viver de 1 a 2 anos (MURRELL et al., 1997; CDC, 2017). Na Figura 2 é demonstrado o ciclo biológico do *A. lumbricoides*.



**Figura 2** - Representação esquemática do ciclo biológico de *A. lumbricoides*. Número 1: vermes adultos no intestino delgado; 2: ovos férteis e inférteis ao solo; 3: Mudança de estágio L1 para L2; 4: Mudança de estágio L2 para L3; 5: Ingestão de forma infectante L3; 6: Eclosão de L3 do ovo no intestino delgado; 7: Migração de L3 para o pulmão; 8: Jovem adulto na região da nasofaringe. (Adaptado de <https://www.CDC.gov/dpdx/ascariasis/index.html>).

O número aumentado de vermes adultos de *A. lumbricoides* no intestino delgado pode causar distensão e dor abdominal, de modo que os vermes podem se agregar no intestino provocando obstrução parcial ou completa, perfuração intestinal, apendicite ou uma peritonite, que pode ser fatal (KHUROO, 1996). Em crianças com febre alta, os vermes adultos também tendem a migrar, resultando no surgimento de vermes na nasofaringe ou ânus. Outras patologias de importância ocorrem quando os parasitos bloqueiam as vias biliares, o que pode provocar cólica biliar, colecistite, colangite, pancreatite ou abscesso hepático. Enquanto a obstrução intestinal é mais comum em crianças, o comprometimento hepatobiliar e pancreático ocorre mais em adultos, presumivelmente porque a árvore adulta biliar é grande o suficiente para acomodar um verme adulto (KHUROO et al., 1990; BETHONY et al., 2006). A ascarirose



pode causar ainda intolerância à lactose e má absorção da vitamina A e outros nutrientes, comprometendo o estado nutricional e afetando processos cognitivos e o crescimento de crianças (TAREN et al., 1987).

A migração das larvas pode provocar reações nos tecidos pelos quais elas migram. As larvas que morrem durante a migração podem provocar granulomas eosinofílicos no fígado (KAPLAN et al., 2001). Nos pulmões, antígenos de larvas causam uma resposta inflamatória intensa consistindo de infiltrados eosinofílicos, que é comumente acompanhada de dispneia, tosse não produtiva, febre e hemoptise, de maneira que algumas crianças afetadas desenvolvem asma. Os sintomas apresentados pela migração das larvas no pulmão é conhecido como síndrome de Loeffler (GELPI & MUSTAFA, 1968; HOENIGL et al., 2011).

As infecções parasitárias intestinais são um dos principais problemas de saúde pública no Brasil, representando um grave problema médico-sanitário a ser resolvido em todo o mundo, especialmente em localidades pobres, sem condições básicas de higiene e com população de baixa renda econômica (COSTA et al., 2015).

Os últimos dados estatísticos no Brasil de prevalência de geo-helminhos foram gerados a partir do programa de controle da esquistossomose. No período de 1995 a 2010, foram realizados, em média, 1.374.000 exames por ano nos estados endêmicos para esquistossomose, sendo detectados nesse período 248.775 casos positivos para *A. lumbricoides*, 137.826 para ancilostomídeos e 82.449 para *T. trichiura*. A positividade média para ascarirose foi a mais elevada dentre os geo-helminhos analisados, 13,7% (variação entre 2 a 37,8%) enquanto que para os ancilostomídeos foi de 8,2% (variação entre 0,3 a 25,1%), e para tricurose foi de 5,1% (variação de 0,1 a 20,9%). Altas taxas de positividade foram detectadas nos estados do Nordeste, com prevalências médias de 20,6% para *A. lumbricoides*, 11% para ancilostomídeos e 7,7% para *T. trichiura*. No período de 1996 a 2009, o Sistema de Informação de Mortalidade/Ministério da Saúde registrou uma média de 563 óbitos causadas por helmintos, sendo a ascarirose responsável por uma média de 52,4% dos óbitos no período analisado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Atualmente está em fase final um projeto financiado pelo Ministério da Saúde, coordenado pelo pesquisador do Centro de Pesquisas René Rachou, da Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais, Dr. Naftale Katz, o Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geo-helminhos, que começou a ser realizado em 2010. O inquérito tem como objetivo realizar 225 mil exames em escolares de sete a catorze anos, em 541 municípios nas 27 unidades da federação para verificar a prevalência de esquistossomose e geo-helminhos no país. Já foi realizada 80% da meta estipulada (KATZ, 2017). A partir dos dados desta pesquisa, será

possível obter informações atualizadas da prevalência da esquistossomose e geo-helmintos no Brasil. Os dados finais ainda não foram divulgados.

As agências da Organização das Nações Unidas reconheceram o grave problema de saúde e comprometimento da educação causado por essas infecções em crianças, tomando medidas para distribuição de fármacos anti-helmínticos em escolas e realização de programas de quimioterapia, os quais consistem no tratamento em massa de pessoas expostas ao risco de contaminação (OMS, 2017a). Em 2001, foi aprovado por unanimidade na Assembleia Mundial da Saúde a resolução WHA54.19, incentivando os países endêmicos a elaborar políticas para o combate às parasitoses, como a esquistossomose e geo-helmintoses. Foi instituído o tratamento periódico de pessoas que vivem em áreas endêmicas. A estratégia para o controle de infecções por helmintos transmitidos pelo solo está direcionada principalmente às pessoas em situação de risco, incluindo crianças pré-escolares, crianças em idade escolar, mulheres em idade fértil (incluindo mulheres grávidas no segundo e terceiro trimestres e mulheres que amamentam) e adultos em determinadas ocupações de alto risco (OMS, 2006).

O controle das helmintoses é baseado no tratamento com utilização de fármacos. O tratamento em massa foi preconizado pela OMS sob a abordagem de quimioterapia preventiva, sendo reconhecida como uma das estratégias de saúde pública de baixo custo para reduzir a carga de parasitos destas infecções. Além do tratamento medicamentoso, melhoria nas condições de saneamento básico, abastecimento de água e educação em saúde fazem parte deste conjunto de medidas para a redução da frequência dos parasitos e intensidade da infecção (BETHONY et al., 2006; ORTU et al., 2016).

A OMS doa esses fármacos para ministérios nacionais de saúde em todos os países endêmicos para o tratamento de todas as crianças em idade escolar. O tratamento medicinal periódico é indicado para todas as pessoas de áreas endêmicas e sem a necessidade de diagnóstico individual prévio. A administração medicamentosa deve ocorrer uma vez por ano, quando a prevalência de infecções por helmintos transmitidos pelo solo na comunidade é maior de 20%, e duas vezes por ano, quando a prevalência de infecções é superior a 50% da população. Essa intervenção reduz a morbidade através da redução da carga de vermes (OMS, 2017a).

De acordo com o Dr. Dirk Engels, diretor do departamento de doenças tropicais negligenciadas da OMS, existe um consenso global de que o tratamento em massa periódico e em grande escala é a melhor maneira de reduzir a morbidade causada por vermes intestinais (OMS, 2017b). Estudo realizado por Ortu et al. (2016) em Burundi, na África, confirmou que a administração repetida em massa de medicamentos anti-helmínticos reduziu

significativamente a prevalência de infecções de intensidade moderada e alta em crianças de escolas primárias desde o início dos estudos, em 2007, até níveis praticamente inexistentes em 2014, com grande redução das coinfeções. Gyorkos et al. (2013), em Iquitos, Peru, também observaram alta eficácia do programa de tratamento com anti-helmínticos através da utilização do albendazol contra infecções por geo-helmintos. Os resultados deste estudo reafirmaram que os programas de tratamento em massa são uma estratégia de controle eficaz, embora não sejam suficientes para fins de eliminação, uma vez que devem ser acompanhados por outras estratégias destinadas a melhorar o acesso à água potável e saneamento, incorporando intervenções sociais, como educação em saúde.

Os resultados do tratamento em massa poderiam estabelecer uma das maiores iniciativas de saúde em todo o mundo já realizadas, contudo, o uso tão difundido e frequente de anti-helmínticos pode levar à resistência ou pelo menos um declínio na eficácia dos medicamentos. Mais estudos são necessários sobre o impacto da medicação em massa para o controle dos geo-helmintos, de modo que deve-se monitorar o processo de surgimento de resistência em vermes aos anti-helmínticos (DIAWARA et al., 2009; ORTU et al., 2016).

## 1.2. Mecanismo de ação dos BZs

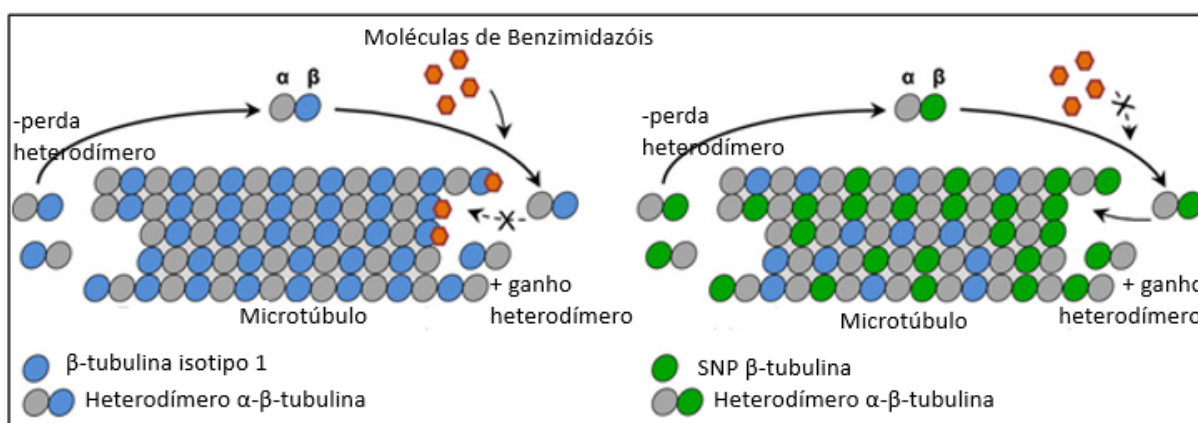
Os BZs representam uma classe de substâncias anti-helmínticas de amplo espectro, amplamente utilizadas desde a década de 1960 para o controle de helmintos de importância humana e veterinária. A partir do sucesso da produção do tiabendazol, ocorreu um estímulo para produção de outras formulações químicas semelhantes, caracterizando o grupo dos BZs (LACEY, 1988). Esta classe inclui vários compostos químicos, entre eles o tiabendazol, o mebendazol e o albendazol, os quais apresentam o mesmo modo de ação: a inibição da polimerização de monômeros de  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina em microtúbulos (LACEY, 1988; NOGALES, 2000; DIAWARA et al., 2009; DEMELER et al., 2013a).

A utilização dos BZs é muito difundida tanto na medicina humana quanto na veterinária. Estes medicamentos são utilizados mundialmente em programas de eliminação de vermes, sendo recomendados pela OMS para o tratamento de nematódeos e cestódeos intestinais ou alojados nos tecidos (DEMBELE et al., 2010; SWANSON et al., 2012). Contudo, nos últimos anos, a eficiência destes fármacos vem sendo questionada a partir da constatação de uma reduzida taxa de cura após o tratamento. Acredita-se que este fato seja devido aos programas de tratamento em massa para o combate dos geo-helmintos *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e ancilostomídeos em humanos. Aliado a este fato, vem sendo muito relatada a detecção de

polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene da  $\beta$ -tubulina, foco de atuação dos BZs e que estão relacionados à resistência a estes fármacos, principalmente na medicina veterinária (DIAWARA et al., 2009; DEMELER et al., 2013b).

Os BZ formam um grupo de fármacos que apresentam como mecanismo de ação principal a inibição da formação de microtúbulos através da sua ligação com a  $\beta$ -tubulina, causando interferência na polimerização da tubulina e desestabilização dos microtúbulos. Os microtúbulos são estruturas que se encontram em constante polimerização, com a adição de um dímero da  $\alpha$ - $\beta$ -tubulina num extremo, e a perda de outro dímero no extremo oposto da cadeia. A ligação do fármaco com a  $\beta$ -tubulina ocorre ao mesmo tempo em que o microtúbulo está perdendo o dímero no outro extremo, o que vai ocasionar o seu encurtamento e desaparecimento. Os microtúbulos participam da formação do citoesqueleto, do fuso mitótico e do transporte intracelular. O efeito do anti-helmíntico acaba inibindo uma série de mecanismos celulares, como transporte de proteínas, manutenção da estrutura celular, segregação cromossômica e mitose. O fármaco provoca a ruptura do metabolismo normal do parasito, e dentro de dois ou três dias, a inibição da absorção de glicose e do transporte intracelular leva a uma depleção letal de glicogênio do verme e no bloqueio da fosforilação oxidativa, culminando na morte celular (LACEY, 1988; NOGALES, 2000; ALBERTS et al., 2002; BETHONY et al., 2006; DIAWARA et al., 2009; BRUNTON et al., 2012; WHITTAKER et al., 2017).

A Figura 3 representa o modo de ação dos Benzimidazóis.



**Figura 3** – Mecanismo de ação dos Benzimidazóis. As moléculas de benzimidazóis (em vermelho) se ligam à subunidade de isotipo-1 de  $\beta$ -tubulina impedindo a ligação do heterodímero de  $\alpha$ - $\beta$ -tubulina no momento que esta perde um heterodímero do lado oposto. A alteração estrutural resultante de um SNP na subunidade de  $\beta$ -tubulina, na cor verde, impede a ligação do BZ e mantém a polimerização normal dos microtúbulos (Modificado de WHITTAKER et al., 2017).

O programa periódico de tratamento em massa como controle das helmintoses pode selecionar indivíduos resistentes, que originam populações resistentes para estes fármacos. A partir dessa pressão seletiva, a população começa a apresentar uma diminuição da resposta ao tratamento ou até mesmo a perda de efeito do fármaco sobre o organismo. A resistência a um fármaco é definida como a diminuição de sua eficiência contra uma população de parasitos que eram geralmente sensíveis a esse fármaco. O insucesso do tratamento é normalmente o primeiro sinal de resistência (SANGSTER & GILL, 1999; DIAWARA et al., 2009; JAMES et al., 2009).

Atualmente, vários estudos relatam falha no uso dos benzimidazóis no tratamento de alguns nematódeos humanos transmitidos pelo solo e principalmente para nematódeos de importância veterinária, evidenciando a necessidade de monitoramento da eficácia dos fármacos. A propagação da resistência anti-helmíntica é um problema mundial para a saúde pública humana e para a produção pecuária, causando grandes prejuízos econômicos a criadores de gado, cavalos, ovelhas e pequenos ruminantes (DEMELER et al., 2013b; RAMÜNKE et al., 2016).

Dentre os fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da resistência aos fármacos, podem ser citadas a frequência do tratamento em que a pessoa ou animal infectado é submetido e o tratamento com subdosagens do fármaco. Esses fatores, aliados à presença de alterações moleculares (polimorfismos genéticos) naturalmente presentes nas populações de

vermes, podem selecionar cepas de vermes resistentes. (DIAWARA et al., 2009; DEMELER et al., 2013a).

### 1.3. Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos BZs

A resistência aos fármacos pode surgir a partir de uma alteração ou mutação no gene para o alvo do fármaco, diminuindo sua ligação. Alterações hereditárias incluindo mutações, deleções ou ampliações de genes específicos podem alterar a expressão do gene em resposta ao fármaco (JAMES et al., 2009; WHITTAKER et al, 2017).

A resistência aos BZs é comumente associada a um SNP nos códons 167, 198 e 200 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1. Nos códons 167 e 200, a trinca TTC que codifica uma fenilalanina (Phe, TTC) sofre alteração do segundo aminoácido para TAC, passando a codificar uma tirosina (Tyr, TAC). No códon 198 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides* a trinca GAA, que codifica um glutamato (Glu, GAA) sofre alteração do segundo aminoácido para GCA e passa a codificar uma alanina (Ala, GCA). A alteração no códon 200 é a mais frequentemente relacionada com o perfil de resistência, sendo que a presença do SNP no códon 198 nunca foi descrita para *A. lumbricoides*. A presença do SNP associado à resistência pode desempenhar um papel na eficácia às vezes baixa e variável de anti-helmínticos contra nematódeos de importância humana e veterinária (COLES et al., 2006; JAMES et al., 2009; DIAWARA et al., 2009; BARRÈRE et al., 2012; DIAWARA et al., 2013a; WHITTAKER et al., 2017).

A base molecular da resistência aos BZs já está bem estabelecida para alguns nematódeos de importância veterinária. De acordo com Beech et al. (2011) e Barrère et al. (2012), SNPs no gene da  $\beta$ -tubulina foram relacionados à seleção de populações resistentes de *Haemonchus contortus*. Estes mesmos SNPs já foram também associados com a resistência a BZ para os parasitos *Teladorsagia spp* e *Trichostrongylus spp*, em trabalho realizado por Ramünke et al. (2016).

Na parasitologia humana existem poucos trabalhos que procuram elucidar os mecanismos moleculares relacionados à resistência aos anti-helmínticos. Estudo realizado por Diawara et al. (2013b) detectou a presença de polimorfismo no códon 167 de *A. lumbricoides*; no códon 200 para ancilostomídeos e nos códons 167, 198 e 200 para *T. trichiura*. A descrição da existência de SNPs para os três códons do gene da  $\beta$ -tubulina em *T. trichiura* leva à hipótese que estes estejam envolvidos na baixa sensibilidade observada no tratamento da tricurose com BZ (DIAWARA et al., 2009; SCHWENKENBECHER & KAPLAN, 2009).

Em um estudo buscando SNPs associados com resistência aos fármacos realizado no Brasil, foi detectada a mutação no códon 200 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *Ancylostoma caninum* coletados de cães naturalmente infectados, numa frequência de 0,8% (FURTADO et al., 2014). Entretanto nenhum SNP foi observado para os códons 167 e 198 quando as mesmas amostras foram analisadas (FURTADO & RABELO, 2015a; FURTADO et al., 2016).

Compreender os mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos em helmintos parasitos, bem como o monitoramento regular da eficácia dos fármacos é fundamental para prolongar a eficácia de anti-helmínticos atuais e auxiliar com evidências científicas para a concepção de novos agentes quimioterápicos, norteando para a identificação de novos alvos para os fármacos (JAMES et al., 2009; DIAWARA et al., 2013a; SCHWENKENBECHER & KAPLAN, 2009).

#### 1.4. Técnicas moleculares para o diagnóstico da resistência

Atualmente são várias as técnicas moleculares que podem ser utilizadas para a detecção de mutações gênicas relacionadas aos casos de resistência aos BZs. Entre elas, destaca-se as PCRs (*Polymerase Chain Reaction*) e suas variações: *nested*-PCR, Tetraprimer ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System*), PCR em Tempo Real, PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), sequenciamento, pirosequenciamento e mais recentemente, SmartAmp2 (*Smart Amplification Process*).

A reação de Tetraprimer ARMS-PCR se baseia na impossibilidade da amplificação do fragmento caso haja uma alteração no local de anelamento do *primer* na última base da extremidade 3', uma vez que a enzima *Taq* convencional não possui a atividade de correção da extremidade 3' para 5'. Portanto, são desenhados quatro iniciadores utilizados numa mesma reação, sendo um para sequência selvagem e outro para a sequência mutada, com homologia para as fitas distintas da molécula a ser amplificada. Os outros dois iniciadores são desenhados para amplificar um fragmento controle da reação, resultando em amplificação, independentemente de haver mutação ou não (YE et al., 2001). Os produtos desta reação podem apresentar sequências com ou sem o alelo da mutação, podendo ainda diferenciar se o genótipo resultante é homocigoto ou heterocigoto. Niciura et al. (2012) utilizou esta metodologia para detectar a presença de SNP no códon 200 de *H. contortus*. A reação de ARMS PCR, realizada como duas reações separadas para a detecção do alelo selvagem e mutado, foi também utilizada para a detecção dos SNPs nos códons 167 e 200 de *A. caninum* (FURTADO et al., 2014;

FURTADO & RABELO, 2015a) e a Tetraprimer ARMS-PCR foi utilizada para a busca do SNP no códon 198 de *A. caninum* (FURTADO et al., 2016).

PCR-RFLP é uma técnica que consiste na amplificação pela PCR de uma região do DNA contendo a sequência de interesse, com subsequente digestão deste fragmento utilizando enzimas endonucleases de restrição. A presença de algum sítio de restrição pode estar presente ou não na região de interesse. Caso esteja presente, a mutação ou a ausência da mutação pode criar ou extinguir o sítio para uma determinada enzima. Essas endonucleases normalmente são formadas por quatro a seis pares de bases e, após o corte no local específico da fita de DNA, geram fragmentos que podem ser separados por tamanho após eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (PAVAN & MONTEIRO, 2014). Tiwari et al. (2006) detectou polimorfismos relacionados à resistência em *H. contortus* utilizando essa técnica.

Para a pesquisa de mutações utilizando as técnicas de PCR e suas variações, o DNA genômico da região alvo é amplificado e posteriormente realizado o sequenciamento ou pirosequenciamento, para a detecção das mutações. No sequenciamento, pelo método automatizado de Sanger, após a desnaturação da dupla fita, didesoxinucleotídeos marcados com compostos fluorescentes são incorporados à cadeia de DNA, a qual é sintetizada pela DNA polimerase. Os didesoxiribonucleotídeos são nucleotídeos modificados que não possuem o grupo hidroxila livre no carbono 3' da pentose. Após incorporação de um didesoxiribonucleotídeo, o próximo nucleotídeo não tem onde se ligar e a replicação é interrompida, formando vários fragmentos de DNA. Os fragmentos de DNA são lidos em um sequenciador e a sequência é analisada para a presença ou ausência de SNPs relacionados à resistência.

O pirosequenciamento é uma técnica na qual a síntese de DNA ocorre através de um complexo de reações enzimáticas, o qual se baseia na detecção da liberação de pirofosfato quando um novo nucleotídeo é incorporado em uma cadeia crescente de DNA através da DNA polimerase. Cada pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia, é convertido em ATP pela ação da enzima ATP sulfúrilase. Em seguida o ATP formado é utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz capturado por uma câmera acoplada ao sistema, gerando um pirograma que será decodificado por softwares especializados, resultando numa sequência de nucleotídeos (CARVALHO & SILVA, 2010; HARRINGTON et al., 2013).

Vários trabalhos utilizam essas técnicas para pesquisas de polimorfismos relacionados à mutação gênica e resistência a medicamentos. A técnica do pirosequenciamento já foi descrita para detectar SNPs associados à resistência aos BZs nos nematódeos de importância



veterinária *Cooperia oncophora*, *Ostertagia ostertagi*, *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis*, bem como para parasitos humanos, entre eles *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *N. americanus* e *A. duodenale* (DIAWARA et al., 2009; DIAWARA et al., 2013a; DEMELER et al., 2013b; RAMÜNKE et al., 2016; YILMAZ et al., 2017).

A técnica de PCR SmarthAmp2 consiste na amplificação isotérmica mediada por LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*). É um método de amplificação de DNA de um único passo, no qual geralmente as reações ocorrem num intervalo aproximado de 60 minutos a uma temperatura de 60 °C. Durante a reação ocorre liberação do subproduto pirofosfato de magnésio que se acumula e provoca turbidez de reação, que pode ser monitorada visualmente usando uma variedade de indicadores metálicos, como calceína, azul de hidroxinaftol ou corantes como o SYBR green I, que apresenta mudanças na intensidade de fluorescência durante a reação. Mutações nos genes da  $\beta$ -tubulina em *N. americanus*, *T. trichiura* e *A. lumbricoides* já foram analisadas por esse método (RASHWAN et al, 2017). Rashwan et al. (2017) relatam que os ensaios de detecção colorimétrica são rápidos, sensíveis e altamente específicos, com potencial para aplicação em situações com recursos limitados. Porém, esta técnica só possibilita a análise de um SNP por reação e demanda o envolvimento de um grande número de iniciadores, o que pode fazer com que a padronização da técnica para diferentes espécies não seja bem-sucedida.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os mecanismos moleculares de resistência aos BZs estão bem estabelecidos para nematódeos parasitos de ruminantes. Contudo, na medicina humana são poucos os trabalhos que discutem esse tema, principalmente em relação aos geo-helminhos, como *A. lumbricoides*. É possível que o tratamento periódico em massa com BZs em humanos resulte na seleção de cepas resistentes. Os trabalhos na literatura que tentaram identificar as mutações em geo-helminhos ainda são restritos tanto à amostragem quanto à abrangência geográfica. Todavia, já foi relatada uma eficácia reduzida desses fármacos após tratamento em massa periódico em alguns estudos, embora nenhum trabalho analisando a presença de polimorfismos associados à resistência aos BZs tenha sido ainda realizado no Brasil.

As análises moleculares possibilitam a identificação mais precoce do estabelecimento ou do aumento da frequência de polimorfismos relacionados à resistência. A detecção de marcadores genéticos associados com resistência aos fármacos pode servir de estímulo para o desenvolvimento de novas formulações anti-helmínticas.

Este trabalho faz parte de um projeto abrangente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para a análise de polimorfismos associados à resistência aos BZs nos geo-helminhos *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e ancilostomídeos. Essa dissertação se concentrou na análise dos polimorfismos para a espécie *A. lumbricoides*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- Realizar uma varredura molecular de SNPs em *A. lumbricoides* associados à resistência aos BZs.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de PCR-RFLP para as mutações nos códons 167 e 198 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo-1 de *A. lumbricoides*;
- Realizar uma varredura molecular para a presença de SNPs para os códons 167 e 198 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo-1 de *A. lumbricoides*, utilizando as técnicas de PCR, *Nested*-PCR e PCR-RFLP, para amostras oriundas de pacientes provenientes de seis diferentes localidades brasileiras;
- Validar o teste molecular padronizado pelo sequenciamento de 10% das amostras analisadas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Considerações éticas

Amostras com resultados laboratoriais positivos para pesquisa de ovos de *A. lumbricoides* foram encaminhadas pelos laboratórios parceiros, constando na identificação número da amostra, data de coleta e cidade de origem. O nome do paciente foi subtraído e o Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) dispensou o termo de consentimento livre e esclarecido, conforme projeto aprovado sob o número de protocolo 61047216.7.0000.5149.

### 4.2. Obtenção de ovos

Os ovos utilizados neste trabalho são oriundos de diferentes localidades brasileiras. Amostras de fezes de pacientes foram coletadas dos estados de Minas Gerais (n = 4), Bahia (n = 7), Ceará (n = 16), Maranhão (n = 15), Piauí (n = 10) e Tocantins (n = 12), totalizando 64 pacientes. Estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Molecular da UFMG, onde foram processadas. As amostras foram identificadas pela sigla AL, de *A. lumbricoides*; seguida do número do paciente e da identificação da origem, por exemplo: AL01CE ovo 1; AL13BA ovo 21; AL05PI ovo 8, e assim por diante, de modo que a sigla CE foi indicada para amostras do Ceará, BA para amostras da Bahia, TO para amostras do Tocantins, PI para amostras do Piauí, MA para amostras do Maranhão e MG para amostras de Minas Gerais.

As fezes foram diluídas em água milli-Q, em volume aproximado de 10 ml, e filtradas em um tubo Falcon de 15 ml. As amostras foram centrifugadas por 1 min a 200 g e desprezado o sobrenadante. O sedimento foi novamente lavado por três vezes com água milli-Q, em volume de 5 ml e centrifugado por 1 min a 200 g. Por fim, as amostras foram lavadas com 2 ml éter etílico mais 3 ml de água milli-Q, através centrifugação com os mesmos parâmetros citados anteriormente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento transferido para um tubo do tipo eppendorf de 1,5 ml.

Os sedimentos foram analisados em microscópio óptico no aumento de 10x para visualização dos ovos. Em duas amostras do estado do Maranhão não foi visualizado nenhum ovo e essas amostras foram descartadas. Três amostras do estado de Minas Gerais apresentaram ovos inférteis e alguns ovos férteis, possivelmente devido à solução nas quais estes ovos foram

coletados, com alta porcentagem de formol, o que diminuiu a viabilidade dos ovos. Porém, mesmo nessas condições, os ovos foram colocados para embrionamento.

Ao sedimento com ovos férteis, foram adicionados 500 µl de solução de hipoclorito de sódio a 5%, com tempo médio de 5 min, para facilitar a eliminação da membrana externa mamilonada e visualização interna do conteúdo dos ovos (larvas em formação). Após ser possível a visualização do interior do ovo (microscópio aumento 10x), a amostra foi lavada três vezes com 1 ml de água milli-Q, utilizando o mesmo protocolo de centrifugação anterior, adicionando à mesma 500 µl de ácido sulfúrico 0,2 N, seguido por incubação em banho-maria (30° C por aproximadamente 30 dias) até se obter o embrionamento dos ovos e o desenvolvimento de larvas.

#### 4.3. Obtenção do DNA genômico a partir de ovos individuais

Após o período de embrionamento dos ovos, o sedimento foi lavado por três vezes com 1 ml de água milli-Q, seguido por centrifugação a 200 g por 1 min. Em seguida, foram acrescentados 500 µl de hipoclorito de sódio 1% ao sedimento, de maneira que o material foi monitorado ao microscópio até que a membrana intermediária, que reveste o ovo, começasse a se desintegrar, com tempo aproximado de 5 min. Após esse período, o material foi lavado com água por três vezes, conforme descrito acima, para retirar a solução de hipoclorito.

Os ovos foram separados individualmente com o auxílio de uma pipeta em um volume final de 2µl e transferidos para tubos do tipo eppendorf de 0,6 ml contendo 20 µl de solução de tampão de lise (50 mM de KCl, 10 mM de Tris pH 8.3, MgCl 22,5 mM, 0,45% de Nonidet e Proteinase K 100 mg/ml) (LAKE et al., 2009; DIAWARA et al., 2013b). Os ovos foram incubados por 2 h a 56 °C e posteriormente a 95 °C por 20 min, para o isolamento do DNA genômico e inativação da proteinase K, respectivamente, uma vez que essa enzima pode inativar a DNA polimerase na reação de PCR. O DNA obtido nesta solução foi usado diretamente nas reações de PCR, e os tubos foram armazenados a 4 °C até o momento do uso.

#### 4.4. Construção dos controles mutados e selvagens

Os controles utilizados nesse trabalho foram sintetizados artificialmente para os códons 167, 198 e 200 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides*, pela bolsista de pós-doutorado e coorientadora desse projeto Dra. Luciana Werneck Zuccherato.

Para síntese do controle do alelo sem mutação (controle selvagem) foi realizada uma primeira reação de PCR utilizando DNA genômico para amplificação de pequenos fragmentos que flanqueiam as regiões dos SNPs nas posições 167, 198 e 200 no gene da  $\beta$ -tubulina. Para o desenho dos *primers* foi utilizada a ferramenta disponível no programa *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), a partir de sequências depositadas no banco de dados *Wormbase Parasite* (<http://parasite.wormbase.org/index.html>) de *A. lumbricoides* (PRJEB4950).

Para a PCR, utilizou-se 1  $\mu$ l de solução de DNA de *A. lumbricoides* em reações de 10  $\mu$ l contendo 1x *GoTaq® G2 Master Mix* (Promega, USA) e 0,2  $\mu$ M de cada *primer*, nas seguintes condições: 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C por 45 s, seguido por uma extensão final de 72 °C por 8 min. Foram utilizados os *primers* Al\_tub\_F e Al\_tub\_R, contendo os três códons de interesse (167, 198 e 200 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1). Foi realizada uma segunda PCR, com as mesmas condições da PCR anterior, utilizando os *primers* Al\_167\_F e Al\_200\_R. Os *primers* utilizados nas duas reações e os tamanhos dos amplicons estão representados no Quadro 1. Foi adicionada uma cauda com a sequência para os *primers* M13F e M13R nos *primers* para a reação de *nested*-PCR, no intuito de facilitar possíveis clonagens dos fragmentos. O produto da reação *nested*-PCR apresentou um tamanho maior do que a primeira reação em função dessa sequência extra.

**Quadro 1** – *Primers* utilizados nas reações de PCR e *nested*-PCR. A sequência em negrito representa a adição da cauda de M13.

| <i>Primers</i> | Sequência (5' – 3')   | Produto Esperado |
|----------------|---|------------------|
| Al_tub_F       | ATG TGA GAA AAT GCG GTC AT'                                     | 596              |
| Al_tub_R       | GGT TGA GGT CTC CGT ATG TG                                      |                  |
| Al_167_F       | <b>GTA AAA CGA CGG CCA GGC GGT CAT</b><br>AGT TTT CAG GGT TT    | 608              |
| Al_200_R       | <b>CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCC GTA</b><br>TGT GGG ATT TGT AAG C |                  |

O fragmento obtido foi clonado com o kit *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega, USA), o produto da ligação transformado em células da linhagem *XL1-blue* (Phoneutria, Brasil) e recuperado utilizando o kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega,

USA). Posteriormente foi realizado o sequenciamento para confirmação de ausência de mutações.

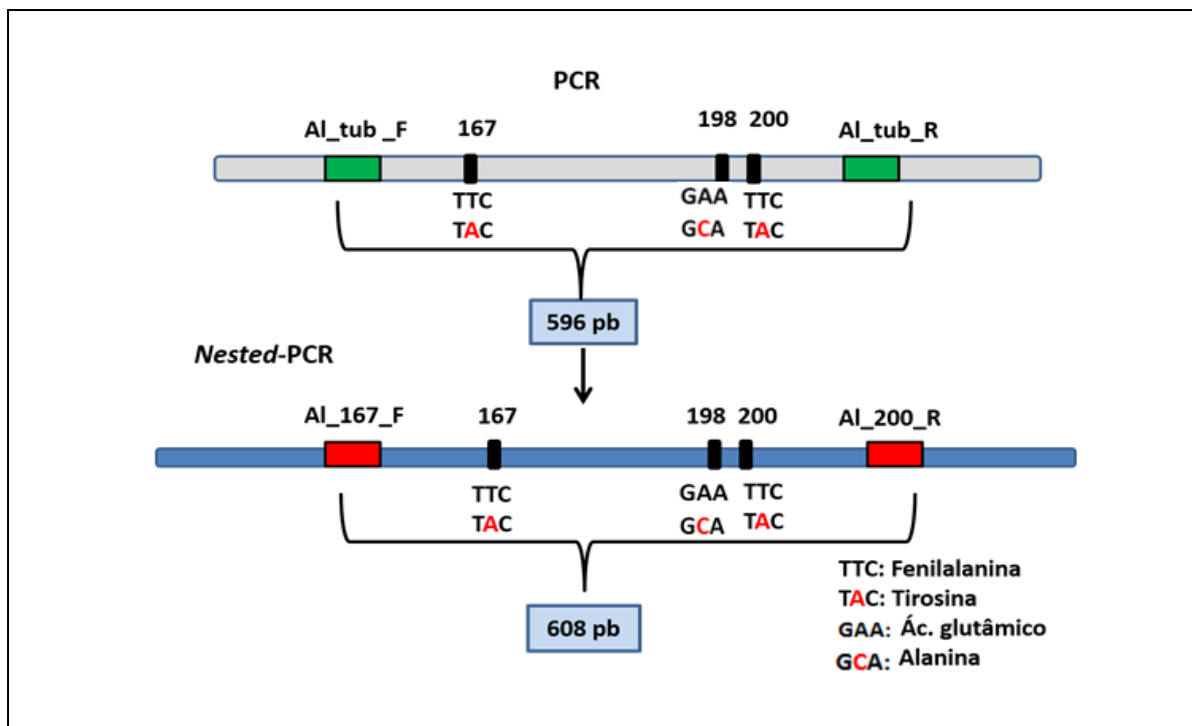
Para a síntese dos controles mutados foram realizadas reações de mutagênese sítio-dirigida através da técnica de Megaprimer-PCR, conforme protocolo descrito por Furtado et al. (2014). Os *primers* utilizados para a síntese de controles mutados para os códons 167 e 198 do gene da  $\beta$ -tubulina de *A. lumbricoides* foram utilizados conforme demonstrado no Quadro 2. Após a clonagem em vetor *pGEM®-T*, as amostras foram sequenciadas para confirmação das sequências e presença das respectivas mutações.

**Quadro 2** – *Primers* utilizados para a síntese de controles mutados da região de  $\beta$ -tubulina de *A. lumbricoides*, através da técnica de Megaprimer-PCR. As bases marcadas em negrito representam as mutações a serem inseridas nos controles, correspondentes aos alelos para os códons 167, 198 e 200. A primeira reação (*primers* A e B) corresponde à síntese do megaprimer, o qual, após a purificação do produto de PCR, foi utilizado como iniciador da segunda reação, juntamente com o *Primer C*.

| Reação I           |                            |          | Reação II    |          |              |
|--------------------|----------------------------|----------|--------------|----------|--------------|
| Primer A (5' – 3') |                            | Primer B | Produto (pb) | Primer C | Produto (pb) |
| Al_Mega_167_R      | AAC AAC TGA GTA CGA GCT CA | Al_tub_F | 146          | Al_tub_R | 596          |
| Al_Mega_198_F      | ACC GAT GCA ACC TTC TGC AT | Al_tub_R | 94           | Al_tub_F |              |
| Al_Mega_200_F      | ACC GAT GAA ACC TAC TGC AT | Al_tub_R |              | Al_tub_F |              |

#### 4.5. Realização de testes moleculares para detecção de mutações

As técnicas moleculares utilizadas nesta pesquisa foram a PCR, *Nested*-PCR e a PCR-RFLP. Após a obtenção do DNA, as amostras foram submetidas à PCR para amplificar fragmentos que flanqueiam as regiões dos SNPs nas posições 167, 198 e 200 no gene da  $\beta$ -tubulina de *A. lumbricoides*. Os *primers* utilizados na primeira reação (Al\_tub\_F e Al\_tub\_R) amplificaram parte do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1, de modo que o produto da primeira reação foi utilizado em nova amplificação *nested*-PCR, desta vez utilizando outro par de *primers* (Al-167F e Al-200R), contemplando nessa amplificação as duas regiões das mutações gênicas pesquisada, conforme esquematizado na Figura 4.



**Figura 4** – Posição de anelamento dos *primers* utilizados para a amplificação da região flanqueando os códons 167, 198 e 200 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *Ascaris lumbricoides*. Primeira reação, destaque em verde dos primers Al\_tub\_F e Al\_tub\_R, amplicon final de 596 pb (pares de base). Segunda reação, *Nested-PCR*, primers em destaque vermelho Al\_167\_F e Al\_200\_R, amplicon final de 608 pb (pares de base).

Para a primeira reação de PCR, com os *primers* Al\_tub\_F e Al\_tub\_R, o DNA de ovo único foi utilizado como molde em reações de volume final de 10 $\mu$ l, constando de 5 $\mu$ l de GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA), 0,2 $\mu$ l de cada *primer* (concentração final de 0,2 $\mu$ M/*primer*), 1 $\mu$ l de DNA (proveniente do tampão de lise) e água ultrapura necessária para completar 10  $\mu$ l. Foram utilizados três controles: um positivo selvagem não mutado (CNM), um positivo mutado (CM) e um controle negativo ou branco da reação (BR), para avaliar a presença de possíveis contaminantes, o qual teve o DNA substituído por água ultrapura. As amplificações ocorreram em termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Alemanha), obedecendo ao seguinte programa: 95 °C por 5 min para desnaturação inicial da dupla fita de DNA, 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 60 °C por 1min, 72 °C por 1 min e um passo final de extensão a 72 °C por 8 min. A segunda reação (*nested-PCR*) seguiu os mesmos parâmetros da amplificação anterior, porém utilizando os *primers* Al\_167\_F e Al\_200\_R. Os *primers* utilizados nas duas reações de PCR foram os mesmos utilizados para a construção dos controles, conforme descrito no tópico 4.4.

Após as duas reações, as amostras foram corridas em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5x e coradas com GelRed™ (Biotium, USA) para confirmar a amplificação do

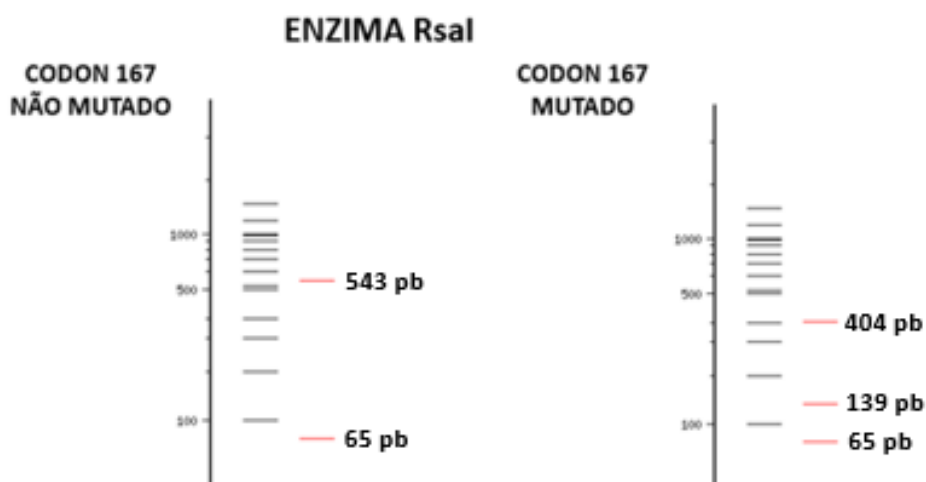


fragmento esperado. Foi dispensado 5 µl de marcador de peso molecular na primeira canaleta (1Kb DNA ladder, Invitrogen). Os controles positivo e negativo e as amostras foram aplicadas nas canaletas posteriores do gel utilizando 3 µl de DNA amplificado (ou BR) diluídos em 1 µl de tampão de corrida e corados com GelRed™ (Biotium, USA). O gel foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta e as imagens foram fotografadas, analisadas e arquivadas.

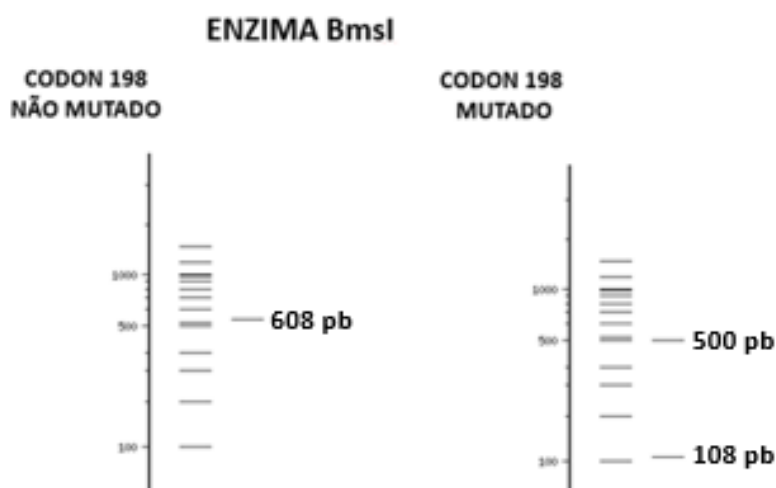
#### 4.6. PCR-RFLP

Após amplificação do DNA pelas duas reações de PCR, as amostras foram submetidas à técnica de PCR-RFLP, que envolve a digestão dos produtos de PCR com endonucleases de restrição. Para a escolha das enzimas de restrição utilizadas, a sequência contendo o fragmento de 608 pb obtido da reação de *nested*-PCR foi submetida ao programa NEB cutter V2.0, da *New England Biolabs* (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), para determinação das melhores enzimas de restrição a serem usadas para a diferenciação dos alelos selvagem e mutado. Essa análise foi realizada para ambos os códon, 167 e 198. Foi demonstrado pelo mapa de restrição dos fragmentos que a enzima *RsaI* poderia ser usada para discriminar entre o alelo mutado e o selvagem para o códon 167 e a enzima *BmsI* para o códon 198.

A enzima *RsaI*, específica para o códon 167, na presença de alelos mutados corta o DNA amplificado em dois locais, produzindo três fragmentos, um com 65 pb, um com 139 pb e outro com 404 pb. Quando não há mutação, a enzima corta o DNA em um local, produzindo dois fragmentos, um de 65 pb e outro com 543 pb. A enzima *BmsI*, específica para o códon 198, na presença de alelos mutados corta o DNA em um local produzindo dois fragmentos, um de 108 pb e outro de 500 pb. Quando não há mutação, o DNA não é cortado, permanecendo um único fragmento de 608pb. As Figuras 5 e 6 mostram uma simulação do perfil do gel para cada tipo de enzima.



**Figura 5** – Perfil do gel após PCR-RFLP utilizando a enzima *RsaI* para análise do códon 167 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides*. A ausência de mutação gera dois fragmentos, 543 pb e 65 pb, enquanto a presença de mutação gera 3 fragmentos, 404 pb, 139pb e 65 pb; (modificado de <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).



**Figura 6** – Perfil do gel após PCR-RFLP utilizando a enzima *BmsI* para análise do códon 198 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides*. Na ausência de mutação não ocorre clivagem do DNA gerando um fragmento único de 608 pb, enquanto que a presença de mutação gera 2 fragmentos, 500 pb e 108 pb; (modificado de <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

O produto final da reação de RFLP foi de 15  $\mu$ l, sendo 1,5  $\mu$ l de tampão da enzima (concentração final 1x), 1,5  $\mu$ l de soro bovino fetal (BSA, com concentração final de 10  $\mu$ g/ $\mu$ l), 0,1  $\mu$ l de enzima *RsaI* (10 u/ $\mu$ l, Promega), concentração final 1 unidade de enzima, ou *BmsI* (10u/ $\mu$ l, Invitrogen), com concentração final 1 unidade de enzima, 3  $\mu$ l do produto da *nested*-PCR e volume de água ultrapura necessário para completar 15  $\mu$ l. Foram utilizados quatro controles: um positivo selvagem não mutado (CNM), um positivo mutado homocigoto (CM), um positivo mutado heterocigoto (CH, mistura dos dois controles) e um controle negativo que

teve o DNA substituído por água ultrapura (BR). Para ação da enzima de restrição, as amostras foram submetidas a uma temperatura de 37 °C durante 15 min. Decorrido o tempo da reação, as amostras foram corridas em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 0,5X corado com Gel red (Biotium, USA), para a visualização de fragmentos resultantes da digestão pelas enzimas de restrição. Na primeira canaleta do gel foi dispensado 5µl do marcador molecular (100 pb DNA ladder, Invitrogen) e posteriormente os controles positivos, as amostras com DNA genômico dos ovos e por fim o controle negativo, sendo 10 µl em cada canaleta, diluídos em 2 µl de tampão da amostra 6x. A leitura do gel foi realizada em transluminador de luz ultravioleta e as imagens foram fotografadas, analisadas e arquivadas.

#### 4.7. Sequenciamento

Para a validação dos resultados obtidos na PCR- RFLP da região dos códons 167 e 198 do gene da  $\beta$ -tubulina de *A. lumbricoides*, foram sequenciadas 52 amostras, de um total de 601 reações de digestão para cada códon. Estas amostras selecionadas incluíram as amostras com perfil claramente de mutação visualizada no gel (20 amostras: 14 com perfil de mutação para o códon 167 e 6 para o códon 198), outras dez amostras que apresentaram perfis de digestão não esperados (6 com perfil não esperado para o códon 167 e 4 para o códon 198) e 22 amostras aleatórias (sem perfil de mutação) para padronização da técnica de PCR-RFLP. Todas estas amostras foram sequenciadas para a validação da técnica e para observar se os perfis atípicos poderiam ser devido a digestões parciais.

Para o sequenciamento, foi realizada a reação de *nested*-PCR em um volume maior (2 reações de 25µl). Para produtos de PCR, foram utilizados os *primers* com sequências de M13 *forward* e *reverse* nas extremidades 5'. O DNA foi purificado utilizando o kit GFX® PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Reino Unido) conforme protocolo descrito pelo fabricante. O DNA obtido foi quantificado no aparelho Nanodrop e encaminhado ao laboratório Myleus para sequenciamento, de acordo com orientações prévias (volume total de 7,5 µl, sendo a concentração do DNA de 30 ng para cada 100 pares de bases, 1 µl de *primer* e água ultrapura para completar o volume). Os tubos do tipo eppendorf foram preparados em duplicata, um para cada *primer*. O tamanho do fragmento a ser sequenciado era de 608 pb, portanto, foram utilizados para o sequenciamento 180 ng do produto amplificado. Os resultados do sequenciamento do laboratório Myleus foram interpretados pelo programa FinchTV (Geospiza, USA). Outra parte das amostras foi sequenciada no Laboratório de Biodiversidade e Evolução

Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, de acordo com o protocolo descrito abaixo.

Os produtos de PCR foram precipitados com solução de PEG (polietilenoglicol) (Promega, USA). Os produtos da PCR (25 µl) foram transferidos para tubos individuais de 500 µl e foi adicionado a cada tubo o mesmo volume de solução de PEG 20% (NaCl 2,5 M + PEG 6000 20%) e estes foram submetidos a vórtex. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C por no mínimo 15 min. Logo após, foram centrifugados por 15 min a 13000 g. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com pipeta e adicionados 125 µl de etanol 80% gelado. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 13000 g. Novamente o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com pipeta e a amostra foi lavada com etanol 80% gelado e centrifugada, com descarte do sobrenadante, tentando descartar o máximo possível do etanol restante. Os tubos foram invertidos e incubados à temperatura ambiente por aproximadamente 10 min ou até não restarem vestígios de etanol no tubo. Os DNA foram ressuspensos em 20 µl de água milli-Q e dosados no aparelho Nanodrop.

Em placa própria para sequenciamento, as amostras foram dispostas em duplicatas para os *primers forward* e *reverse*. As amostras com boa concentração na dosagem do DNA (média 180 ng/µl) foram preparadas com 2 µl do DNA, 3 µl de água milli-Q e 1 µl de cada *primer* em cada poço. As amostras consideradas de baixa concentração na dosagem do DNA (média 50 ng/µl) foram preparadas com 5 µl do DNA e 1 µl de cada *primer* em cada poço. Em seguida, foram adicionados 4 µl de reagente BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Estados Unidos) em cada poço. A placa foi vedada e submetida a uma rápida centrifugação e posteriormente colocada em termociclador com o seguinte programa: 96 °C por 1 min, 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. O ciclo se repetiu por 25 vezes. Ao término, a placa foi envolvida em papel alumínio e armazenada no freezer até o dia seguinte, quando foi realizado o processo de precipitação do DNA.

Para a precipitação de nucleotídeos não incorporados, em 10 µl de reação de sequenciamento foram adicionados 1 µl de acetato de amônio (7,5 M) e 2,5 volumes de etanol absoluto (28 µl), agitados vigorosamente em vórtex. Foi colocado um selante na placa, seguida de uma incubação por 15 min à temperatura ambiente (enrolada em alumínio devido a presença de nucleotídeos marcados). A placa foi centrifugada por 45 min a 4000 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa, com posterior adição de 150 µl de etanol 70%. A placa foi centrifugada novamente por 15 min a 4000 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa e a mesma foi mantida invertida. Foi dado um *spin down* com a placa invertida a 4000 g por 1 min e adicionados 10 µl de tampão

da amostra (70% de formamida, 1mM EDTA). A placa foi vortexada vigorosamente, para dissolver o pellet de DNA, seguida de rápida centrifugação. Após esse processo, a placa foi encaminhada para sequenciamento e os resultados foram avaliados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Amplificação dos ovos únicos por PCR e *Nested*-PCR

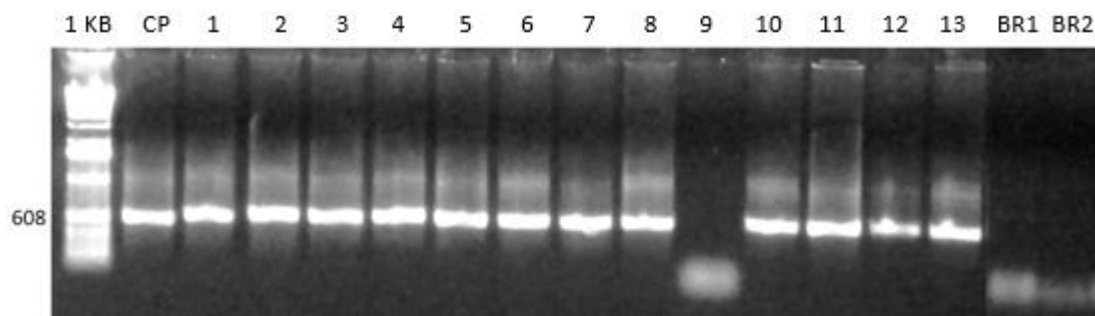
As amostras de fezes contendo os ovos utilizados neste trabalho, oriundos dos estados de Minas Gerais (n = 4), Bahia (n = 7), Ceará (n = 16), Maranhão (n = 15), Piauí (n = 10) e Tocantins (n = 12), totalizando 64 amostras de pacientes dos seis estados brasileiros, foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Molecular, onde foram processadas de acordo com metodologia já descrita anteriormente. Duas amostras do estado do Maranhão foram desprezadas porque, após análise microscópica, não foi visualizado nenhum ovo. Portanto, o número final de pacientes foi de 62. Para as reações de *nested*-PCR em que as amplificações não foram satisfatórias, foram selecionados novos ovos de um mesmo paciente e novas reações foram realizadas. Inicialmente, foram realizadas 864 análises de PCR e *nested*-PCR a partir de ovos únicos, distribuídos entre todas as amostras, numa média aproximada de 15 ovos por amostra de paciente. A Tabela 1 sumariza o número de pacientes por estado e a média do número de ovos analisados por estado.

**Tabela 1** – Número de amostras de pacientes e ovos analisados por estado.

| Estado de origem | Número de pacientes | Número de ovos analisados por paciente | Número de ovos analisados por Estado |
|------------------|---------------------|--|--------------------------------------|
| Bahia            | 07                  | 12-19                                  | 105                                  |
| Ceará            | 16                  | 13-15                                  | 217                                  |
| Maranhão         | 13                  | 13-16                                  | 181                                  |
| Minas Gerais     | 04                  | 9-18                                   | 55                                   |
| Piauí            | 10                  | 13-18                                  | 144                                  |
| Tocantins        | 12                  | 13-14                                  | 162                                  |
| <b>Total</b>     | <b>62</b>           |  | <b>864</b>                           |

Na Figura 7 é apresentado um gel representativo do resultado da *nested*-PCR com o fragmento de tamanho esperado de 608 pb. Este fragmento contém todos os três códons de interesse, no que tange a possível presença de SNPs associados com resistência aos BZs. Nesta reação, foi incluso o plasmídeo contendo o fragmento de 608 pb clonado, como controle positivo da reação. Dentre todas as *nested*-PCR realizadas (864) foram selecionadas 601 amostras para realização da reação de PCR-RFLP para os códons 167 e 198. Foram utilizadas, quando possível, dez amostras de ovos individuais por paciente. As amostras analisadas na

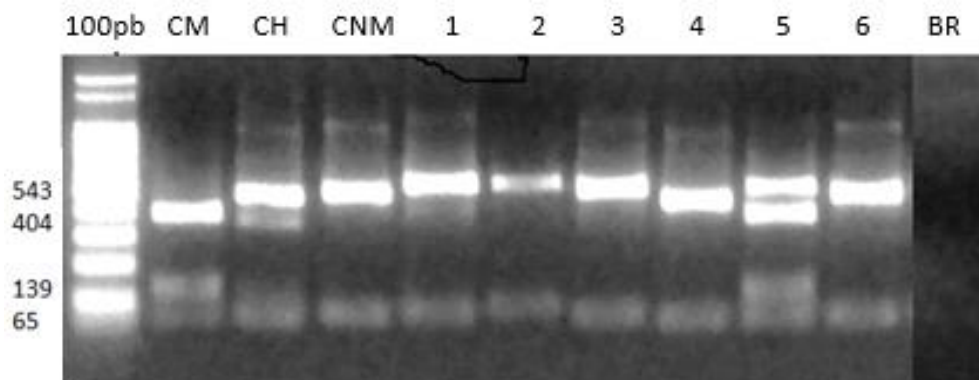
Figura 7 correspondem à amostra AL04MA. Com exceção da amostra do ovo de número 9, as demais amplificaram adequadamente.



**Figura 7** – Gel de agarose 1% representativo da *nested*-PCR para análise de SNPs no gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides*. Primeira canaleta: Marcador de Peso Molecular 1KB, CP: controle positivo (plasmídeo 608pb), 1-13: amostras AL04MA, BR1: branco oriundo da primeira reação, BR2: branco da segunda reação.

## 5.2. PCR-RFLP

Das 864 amostras submetidas às reações de PCR e *nested*-PCR, 601 foram selecionadas e submetidas às reações de digestão com as enzimas para os códons 167 e 198. Para o códon 167, foi utilizada a enzima *RsaI*. Em todos os géis foram aplicados produtos de reações de digestão para o controle mutado (CM), que apresenta o SNP no códon 167; controle selvagem não mutado (CNM), e controle heterozigoto (CH) resultante da amplificação conjunta de CNM + CM, correspondendo a presença de alelos heterozigotos. Conforme gel representativo para a digestão da enzima de restrição *RsaI* (Figura 8), o fragmento contendo a mutação no códon 167 (CM) apresenta três fragmentos de DNA no gel: 65, 139 e 404 pb. O controle heterozigoto (CH) apresenta quatro fragmentos de DNA no gel: 65, 139, 404 e 543 pb. Os controles selvagens normais (CN), quando submetidos à ação da enzima, são clivados em apenas um local do fragmento, resultando em duas bandas (65 e 543 pb). Na Figura 8, apenas a amostra 5 apresentou mutação, estando presente os dois alelos, o mutado e o não mutado.



**Figura 8** – Resultado demonstrativo da RFLP-PCR para varredura de SNPs no códon 167 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides*. Amostras individuais de DNA genômico de ovo único do nematódeo, após duas PCRs, foram submetidas à digestão com enzima de restrição (*RsaI*). Primeira canaleta: marcador de Peso Molecular (100pb); seguidas do controle positivo com mutação no códon 167 (CM) (plasmídeo com mutação); controle positivo heterozigoto (CH) (mix de plasmídeos com e sem mutação); controle positivo selvagem não mutado (CNM) (plasmídeo não mutado); canaletas enumeradas de 1 a 6: produtos de *nested*-PCR de ovo único após PCR-RFLP. BR: Branco. Fragmentos esperados (pb): homozigoto sem mutação: 543 e 65, homozigoto com mutação: 404, 139 e 65, heterozigoto: 543, 404, 139 e 65. A imagem mostra um gel de agarose a 1,5% corado com GelRed™ (Biotium, USA).

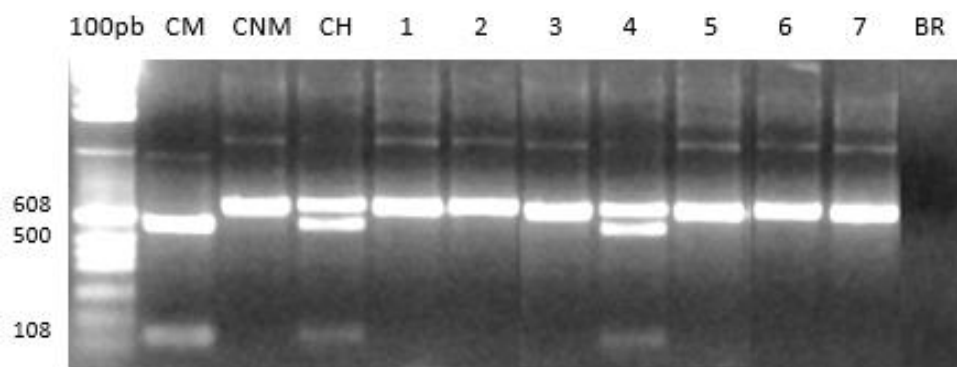
Os resultados das reações de PCR-RFLP para ovo único de *A. lumbricoides* com utilização da enzima *RsaI* apresentaram 14 perfis sugestivos de mutações: cinco em homozigose (AL03BA ovo 1, AL03BA ovo 2, AL27BA ovo 4, AL27BA ovo 7 e AL05TO ovo 6) e nove em heterozigose (AL07CE ovo 9, AL01MA ovo 2, AL11MA ovo 10, AL03TO ovo 4, AL03TO ovo 6, AL04TO ovo 2, AL08TO ovo 5, AL10TO ovo 2 e AL12TO ovo 5).

Além destas amostras, outras seis digestões apresentaram perfis de digestão distintos do esperado. Algumas amostras apresentaram um fragmento de tamanho aproximado de 139 pb, mas não apresentaram o fragmento de 404 pb, ou apresentaram outro perfil de digestão, não sendo característico dos perfis de homozigose ou de heterozigose (dados não mostrados).

Para o códon 198 também foram realizadas 601 reações de digestão utilizando a enzima *BmsI*. Os produtos das reações foram corridos em gel de agarose a 1,5%. Um gel demonstrativo do perfil de digestão é apresentado na Figura 9. Foram realizadas reações de digestão para o controle mutado (CM), que apresenta o SNP no códon 198; controle selvagem não mutado (CN) e controle heterozigoto (CH) resultante da amplificação conjunta de CN + CM, correspondendo à presença de alelos heterozigotos. Conforme mostrado no gel representativo para a digestão da *BmsI*, o fragmento contendo a mutação no códon 198 (CM) é clivado uma vez, originando duas bandas de DNA, uma de 108 pb e outra de 500 pb (homozigoto). Para as amostras que não apresentam mutações neste códon, o DNA amplificado não é digerido e o gel

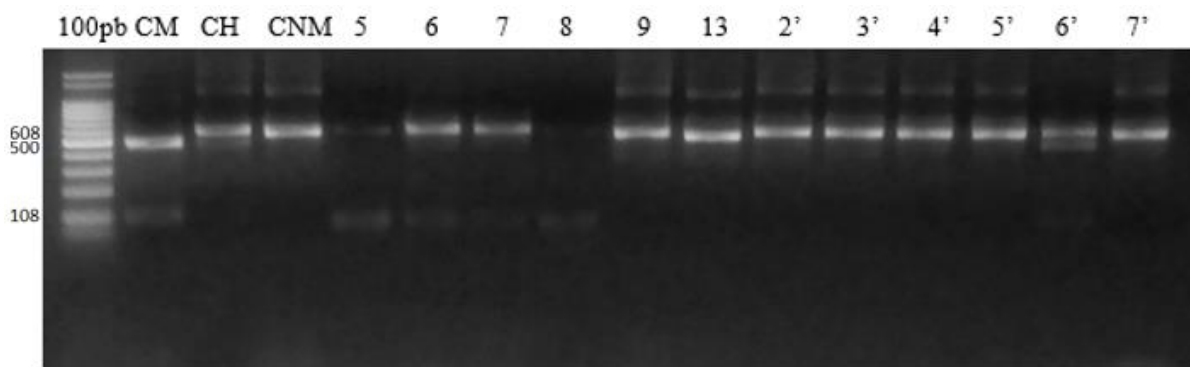


apresenta apenas uma banda de DNA com 608 pb. As amostras com perfil heterozigoto apresentam três fragmentos no gel, um de 608pb, um de 500 e um de 108 pb. A canaleta quatro apresenta um resultado de perfil heterozigoto para o SNP no códon 198, correspondente à amostra AL13BA ovo 2.



**Figura 9** – Resultado demonstrativo da RFLP-PCR para varredura de SNPs no códon 198 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides*. Amostras individuais de DNA genômico de ovo único do nematódeo, após duas PCRs foram submetidas à digestão com enzima de restrição (*BmsI*). Primeira canaleta marcador de Peso Molecular 100pb; seguidas do controle positivo com mutação no códon 198 CM (plasmídeo com mutação); controle positivo selvagem não mutado CNM (plasmídeo sem mutação); controle positivo heterozigoto (CH) (mix de plasmídeos com e sem mutação); canaletas enumeradas de 1 a 7: produtos de *nested* PCR de ovo único após digestão por PCR-RFLP. BR: Branco. Fragmentos esperados (pb): homozigoto sem mutação: 608, homozigoto com mutação: 500 e 108, heterozigoto: 608, 500 e 108. A imagem mostra gel de agarose a 1,5%, corado com GelRed™ (Biotium, USA).

Os resultados das reações de PCR-RFLP com utilização da enzima *BmsI* demonstraram a presença de SNPs para seis amostras analisadas. Foram encontrados três ovos com mutações homozigóticas no códon 198, duas amostras do estado do Maranhão (AL15MA ovos 21 e 22) e uma amostra do estado do Tocantins (AL05TO ovo 8). Foram encontrados três SNPs para alelos heterozigotos, uma amostra do estado da Bahia (AL13BA ovo 2) e duas amostras do estado do Ceará (AL13CE ovo 5 e AL13CE ovo 6). Da mesma forma que ocorreu para o códon 167, foram também observados quatro perfis de digestão atípicos para o códon 198. A Figura 10 ilustra estes perfis.



**Figura 10** – Resultado demonstrativo da PCR-RFLP para varredura de SNPs no códon 198 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides* com resultados atípicos. Primeira canaleta: marcador de peso molecular (100pb), seguido do controle mutado (CM), controle heterozigoto (CH) (mix de plasmídeo mutado e não mutado), Controle não mutado (CNM), canaletas de 5-13: amostras provenientes de AL09CE, canaletas de 2'-7': amostras provenientes de AL13CE.

A Figura 10 demonstra exemplo de perfil de digestão para o códon 198 que apresentou uma banda com intensidade bem fraca e semelhante ao fragmento de 108 pb, entretanto a banda maior é equivalente ao perfil de não mutado, ou seja, equivalente ao tamanho de 608 pb. Estas amostras presentes nas canaletas 5 a 7 foram submetidas ao sequenciamento e não foram observadas as mutações para o códon 198. No mesmo gel, é apresentada a canaleta 6' que corresponde ao ovo 6 da amostra ALCE13, para a qual a mutação para o codon 198 foi confirmada, por sequenciamento, com um perfil de heterozigose. Os resultados das análises através da ação das enzimas *RsaI* (códon 167) e *BmsI* (códon 198), bem como o número de amostras apresentando perfil mutado/sugestivo de mutações por estado estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Total de reações de PCR-RFLP realizadas e corridas em gel de agarose 1,5%. Compilação de resultados das reações de PCR-RFLP.

| Estado de origem | Análises dos códons 167 e 198 | Perfil mutado ou distinto do esperado (Códon 167) | Perfil mutado ou distinto do esperado (Códon 198) | Total     |
|------------------|-------------------------------|---|---|-----------|
| Bahia            | 70                            | 04  | 01  | 05        |
| Ceará            | 160                           | 01  | 02  | 03        |
| Maranhão         | 130                           | 02  | 02  | 04        |
| Minas Gerais     | 21                            | 0   | -   | 0         |
| Piauí            | 100                           | 0   | 0   | 00        |
| Tocantins        | 120                           | 07  | 01  | 08        |
| <b>Total</b>     | <b>601</b>                    | <b>14</b>   | <b>06</b>   | <b>20</b> |

### 5.3. Sequenciamento das amostras apresentando perfil mutado ou perfil distinto do esperado

Todas as amostras que nas reações de PCR-RFLP que apresentaram um perfil mutado de heterozigose ou homozigose para os códons 167 ou 198 foram sequenciadas para confirmação dos SNPs. Foram sequenciadas também outras amostras para a validação da técnica. No total, foram produzidas 52 sequências de boa qualidade. A Tabela 3 mostra os resultados das sequências obtidas.

**Tabela 3** – Resultados dos sequenciamentos mostrando as alterações encontradas em comparação com as sequências dos controles mutado e não mutado. Na parte cinza da Tabela encontram-se as sequências que foram produzidas para a construção dos plasmídeos controles. No topo da Tabela está demonstrada a alteração que ocorre caso o códon seja mutado e o número na sequência que corresponde a cada códon. “Al pool” significa amplificação realizada a partir de um pool de ovos; “Al WT” corresponde à sequência do plasmídeo construído com a sequência selvagem ou sem mutação; “Al WT 18/07” corresponde a outra construção realizada com a sequência sem mutação; “167\_1”, “167\_2”, “198\_1” e “198\_2” correspondem aos controles construídos para estes códon contendo mutações.

| Amostra              | Ovo |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            | 167        |            |  |
|----------------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|
|                      |     | 107<br>A>G | 137<br>T>A | 148<br>C>A | 176<br>A>G | 207<br>G>A | 208<br>A>G | 273<br>T>C | 276<br>T>C | 335<br>T>C | 355<br>G>A | 468<br>A>G | 503<br>C>T | 198<br>A>C | 200<br>T>C |  |
| Al pool              |     | AA         | TT         | CC         | AA         | AA         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| Al WT                |     | AA         | TT         | CC         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| Al WT_1807           |     | GG         | TT         | CC         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| 167_1                |     | AA         | AA         | AA         | AA         | GG         | AA         | TT         | TT         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| 167_2                |     | AA         | AA         | AA         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| 198_1                |     | AA         | TT         | CC         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | AA         | AA         | TT         | CC         | TT         |  |
| 198_2                |     | AA         | TT         | CC         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | AA         | AA         | TT         | CC         | TT         |  |
| Al 200 mut sem o A   |     | AA         | TT         | CC         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| Al 200 mut sem o A_2 |     | GG         | TT         | CC         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| Al both              |     | GG         | TT         | CC         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | TT         | CC         | CC         |  |
| AL01MA               | 2   | AA         | TA         | CA         | AA         | GA         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| AL11MA               | 10  | AA         | TA         | CA         | AA         | AG         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| AL15MA               | 21  | AA         | TT         | CC         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | AA         | AA         | TT         | CC         | TT         |  |
| AL15MA               | 22  | AA         | TT         | CC         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | AA         | AA         | TT         | CC         | TT         |  |
| AL03BA               | 1   | AA         | AA         | AA         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| AL03BA               | 2   | AA         | AA         | AA         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |
| AL13BA               | 2   | AG         | TT         | CC         | AA         | GG         | AA         | TT         | CC         | TT         | GA         | AA         | CT         | AC         | TT         |  |
| AL16BA               | 8   | AA         | TT         | CC         | AA         | GA         | AA         | TT         | CC         | TT         | GG         | AA         | CC         | AA         | TT         |  |

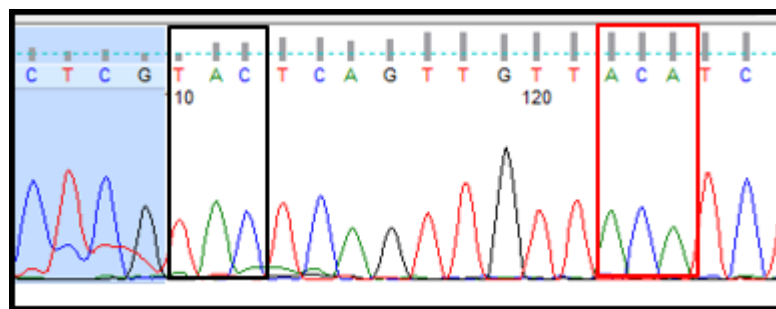
|                |            |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |            |            |
|----------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------|------------|
| AL21BA         | 7          | AA            | TT            | CC            | AA            | GA            | AA            | CT            | CT            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL27BA         | 4          | AA            | AA            | AA            | AA            | GG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL27BA         | 7          | AA            | AA            | AA            | GG            | GG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | GG            | CC            | AA            | TT            |            |            |
|                |            |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               | <b>167</b>    |               | <b>198</b> | <b>200</b> |
| <b>Amostra</b> | <b>Ovo</b> | <b>107</b>    | <b>137</b>    | <b>148</b>    | <b>176</b>    | <b>207</b>    | <b>208</b>    | <b>273</b>    | <b>276</b>    | <b>335</b>    | <b>355</b>    | <b>468</b>    | <b>503</b>    | <b>511</b>    | <b>516</b>    |            |            |
|                |            | <b>A&gt;G</b> | <b>T&gt;A</b> | <b>C&gt;A</b> | <b>A&gt;G</b> | <b>G&gt;A</b> | <b>A&gt;G</b> | <b>T&gt;C</b> | <b>T&gt;C</b> | <b>T&gt;C</b> | <b>G&gt;A</b> | <b>A&gt;G</b> | <b>C&gt;T</b> | <b>A&gt;C</b> | <b>T&gt;C</b> |            |            |
| AL01CE         | 12         | AA            | TT            | CC            | AA            | AG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL01CE         | 15         | AA            | TT            | CC            | AA            | AG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL07CE         | 9          | AA            | AT            | CA            | AA            | GG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL10CE         | 5          | GG            | TT            | CC            | AA            | GG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL10CE         | 3          | AA            | TT            | CC            | AA            | AG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL10CE         | 6          | AA            | TT            | CC            | AA            | AG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL10CE         | 8          | AA            | TT            | CC            | AA            | AA            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | GG            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL13CE         | 5          | AA            | TT            | CC            | AA            | GA            | GA            | TT            | CC            | TT            | GA            | AA            | CT            | AC            | TT            |            |            |
| AL13CE         | 6          | AA            | TT            | CC            | AA            | GG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GA            | AA            | CT            | AC            | TT            |            |            |
| AL14CE         | 1          | AA            | TT            | CC            | AA            | AG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GA            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL14CE         | 3          | GG            | TT            | CC            | AA            | GG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL14CE         | 8          | GG            | TT            | CC            | AA            | GG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
|                |            |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |            |            |
| AL03TO         | 2          | AA            | TT            | CC            | AA            | GA            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL03TO         | 3          | AA            | TT            | CC            | AA            | GG            | AA            | TT            | CC            | TC            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL03TO         | 4          | AA            | TT            | CC            | AA            | GG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL03TO         | 6          | AA            | TT            | CC            | AA            | GG            | AA            | TT            | CT            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL04TO         | 2          | AA            | TA            | AC            | AA            | GA            | AA            | TT            | CT            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL05TO         | 1          | AA            | TT            | CC            | AA            | AG            | AA            | TT            | CC            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL05TO         | 6          | AA            | AA            | AA            | AA            | GG            | AA            | TT            | TT            | TT            | GG            | AA            | CC            | AA            | TT            |            |            |
| AL05TO         | 8          | AA            | TT            | CC            | AA            | GG            | AA            | TT            | CC            | TT            | AA            | AA            | CT            | AC            | TT            |            |            |

|                |            |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
|----------------|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| AL05TO         | 9          | AG                    | TT                    | CC                    | AA                    | GG                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL05TO         | 11         | GG                    | TT                    | CC                    | AA                    | GG                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL07TO         | 10         | AA                    | TT                    | CC                    | AA                    | AA                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL08TO         | 5          | GG                    | TT                    | CC                    | AA                    | GG                    | AA                    | TT                    | CT                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL09TO         | 7          | GG                    | TT                    | CC                    | AA                    | GG                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
|                |            |                       | <b>167</b>            |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       | <b>198</b>            | <b>200</b>            |
| <b>Amostra</b> | <b>Ovo</b> | <b>107<br/>A&gt;G</b> | <b>137<br/>T&gt;A</b> | <b>148<br/>C&gt;A</b> | <b>176<br/>A&gt;G</b> | <b>207<br/>G&gt;A</b> | <b>208<br/>A&gt;G</b> | <b>273<br/>T&gt;C</b> | <b>276<br/>T&gt;C</b> | <b>335<br/>T&gt;C</b> | <b>355<br/>G&gt;A</b> | <b>468<br/>A&gt;G</b> | <b>503<br/>C&gt;T</b> | <b>511<br/>A&gt;C</b> | <b>516<br/>T&gt;C</b> |
| AL10TO         | 1          | AA                    | TT                    | CC                    | AA                    | AA                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL10TO         | 2          | AG                    | TT                    | CC                    | AA                    | GG                    | AA                    | TT                    | CT                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL10TO         | 6          | GG                    | TT                    | CC                    | AA                    | GG                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL11TO         | 7          | AA                    | TT                    | CC                    | AA                    | GA                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL11TO         | 9          | AA                    | TT                    | CC                    | AA                    | GA                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL12TO         | 5          | AA                    | TT                    | CC                    | AA                    | GG                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
|                |            |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| AL04PI         | 7          | AA                    | TT                    | CC                    | AA                    | AA                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL04PI         | 9          | AA                    | TT                    | CC                    | AA                    | AA                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL05PI         | 4          | AA                    | TT                    | CC                    | AA                    | AA                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
| AL05PI         | 8          | AA                    | TT                    | CC                    | AA                    | AA                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GG                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |
|                |            |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| AL02MG         | 18         | AA                    | TT                    | CC                    | AA                    | GG                    | AA                    | TT                    | CC                    | TT                    | GA                    | AA                    | CC                    | AA                    | TT                    |

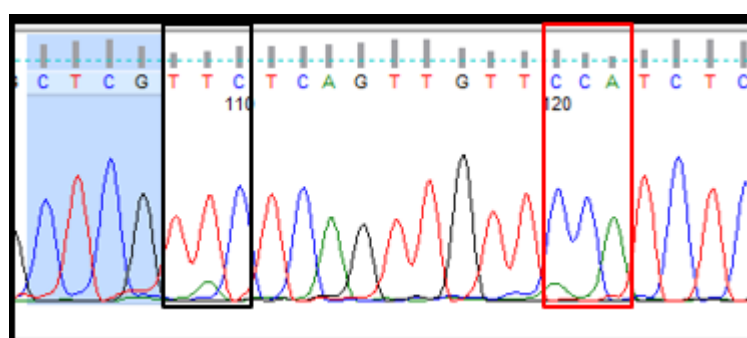
A análise das sequências demonstrou que todas as amostras que apresentaram perfil de mutações no gel eram contaminantes referentes aos plasmídeos controle mutado para o códon 167 ou para o códon 198. A identificação do plasmídeo mutado foi possível devido à introdução de uma adenina na extremidade 3' do megaprimer utilizado para a construção de cada plasmídeo mutado. A *Taq* DNA polimerase convencional introduz uma adenina inespecífica na extremidade 3' do produto de PCR. Quando o megaprimer foi utilizado para a construção do plasmídeo mutado (a partir da sequência da  $\beta$ -tubulina clonada no plasmídeo controle não mutado), houve a troca de uma citosina por uma adenina no códon 171 do plasmídeo controle para o códon 167, e do códon 195 do plasmídeo mutado para o códon 198. Esta inserção da adenina se mostrou como um ótimo controle para o monitoramento de possíveis contaminações, algo tão comum em *nested*-PCRs. Em suma, das 601 amostras analisadas para os códons 167 e 198 dos seis estados brasileiros, não foi encontrada nenhuma amostra contendo mutação.

No início deste trabalho, foram observadas contaminações na realização das reações de PCR, com a amplificação de produtos para o controle negativo da reação. Várias estratégias foram estabelecidas para a solução deste problema. Todos os reagentes foram descartados, a pipetagem do DNA nos tubos passou a ser realizada em uma capela em outra sala, ponteiras com filtros passaram a ser utilizadas nas reações e não foi mais realizada a amplificação dos plasmídeos controles simultaneamente com a análise dos ovos. Dessa forma, todos os controles negativos deixaram de apresentar amplificações, que sugeriu que o problema da contaminação havia sido solucionado. Entretanto, contaminações em PCR duplas é um problema recorrente descrito na literatura. As reações de sequenciamento demonstraram a existência das mutações de forma muito clara, ou seja, as mutações decorrentes das contaminações produziram o perfil esperado corroborando a eficácia da técnica. As outras amostras sequenciadas que apresentaram um perfil distinto e que serviram de controle para a metodologia confirmaram que as sequências não apresentavam mutações.

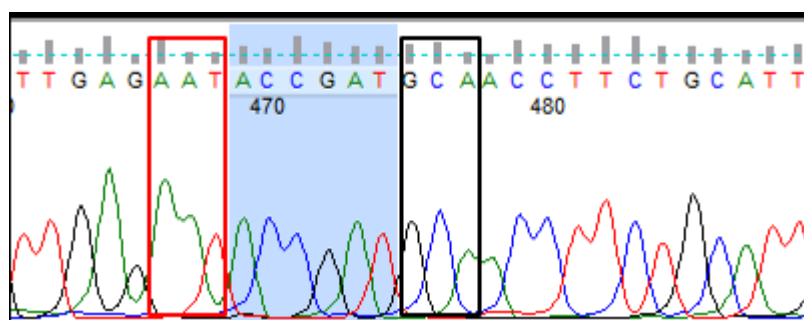
As Figuras de 11 a 14 demonstram exemplos dos resultados dos cromatogramas do sequenciamento para as mutações nos códons 167 e 198 (homozigotos e heterozigotos), confirmando a presença da adição da adenina ou timina (fita reversa), característica presente nos plasmídeos controles mutados para os códons 167 e 198.



**Figura 11** – Cromatograma representativo do sequenciamento das amostras de ovo único de *A. lumbricoides*. A presença de um único pico na adenina no códon 167, destacado em preto, revela uma sequência homozigota para este códon. A presença de uma segunda mutação no códon 171 (destacado em vermelho), com a troca de uma citosina para uma adenina (primeira adenina), indica que esta é a sequência do plasmídeo controle mutado.

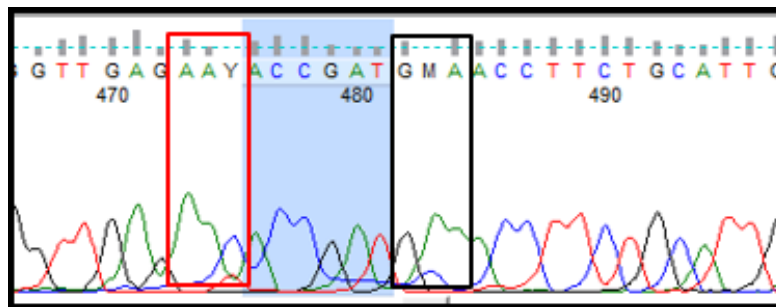


**Figura 12** – Cromatograma representativo do sequenciamento das amostras de ovo único de *A. lumbricoides* apresentando mutação no códon 167. A presença de dois picos para timina (adenina e timina) no códon destacado em preto revela uma sequência heterozigota. A presença de uma segunda mutação no códon 171 (destacado em vermelho), com um pico para adenina junto com citosina, indica que esta sequência está contaminada com a sequência do plasmídeo controle mutado.



**Figura 13** – Cromatograma representativo do sequenciamento das amostras de ovo único de *A. lumbricoides* apresentando mutação no códon 198. A presença de um único pico na citosina no códon destacado em preto revela uma sequência homozigota para este códon. A presença de uma segunda mutação no códon 195 (destaque em vermelho), com a troca de uma citosina para uma timina indica que esta é a sequência do plasmídeo controle mutado.





**Figura 14** – Cromatograma representativo do sequenciamento das amostras de ovo único de *A. lumbricoides* apresentando mutação no códon 198. A presença de dois picos para M (citosina e adenina) no códon destacado em preto revela uma sequência heterozigota. A presença de uma segunda mutação no códon 195 (destaque em vermelho), com um pico duplo de um Y (citosina e timina), indica que a sequência está contaminada com a sequência do plasmídeo controle mutado.

Nesse estudo, não foi possível analisar a presença de SNP no códon 200, usando a metodologia de PCR-RFLP, uma vez que a presença ou ausência de mutação nesse códon não é reconhecida pelas enzimas disponibilizadas comercialmente. Entretanto, através do resultado do cromatograma do sequenciamento, também foi possível a avaliação do códon 200 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1. Nessa varredura, das cinquenta e duas amostras enviadas para sequenciamento, nenhuma mutação do códon 200 foi encontrada na interpretação dos cromatogramas.

## 6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, unidades de implementação de serviços de saúde em todo o mundo têm dispensado grandes esforços no intuito de reduzir o ônus das infecções transmitidas pelos geo-helmintos, de modo que a principal estratégia tem sido os programas da quimioterapia preventiva, contemplando em particular as crianças em idade pré-escolar e escolar (OMS, 2006; KRÜCKEN et al., 2017).

Os anti-helmínticos BZs são os principais medicamentos utilizados para o tratamento das geo-helmintoses. Todavia, devido às altas frequências de tratamento e cobertura, tem-se oferecido um risco de pressão de seleção de parasitos com a possibilidade de estabelecimento de resistência aos BZs. Em parasitos de importância veterinária, a resistência aos BZs é um problema sério. O tratamento de *H. contortus* e outros trichostrongilóides tornou-se cada vez mais difícil devido ao surgimento de resistência anti-helmíntica, particularmente em países que dependem fortemente do uso de anti-helmínticos na produção pecuária (BARRÈRE et al., 2012; RAMÜNKE et al., 2016).

O uso intensivo em tratamento em massa contra parasitos de humanos é preocupante, tendo em vista que um quadro semelhante aos parasitos de ruminantes possa vir a ocorrer com os helmintos de humanos (RASHWAN et al., 2017; YILMAZ, 2017). Em nematódeos de importância veterinária, vários estudos relatam a resistência aos BZs, a qual está relacionada com SNPs no gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1, nos códons 167, 198 e 200. Estes SNPs também foram correlacionados com uma resposta pouco eficiente no tratamento de *T. trichiura* com BZ (DIAWARA et al., 2009). O monitoramento da presença de SNPs associados à resistência em geo-helmintos é importante para uma detecção precoce da baixa eficiência dos BZs antes que a resistência se torne clinicamente estabelecida (DIAWARA et al., 2009; KRÜCKEN et al., 2017; RASHWAN et al., 2017).

A falha no tratamento por albendazol em pacientes infectados com ancilostomídeos foi identificada em um estudo avaliando 292 pessoas de 62 famílias provenientes de Kintampo, Gana. Neste município, a prevalência geral de infecção por ancilostomídeos foi de 45% (102 pessoas). Após o tratamento, embora tenha sido observada uma taxa global de redução de ovos de 82%, 37 (39%) indivíduos, dos 95 que apresentaram uma segunda amostra de fezes para ser analisada, permaneceram infectados. A alta taxa de falha no tratamento com albendazol observada nesta população mostra uma necessidade de aprofundamento nos estudos relacionados à resistência aos benzimidazóis (HUMPHRIES et al., 2011).

Em um estudo realizado por Krücken et al. (2017) no distrito de Huye, em Ruanda, África, onde a infecção por *A. lumbricoides* é predominante, avaliou-se a eficácia da dose única de albendazol (400 mg) em 12 escolas. As amostras de fezes foram coletadas antes e após o tratamento. Foram realizadas duas técnicas microscópicas para a pesquisa de ovos e testes moleculares para pesquisa de SNPs nos códons 167, 198 e 200 para quatro isotipos do gene da  $\beta$ -tubulina associados à resistência aos BZs. A taxa média de cura resultante dos testes de microscopia foi de 80% e não foram encontrados SNPs. Os resultados indicam uma eficácia reduzida sugerindo que exista resistência ao fármaco nesta população analisada. Entretanto, com a ausência de evidências moleculares, não foi possível a associação de resistência com SNPs no gene da  $\beta$ -tubulina. Achados semelhantes já foram descritos para outros casos de suspeita de resistência aos BZs para *N. americanus* e *A. duodenale*, em uma comunidade na ilha de Pemba, na África, na qual o tratamento com albendazol se mostrou pouco eficiente (ALBONICO et al., 2004). Entretanto, nesse estudo só foi investigado a presença de SNP no códon 200.

A descrição de casos de falhas nos tratamentos com os BZs, sem a detecção dos SNPs associados com o mecanismo de resistência em nematódeos de ruminantes, tem levantado outras hipóteses para os mecanismos envolvidos na resistência aos BZs. Para alguns fungos já foi descrito o envolvimento de outros códons do gene da  $\beta$ -tubulina (MCKAY & COOKE, 1997; MA et al., 2005). Outro mecanismo envolvido em resistência aos fármacos, principalmente associado ao grupo das lactonas macrocíclicas, nas quais se inclui a ivermectina, diz respeito aos níveis das glicoproteínas P (Pgps) (PRICHARD, 2001). As glicoproteínas P (Pgp) são proteínas de membrana grandes que funcionam como transportadores de fármacos através do bombeamento para fora das células e, portanto, é muitas vezes responsável por falhas terapêuticas em seres humanos e animais. Entretanto, os trabalhos que analisaram a associação de helmintos resistentes aos BZs quando incubados com esse fármaco, não demonstraram aumento da atividade das Pgps, enquanto a incubação com lactonas macrocíclicas estimularam a atividade das Pgps (KERBOEUF & GUEGNARD, 2011).

Outro possível mecanismo associado à resistência aos BZs está relacionado com as enzimas que participam do metabolismo dos fármacos, como as proteínas monooxigenases da classe do citocromo P450 (CYPs). As CYPs são conhecidas como responsáveis pela biotransformação de uma grande quantidade de fármacos, sendo associadas à resistência aos fármacos em mamíferos e artrópodes. Essas proteínas já foram consideradas como mediadores da resistência anti-helmíntica (ROCHAT, 2005). Já foram descritas mais de 80 CYPs no genoma de *Caenorhabditis elegans* (MENZEL et al., 2001; MENZEL et al., 2005) e foram

detectados níveis aumentados para RNAs mensageiros para algumas CYPs em *C. elegans* quando estes foram expostos aos BZs (LAING et al., 2010). Entretanto, a avaliação dos níveis de RNA mensageiro para estas CYPs em amostras de larvas de *H. contortus* apresentando diferentes susceptibilidades aos fármacos, incluindo um isolado resistente ao albendazol, não demonstrou nenhuma alteração significativa que pudesse associar estas CYPs ao mecanismo de resistência (YLMAZ et al., 2017).

Várias metodologias já foram descritas para a detecção de SNPs associados com resistência aos BZs em nematódeos. Rashwan et al. (2017) utilizou o método SmartAmp2, uma nova técnica para genotipagem rápida, para detectar polimorfismos no gene da  $\beta$ -tubulina de *T. trichiura* e *A. lumbricoides*. Segundo o autor, o método é rápido e econômico e permite a detecção de polimorfismos genéticos ou mutações em 30 a 45 min, em condições isotérmicas, com alta especificidade e sensibilidade, sem isolamento de DNA e sem amplificação por PCR. O estudo de Rashwan et al. (2017) visou desenvolver novos ensaios de genotipagem para rastrear a presença de SNPs no gene da  $\beta$ -tubulina em *T. trichiura* e *A. lumbricoides*. Nesse trabalho, foram utilizadas amostras do Haiti e do Panamá, com detecção do SNP no códon 200 de *T. trichiura*, e do SNP no códon 167 de *A. lumbricoides*, confirmando resultados anteriores publicados por Diawara et al. (2009) e Diawara et al. (2013a). Para esta técnica, devem ser construídos *primers* específicos para cada códon, todavia, uma limitação do estudo é que o ensaio pode detectar apenas um SNP de cada vez.

O pirosequenciamento, como já descrito no item 1.4, é uma técnica na qual a síntese de DNA ocorre através de um complexo de reações enzimáticas e se baseia na detecção da liberação de pirofosfato, que ao ser convertido em ATP, é utilizado para oxidação da luciferina, produzindo um sinal luminoso, que é capturado e gerado um pirograma, resultando numa sequência de nucleotídeos. Diawara et al. (2009) e Diawara et al. (2013b) utilizaram essa técnica para detecção de polimorfismos em geo-helminths. No trabalho de validação da metodologia, foram analisadas amostras de paciente pré e pós-tratamento com albendazol de três países diferentes: Haiti, Panamá e Quênia. Estes autores analisaram a presença de SNPs para os três códons 167, 198 e 200 para *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *N. americanus* (Diawara et al., 2013a). No caso de *A. lumbricoides*, só foi detectado SNP para o códon 167, porém em uma frequência bastante elevada. No Haiti o tipo de alelo associado com resistência, presente na população antes do tratamento foi de 40% em homozigose e 60% em heterozigose, e apenas os heterozigotos foram detectados após o tratamento. No Quênia, antes do tratamento, predominou a frequência de genótipos homozigotos, 72,7% no códon 167. Após o tratamento, houve aumento significativo de heterozigotos, de 4,5% para 21,1%. No Panamá, o genótipo de

resistência mais abundante no códon 167 foi do tipo homozigoto, de 97,7% antes do tratamento para 96,7% após o tratamento com albendazol. Ao contrário desta alta frequência encontrada por Diawara et al. (2013a), no trabalho de Kruchen et al. (2017), realizado entre escolares de Ruanda com uma amostragem bem mais elevada, não foi detectado SNP para nenhum dos códons analisados para *A. lumbricoides*.

A metodologia de ARMS-PCR ou de Tetraprimer ARMS-PCR para a detecção dos três SNPS nos códons 167, 198 e 200 já foram utilizados para *A. caninum* (FURTADO et al., 2014; FURTADO & RABELO, 2015b; FURTADO et al., 2016). Na Tetraprimer ARMS-PCR são usados, em uma segunda PCR, quatro *primers* que possibilitam a amplificação de três fragmentos: um fragmento controle e os alelos mutado e selvagem, simultaneamente. A metodologia se mostrou bastante precisa, entretanto, como é necessário um ajuste perfeito entre os quatro iniciadores para serem usados em uma única reação, a técnica pode não funcionar satisfatoriamente para todos os alvos. No caso de *A. caninum* essa metodologia só funcionou adequadamente para o códon 198 (FURTADO et al., 2016). Para os códons 167 e 200, não foi possível a utilização dos quatro iniciadores em uma única reação, fazendo com que o ensaio tivesse que ser duplicado para a detecção do alelo mutado, separado do alelo selvagem (FURTADO et al., 2014; FURTADO & RABELO, 2015a). Neste trabalho, foi escolhida a metodologia de PCR-RFLP por ser considerada relativamente simples e direta para a detecção de polimorfismos. Como o tamanho dos fragmentos obtidos eram eficientemente visualizados em gel de agarose, não foi necessário o uso de gel de poliacrilamida, facilitando o protocolo experimental. A maioria dos resultados obtidos, utilizando os controles, demonstrou a presença de polimorfismos de forma clara.

Para algumas PCRs, foi observado um perfil distinto do esperado, com o aparecimento de um fragmento menor de baixa intensidade. O sequenciamento destas e de outras amostras demonstrou a especificidade da técnica. Estes perfis não se constituíram em perfis mutados e podem ser decorrentes de outras amplificações inespecíficas na PCR. As amostras positivas para mutações no sequenciamento foram decorrentes de contaminações na reação da PCR, apesar de todas as estratégias adotadas para evitar a contaminação. Contaminações em *nested-PCR* é um problema recorrente descrito na literatura, principalmente envolvendo manipulação de plasmídeos. As reações em sequência, como a PCR e *nested-PCR*, são particularmente mais propensas a contaminação porque os produtos de PCR gerados durante a primeira amplificação são geralmente pipetados para novos tubos de reação antes da reamplificação. Mesmo sendo dispensado todos os cuidados, os resultados falsos positivos podem surgir (NEUMAIER, 1998). Neste trabalho, as reações do branco da *nested-PCR* não apresentaram amplificação, portanto,

a presença de contaminações com o plasmídeo controle se constituiu em um resultado não esperado.

As contaminações em laboratórios clínicos de PCR podem resultar de fontes diversas, como reagentes, equipamentos, amplicons presentes em aerossóis e especialmente em superfícies, como relata Wu et al. (2017), em estudo realizado em um hospital na China. Em um laboratório de biologia molecular, o ideal é a separação de espaços em diferentes salas, para minimizar os episódios de contaminação, com salas individuais, intercaladas por janelas de transferência distribuídas em sala de preparo de reagentes, manuseio de amostras, amplificação dos genes e análise dos resultados. Os equipamentos de proteção individual e materiais de laboratório utilizados em cada sala devem ser distintos de cada setor e deve-se evitar o trânsito de profissionais de uma área para outra (WU et al., 2017).

Uma opção para se evitar contaminações na *nested*-PCR seria a realização das duas PCRs em um único tubo. Existem vários trabalhos na literatura para os quais essa metodologia é empregada. Nesta técnica os primers da segunda PCR são fixados na tampa do tubo por aquecimento 37°C, realiza-se a primeira reação e depois os *primers* da *Nested*-PCR são dissolvidos por inversão (HU & ARSOV, 2014; DA SILVA et al., 2013). Outra metodologia muito eficaz para evitar contaminação com produtos previamente amplificados é o uso da enzima uracil DNA N-glicosilase-UDG (LONGO et al., 1990). Essa metodologia se baseia na capacidade que a enzima possui de realizar correções na molécula de DNA *in vivo* caso ocorra a deaminação de uma molécula de citosina, a transformando em timina. Portanto, as reações de PCR devem ser realizadas sempre usando dUTP ao invés de dTTP e o uso da UDG juntamente com a mix de PCR eliminaria qualquer molécula carregada de amplificações prévias. A enzima precisa ser inativada por aquecimento antes do início da reação da PCR para que não ocorra destruição do novo produto amplificado, utilizando o dUTP. Esta técnica não foi utilizada neste estudo porque diminui a eficácia de ação das enzimas RFLP. Problema técnico de outra ordem já foi descrito por Schwenkenbecher e Kaplan (2009), que consideraram os resultados de mutações encontrados para os códons 167 e 200 de *N. americanus* poderiam ser decorrentes de erro experimental causados por variações na técnica de PCR em tempo real.

Neste trabalho, não foi detectado nenhum polimorfismo nos códons analisados no gene da  $\beta$ -tubulina de *A. lumbricoides*. Em estudos recentes, nos quais foi detectada a presença de SNP nos códons 167 em *A. lumbricoides*, a reação foi realizada com pool de ovos (DIAWARA et al., 2009; DIAWARA et al., 2013a). O intuito do presente trabalho foi o de realizar uma varredura na população como um todo. Não foi possível obter informações sobre o histórico do paciente, incluindo se eles já haviam sido diagnosticados com ascaridose e se já haviam

recebido algum tratamento. Portanto, não é possível analisar o potencial do fármaco em selecionar os SNPs associados com resistência. Contudo, o tipo de abordagem usado no presente trabalho corresponde a uma boa estratégia, principalmente quando a metodologia propõe a análise de ovos únicos porque haverá maior amostragem genética a ser analisada. Os trabalhos nos quais são realizadas análises de SNPs após falha no tratamento de pacientes podem ter desenhos experimentais, apresentando algum viés, como é o caso da resistência ao tratamento de ascaridose em escolares de Ruanda (KRÜCKEN et al., 2017). Neste estudo, os ovos obtidos após o tratamento foram genotipados, não sendo encontrado nenhum SNP associado com resistência aos BZs. Uma questão que deveria ser considerada neste desenho experimental é que em *A. suum*, e por analogia, provavelmente também em *A. lumbricoides*, a reprodução é do tipo poliândrica, ou seja, uma mesma fêmea pode ser fecundada por vários machos (ZHOU et al., 2011). Portanto, os ovos encontrados nas fezes após o tratamento podem conter genótipos distintos do da mãe, e, assim, não apresentar os SNPs nos códons 167, 198 e 200. Outro fato a ser considerado é que o material sequenciado para a análise dos SNPs derivou de um pool de ovos obtidos após o tratamento dos pacientes, desta forma a presença de um genótipo menos representativo pode ter sido potencialmente “diluído” na análise.

Dentre as medidas preventivas para o combate às parasitoses humanas, destacam-se o tratamento em massa, melhores condições de higiene, saneamento básico, educação para a saúde e o acesso à água potável.

Já foram descritas falhas nos tratamentos de helmintoses em animais e em humanos, entretanto, apesar de já ter sido relatada mutação nos códons 167, 198 e 200 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 para nematódeos específicos de humanos, uma varredura para o monitoramento da presença das mutações associadas à resistência em geo-helmintos no Brasil ainda não havia sido realizada. A sistematização das análises moleculares possibilita o conhecimento mais precoce do estabelecimento ou do aumento da frequência de polimorfismos relacionados à resistência. Os resultados deste trabalho reforçam a necessidade de mais estudos sobre o tema de resistência aos anti-helmínticos nos parasitos transmitidos pelo solo, bem como a busca para a elucidação das relações entre a baixa eficácia dos BZs para o tratamento de alguns nematódeos e as possíveis causas envolvidas, moleculares ou metabólicas.

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, a técnica de PCR-RFLP para detecção de mutações nos códons 167 e 198 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides* foi padronizada com sucesso, o que levou a um depósito de patente para este procedimento, cuja a invenção trata de um kit e de iniciadores específicos para detecção de mutações associadas à resistência aos BZs nos códons 167 e 198 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides*, a partir de ovo único. A amplificação a partir de ovo único exige dois passos de amplificação do DNA o que pode favorecer a contaminação das amostras. Nestas situações é necessário um maior cuidado na manipulação das amostras com a introdução de métodos de controle de contaminantes de produtos previamente amplificados.

O número limitado de amostras positivas para *Ascaris* neste estudo pode ser considerado um resultado positivo do tratamento em massa preconizado pela OMS, motivo pelo qual tivemos dificuldades em conseguir uma amostragem maior. Definimos por pesquisar os SNPs em ovo único por considerar que a reação em pool de amostras pode diluir a concentração do DNA obtido e ocorrer a não detecção de uma mutação.

Não foram encontrados SNPs para nenhum dos dois códons analisados. Entretanto, como este trabalho objetivou realizar uma varredura utilizando ovos de pacientes sem um histórico médico, não se sabe se estes já haviam sido expostos aos fármacos e se, portanto, os parasitos haviam sido submetidos à pressão seletiva de genótipos resistentes, porventura, presentes na população de vermes albergados pelos pacientes.

Para a genotipagem do códon 200 de *A. lumbricoides* foi selecionado o ensaio customizado de TaqMan® (Thermo Fisher Scientific, USA). Todos os reagentes já foram adquiridos para o ensaio e esta análise é uma perspectiva deste trabalho.

Outras perspectivas de estudos que estão sendo avaliadas são a pesquisa de SNPs no gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *Ascaris suum* e a confirmação por sequenciamento genômico se as amostras utilizadas nesse estudo eram realmente *Ascaris lumbricoides* ou *Ascaris suum*.

A pesquisa de SNPs a partir de ovos de *Ascaris suum* poderá ter resultados mais favoráveis, uma vez que poderemos avaliar com maior clareza a eficácia dos benzimidazóis, pois este fármaco já está introduzido de forma preventiva na alimentação diária da maioria das propriedades de suinocultura intensiva. Neste caso, será possível avaliar se ocorreu a pressão de seleção de parasitas resistentes, fato que não foi possível no estudo atual, pois não tínhamos conhecimentos prévios de dados relativos aos nossos pacientes.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**, 4ª Ed, Garland Science, 2002.

ALBONICO, M. et al. Molecular analysis of the beta-tubulin gene of human hookworms as a basis for possible benzimidazole resistance on Pemba Island. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 134, n. 2, p. 281-284, 2004.

ANDERSON, TJ. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 4, p. 183-188, 2001.

BARRÈRE, V. et al. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the  $\beta$ -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 344-9, 2012.

BEECH, RN. et al. Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? **Parasitology**, v. 138, n. 2, p. 160-174, 2011.

BETHONY, J. et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, n. 9521, p. 1521-32, 2006.

BETSON, M. et al. Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. **The Journal of Infectious Diseases**, n. 210, v. 6, p. 932-941, 2014.

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

CARVALHO, MC; SILVA, DC. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p.735-744, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Data Statistics. 2017, <https://www.cdc.gov/DataStatistics/>. Data de acesso: 5 de janeiro de 2018.

COLES, GC. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 167-85, 2006.

COSTA, TD. et al. Enteroparasitosis analysis in children of preschool age in the municipality of Santa Catarina, Brasil. **Revista Prevenção em Infecção e Saúde**, v. 1, 2015.

DA SILVA, MA. et al. Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 2, p. 206-210, 2013.

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

DEMELER, J. et al. Discrimination of gastrointestinal nematode eggs from crude fecal egg preparations by inhibitor-resistant conventional and real-time PCR. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61285, 2013b.

DEMELER, J. et al. Phylogenetic characterization of  $\beta$ -tubulins and development of pyrosequencing assays for benzimidazole resistance in cattle nematodes. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70212, 2013a.

DIAWARA, 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.

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

DIAWARA, 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.

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

FURTADO, LF. et al. Standardization and application of the tetraprimer ARMS-PCR technique for screening of the E198A SNP in the  $\beta$ -tubulin gene of hookworm populations in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 224, p. 65-67, 2016.

FURTADO, LF; RABELO É. Development of a new amplification-refractory mutation system for detection of a single nucleotide polymorphism linked to drug resistance in *Ancylostoma caninum*. **Genetic and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 5103-5111, 2015b.

FURTADO, LF; RABELO É. Molecular analysis of the F167Y SNP in the  $\beta$ -tubulin gene by screening genotypes of two *Ancylostoma caninum* populations. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1-2, p. 114-117, 2015a.

GELPI, AP; MUSTAFA, A. *Ascaris* pneumonia. **The American Journal of Medicine**, v. 44, n. 3, p. 377-89, 1968.

GYORKOS, TW. et al. Efficacy of a single dose of Albendazole for soil-transmitted helminth infections in school children of a village in Iquitos, **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 30, n. 4, p. 601-607, 2013.

HARRINGTON, CT. et al. Fundamentals of Pyrosequencing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 137, 2013

HOENIGL, M. et al. Pulmonary ascariasis: two cases in Austria and review of the literature. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 122, n. 3, p. 94-96, 2010.

HU, Y; ARSOV I. A rapid single-tube protocol for HAV detection by nested real-time PCR. **Food and Environmental Virology**, v. 6, n. 3, p. 189-195, 2014.

HUMPHRIES, D. et al. Epidemiology of Hookworm Infection in Kintampo North Municipality, Ghana: Patterns of Malaria Coinfection, Anemia, and Albendazole Treatment

Failure. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 5, p. 792-800, 2011.

JAMES, CE. Et al. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 7, p. 328-35, 2009.

KAPLAN, KJ. et al. Eosinophilic granuloma of the liver: a characteristic lesion with relationship to visceral larva migrans. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 25, n. 10, p. 1316-21, 2001.

KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geo-helminthos. 2017, <http://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/inquerito-nacional-de-prevalencia-da-esquistossomose-e-geo-helminthos/>. Data de acesso: 7 de março de 2017.

KERBOEUF, D; GUÉGNARD, F. Anthelmintics are substrates and activators of nematode P glycoprotein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2224-2232.

KHURROO, MS. Ascariasis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 553-77, 1996.

KHURROO, MS; ZARGAR, SA; MAHAJAN, R. Hepatobiliary and pancreatic ascariasis in India. **Lancet**, v. 335, n. 8704, p. 1503-6, 1990.

KRÜCKEN, J. et al. Reduced efficacy of albendazole against *Ascaris lumbricoides* in Rwandan schoolchildren. **The International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 3, p. 262-271, 2017.

LACEY, E. Mode of action of benzimidazoles. **Parasitology Today**, v. 6, 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.

LAING, ST. et al. Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites. **Biochemical Journal**, v. 432, n. 3, p. 505-514, 2010.

LAKE, SL. et al. Determination of genomic DNA sequences for beta-tubulin isotype 1 from multiple species of cyathostomin and detection of resistance alleles in third-stage larvae from horses with naturally acquired infections. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. 2, p. S6, 2009.

LELES, D. et al. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **Parasites and Vectors**, v. 5, p. 42, 2012.

LI, K. et al. Analysis of the internal transcribed spacer region of *Ascaris suum* and *Ascaris lumbricoides* derived from free range Tibetan pigs. **Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis**, v. 21, p. 1-5, 2017.

LONGO, MC. et al. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. **Gene**, v. 93, n. 1, p. 125-128, 1990.

MA, Z. et al. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. **Pest Management Science**, v. 61, p. 449-457, 2005.

MCKAY, GJ; COOKE, LR. A PCR-based method to characterise and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, n. 2, p. 371-378, 1997.

MENZEL, R. et al. A systematic gene expression screen of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 395, n. 2, p. 158-168, 2001.

MENZEL, R. et al. Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 21, p. 8324-8332, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Busca ativa e tratamento de hanseníase e verminoses nas escolas: 89% dos estados já iniciaram campanha. 2014, <http://portalms.saude.gov.br/noticias/722-svs-noticias/14499-busca-ativa-e-tratamento-de-hanseniase-e-verminoses-nas-escolas-89-dos-estados-ja-iniciaram-campanha>. Data de acesso: 10 de janeiro de 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases. 2012, [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano\\_integrado\\_acoes\\_estrategicas\\_2011\\_2015.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_2011_2015.pdf). Data de acesso: 8 de janeiro de 2018.

MURRELL, KD; ERIKSEN, L; NANSEN, P; SLOTVED, HC; RASMUSSEN, T. *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 255-260, 1997.

NEJSUM, P. et al. *Ascaris* phylogeny based on multiple whole mtDNA genomes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 4-9, 2017.

NICIURA, SC. et al. F200Y polymorphism in the  $\beta$ -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.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases: number of people treated in 2016 *Weekly epidemiological record*. 2016, [http://www.who.int/neglected\\_diseases/resources/who\\_wer9249/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/resources/who_wer9249/en/). Data de acesso: 5 de janeiro de 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Soil-transmitted Helminths. 2017b, [http://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/sth/sth.html](http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sth/sth.html). Data de acesso: 5 de janeiro de 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Weekly epidemiological record. 8 de dezembro de 2017, 92º ano; n. 49, p. 749-760, 2017a.

ORTU, G. et al. The impact of an 8-year mass drug administration programme on prevalence, intensity and co-infections of soil-transmitted helminthiases in Burundi. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 513, 2016.

PAVAN, MG; MONTEIRO, FA. Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial. In: GALVÃO, C. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, pp. 241-260.

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

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

RASHWAN, N. et al. Rapid Genotyping of  $\beta$ -tubulin Polymorphisms in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. e0005205, 2017.

ROCHAT, B. Role of Cytochrome P450 Activity in the Fate of Anticancer Agents and in Drug Resistance. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 4, p. 349-366, 2005.

SANGSTER, NC; GILL, J. Pharmacology of anthelmintic resistance. **Parasitology Today**, v. 15, n. 4, p. 141-6, 1999.

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

SOE, MJ. et al. *Ascaris* from Humans and Pigs Appear to Be Reproductively Isolated Species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9: p. e0004855, 2016.

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

TAREN, DL. et al. Contributions of ascariasis to poor nutritional status in children from Chiriqui Province, Republic of Panama. **Parasitology**, v. 95 (Pt 3), p. 603-13, 1987.

TIWARI, J. et al. Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 301-307, 2006.

WU, Y. et al. DNA decontamination methods for internal quality management in clinical PCR laboratories. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, p. e22290, 2017.

WHITTAKER, JH. 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.

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

YILMAZ, E. et al. Comparison of constitutive and thiabendazole-induced expression of five cytochrome P450 genes in fourth-stage larvae of *Haemonchus contortus* isolates with different drug susceptibility identifies one gene with high constitutive expression in a multi-resistant isolate. **The International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 3, p. 362-369, 2017.

ZHANG, Z. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. **Zootaxa**, v. 3148, p. 1-237, 2011.

ZHOU, C. et al. Molecular genetic evidence for polyandry in *Ascaris suum*. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 703-708, 2011.





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

Número do Processo: BR 10 2017 013907 7

**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

**Estado:** MG

**CEP:** 31270-901

**País:** Brasil

**Telefone:** (31) 34094774

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** "INICIADORES E KIT PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE  
MUTAÇÕES EM ASCARIS LUMBRICOIDES ASSOCIADAS À  
RESISTÊNCIA AOS BENZIMIDAZÓIS, E USOS"

**Resumo:** A presente invenção trata de iniciadores e um kit, específicos para  
detecção de mutações associadas à resistência aos benzimidazóis,  
nos códons 167 e 198 do gene da beta-tubulina de Ascaris  
lumbricoides, a partir de ovo único.

**Figura a publicar:** 1

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 4**

**Nome:** ÉLIDA MARA LEITE RABELO

**CPF:**

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:**

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:**

**País:** BRASIL

**Telefone:** (31) 340 93932

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

**Inventor 2 de 4**

**Nome:** LUCIANA WERNECK ZUCCHERATO

**CPF:**

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:**

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 30411-308

**País:** BRASIL

**Telefone:** (31) 340 93932

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

**Inventor 3 de 4**

**Nome:** LUIS FERNANDO VIANA FURTADO

**CPF:**

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:**

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:**

**País:** BRASIL

**Telefone:** (31) 340 93932

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

**Inventor 4 de 4**

**Nome:** CELI DA SILVA MEDEIROS

**CPF:**

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

**Endereço:**

**Cidade:** Sabará

**Estado:** MG

**CEP:**

**País:** BRASIL

**Telefone:** (31) 340 93932

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br