

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

JOÃO ALEXSANDER SILVA COSTA

ANÁLISE DA VARIABILIDADE INTRAPOPULACIONAL DE DUAS CEPAS DE
Ancylostoma ceylanicum **UTILIZANDO MARCADORES MITOCONDRIAIS**

Belo Horizonte

2023

JOÃO ALEXSANDER SILVA COSTA

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE INTRAPOPULACIONAL DE DUAS CEPAS DE
Ancylostoma ceylanicum UTILIZANDO MARCADORES MITOCONDRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.
Área de concentração: Imunoparasitologia, Biologia Celular e Molecular de Parasitos.

Orientação: Dra. Élide Mara Leite Rabelo

Coorientação: Dr. Luis Fernando Viana Furtado

Belo Horizonte

2023

043

Costa, João Alexsander Silva.

Análise da variabilidade intrapopulacional de duas cepas de *Ancylostoma ceylanicum* utilizando marcadores mitocondriais [manuscrito] / João Alexsander Silva Costa. – 2023.

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

Orientação: Dra. Élide Mara Leite Rabelo. Coorientação: Dr. Luis Fernando Viana Furtado.

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

1. Parasitologia. 2. *Ancylostoma*. 3. Benzimidazóis. 4. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. I. Rabelo, Élide Mara Leite. II. Furtado, Luis Fernando Viana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO 460/2023/15

TÍTULO: "ANÁLISE DA VARIABILIDADE INTRAPOPULACIONAL DE DUAS CEPAS DE *Ancylostoma ceylanicum* UTILIZANDO MARCADORES MITOCONDRIAIS"

ALUNO: JOÃO ALEXSANDER SILVA COSTA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **vinte e sete de setembro de 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Felipe Bisaggio Pereira

UFMG

Ricardo Nascimento Araújo

UFMG

Luís Fernando Viana Furtado - Coorientador

UFMG

Élida Mara Leite Rabelo - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 27 de setembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Eli da Mara Leite Rabelo, Vice diretor(a)**, em 28/09/2023, às 14:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Nascimento Araujo, Professor do Magistério Superior**, em 28/09/2023, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Bisaggio Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 28/09/2023, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luis Fernando Viana Furtado, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2023, às 10:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2626828** e o código CRC **ACD27F5A**.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – APQ01289-21 e APQ-02273-21).

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder muito discernimento e por nunca me desamparar, mesmo quando eu achava que estivesse sozinho, assim como nunca estive sozinho nas demais situações em minha vida;

À Élida, por ter aceitado o convite de me orientar mesmo sem um conhecimento prévio de minha pessoa, por todos os ensinamentos que você está sempre tão disposta e solícita quando precisamos sanar qualquer dúvida que seja, por acreditar no meu potencial enquanto profissional em formação e pelo acolhimento aconchegante no seu laboratório. Admiro muito a exímia profissional que você é e, principalmente, admiro sua capacidade de ser empática e humana, mesmo num ambiente em que ter esse tipo de atitude ainda não seja algo comum e esperado. Enfim, agradeço também por todos os momentos únicos de risadas, puxões de orelha e troca de experiências acerca desse ciclo, ainda mais complicado que o ciclo biológico de *Plasmodium* spp., que é a vida;

Ao Luis Fernando Viana Furtado, pessoa na qual me acolheu de uma maneira genuína e única. Muito obrigado, Fernando, por aceitar me coorientar e por todos os momentos de descontração, principalmente por ter com quem compartilhar sobre reality-shows e digo, majoritariamente, sobre RuPaul's Drag Race. Te agradeço, sobretudo, por ser sempre paciente e tenho um apreço gigantesco pelo seu dom para ensinar, o mundo carece de profissionais incríveis como você. Não poderia deixar de agradecer por estar sempre disposto a ajudar e por abrandar meu coração nas situações de desespero sempre que eu faltava enlouquecer e surtar com o mestrado. Levarei para sempre lições e aprendizados que tive contigo e espero me tornar um profissional à sua altura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo fornecimento da bolsa de pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, pelo financiamento do projeto;

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, por minha formação;

Às secretárias do Departamento de Parasitologia, Sumara Ferreira e Sibebe Abreu, por serem extremamente prestativas e por responderem as dúvidas e questionamentos quase que instantaneamente;

À Talita Rodrigues, vulgo Talitita, minha grande amiga e companheira de laboratório por todos os nossos momentos únicos e, muitas vezes, inexplicáveis para pessoas que fogem um pouco do nosso convívio. Você é, de longe, uma das pessoas mais incríveis que conheci durante essa trajetória toda, está sempre pronta para ajudar a quem pedir e sem pestanejar. A convivência no laboratório entra em perfeita harmonia e estado de homeostase quando somos agraciados com sua presença, sempre brinco contigo de que você é a cabeça pensante do laboratório e você sempre me corrige dizendo que não, mas, acredite, você é. MUITÍSSIMO obrigado pelos ensinamentos, por me acolher da melhor maneira possível, por me ensinar desde o início do mestrado a dinâmica do laboratório, por me acalmar, pelos nossos momentos de risadas em lugares e momentos inoportunos e por sua amizade. Pode ter certeza de que jamais esquecerei todas as coisas que você fez por mim e espero um dia conseguir te retribuir, minuciosamente, cada coisa;

À Celi Medeiros, por ceder algumas amostras que foram utilizadas durante seu doutorado para que eu conseguisse realizar esse trabalho, por me ensinar, com seu jeito único, a perder o medo dos hamsters, principalmente no momento de fazer infecção;

À meus outros companheiros de laboratório, que também são amigos, Ana Carolina Rangel, Lucas Rabelo e Letícia Lopes, por todos os momentos únicos de muita risada, descontração e pela convivência incrível que me faz sentir falta nos dias que não estamos no laboratório;

A meus amigos da turma de mestrado, Aline, Ana Carolina, Gabriela, Luiz Gustavo e Marcela, por todos os momentos únicos de muita diversão e por tornarem todos os momentos únicos e inesquecíveis. O período das disciplinas obrigatórias foi muito menos árduo por ter vocês ao meu lado e a viagem para Januária foi maravilhosa, principalmente, devido a vocês. Agradeço de forma especial ao Luiz Gustavo que foi, contra seu próprio consentimento, meu casamento acadêmico durante o mestrado. Obrigado, amigo, por aguentar meus surtos durante os trabalhos que fizemos juntos e por me ajudar com coisas nas quais não tinha conhecimento ainda.

À minha família, em especial à minha mãe Regina, por ser minha melhor amiga, meu alicerce e meu exemplo diário de resiliência e resistência e por sempre me apoiar e acreditar em mim. Você, mãe, é o maior tesouro que existe nesse mundo e não há nada mais valioso do que seu caráter, índole e complacência, essa conquista também é sua e saiba que meu amor e gratidão por ti são incalculáveis e imensuráveis. Agradeço também ao meu pai João e ao meu irmão Vinícius, por todo apoio e por também acreditarem em mim;

Às minhas amigas da vida, Clarice, Duda e Nayara, por me ampararem em todos os momentos, pelo apoio constante e por nunca me deixarem desistir de tudo que eu luto para conquistar, eu amo muito vocês;

Aos meus amigos de graduação, Leandro, Larissa e Tatiana, por sempre estarem comigo desde a época da PUC e por me incentivarem a correr atrás dos meus objetivos e por se alegrarem por minhas conquistas;

À todas as pessoas acometidas por geo-helminthoses, especialmente pela ancilostomíase, espero com esse estudo e com todos os demais que um dia consigamos atenuar todos os impactos sociais, ambientais e de saúde pública que essas doenças causam.

*“Back when we were still changin’ for the better
Wanting was enough
For me, it was enough
To live for the hope of it all”
August, Taylor Swift*

RESUMO

O uso indiscriminado de benzimidazóis para o tratamento da ancilostomíase pode selecionar cepas resistentes ao tratamento. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos códons 167, 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1, proteína alvo do fármaco, estão associados com a resistência aos benzimidazóis em nematódeos. Em um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, foi isolada uma cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol por pressão seletiva do fármaco a partir de uma cepa selvagem de *Ancylostoma ceylanicum* mantida há mais de 15 anos em modelo experimental. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade molecular intrapopulacional da cepa resistente ao albendazol em comparação com a cepa selvagem, assim como avaliar a porcentagem da presença de SNPs após quatro anos de seleção da cepa. Foram realizadas amplificações do gene COI, NAD1 e dos códons 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 das duas cepas de *A. ceylanicum* selvagem e resistente ao tratamento por albendazol, através de PCRs convencionais seguidas de sequenciamento. Não foram identificados SNPs nos códons 198 e 200 da cepa resistente. Além disso, para descartar a possibilidade de troca de cepas, foram sequenciadas também amostras da cepa selvagem. As amostras da cepa selvagem, conforme o esperado, não apresentaram as mutações, comprovando que houve reversão do caráter de resistência da cepa. As análises para os marcadores mitocondriais demonstraram uma baixa diversidade nucleotídica, de 0,16% para o gene COI, e de 0,25% para o gene NAD1. Ao construir árvores filogenéticas com base em dois métodos, o método de Máxima Verossimilhança e a Inferência Bayesiana, foram observados padrões muito semelhantes ao se comparar os dois modelos para ambos os marcadores, com altos valores de bootstrap, reforçando a topologia das árvores filogenéticas. Esse resultado não foi de todo surpreendente, tendo em vista que a cepa original já estava há muitos anos sem a possibilidade de recombinação com outras populações. A baixa diversidade genética encontrada em ambos os marcadores moleculares, COI e NAD1 e a ausência de SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 sugere que a combinação do efeito gargalo, a deriva genética e a ausência de fluxo gênico foram, em conjunto, responsáveis pela baixa variabilidade genética da população. Os dados aqui apresentados contribuem para o avanço de conhecimentos de genética populacional dos ancilostomídeos, além de servirem de base para elaborações de futuras estratégias de controle e desenvolvimento de novas terapias farmacológicas.

Palavras-chave: *Ancylostoma ceylanicum*. Resistência. Benzimidazóis. Marcadores Mitocondriais. SNP.

ABSTRACT

The indiscriminate use of benzimidazoles for the treatment of hookworm may select strains resistant to treatment. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in codons 167, 198 and 200 of the gene encoding β -tubulin isotype 1, the drug's target protein, are associated with resistance to benzimidazoles in nematodes. In previous work by our research group, a strain of *Ancylostoma. ceylanicum* resistant to albendazole was isolated by selective pressure from the drug from a wild strain of *A. ceylanicum* maintained for more than 15 years in an experimental model. The objective of this work was to analyze the intrapopulation molecular variability of the albendazole-resistant strain in comparison with the wild-type strain, as well as to evaluate the percentage of presence of SNPs previously identified after four years of strain selection. Amplifications of the COI gene, NAD1 and codons 198 and 200 of the gene encoding β -tubulin isotype 1 of the two strains of wild-type *A. ceylanicum* and resistant to albendazole treatment were carried out using conventional PCRs followed by sequencing. No SNPs were found in codons 198 and 200 of the resistant strain and, to exclude strain exchange, samples of the wild-type strain were also sequenced. Samples of the wild strain, as expected, did not present the mutations, proving that there was a reversal of the strain's resistance character. Analyzes for mitochondrial markers demonstrated a low nucleotide diversity, of 0.16% for the COI gene, and 0.25% for the NAD1 gene. When building phylogenetic trees based on two methods, the Maximum Likelihood method and Bayesian Inference, very similar patterns were observed when comparing the two models for both markers, with high bootstrap values, reinforcing the topology of the phylogenetic trees. This result was not at all surprising, considering that the original strain had been without the possibility of recombination with other populations for many years. The low genetic diversity found in both molecular markers, COI and NAD1 and the absence of SNPs in the isotype 1 β -tubulin gene suggests that the combination of the bottleneck effect, genetic drift and the absence of gene flow were, together, responsible due to the low genetic variability of the population. The data presented here contribute to the advancement of knowledge on population genetics of hookworms, in addition to serving as a basis for developing future control strategies and developing new pharmacological therapies.

Keywords: *Ancylostoma ceylanicum*. Resistance, Benzimidazoles. Mitochondrial Markers. SNPs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida dos ancilostomídeos	24
Figura 2: Dados dos DALYs (por 100.000) resultantes de infecções por ancilostomídeos em todo o mundo em 2019.....	26
Figura 3: Representação esquemática da organização do DNA mitocondrial de <i>Ancylostoma</i> spp.	35
Figura 4: Representação esquemática de amplificação por PCR Nested de uma região do gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>A. ceylanicum</i>	46
Figura 5: Amplificação da região do gene COI utilizando DNA genômico de vermes machos adultos de <i>A. ceylanicum</i>	50
Figura 6a: Alinhamento das sequências de COI de <i>A. ceylanicum</i>	51
Figura 6b: Alinhamento de sequências do gene COI de <i>A. ceylanicum</i>	52
Figura 7: Árvore filogenética construída para as amostras de <i>A. ceylanicum</i> utilizando a região do gene COI como marcador genético.	54
Figura 8: Árvore filogenética construída para as amostras de <i>A. ceylanicum</i> utilizando a região do gene COI como marcador genético comparando com demais sequências do gene depositadas no GenBank.	55
Figura 9: Árvore filogenética construída a partir da inferência bayesiana para a região do gene COI de <i>A. ceylanicum</i>	56
Figura 10: Amplificação da região do gene NAD1 utilizando DNA genômico de vermes machos resistentes de <i>A. ceylanicum</i>	57
Figura 11: Alinhamento de sequências do gene NAD1 de <i>A. ceylanicum</i>	58

Figura 12: Árvore filogenética construída para as amostras de <i>A. ceylanicum</i> utilizando a região do gene NAD1 como marcador genético.	59
Figura 13: Árvore filogenética construída a partir da inferência bayesiana para a região do gene NAD1 de <i>A. ceylanicum</i>	60
Figura 14: Amplificação dos códons 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 utilizando DNA genômico de machos adultos de <i>A. ceylanicum</i>	63
Figura 15: Cromatogramas do sequenciamento dos códons 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 para as cepas sensível e resistente de <i>A. ceylanicum</i>	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Iniciadores utilizados para amplificar região do gene NAD1 e COI de <i>A. ceylanicum</i>	45
Quadro 2: Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificar os códons 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Amostras utilizadas para o estudo para os marcadores mitocondriais, COI e NAD1, e para o gene codificador da β -tubulina isotipo 1.....41
- Tabela 2:** Quantitativo de parasitos recuperados antes e após o tratamento com 0,3mg de albendazol dos hamsters infectados com as cepas sensível e resistente de *A. ceylanicum* três anos e meio após a seleção da cepa.61
- Tabela 3:** Quantitativo de parasitos recuperados antes e após o tratamento com 0,3mg de albendazol dos hamsters infectados com a cepa resistente de *A. ceylanicum* quatro após a seleção da cepa.65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABZ	Albendazol
CDC	Centro de Controle de Doenças e Prevenção, do inglês “ <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> ”
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
COI	Citocromo c oxidase subunidade 1
DALY	Ano de vida perdido ajustado por incapacidade, do inglês “ <i>disability- adjusted life year</i> ”
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “ <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ”
DPI	Dias pós-infecção
DTN	Doença Tropical Negligenciada
GBD	Carga Global de Doenças, do inglês “ <i>Global Burden Disease</i> ”
HTS	Helmintos transmitidos pelo solo
IC	Intervalo de credibilidade
IgE	Imunoglobulina de classe E
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
ITS	Espaço transcrito interno (do inglês “ <i>internal trascribed spacer</i> ”)
L1	Larva de primeiro estágio
L2	Larva de segundo estágio
L3	Larva de terceiro estágio
L4	Larva de quarto estágio
L5	Larva de quinto estágio
mtDNA	DNA mitocondrial, do inglês “ <i>mitochondrial DNA</i> ”
NaCl	Cloreto de sódio
NAD1	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo desidrogenase subunidade 1, do inglês “ <i>Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit1</i> ”
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salina, do inglês “ <i>Phosphate saline Buffer</i> ”
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “ <i>Polymerase chain reaction</i> ”
PEG	Polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês “ <i>Ribonucleic acid</i> ”)

SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês “ <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ”
TAE	Tris-Acetato EDTA
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Xg	Força centrífuga relativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Os ancilostomídeos	21
1.1.1 Aspectos gerais.....	21
1.1.2 Ciclo biológico	23
1.2 Os benzimidazóis (BZs)	28
1.2.1 Mecanismo de ação	28
1.2.2 Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos BZs	29
1.2.3 Falha de tratamento com o uso de BZs em ancilostomídeos	31
1.2.4 Métodos para identificação de resistência aos BZs.....	32
1.3 Marcadores moleculares mitocondriais em estudos de helmintos	33
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Considerações éticas	40
4.2 Amostras de estudo	40
4.2.1 Seleção da cepa resistente	40
4.2.2 Amostragem	40
4.3 Manutenção da cepa de <i>A. ceylanicum</i>	41
4.3.1 Tratamento profilático.....	41
4.3.2 Infecção dos hamsters com a cepa de <i>A. ceylanicum</i>	41
4.3.3 Preparo das coproculturas e recuperação de larvas	42
4.3.4 Eutanásia, necrópsia e recuperação de vermes adultos	42
4.3.5 Teste fenotípico de resistência	43
4.4 Extração de DNA	43
4.5 Iniciadores utilizados para amplificação	44
4.6 PCR (Reação em cadeia da polimerase)	45
4.6.1 Amplificação do gene Citocromo C Oxidase Subunidade 1– COI e NAD1	45
4.6.2 Amplificação da região compreendendo os códons 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1	46

4.7 Eletroforese.....	47
4.8 Purificação do DNA	47
4.9 Sequenciamento	48
4.10 Análise de dados.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1 Análise parcial do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase Subunidade 1 (COI)	49
5.1.1 Amplificação, purificação e sequenciamento.....	49
5.1.2 Análise filogenética.....	53
5.2 Amplificação parcial do gene mitocondrial NAD1	56
5.2.1 Amplificação, purificação e sequenciamento.....	56
5.2.2 Análise filogenética.....	58
5.3 Teste fenotípico	61
5.3.1 Primeiro teste.....	61
5.4 Sequenciamento do gene codificador da β-tubulina isotipo 1 após 4 anos de obtenção da cepa	62
5.4.1 Amplificação e purificação	62
5.4.2 Análise de SNPs nos códons 198 e 200	63
5.5 Realização do segundo teste fenotípico	65
5.5.1 Segundo teste fenotípico	65
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os ancilostomídeos

1.1.1 Aspectos gerais

Os geo-helminhos, ou helmintos transmitidos pelo solo (HTS), formam um grupo de parasitos gastrointestinais pertencentes ao filo Nematoda, os quais causam infecção em humanos por meio da ingestão de ovos ou larvas ou por penetração percutânea, a depender da espécie. Esses helmintos são encontrados em solos úmidos e quentes onde passam pelo processo de embrionamento (Kim *et al.*, 2012; Ojha *et al.*, 2014; Prieto-Pérez *et al.*, 2016).

As geo-helminthoses estão entre as infecções mais comuns em todo o mundo e acometem, principalmente, regiões precárias socioeconomicamente e com saneamento básico contingente, o que beneficia ainda mais a maturação de formas evolutivas. No decorrer do ciclo de vida dos nematódeos, o solo com condições ideais de umidade, temperatura e oxigenação, propiciam o desenvolvimento dos estádios infectantes (Bethony *et al.*, 2006; Tchakounté *et al.*, 2018). Portanto, o índice elevado de prevalência dessas infecções na América do Sul, África Subsaariana, Ásia e na China pode ser justificado pelo clima predominantemente quente nessas localidades (Khurana *et al.*, 2021).

Estima-se que cerca de 24% da população mundial, em torno de 1,5 bilhão de pessoas, estejam infectadas com algum tipo de HTS. Mais de 267 milhões de crianças em idade pré-escolar e 568 milhões de escolares estão infectadas e residem em áreas em que a taxa de transmissão é alta, necessitando de tratamentos e de medidas profiláticas eficientes (WHO, 2022).

Os HTS representam uma das principais causas mundiais de atraso no desenvolvimento físico e cognitivo. Essas infecções permanecem sendo negligenciadas pelas agências de saúde internacionais em virtude de três características, a saber: i. as pessoas acometidas estão localizadas em países que sofrem com a escassez de recursos financeiros voltados para a saúde; ii. as infecções causam doenças crônicas de difícil diagnóstico; e iii. é complicado quantificar as consequências dessas infecções nos âmbitos econômicos e educacionais (Bethony *et al.*, 2006).

Os geo-helminhos com importância médica são *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus 1758), causador da ascaridíase; *Ancylostoma duodenale* (Dubini 1843), *Necator americanus* (Stiles 1902), causadores da ancilostomíase e *Trichuris trichiura* (Linnaeus 1771), causador da

tricuriase; consideradas doenças tropicais negligenciadas (DTN's). No sudeste asiático, casos de infecção por *Ancylostoma ceylanicum* (Looss 1911) em humanos têm sido registrados e reportados, evidenciando seu potencial zoonótico e expandindo sua significância epidemiológica (Bethony et al., 2006; Da Silva et al., 2019; Colella et al., 2021; WHO, 2022).

Embora a espécie *Strongyloides stercoralis* (Normand 1876), causadora da estrogiloidíase, não seja reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada, a doença é uma importante geo-helminose devido à morbidade significativa dessa infecção, tendo uma estimativa de 600 milhões de acometidos em todo o mundo e em razão da sobreposição de áreas com as demais infecções acima citadas (WHO, 2022). Além disso, a estrogiloidíase pode ter consequências severas em indivíduos portadores do vírus HIV e HTLV (Marcos et al., 2008)

Os ancilostomídeos estão inseridos no Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Superfamília Strongyloidea e Família Ancylostomatidae (Zhang, 2013). Os ancilostomídeos são hematófagos, tendo potencial de causar anemia e hipoalbuminemia e, em infecções severas, podem vir a causar anemia ferropriva em decorrência da hematófagia e da hemorragia causada pela laceração de capilares na mucosa intestinal, bem como a perda de proteínas séricas e inflamação intestinal. Os vermes mudam de posição em um intervalo aproximado de quatro a seis horas, prejudicando a função do sistema imune dos acometidos por causarem uma resposta inflamatória local, aumentando os riscos de o paciente adquirir outras doenças por infecções secundárias devido à porta de entrada para demais infecções. Estima-se que, anualmente, sejam registradas entre 3000 e 6500 mortes decorrentes de infecções por esses parasitos (Loukas & Prociv, 2001; Hotez et al., 2004; Jones & Capello, 2004; Held et al., 2006; Feleke, 2018).

Aproximadamente 740 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com ancilostomídeos. Na África Subsaariana, cerca de 200 milhões de pessoas foram infectadas e, destas, 90 milhões são crianças (Feleke, 2018). A espécie mais predominante em todo o mundo é *N. americanus*, sendo encontrada principalmente em regiões costeiras e em localidades com clima tropical, típicos das regiões sul e sudoeste da China, Ásia, África Subsaariana e Américas do Sul e Central. A espécie *A. duodenale* é encontrada principalmente em regiões de clima temperado a frio e *A. ceylanicum* é mais presente na Ásia (Fujiwara, 2016; Feleke, 2018).

Os ancilostomídeos zoonóticos, helmintos comumente encontrados parasitando canídeos e felídeos, podem causar infecção e resultar em sintomas e manifestações clínicas em humanos que não são observadas em ancilostomídeos antroponóticos. Um exemplo é a infecção

pelo parasito *A. braziliense* (de Faria 1909), em que a penetração das larvas na pele pode causar a larva *migrans* cutânea. Essa condição é caracterizada por lesões serpiginosas que podem atingir 1-5 cm de comprimento devido à migração da larva na derme, podendo até mesmo causar infiltrados pulmonares caso a infecção avance (Guill; Odom, 1978; Bowman *et al.*, 2010; Loukas *et al.*, 2016). Outro exemplo é a infecção pelo *A. caninum* (Ercolani 1859), o qual a penetração de larvas também pode causar a larva *migrans* e enterite eosinofílica (Prociv & Croese, 1996), apesar dos vermes não atingirem a forma evolutiva de adultos sexualmente maduros. Entretanto, estudos recentes, como o de Ngcamphala e colaboradores (2019) e Furtado e colaboradores (2020), demonstram a possibilidade de infecção por *A. caninum* patente em humanos.

1.1.2 Ciclo biológico

O ciclo de vida dos ancilostomídeos (Figura 1) é direto e independente de hospedeiros intermediários. A transmissão ocorre por meio da penetração percutânea de larvas filarioides (larvas de terceiro estágio - L3) (*N. americanus*, *A. duodenale* e *A. ceylanicum*) em solos contaminados; ou ingestão da forma infectante (*A. duodenale* e *A. ceylanicum*). As larvas filarioides se acumulam no solo ou na vegetação e, ao receberem estímulos de temperatura (termotropismo positivo) oriundos da pele do hospedeiro, se aderem a tal. Assim que entram em contato com o ser humano, atravessam a pele através dos folículos pilosos e penetram nos tecidos por meio de sinais químicos e elétricos do hospedeiro. Após este processo, as larvas liberam a cutícula externa conservada da segunda muda e migram pela circulação sanguínea periférica ou linfática, onde são carreadas passivamente pela corrente sanguínea em direção aos pulmões, mas passando primeiramente pelo átrio e ventrículo direito do coração e, posteriormente, seguem para a vasculatura pulmonar (Soulsby, 1965; Crompton, 2000; Fujiwara, 2016; Loukas *et al.*, 2016).

Nos pulmões, as L3 passam pelo processo de maturação até o estágio L4, migrando posteriormente para a faringe, onde são expectoradas e deglutidas. Em seguida, as larvas chegam ao duodeno, onde se transformam em adultos jovens e iniciam o hematofagismo. Os vermes juvenis finalizam o processo de maturação, alcançando a forma evolutiva de vermes adultos sexualmente maduros e, posteriormente, machos e fêmeas copulam com produção de até 10.000 ovos por dia. Os ovos são liberados nas fezes, as larvas L1 (rabitóides) eclodem dos ovos e realizam a muda para larva L2 e, subsequentemente, L3, dando continuidade ao

ciclo. O processo desde a penetração das larvas L3 até a patência (produção de ovos) leva, aproximadamente, 6 a 8 semanas em *N. americanus* e em *A. duodenale*. Para *A. ceylanicum*, o período de patência ocorre entre 15-17 dias após a penetração das larvas (Areekul *et al.*, 1975; Fujiwara, 2016; Loukas *et al.*, 2016).

Os parasitos do gênero *Ancylostoma* spp., quando adquiridos por via oral, não realizam o ciclo pulmonar, as L3 penetram nas criptas de Lieberkuhn, onde se transformam em L4 e, posteriormente, retornam à luz do intestino como adultos jovens, até atingirem a forma evolutiva de vermes adultos sexualmente maduros no intestino delgado do hospedeiro. Isso ocorre, por exemplo, no caso da infecção experimental de *A. ceylanicum* em hospedeiros competentes, como hamsters (Soulsby, 1965).

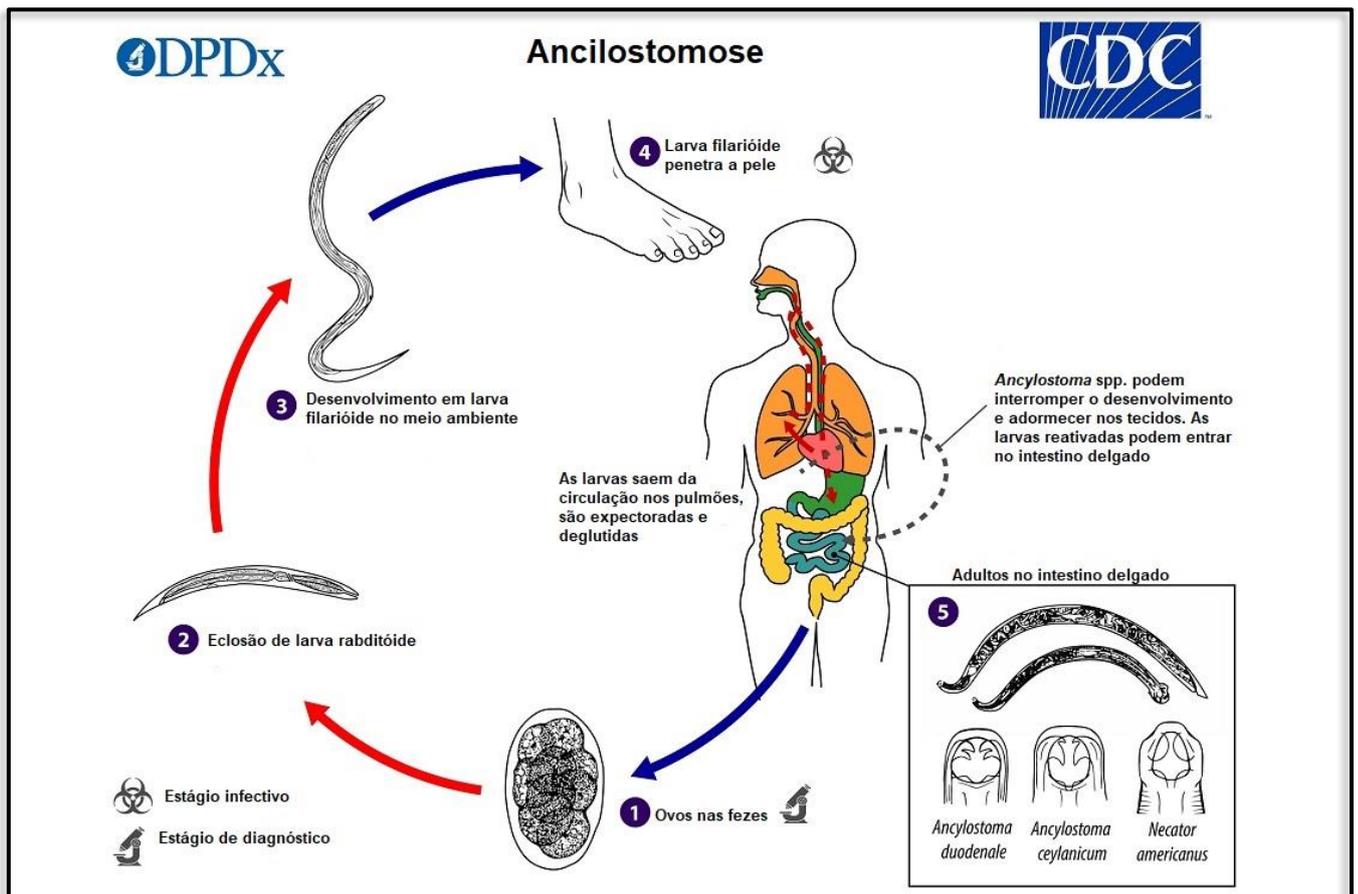


Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida dos ancilostomídeos. A infecção por via oral através da ingestão de L3 de *Ancylostoma* spp. não está representada na figura. Adaptado de CDC.

1.1.3 Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle dos ancilostomídeos

A espécie de ancilostomídeo mais prevalente em infecções humanas é o *N. americanus*, com proporção de aproximadamente 79% dos casos de infecção em todo o mundo, segundo

levantamento feito por Clements & Alene (2022), seguido pela proporção inferior de infecções por *Ancylostoma* spp., 32%.

No Brasil, 80% dos casos de ancilostomíase registrados são infecções por *N. americanus*, com índice de prevalência maior nas regiões nordeste e centro-oeste, regiões nas quais o saneamento básico é deficiente, visto que existe pouco investimento financeiro para combate e estabelecimento de medidas sanitárias eficientes, bem como escassez de investimento financeiro para estudos acerca da ancilostomíase, reflexo da ausência de infraestrutura sanitária e das condições climáticas encontradas no Brasil, o que reitera que fazem parte do grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (Mudenda *et al.*, 2012; Feleke, 2018; Guimarães *et al.*, 2019).

Segundo os dados do GBD - *Global Burden Diseases* (2019), a ancilostomíase teve uma carga de 984.000 DALYs (anos de vida perdidos ajustados por incapacidade, do inglês “*disability-adjusted life years*”), com a prevalência de mais de 173 milhões de casos confirmados de infecção por ancilostomídeos em todo o mundo, acometendo principalmente escolares que se encontram no continente africano e asiático, conforme é possível visualizar na Figura 2 (Global Health Data, 2019).

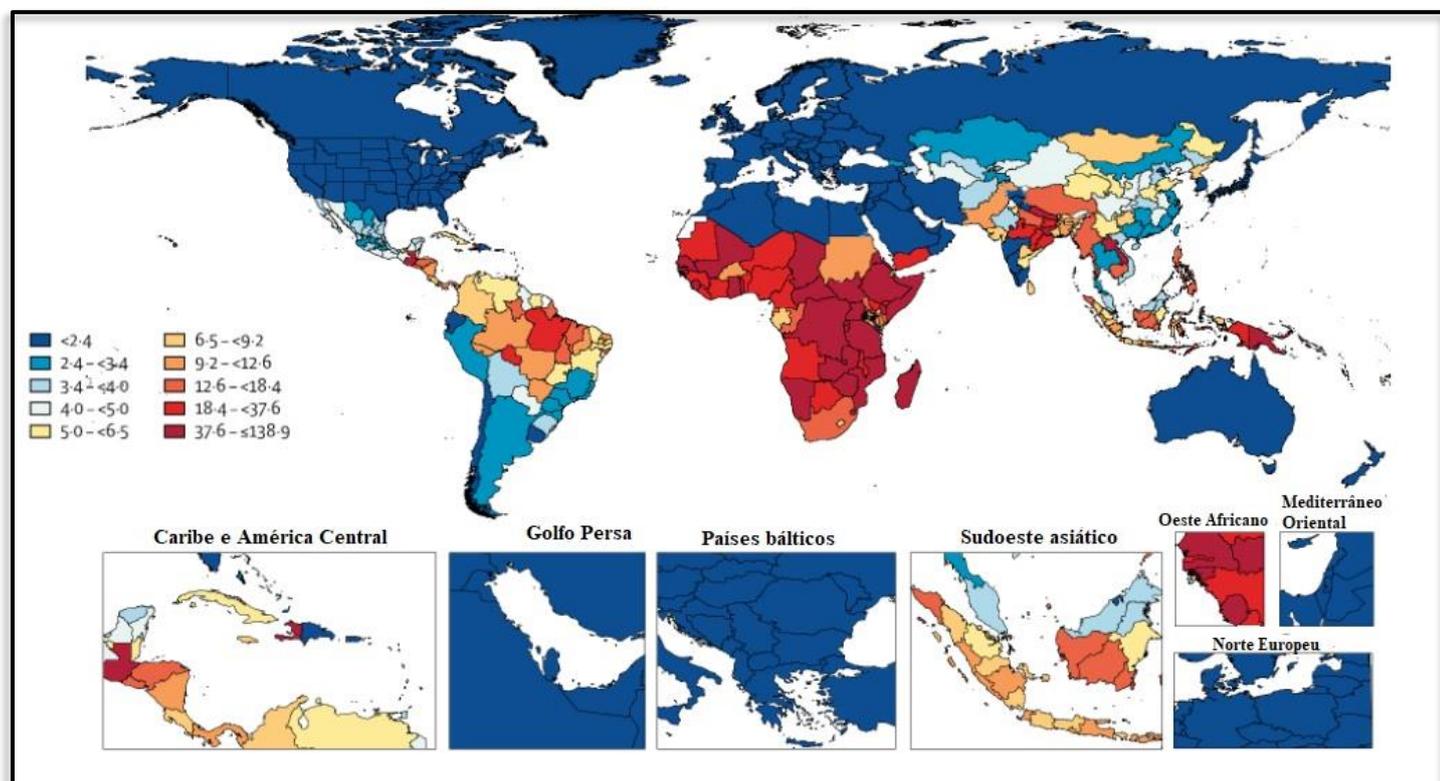


Figura 2: Dados dos DALYs (por 100.000) resultantes de infecções por ancilostomídeos em todo o mundo em 2019. As cores mais escuras correspondem aos países com maior quantidade de DALYs concentrando-se, majoritariamente, no continente africano e no sul e sudeste da Ásia. Adaptado de Healhdata (2019).

Um dos maiores desafios da estimativa dos impactos que a ancilostomíase causa em todo mundo é a subnotificação de complicações dessa doença, como a anemia ferropriva e desnutrição e, quando há a notificação, raramente são associadas à infecção por esses agentes. Nas áreas onde são encontrados muitos casos notificados de ancilostomíase, há também a notificação de demais parasitoses com grande importância médica, como a malária, por exemplo, o que configura uma sobreposição de área endêmica, dificultando ainda mais o cálculo da morbidade desta enfermidade devido à negligência da associação de tais fatores com a ancilostomíase (Hotez *et al*, 2004; Brooker *et al.*, 2007; Clements & Alene, 2022).

O diagnóstico de ancilostomíase pode ser feito por meio do esfregaço Kato-Katz, pela técnica de McMaster, sedimentação espontânea e FLOTAC, com o intuito de estimar a gravidade da infecção por meio da contagem de ovos por grama de fezes. Em infecções por ancilostomídeos, é essencial determinar o grau de anemia, apresentando geralmente eritrócitos

microcíticos e hipocrômicos (Bethony *et al.*, 2006; Cringoli *et al.*, 2011). O diagnóstico também pode ser por meio de técnicas de biologia molecular, visto que a identificação morfológica dos ovos não é possível por microscopia (Xu *et al.*, 2021). Mesmo na eventualidade de obtenção de vermes adultos, a identificação de espécies é difícil por requerer um morfolologista qualificado. Em decorrência da dificuldade do diagnóstico morfológico, o diagnóstico por meio de técnicas de biologia molecular se mostra mais eficiente e sensível comparado com técnicas anteriormente citadas (Silva *et al.*, 2006; Gasser *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2021; Nath *et al.*, 2023).

Existe uma vacina em desenvolvimento, por um consórcio de pesquisadores com os coordenadores associados ao Baylor College of Medicine para o *N. americanus*. A vacina possui como alvo dois antígenos recombinantes: o *Na*-GST-1, uma proteína recombinante de glutationa-S-transferase e, a *Na*-APR-1, uma proteína recombinante de protease aspártica, sendo ambas essenciais para o parasito por auxiliarem no processo de digestão de hemoglobina (Plieskatt *et al.*, 2012; Diemert *et al.*, 2022). No Gabão, no continente africano, foi feito um teste na fase 1 da vacinação com os antígenos recombinantes *Na*-GST-1 e *Na*-APR-1 com indivíduos adultos infectados com *N. americanus* e foi observado uma indução de IgG nos pacientes que foram submetidos à vacinação, com o pico da resposta humoral duas semanas após a aplicação da terceira dose da vacina (Adegnika *et al.*, 2021). Existe um estudo em andamento da vacinação com ambos os antígenos em crianças saudáveis no Gabão, bem como a fase 2 dos estudos com as vacinas nos Estados Unidos.

Outra vacina para ancilostomídeos cujo alvo era a proteína *Na*-ASP-2 (*Ancylostoma Secreted Protein*) já havia sido desenvolvida. Porém, na fase 1 dos testes em uma população de adultos saudáveis em uma área rural endêmica no Brasil, os testes foram interrompidos em decorrência da apresentação de urticária generalizada em 3 pacientes. Estudos subsequentes demonstraram aumento de IgE na resposta contra o antígeno aplicado, o que desencadeou a reação de hipersensibilidade (Fujiwara *et al.* 2006; Loukas *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2011; Diemert *et al.*, 2012; Goud *et al.*, 2012).

A adoção de medidas sanitárias efetivas, como o saneamento básico e educação em saúde se mostrou promissora na redução significativa de infecções por esses patógenos em províncias na China e nos Estados Unidos, conforme discorrido por Hotez (2008). Como estratégias de controle de geo-helminthoses, a quimioterapia preventiva com o uso de benzimidazóis é uma opção preconizada pela própria OMS, porém, é necessário a implementação de melhorias sanitárias para uma maior eficácia no controle de geo-helminthoses.

Existem programas de desparasitação em larga escala comprovadamente eficientes na redução na morbidade, prevalência e a intensidade da infecção por geo-helmintos, entretanto, até que algumas localidades acometidas tenham acesso e incentivo econômico à essas estratégias, como o saneamento básico, inúmeros acometidos continuarão lidando com a contaminação e a persistência de formas evolutivas viáveis desses parasitos no ambiente, que podem durar semanas (larvas de ancilostomídeos) ou anos (ovos de *Ascaris* spp.) caso encontrem um ambiente com condições favoráveis (Mireku *et al.*, 2015; King, 2019).

Em suma, o uso desenfreado de fármacos anti-helmínticos já foi descrito com queda na eficácia ao longo do tempo, levando ao aparecimento de parasitos com fenótipo resistente aos fármacos utilizados no tratamento (Albonico *et al.*, 2003; Demeler *et al.*, 2013).

1.2 Os benzimidazóis (BZs)

1.2.1 Mecanismo de ação

Os benzimidazóis, como mebendazol, albendazol e tiabendazol, simbolizam uma classe de fármacos com ação anti-helmíntica de amplo espectro, sendo eficazes para tratamento em infecções por cestódeos (Ammann *et al.*, 2015), trematódeos (Sidor & Andreyanov, 2021) e nematódeos (Prichard, 2007), além de apresentarem ação antifúngica (Lacey, 1990). Esses fármacos possuem inúmeras vantagens, como: baixo custo, fácil administração e eficiência contra todas as formas evolutivas de nematódeos, embora sejam menos eficazes para tratamento de larvas (Brunton *et al.*, 2012).

Complementarmente, Lacey (1988) constatou que, apesar de toda ação em níveis bioquímico e celular, o principal sítio de ação dos BZs é a tubulina, uma proteína presente no citoesqueleto de eucariotos. A tubulina, uma subunidade dos microtúbulos, é uma proteína dimérica composta pela unidade α e β , de aproximadamente 50kDa cada uma. No que diz respeito a questões estruturais, ambas são proteínas heterogêneas resultantes de modificações pós-traducionais (Dustin, 1984).

Os microtúbulos são estruturas rígidas, cilíndricas e ocas construídas a partir de 13 protofilamentos paralelos, tais estruturas são formadas por heterodímeros de α - β tubulina. Os microtúbulos estão em estado de polimerização recorrentemente, de forma que um heterodímero de α - β tubulina é adicionado em uma extremidade e outro é liberado na extremidade oposta (Alberts *et al.*, 2002). A molécula de BZ se liga na β -tubulina e é

incorporada no mesmo instante em que está ocorrendo uma polimerização. De forma concomitante, um heterodímero é liberado na extremidade oposta, causando o encurtamento e desaparecimento do microtúbulo (Lacey, 1988). Os BZs também apresentam outros mecanismos de ação no parasito, como a inibição da enzima fumarato redutase e a inibição da absorção de glicose, o que pode causar a morte do parasito por inanição (Prichard, 1973).

1.2.2 Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos BZs

Em consequência do aumento de identificação de populações com fenótipo de resistência aos BZs em nematódeos de importância veterinária, como *Haemonchus contortus* (Rudolphi 1803), há um crescente interesse no estudo acerca de mecanismos moleculares de resistência dos BZs para outros nematódeos. Isto ocorre porque a resistência parasitária pode causar um grande prejuízo financeiro para a agropecuária e para a saúde humana.

O nematódeo de vida livre *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900) é modelo para inúmeros estudos e é referência em pesquisas acerca da diversidade de expressões de isotipos do gene codificador da β -tubulina e os mecanismos de resistência. No genoma de *C. elegans* existem seis isotipos de β -tubulina, enquanto outros nematódeos de interesse veterinário, como o *H. contortus*, possui quatro isotipos (Demeler *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2022).

Algumas mutações no gene da β -tubulina, como SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único, do inglês “*single nucleotide polymorphism*”) nos códons 167, 198 e 200 já foram relacionados à resistência em fungos (Koenraad *et al.*, 1992; Albertini *et al.*, 1999) e em diversos helmintos (Wolstenholme *et al.*, 2004).

Algumas espécies de nematódeos, como as ancilostomídeos, com fenótipo de sensibilidade ao tratamento com os BZs apresentam, no códon TTC na posição 200 do gene da β -tubulina, trinca que codifica o aminoácido fenilalanina. A substituição da segunda timina por uma adenina causa alteração no códon, que passa a codificar uma tirosina (Kwa *et al.*, 1994). O mesmo ocorre para o códon 167 (Mottier & Prichard, 2008). O códon GAG na posição 198 do gene em questão codifica o aminoácido glutamato, a alteração de adenina para uma citosina, gerando a trinca GCG, passa a codificar uma alanina, acarretando um polimorfismo que pode resultar em um fenótipo de resistência (Ghisi *et al.*, 2007).

Existem vários estudos apontando a relação de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 e o estabelecimento do fenótipo resistente em nematódeos de importância veterinária (Diawara *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2013). Salienta-se que o fármaco

não é mutagênico e que o polimorfismo pode já estar presente em uma população e, com o uso indiscriminado do fármaco, apenas indivíduos que apresentem o genótipo sejam favorecidos, resultando em uma população com fenótipo resistente, visto que os indivíduos que não apresentam os SNPs serão eliminados (Prichard, 2007). Em virtude disso, as gerações seguintes terão altas chances de manter o genótipo e, conseqüentemente, o mesmo fenótipo. Mutações que conferem fenótipo de resistência podem ocorrer de maneira isolada, como um único SNP, ou em combinações, podendo variar a frequência em populações ou espécie (Blackhall *et al.*, 2011).

Apesar desses achados, alguns trabalhos como o de Palma e colaboradores (2020), encontrou populações de nematódeos apresentando resistência aos BZs, em específico *Ascaris* spp. (*A. suum* e *A. lumbricoides*), sem mutações nos códons 167, 198 e 200. Os autores discutem que a propensão à resistência genética aos BZs é menor em helmintos pertencentes à ordem Spirurina, como *Ascaridia galli* e *Parascaris equorum*, filogeneticamente próximos à *Ascaris* spp., comparado com helmintos pertencentes à ordem Strongylida, principalmente os pertencentes à superfamília Trichostrongyloidea, como *Haemonchus* sp., *Ostertagia* sp., *Cooperia* sp e *Teladorsagia* sp. (Demeler *et al.*, 2013; McIntyre *et al.*, 2018) por se tratarem de nematódeos de importância veterinária e seus hospedeiros serem submetidos à tratamento com uma frequência muito maior.

Furtado e colaboradores (2019) isolaram uma cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol, por pressão seletiva do fármaco em modelo experimental, no entanto, ao construir e analisarem uma minibiblioteca de cDNA originada desse isolado, não encontraram a presença de nenhum dos SNPs que na β -tubulina são comumente associados com resistência em parasitos de ruminantes. Os autores discutiram a possibilidade do envolvimento de outros mecanismos, como polimorfismos no gene que codifica para a glicoproteína-P, como ocorre em *H. contortus* (Blackhall *et al.*, 2008) e por alteração na expressão ou atividade de microRNAs, como observado por Simon e colaboradores (2008) em *C. elegans*. Após a realização de diversos testes fenotípicos e observada a dificuldade em manter a cepa após passagens seriadas de infecção em hamsters, Furtado e colaboradores (2019) relataram a perda dessa cepa, provavelmente devido à sua baixa adaptabilidade.

Uma nova cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol foi isolada por Medeiros e colaboradores. (2022), ao realizarem alterações no protocolo metodológico de isolamento da cepa. O novo isolado obtido, apresentou um nível de resistência ao albendazol mais elevado do que a cepa isolada por Furtado e colaboradores. (2019). Após a caracterização fenotípica e

genotípica, Medeiros e colaboradores (2022) observaram o aumento gradativo da frequência de mutação no códon 198 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 na medida que a concentração do fármaco aumentava, atingindo 100% de frequência para esse códon, na maior concentração. Não foram identificadas mutações no códon 167 e menos de 6% das amostras apresentaram um SNP no códon 200 nunca descrito anteriormente para helmintos de importância humana. Especulou-se que essa nova mutação poderia atuar como um possível mecanismo secundário de resistência nessa população.

Alguns estudos investigaram a correlação entre a presença de resistência aos BZs com a variabilidade genética em tricostrongilídeos, em parasitos de diferentes populações de bovinos nos Estados Unidos, como foi o caso do estudo de Blouin e colaboradores (1992; 1995). Nesses trabalhos, foram usados marcadores mitocondriais em específico a região NAD4 com o intuito de avaliar a diversidade nucleotídica nas diferentes populações. Os resultados demonstraram uma grande diversidade genética nas populações analisadas, porém sem diferenciação entre elas. Os autores sugeriram que o alto fluxo gênico encontrado nas populações desses parasitos é reflexo do grande deslocamento territorial dos rebanhos. Na análise de marcadores mitocondriais em populações isoladas de *Teladorsagia circumcincta* na França, foi encontrada uma alta diversidade genômica nas populações de vermes resistentes e sensíveis aos BZs, porém, sem discrepância entre ambas (Leignel & Humbert, 2001). Os autores discutem que o efeito gargalo observado no processo de seleção da resistência em populações isoladas não foi suficiente para separar essas populações que não apresentaram diferenciação entre si.

O estudo de Venkatesan e colaboradores (2023) foi pioneiro na identificação de um novo SNP no gene codificador da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. A mutação encontra-se no códon 134 e em maior frequência comparada com mutação no códon 167 em uma população isolada de cães galgos nos Estados Unidos. Os autores, ao utilizarem de modelagem estrutural do sítio de ligação do fármaco, relataram que, aparentemente, essa mutação no códon 134 reduz significativamente a afinidade dos benzimidazóis com o sítio de ligação, hipotetizando que essa mutação seja responsável pelo fenótipo de resistência nessa população.

1.2.3 Falha de tratamento com o uso de BZs em ancilostomídeos

Inúmeros estudos buscam investigar as falhas e a eficácia no tratamento com BZs em populações de nematódeos de importância médica e veterinária. O estudo de Avramenko e colaboradores (2020) avaliou a frequência de mutações no gene codificador da β -tubulina isotipo 1 associados com a resistência em tricostrongilídeos que parasitam ruminantes, como bisões e bovinos dos Estados Unidos. Os autores encontraram uma frequência alta de mutação

no códon 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 nesses parasitos, sugerindo que a resistência ao tratamento pode ser encontrada em inúmeras espécies de parasitos.

A administração de fármacos com o intuito de tratar infecções por ancilostomídeos já foram relatadas em vários estudos. Loukouri e colaboradores (2020) descreveram que a prevalência de infecções por ancilostomídeos, predominantemente *N. americanus*, foi duas vezes maior em uma região em que é feito o tratamento em massa (com ivermectina e albendazol) anualmente do que em uma região com tratamento em massa duas vezes ao ano, ambos na Costa do Marfim, na África Ocidental.

Humphries e colaboradores (2017) avaliaram a efetividade do tratamento com albendazol em diferentes comunidades de Gana, no continente africano, os resultados demonstraram que a diferença na eficácia do tratamento contra ancilostomídeos foi variável, principalmente nas regiões onde há uso constante de fármacos antiparasitários como a ivermectina, para o tratamento de *Onchocerca volvulus* (Leuckart 1893) e *Wuchereria bancrofti* (Cobbold 1877).

No que se refere aos mecanismos moleculares associados ao processo de resistência aos BZs em ancilostomídeos, a detecção de alterações em diferentes marcadores moleculares no genoma desses parasitos só é possível devido à eficácia de ferramentas de biologia molecular para a varredura de polimorfismos (Orr *et al.*, 2019).

1.2.4 Métodos para identificação de resistência aos BZs

Em resposta ao crescente número de tricostrongilídeos resistentes aos BZs desde meados da década de 60, principalmente ao tiabendazol, conforme foi mostrado por Drudge e colaboradores (1964), existem alguns bioensaios *in vitro* que podem ser feitos para detecção de resistência, como o teste de eclodibilidade larval (EHT – do inglês “*egg hatch test*”). O teste consiste em incubar os ovos em diferentes concentrações do fármaco e as diferenças no embrionamento e no sucesso da eclosão são indicativos de resistência. Uma desvantagem dessa técnica é a necessidade de utilizar ovos não embrionados (Lejambre *et al.*, 1970).

O teste FERCT (Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes, do inglês “*faecal egg reduction count test*”) é um bioensaio *in vivo* com finalidade de avaliar a eficácia de um fármaco, realizando a contagem de ovos antes e depois do tratamento e comparando os resultados obtidos. De acordo com o teste, a resistência ao fármaco está presente quando menos

de 95% dos ovos contados é eliminado pós-tratamento em relação à contagem de ovos feita anteriormente ao tratamento (Coles *et al.* 1992; Jackson *et al.*, 2000).

Como existem inúmeros mecanismos moleculares que estão associados com a resistência aos BZs, como foi explanado no item 1.2.2, a varredura de genótipos que podem favorecer o aparecimento do fenótipo resistente pode ser realizada utilizando ferramentas de biologia molecular. O uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional e suas variações pode ser bastante eficiente na detecção de SNPs relacionados à resistência. Gaudet e colaboradores (2009) citam a relevância da PCR alelo-específico para a detecção de SNPs no genoma, não exigindo equipamentos sofisticados. Essa metodologia se baseia na obtenção de um produto de PCR específico para o SNP utilizando iniciadores alelo-específicos que possuem o 3' terminal complementar ao sítio de localização do SNP. A vantagem dessa técnica é o baixo custo e a rápida detecção, podendo ser visualizada em gel de agarose (Kim *et al.*, 2005).

O sequenciamento do DNA é uma metodologia também utilizada para a busca de SNPs associados à resistência aos BZs. Melville e colaboradores (2020) utilizaram a técnica de sequenciamento e de pirosequenciamento, indicando a emergência de *Nematodirus battus* resistentes. A técnica permite a identificação de variações no alvo do genoma numa mesma reação, porém, possui um custo elevado, o que dificulta a sua utilização para a análise de um número considerável de amostras (Rashwan *et al.*, 2016; Milhes *et al.*, 2017). O sequenciamento é amplamente utilizado em trabalhos de genética populacional, principalmente utilizando marcadores mitocondriais, uma abordagem muito eficiente para a amplificação dessas regiões. Trabalhos como o de Palevich & Maclean (2021) utilizaram dessa abordagem para a amplificação de regiões do DNA mitocondrial de helmintos.

1.3 Marcadores moleculares mitocondriais em estudos de helmintos

Os marcadores moleculares são regiões específicas do genoma que permitem a detecção de variação e de SNPs entre indivíduos de uma mesma população ou, até mesmo, de populações diferentes. Esses marcadores são utilizados recorrentemente em estudos genéticos de diversos organismos, dentre eles os helmintos, com aplicações em estudos de genética populacional, biologia do parasito, história evolutiva, filogeografia e resistência à anti-helmínticos (Gilleard *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2008; Marval *et al.*, 2014; Thorn *et al.*, 2023).

O DNA mitocondrial (mtDNA) apresenta inúmeras características para ser utilizado como um marcador molecular em estudos de genética de populações. Dentre essas características, destacam-se a presença de múltiplas cópias, a haploidia, a herança materna, o

tamanho reduzido, uma taxa de evolução e mutações relativamente altas quando comparadas com o DNA nuclear (Awise *et al.*, 1987). Além disso, as mudanças no mtDNA ocorrem principalmente devido a mutações, ao contrário da recombinação gênica que é mais comum no DNA nuclear (Eyre *et al.*, 2001). Essas características contribuem para estudos genéticos de população, epidemiologia e análises filogenéticas (Hu *et al.*, 2002).

A amplificação de marcadores moleculares nucleares, como o ITS (Espaço transcrito interno, do inglês “*internal transcribed spacer*”), e mitocondriais, como o COI e NAD1, tem sido alvo para estudos, principalmente para análises filogenéticas, populacionais e diagnóstico de helmintos (Chan *et al.*, 2021), assim como o uso de COI em barcode de parasitos, como *Trypanosoma cruzi* (Rodrigues *et al.*, 2017) e em nematódeos (Derycke *et al.*, 2010). Miranda e colaboradores (2008) conseguiram demonstrar uma diversidade genética moderada entre as populações de *A. caninum* em diferentes localidades do Brasil, analisando o marcador mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1.

O DNA mitocondrial de ancilostomídeos possui aproximadamente 13-14Kb, o qual é composto por 12 genes que codificam proteínas que são importantes para que o processo de fosforilação oxidativa ocorra, podendo-se citar COX1-3, NAD1-6, ATP6, COB e 4L, dois genes ribossomais (rrnS e rrnL) e vinte e dois genes do RNAt, bem como uma região codificadora AT, que é responsável pelo controle transcricional (Hawdon *et al.*, 2001). A Figura 3 ilustra a estrutura e composição o DNA mitocondrial de *Ancylostoma spp.*, adaptado de Tuli *et al.* (2022).

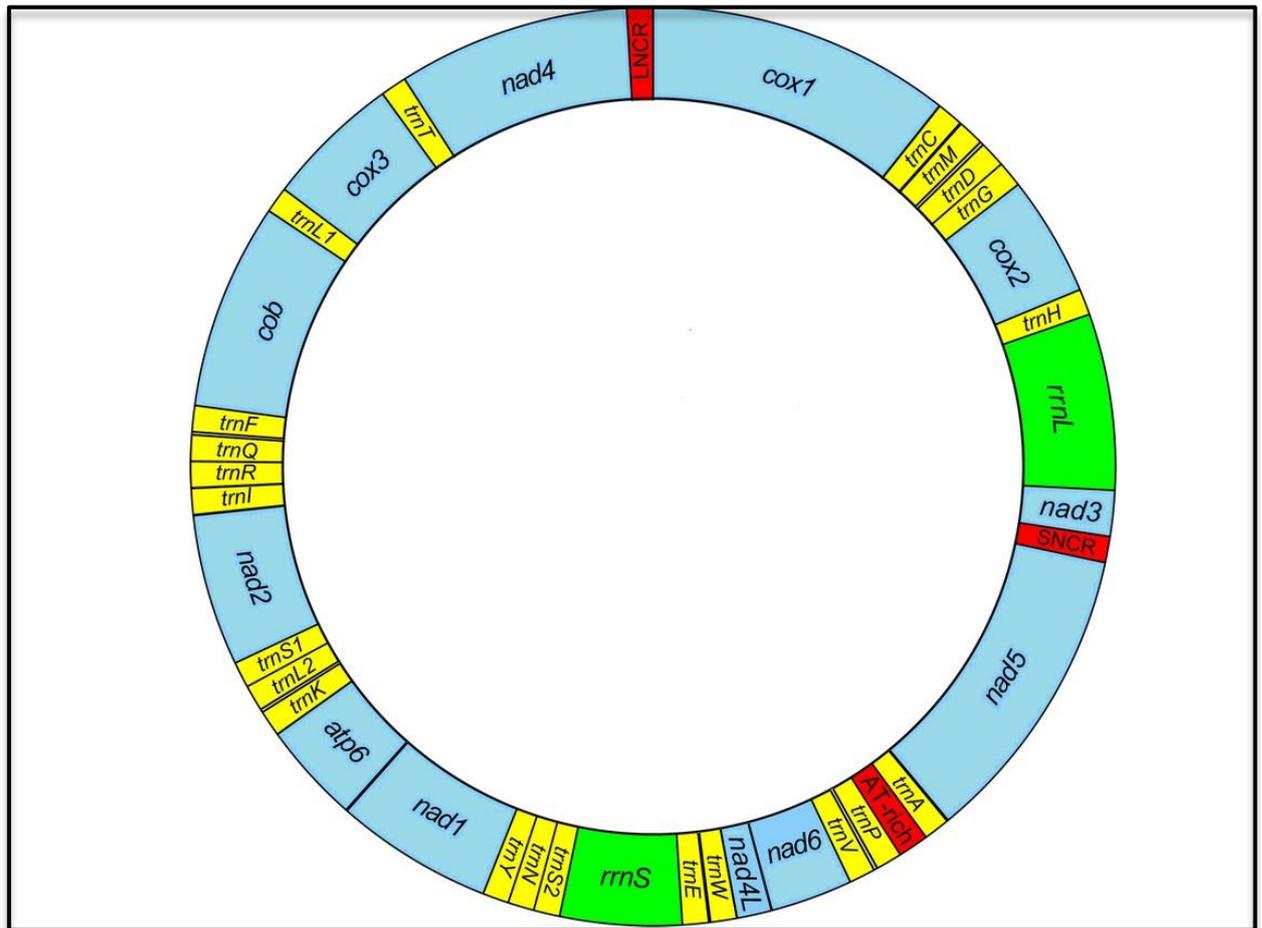


Figura 3: Representação esquemática da organização do DNA mitocondrial de *Ancylostoma* spp.

Com um tamanho total de 13.757pb, o genoma mitocondrial de ancilostomídeos é composto por uma região codificante (em azul), região não codificante (em vermelho), por RNA transportador (em amarelo) e RNA ribossômico (em verde). Adaptado de Tuli e colaboradores (2022).

O *Ascaris suum* foi o primeiro nematódeo a ter o genoma mitocondrial totalmente sequenciado (Okimoto *et al.*, 1992). Desde então, muitos estudos têm empregado o genoma mitocondrial como uma ferramenta para discriminação entre espécies e populações (Sorensen *et al.*, 1998). Marcadores moleculares derivados do genoma mitocondrial têm sido amplamente utilizados para discriminação intraespecífica dentre os demais grupos de helmintos, como *Taenia* spp. (Gasser *et al.*, 1999), *Echinostoma* spp. e *Schistosoma* spp. (Poon *et al.*, 2017) e *Trichuris* spp. (Callejon *et al.*, 2013).

Em um estudo realizado no Paquistão avaliando isolados de *Echinococcus granulosus* (Batsch 1786), duas regiões do genoma mitocondrial, o gene codificador para citocromo b e o gene para NAD5, foram analisadas a fim de verificar o grau de variabilidade genética da população de *E. granulosus* no país (Alvi *et al.*, 2023). Nesse mesmo estudo foi relatado, pela primeira vez, o achado de *E. granulosus* resistentes aos BZs no Paquistão, no entanto, não houve

uma correlação entre a resistência aos BZs com os marcadores mitocondriais. O estudo de Cai e colaboradores (2022) investigou a prevalência de *Echinococcus* spp. em raposas e outros canídeos na China com base na amplificação de COI e NAD1, utilizando desse último marcador para descobrir qual genótipo de *E. granulosus* estava infectando esses hospedeiros. Demais estudos com cestódeos, como o de Khan e colaboradores (2021) citam a importância epidemiológica de avaliar esses marcadores mitocondriais na detecção de infecções por helmintos.

Em cestódeos, o uso de marcadores mitocondriais é amplamente utilizado para estudos de genética populacional. Na China, foi reportado o primeiro caso de infecção por *Taenia ovis*, nunca antes descrita no país, com base em estudos de genética populacional analisando COI e NAD1 de cisticercos encontrados no esqueleto e na musculatura cardíaca (Shi *et al.*, 2016). Em função desses achados, os autores utilizaram a técnica de Barcode para a identificação do gênero *Taenia* para a confirmação molecular da ocorrência de *T. ovis* infectando ovinos na China. O estudo de Bacelar e colaboradores (2022) foi pioneiro na identificação de sete haplótipos no gene COI de *Oesophagostomum* spp. infectando populações isoladas de suínos no Brasil.

Para ancilostomídeos, existem alguns estudos utilizando de marcadores mitocondriais, como o estudo de Zhan e colaboradores (2001) que utilizaram o gene COI para a identificação espécie específica de ancilostomídeos antroponóticos, o *A. duodenale* e *N. americanus*. Isso ressalta a relevância epidemiológica desses marcadores no diagnóstico diferencial da ancilostomíase. O estudo de Xu e colaboradores (2021) utilizou o mesmo gene como alvo para o diagnóstico de *N. americanus* na China.

Diante dessa situação, a análise do genoma mitocondrial assume um papel crucial, principalmente em decorrência da sua aplicação em estudos acerca da epidemiologia de parasitoses. A ancilostomíase é um desafio para a saúde pública, sendo uma doença negligenciada e debilitante. Isso realça a importância de investigar o genoma mitocondrial desses parasitos como uma ferramenta valiosa para compreender sua diversidade e disseminação.

A abordagem One Health torna-se ainda mais relevante nesse cenário justamente por abranger todos os elementos essenciais para o controle de parasitoses, como a saúde humana, animal e o ambiente em que todos estão imersos. Isso destaca que doenças como a ancilostomíase, por ser uma zoonose, não se limitam apenas aos seres humanos, mas têm implicações em populações animais e no meio ambiente, e que uma abordagem integrada é fundamental para prevenir, monitorar e controlar efetivamente essas relações.

2. JUSTIFICATIVA

Em recente trabalho do nosso grupo, foi isolada uma cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol por meio de pressão seletiva com esse fármaco. Durante a investigação das bases genéticas dessa resistência, foram realizadas buscas por polimorfismos no gene codificador da β -tubulina isotipo 1, conhecido por sua associação com a resistência ao albendazol em vários nematódeos de ruminantes. Essa análise revelou a presença do SNP no códon 198, que estava consistentemente presente em todos os vermes analisados após a seleção da cepa.

Adicionalmente, após várias passagens da cepa em hamsters, foi identificado um novo SNP no códon 200. Essa alteração só foi detectada após a quarta passagem sob pressão do fármaco, e ocorreu em heterozigose em cerca de 5,5% dos vermes. Esses achados iniciais forneceram dados importantes e levantaram questões fundamentais. Primeiramente, a presença do SNP no códon 200 apenas em heterozigose após passagens subsequentes sob pressão farmacológica sugere uma possível relação entre a frequência desse SNP e a intensidade da pressão seletiva exercida pelo tratamento com albendazol. Além disso, o fato de a cepa apresentar o SNP no códon 198 em 100% dos vermes analisados e observado um aumento proporcional na frequência de homozigotos à medida que a cepa era submetida a múltiplas passagens sob tratamento farmacológico levanta questões intrigantes sobre a estabilidade genética da resistência.

Diante dessas descobertas, duas questões cruciais foram formuladas: 1. Seria possível que a cepa resistente pudesse eventualmente reverter seu perfil de resistência e se tornar sensível ao albendazol após um longo período sem pressão de fármaco? Em segundo lugar, como se apresentaria o perfil genotípico da cepa resistente após anos de isolamento sem tratamento com o fármaco?

As respostas à essas perguntas não apenas aprofundarão a compreensão da dinâmica da resistência a medicamentos em nematódeos, mas também podem revelar dados importantes para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de tratamento para a ancilostomíase e outras infecções por helmintos. Além disso, a identificação de novos marcadores genéticos pode servir como uma base sólida para o desenvolvimento de novas formulações anti-helmínticas.

Adicionalmente, a avaliação do status da cepa resistente quanto à sua resistência ao albendazol após quatro anos de isolamento é essencial, uma vez que o genótipo de resistência pode estar acompanhado de outras alterações que impactam a biologia do parasito.

É importante mencionar que a seleção natural de cepas de nematódeos resistentes a benzimidazóis em ambientes naturais tem sido associada à diminuição da diversidade genética nas populações. No entanto, essa correlação é frequentemente dificultada pela interação entre diferentes populações em campos abertos. A cepa resistente isolada por nosso grupo de pesquisa apresenta uma vantagem única para estudos comparativos de variabilidade genética, uma vez que, tanto a cepa resistente quanto a cepa selvagem estão completamente isoladas em um ambiente de laboratório.

Os marcadores mitocondriais, como COI e NADI, são amplamente utilizados para análises de variabilidade em estudos de genética populacional. Os genes mitocondriais acumulam mutações em uma taxa relativamente constante ao longo do tempo comparado com o genoma nuclear, tornando-os especialmente adequados para rastrear eventos evolutivos em escalas temporais. Assim, este projeto de pesquisa permite aprofundar a compreensão da resistência à fármacos, investigar a estabilidade genética dessa resistência ao longo do tempo e explorar as implicações fenotípicas e genotípicas associadas a essa adaptação. Além disso, oferece a oportunidade de contribuir para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes no combate à ancilostomíase e outras infecções por helmintos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a variabilidade molecular intrapopulacional de uma cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol, em comparação com a cepa selvagem.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a variabilidade genética de duas cepas isoladas de *A. ceylanicum*, uma selvagem e uma resistente ao albendazol, utilizando os marcadores mitocondriais COI e NAD1;
- Determinar a frequência de SNPs para os códonos 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 da cepa resistente após quatro anos de manutenção em laboratório;
- Avaliar fenotipicamente a cepa de *A. ceylanicum* resistente após quatro anos do seu isolamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob número de protocolo 25/2019.

4.2 Amostras de estudo

4.2.1 Seleção da cepa resistente

A cepa de *A. ceylanicum* resistente foi obtida a partir de uma cepa selvagem (Medeiros *et al.*, 2022). Inicialmente, as L3 da cepa selvagem foram submetidas a um tratamento *in vitro*, como forma de pré-selecionar espécimes com algum nível de resistência. A partir desse procedimento, por meio de passagens sucessivas de L3 em hamsters e com o aumento gradual da dosagem de albendazol, foi possível obter a cepa resistente, de maneira que, após quatro passagens, a cepa sobreviveu a uma sobredose do medicamento, enquanto, paralelamente, todos os vermes da cepa selvagem eram eliminados. O isolamento da cepa resistente ocorreu em 2019 e vem sendo mantida em passagens sucessivas em hamsters desde então, sem novos desafios de tratamento.

4.2.2 Amostragem

As amostras de DNA extraído de vermes adultos machos individuais de *A. ceylanicum* de cada etapa de infecção até a seleção bem-sucedida da cepa foram armazenadas em freezer na temperatura de -20°C no Laboratório de Parasitologia Molecular ICB/UFMG. Essas amostras foram utilizadas previamente para estudos de varredura de SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 (Medeiros *et al.*, 2022).

Para comparação do caráter genotípico desde quando a cepa foi selecionada e os dias atuais, vermes de infecções mais recentes foram recuperados para posteriores análises moleculares dos marcadores mitocondriais COI e NAD1 e do gene codificador da β -tubulina isotipo 1. A Tabela 1 mostra todas as amostras utilizadas para o presente estudo, bem como sua respectiva passagem.

Tabela 1: Amostras utilizadas para o estudo para os marcadores mitocondriais, COI e NAD1, e para o gene codificador da β -tubulina isotipo 1.

Passagem	Fenótipo	Amostra	Passagem	Fenótipo	Amostra	Passagem	Fenótipo	Amostra	Passagem	Fenótipo	Amostra
3ª infecção – Janeiro/ 2019	Resistente	24	5ª infecção – Março/2019	Resistente	55	Março/2023	Resistente	R10	Março/2023	Selvagem	S1
		25			58			R11			S2
		27			60			R12			S3
		28			62			R13			S4
		34			63			R14			S5
		35			64			R15			S6
4ª infecção – Fevereiro/ 2019	Resistente	36	Março/2023	Resistente	65	Março/2023	Resistente	R16	Março/2023	Selvagem	S7
		37			66			R17			S8
		38			R1			R18			S9
		39			R2			R19			S10
		40			R3			R20			
		41			R4			R21			
		46			R5			R22			
		47			R6			R23			
		52			R7			R24			
		53			R8			R25			
54	R9										

4.3 Manutenção da cepa de *A. ceylanicum*

4.3.1 Tratamento profilático

Paralelamente à manutenção da cepa selvagem de *A. ceylanicum*, desde o seu isolamento inicial, a cepa resistente vem sendo mantida em hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) fêmeas, com idade de quatro a seis semanas, mantidos em biotério com temperatura e umidade controladas. Assim que os animais chegam ao biotério, é feito um tratamento profilático com 0,4 mg/200 μ L de albendazol a fim de eliminar quaisquer parasitos que possam interferir nos experimentos subsequentes.

4.3.2 Infecção dos hamsters com a cepa de *A. ceylanicum*

Para manutenção das cepas, a cada mês foi realizada uma nova infecção de grupos de animais. A cada infecção foram infectados dois grupos com 20 hamsters no total, sendo um

grupo composto por doze hamsters infectados com larvas da cepa selvagem, e outro grupo com oito hamsters infectados com larvas da cepa resistente. Os hamsters foram infectados por via oral com o auxílio de uma agulha de gavagem com, aproximadamente, 75 L3 em 200 µL de água, por hamster.

4.3.3 Preparo das coproculturas e recuperação de larvas

Assim que a infecção atingiu o período pré-patente, no 18° DPI, os animais foram colocados para a coleta de fezes durante o período noturno por cerca de 14 horas. As fezes foram recolhidas na manhã seguinte com o auxílio de um palito de madeira, armazenadas em um recipiente com cerca de 2 mL de água para amolecer e homogeneizar. Posteriormente, foi adicionada vermiculita nas fezes, na proporção de 2:1, o frasco foi identificado e coberto por gaze e incubado em estufa na temperatura de 27°C por 7 dias. Após esse período, foi realizada a recuperação das larvas infectantes pelo método de Rugai (1954). A mistura de fezes com a vermiculita foi envolta em gaze dobrada em 8, esse conteúdo foi submerso em um cálice de vidro de 250 mL contendo água pré-aquecida a 45 °C, ficando em repouso por, no mínimo, 2 horas. Após esse intervalo, a coprocultura envolvida na gaze foi removida do cálice e o líquido transferido para um tubo de plástico tipo Falcon de 50 mL. O material foi centrifugado a 1000 xg por 1 minuto, o sobrenadante descartado até um volume aproximado de 10 mL e a concentração de larvas L3 necessárias à infecção (+/-75 L3/200µL) ajustadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Logo após esse processo, foi feita a infecção dos hamsters, conforme foi descrito no item 4.3.2.

4.3.4 Eutanásia, necrópsia e recuperação de vermes adultos

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

4.3.5 Teste fenotípico de resistência

Para avaliar a resistência da cepa, foram realizados testes *in vivo* com a cepa resistente de *A. ceylanicum* em dois momentos: após três anos e meio e após quatro anos da seleção da cepa.

Os grupos de seis animais infectados tanto com a cepa sensível quanto com a cepa resistente foram tratados no 20º DPI. A dosagem utilizada para tratamento foi de 0,3 mg de ABZ, a qual, nos experimentos de Medeiros e colaboradores (2022) foi considerada a sobredose máxima de medicamento que a cepa resistente conseguiu sobreviver, em comparação com a cepa selvagem, que teve a dosagem de 0,2 mg de ABZ considerada esterilizante nas análises iniciais. Os animais foram eutanasiados no 30º DPI, os vermes recuperados do intestino delgado, separados por sexo e armazenados a - 20°C para futuras ampliações das regiões dos códons 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1. Para controle, foi separado um grupo composto por 6 animais para cada cepa.

4.4 Extração de DNA

Os vermes machos foram armazenados, individualmente, em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL e acondicionados em freezer -20°C. O DNA dos 78 vermes obtidos foi extraído de acordo com o Protocolo de Extração de DNA do Laboratório de Parasitologia Molecular do ICB/UFMG, descrito a seguir. Nos tubos contendo os vermes, foram adicionados 200 μ L de tampão de lise (50 mM de EDTA, 100 mM de Tris-HCl pH 7,4, 100 mM de NaCl e SDS 10%). O verme foi triturado com o auxílio de um pistilo de vidro, previamente esterilizado, em seguida foi adicionado mais 200 μ L do tampão de lise. Foi adicionado ao tubo 2 μ L de proteinase K (20 μ g/ μ L), seguido de incubação em banho seco a 65 °C por 30 minutos. Decorrido esse período, foram adicionados 400 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (proporção 24:1) e a amostra centrifugada por 12000 xg a 25°C por 5 minutos. Com o auxílio de uma pipeta, a fase superior foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, adicionados 4 μ L de RNase (100 μ g/ μ L) (Invitrogen) e o tubo incubado em banho seco a 65 °C por 30 minutos. Na etapa seguinte, os passos anteriores, de adição de clorofórmio: álcool isoamílico, centrifugação e transferência da fase superior para um novo tubo foram repetidos. Em seguida foram adicionados 400 μ L de isopropanol, o material foi homogeneizado, centrifugado por 14.000 xg a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante descartado vertendo totalmente o conteúdo do tubo. Foram adicionados 400 μ L de etanol 70%, seguida de centrifugação por 12000 xg a 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante

novamente descartado. Novamente foram adicionados 400 μL de etanol 70%, a amostra centrifugada e o sobrenadante descartado. Por fim, o DNA foi ressuspensão em 10 μL de água milli-Q, sua concentração foi determinada por espectrofotometria através do aparelho NanoDropLite™ (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), com posterior armazenamento a 4°C. A qualidade do DNA foi determinada com base na relação de absorbância 260/280 para determinar a pureza do material.

4.5 Iniciadores utilizados para amplificação

Os iniciadores foram desenhados com base na sequência de nucleotídeos do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) sob o número de acesso NC_035142.1 para o gene de NAD1 de *A. ceylanicum*. Os iniciadores (Quadro 1) foram validados utilizando o software BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para garantir o caráter espécie-específico. O amplicon resultante da amplificação com o uso desses iniciadores gera um fragmento de 503 pb. Foi padronizada uma PCR de gradiente de temperatura com o intuito de identificar qual temperatura de anelamento seria mais eficiente para amplificação do alvo. A temperatura de 55°C demonstrou ser a ideal.

Para o gene COI, foram usados os iniciadores descritos por Folmer e colaboradores (1994) os quais produzem um fragmento de aproximadamente 705pb. No Quadro 1, são apresentados os iniciadores para os marcadores NAD1 e COI. Os iniciadores utilizados para amplificação dos códons 198 e 200 foram desenhados por Furtado e colaboradores (2019). As sequências dos iniciadores para o gene da β -tubulina isotipo 1 estão representadas no Quadro 2.

Quadro 1: Iniciadores utilizados para amplificar os marcadores mitocondriais de *A. ceylanicum*

Marcador	Iniciador	Sequência (5' → 3')	Temperatura de Anelamento (°C)	Amplicon (pb)
NAD1	NAD1Acey F	ACA AAA TCG TTT AGG TCC AAC A	56,5	503
	NAD1Acey R	ACT CCC TTT CAC CTT CAG CA	58,9	
COI	LCO1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	50,5	705
	HCO2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	55,3	

4.6 PCR (Reação em cadeia da polimerase)

4.6.1 Amplificação do gene Citocromo C Oxidase Subunidade 1– COI e NAD1

As PCRs para amplificação dos marcadores COI e NAD1 foram realizadas individualmente, em reações de 30 µl contendo 15 µl de GoTaq Mastermix Colorless (Promega, Estados Unidos), 1,2 µl de cada iniciador (com concentração final de 0,4 µM cada), 3 µl de DNA (~30ng) e 10,8 µl de água ultrapura. As amplificações ocorreram em um termociclador (Mastercycler®-EPPENDORF). Para COI, as amostras foram submetidas aos seguintes parâmetros: 95°C por 5 min. para desnaturação inicial da dupla fita de DNA genômico, seguido de 30 ciclos a 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e um passo final de extensão à 72°C por 8 min. Para NAD1, foi utilizado o seguinte programa: 95°C por 5 min. para desnaturação inicial da dupla fita de DNA genômico, seguido de 30 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 45s e um passo final de extensão à 72°C por 8 min. Os respectivos amplicons foram visualizados em eletroforese de gel de agarose 0,8% corados com GelRed® (Biotium, Estados Unidos).

Em todas as reações realizadas, foram incluídos controle positivo (DNA genômico de *A. ceylanicum*) e branco (água) para avaliar a presença e/ou ausência de possíveis

contaminantes ou inibidores durante o processo de extração de DNA e/ou preparação das reações de PCR.

4.6.2 Amplificação da região compreendendo os códons 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1

Para a amplificação dos códons 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum* foi realizada uma PCR- Nested. Para a primeira reação, foram adicionados 5 μ l de GoTaq Mastermix Colorless (Promega, Estados Unidos), 0,2 do mix de iniciadores (10 μ M), 3,8 μ l de água ultrapura e 1 μ l de DNA (~30ng).

Para a segunda reação, foram adicionados 15 μ l de GoTaq Mastermix Colorless (Promega, Estados Unidos), 0,6 μ l do mix de iniciadores (10 μ M), 11,4 μ l de água ultrapura e 3 μ l do produto amplificado resultante da primeira reação. A reação de amplificação do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum* está ilustrada na Figura 4. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 0,8%.

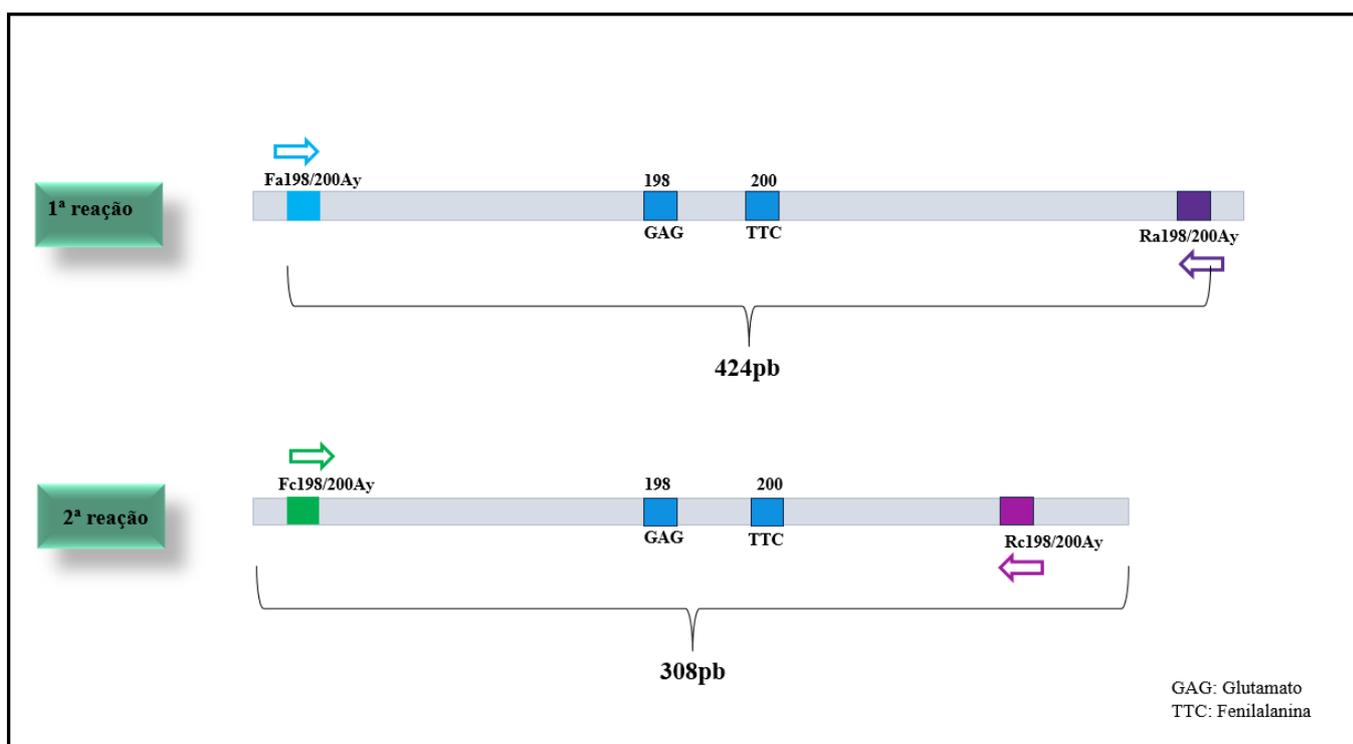


Figura 4: Representação esquemática de amplificação por PCR Nested de uma região do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*. Na primeira reação, os iniciadores externos geram um amplicon de 424pb. O produto da 1ª reação é utilizado para uma segunda reação com iniciadores internos que geram um amplicon de 308pb.

Quadro 2: Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificar os códons 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *Ancylostoma ceylanicum*.

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Temperatura de desnaturação (°C)	Amplicon (nts)
Fa198/200Ay	TGT TCC TAA AAA GGG GTC GGG	57	424 pb (1ª reação)
Ra198/200Ay	AAG CGA AGG CAG GTA GTG AC	57	
Fc198/200Ay	GCA GTC CAC GTT CCT GCT TA	57	308 pb (2ª reação)
Rc198/200Ay	ACC GGA CAT TGT TAC AGA CAC T	57	

4.7 Eletroforese

Para a confirmação da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos eletroforese em gel de agarose com suas respectivas concentrações (1% para COI e 0,8% para NAD1 e β -tubulina isotipo 1) com tampão TAE (Tris-Acetato EDTA) 0,5X e corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos).

Na primeira canaleta do gel foram dispensados 5 μ L de marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, Estados Unidos), nas canaletas seguintes foram aplicados o controle positivo (DNA genômico obtido de verme adulto de *A. ceylanicum*), as amostras e, por fim, o controle negativo (água ultrapura no lugar do DNA). Em cada canaleta, foi aplicado um volume de 5 μ L de amostra, 1 μ L de tampão de amostra 6X e 1 μ L de GelRed® 400X. As amostras correram no gel sob uma voltagem de 100V durante 30 minutos. O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta acoplado com uma câmera. As imagens capturadas foram analisadas e arquivadas.

4.8 Purificação do DNA

Os produtos de PCR foram purificados com PEG (Promega, Estados Unidos) (20% polietilenoglicol 8.000 em solução de NaCl 2,5 M). A precipitação com o sistema PEG foi

realizada misturando, em um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL, 1 volume do produto amplificado (geralmente 25 μ L) com 1 volume de PEG 20%, seguida de uma intensa homogeneização em vórtex. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 13.000 xg, a 25 °C por 45 min, com o subsequente descarte do sobrenadante e adição de 125 μ L de etanol 80%. Foi realizada uma centrifugação a 13.000 xg, a 25 °C por 15 min, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao tubo o mesmo volume de etanol 80% e o tubo centrifugado sob os mesmos parâmetros para retirada do excesso de sal. O sobrenadante foi descartado e o precipitado redissolvido em 12 μ L de água ultrapura. O material foi dosado, em duplicata, através de espectrofotômetro NanoDropLite™ (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) e armazenado a -20 °C.

4.9 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado seguindo o método descrito originalmente por Sanger e colaboradores (1977). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Estados Unidos) em um volume final de 10 μ L contendo 1 μ L do iniciador direto ou reverso (10 μ M), 1 μ L de produto de PCR purificado (5-20 ng para fragmentos de 500-1000 pb), 5,5 μ L de água ultrapura e 2,5 μ L de BigDye. As corridas foram feitas em capilares de 50 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software *Sequencing Analysis 5.4* utilizando o *Base Caller KB*. Cada amostra foi sequenciada no sentido direto e reverso.

4.10 Análise de dados

A análise do cromatograma foi feita utilizando o software ChromasPro (Technelysium, Austrália). Para o alinhamento e análise das sequências, foi utilizado o software MEGA (versão 11.0.13) e as filogenias foram construídas com o método Máxima Verossimilhança, do inglês "*Maximum Likelihood*" no mesmo programa. As amostras que apresentaram variabilidade nucleotídica foram traduzidas no mesmo software e observado se houve alteração no aminoácido codificado da trinca mutada. Adicionalmente, foi realizada a inferência bayesiana no software Mr.Bayes versão 3.2.7, seguindo o modelo GTR+1 Markov Chain Monte Carlo para os marcadores mitocondriais, seguindo o método de Hayasaka e colaboradores (1988) por 2.000.000 gerações de árvores filogenéticas. A partir dos dados gerados por esse software, foram construídas filogenias no programa FigTree versão 1.4.4.

5. RESULTADOS

5.1 Análise parcial do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase Subunidade 1 (COI)

5.1.1 Amplificação, purificação e sequenciamento

As amostras de DNA genômico das diferentes passagens para o isolamento e depois para a manutenção das cepas resistente e selvagem, conforme mostrado na Tabela 1, foram amplificadas por PCR conforme parâmetros estabelecidos previamente no item 4.6.1. O produto de PCR para amplificação de COI corresponde a um fragmento de aproximadamente 705pb. Através de corrida eletroforética em gel de agarose 1%, das 44 amostras, foram observadas ampliações em 34. Na Figura 5 é mostrado um gel representativo contendo produtos dessa amplificação.

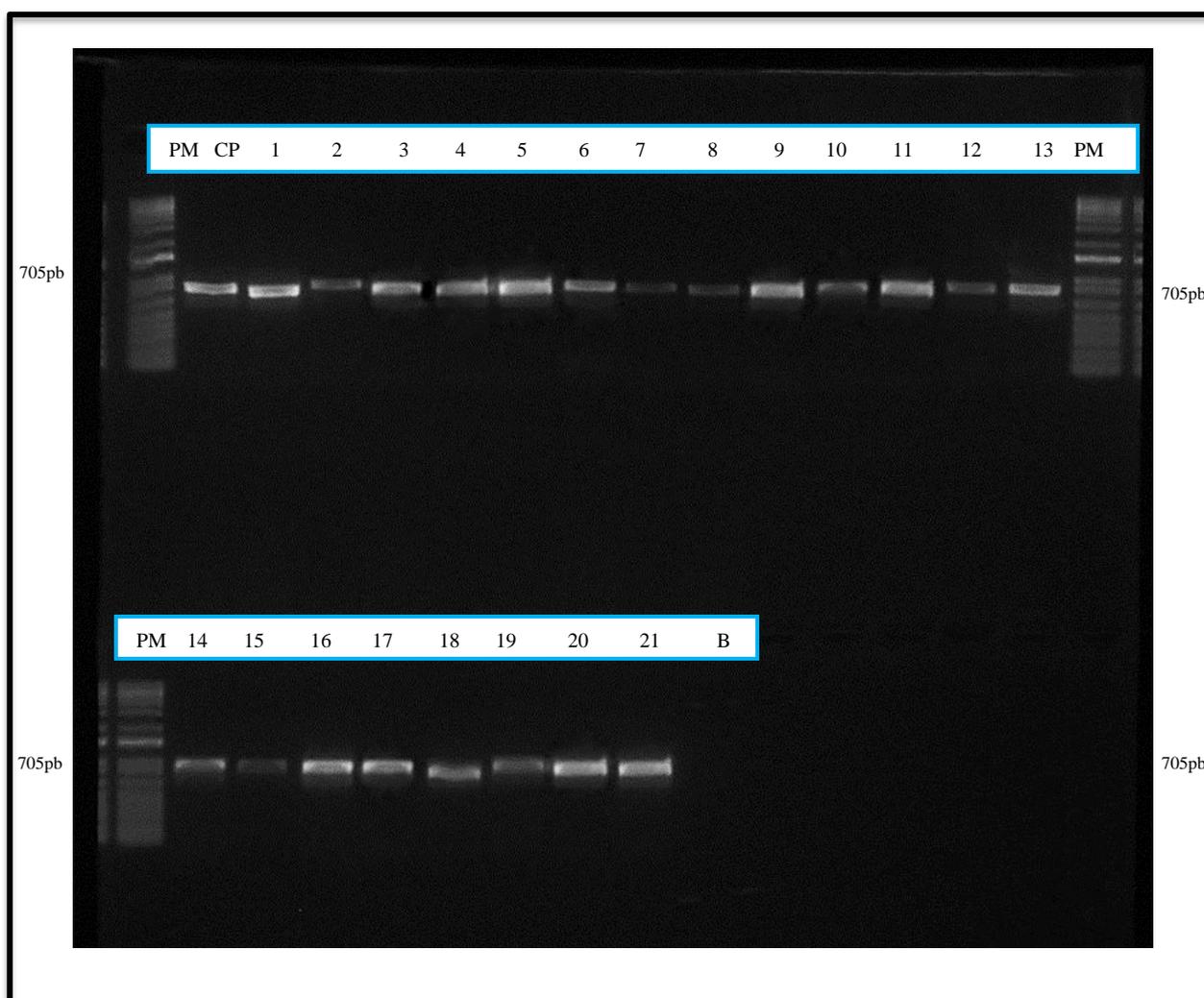


Figura 5: Gel representativo da amplificação da região do gene COI utilizando DNA genômico de vermes machos adultos de *A. ceylanicum*. PM = 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), CP = controle positivo, B = branco (água ultrapura). O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1%, com amplicon esperado de 705pb.

Os indicadores LCO1490 e HCO2198 foram eficientes no sequenciamento das amostras de COI de *A. ceylanicum*, permitindo a obtenção de fragmentos de até 700 pb. Porém, amostras que apresentaram padrões semelhantes de intensidade de banda no gel de agarose e na dosagem pós purificação apresentaram qualidades distintas no sequenciamento. Algumas amostras, mesmo após repetições no sequenciamento, não produziram seqüências consenso superiores a 600 pb. As amostras foram sequenciadas tanto no sentido direto quanto no reverso, ambas foram alinhadas em conjunto formando a seqüência consenso entre ambas as fitas e, a partir dessa

sequência resultante, as amostras foram plotadas no software MEGA. Sendo assim, ao realizar a edição da fita, retirando ambas as extremidades que ficaram com baixa qualidade, foi possível obter sequências de 612 pb, tais sequências foram alinhadas e submetidas à construção de árvore filogenética no MEGA pelo método Maximum Likelihood (versão 11).

Dentre as amostras, foram incluídas amostras da terceira, quarta e quinta infecções de quando a cepa resistente foi selecionada, em 2019, e amostras da cepa resistente e sensível de vermes recuperados da infecção de março de 2023. As amostras 36, 38, 39 e 40, todas da quarta infecção, apresentaram apenas um nucleotídeo diferente para cada, em comparação com as demais sequências, sendo que a amostra 36 apresentou a mesma alteração que a amostra 39 (posição 389) e a amostra 38 apresentou a mesma alteração que a amostra 40 (posição 528), conforme demonstrado nas Figuras 6a e 6b.

1. 24	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
2. 25	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
3. 27	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
4. 28	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
5. 34	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
6. 35	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
7. 37	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
8. 38	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A T A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
9. 40	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A T A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
10. 41	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
11. 46	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
12. 47	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
13. 52	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
14. 55	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
15. 58	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
16. 62	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
17. 64	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
18. 54	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
19. 63	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
20. 66	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
21. 36	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
22. 39	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
23. 53	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
24. 56	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
25. R1	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
26. R2	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
27. R6	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
28. R8	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
29. R9	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
30. R16	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A
31. R20	T T T G T T T G A A C T G T A T T G T A A C A G T T T T T T T A T T G G T T T T A T C A T T A C C T G T A T T A G C T G G G G C A A

Figura 6a: Alinhamento das sequências de COI de *A. ceylanicum*. As amostras destacadas, 38 e 40, apresentaram uma diferença nucleotídica comparado com as demais sequências, uma troca de citosina por timina na posição 528

1. 24	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
2. 25	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
3. 27	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
4. 28	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
5. 34	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
6. 35	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
7. 37	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
8. 38	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
9. 40	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
10. 41	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
11. 46	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
12. 47	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
13. 52	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
14. 55	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
15. 58	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
16. 62	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
17. 64	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
18. 54	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
19. 63	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
20. 66	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
21. 36	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G C T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
22. 39	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G C T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
23. 53	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
24. 56	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
25. R1	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
26. R2	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
27. R6	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
28. R8	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
29. R9	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
30. R16	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C
31. R20	A T A T A G G G T G T G G A A C T A G A T G A A C A G T T T A T C C A C C T T T A A G A A C A T T A G G T C A T C C T G G A A G A A G T G T A G A T T T A G C

Figura 6b: Alinhamento de seqüências do gene COI de *A. ceylanicum*. As amostras destacadas, 36 e 39, apresentaram uma alteração no nucleotídeo 389, apresentando uma citosina onde, nas demais amostras, aparece uma timina.

As amostras de COI que apresentaram uma base nitrogenada diferente representam 0,16% de variabilidade (1/612) comparado com as demais amostras, representando uma baixa diversidade intrapopulacional.

As seqüências que apresentam variabilidade nucleotídica foram traduzidas a fim de verificar se as proteínas resultantes seriam diferentes. Para as amostras 38 e 40, o códon AAT que codifica o aminoácido asparagina, passou a ser AAC, codificando uma asparagina, configurando uma mutação silenciosa. As amostras 36 e 39, o códon AGT que codifica uma serina, passou a ser AGC, codificando uma serina, configurando, também, uma mutação silenciosa.

5.1.2 Análise filogenética

Para a avaliação da proximidade dessas amostras de diferentes gerações e de fenótipos diferentes em relação à porcentagem de alelos contendo SNPs para o códon 198 ao longo das passagens, foi construída uma árvore filogenética (Figura 7) com uma sequência de uma amostras “TIPO” (a qual representa a maior parte das amostras - amostra 25); amostras “TIPO” que apresentaram polimorfismo (36 e 38) e com sequências de outros ancilostomídeos, a sequência de um exemplar de *A. ceylanicum* da China depositada no Genbank (sob o nº de acesso NC035142.1), *A. caninum* (sob nº de acesso NC012309.1), *A. tubaeforme* (sob nº de acesso NC034289.1), *A. duodenale* (sob nº de acesso NC003415.1), *N. americanus* (sob nº de acesso NC003416.2) e *Trichostrongylus axei* (sob nº de acesso NC013824.1) como grupo externo.

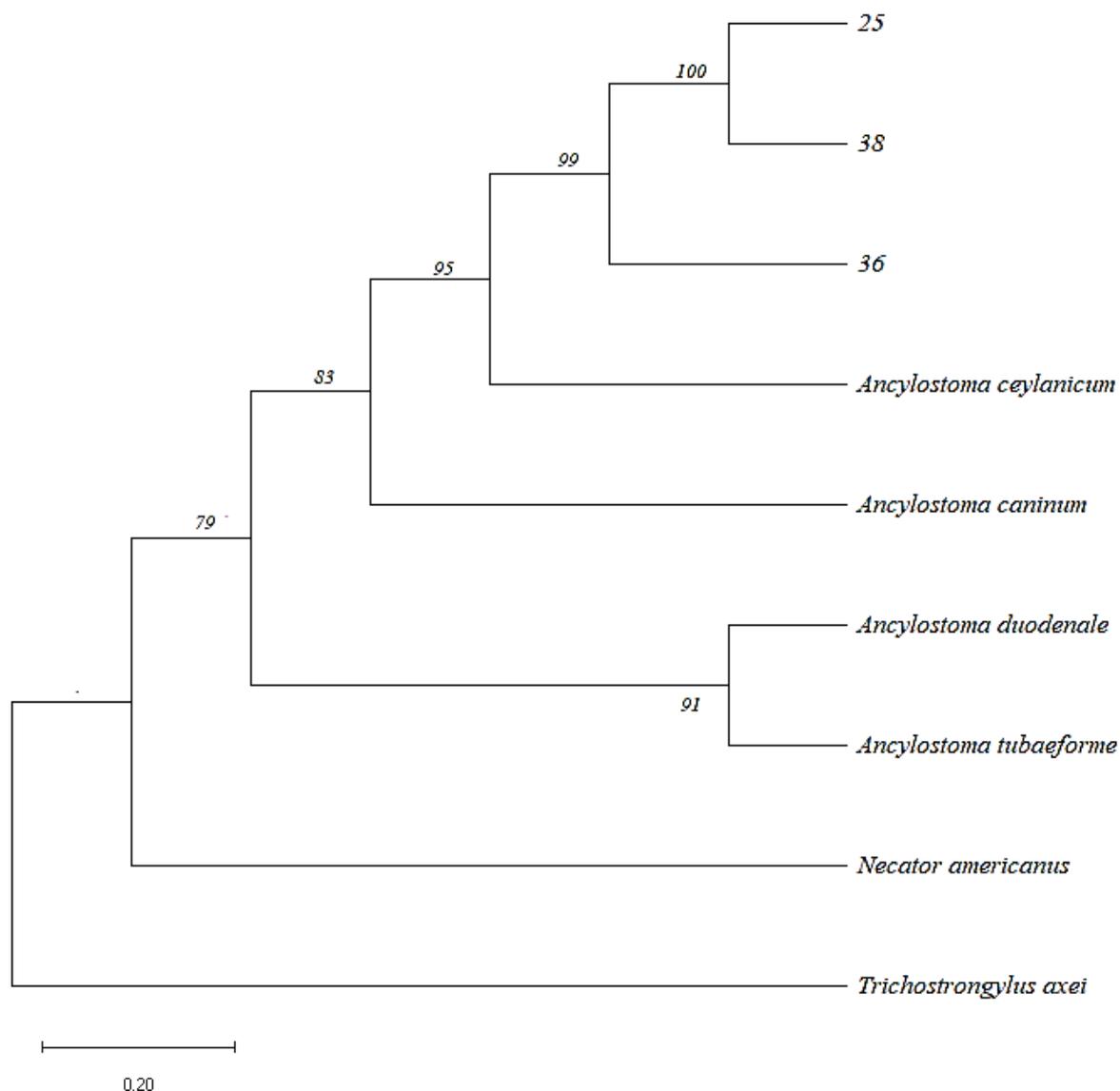


Figura 7: Árvore filogenética construída para as amostras de *A. ceylanicum* utilizando a região do gene COI como marcador genético. A construção desta filogenia foi realizada através do método de Maximum Likelihood, utilizando o software MEGA v.11.0.13.

Os valores de bootstrap do agrupamento das amostras confirmam a confiabilidade da topologia da árvore. Os valores de bootstrap correspondem a cobertura particular do clado após inúmeras replicatas da filogenia, sendo 100% o maior nível de confiabilidade (Russo; Selvatti, 2018). As amostras em questão foram submetidas a 1.000 replicatas, a fim de aumentar a confiabilidade do agrupamento encontrado.

Para a confirmação, foi construída outra árvore filogenética (Figura 8) com demais sequências do gene COI de *A. ceylanicum* depositadas no Genbank de diferentes localidades

geográficas para averiguar a semelhança nucleotídica entre indivíduos de diferentes populações e *Trichostrongylus axei* (sob nº de acesso NC013824.1), como grupo externo.

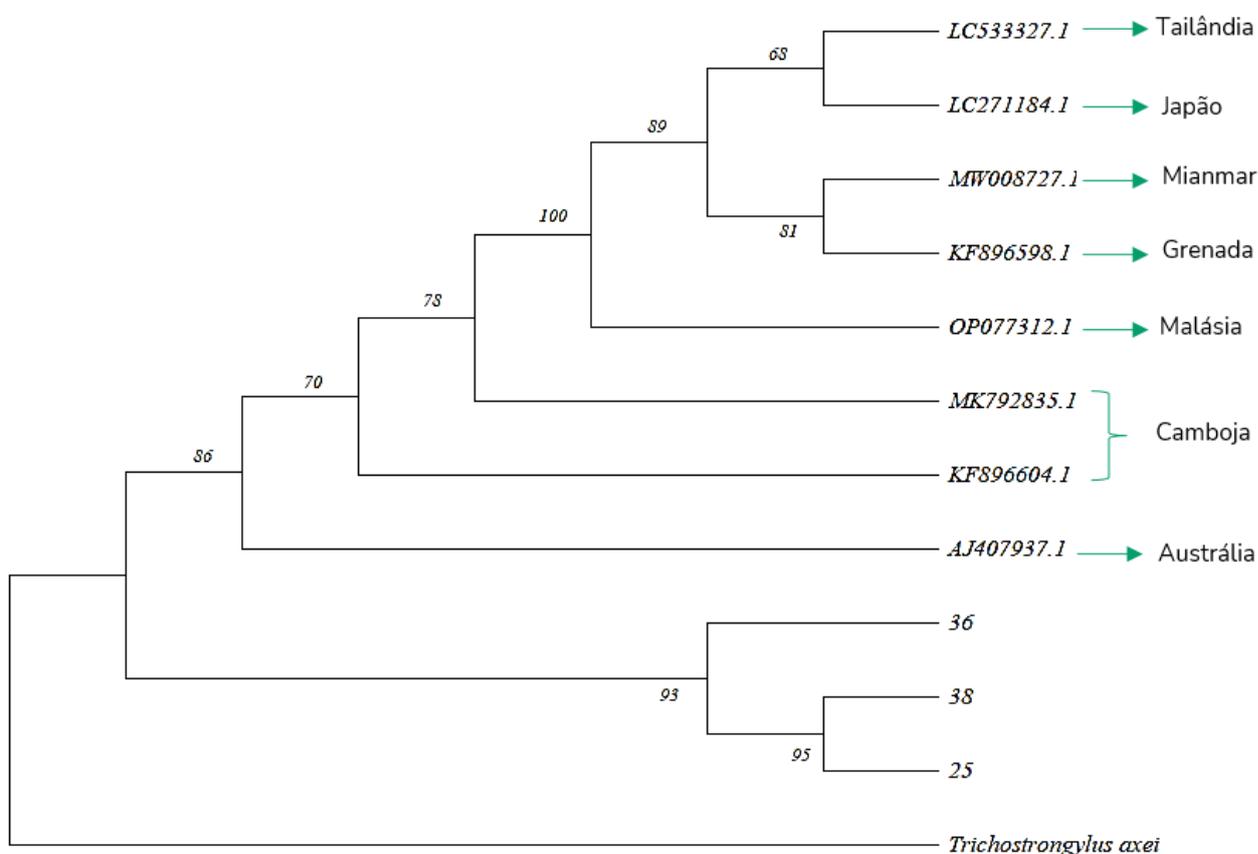


Figura 8: Árvore filogenética construída para as amostras de *A. ceylanicum* utilizando a região do gene COI como marcador genético comparando com demais sequências do gene depositadas no GenBank. A construção desta filogenia foi através do método de Máxima Verossimilhança e o programa utilizado foi o MEGA v.11.0.13. A sequência LC533327.1 é originária da Tailândia, LC271184.1 do Japão, MW008727.1 do Mianmar, OP077312.1 de Grenada, MK792835.1 da Malásia, KF896598.1 e KF896604.1 do Camboja e AJ407937.1 da Austrália.

Conforme é possível observar na árvore da Figura 8, as sequências do gene COI obtidas a partir do presente estudo foram agrupadas juntas e as demais, de diferentes localidades, foram agrupadas em outros ramos, demonstrando a diversidade genética que pode ser observada nesse marcador mitocondrial, principalmente em amostras de campo. Vale ressaltar que as sequências passaram por edição para todas terem o mesmo tamanho (301pb).

Quanto à inferência bayesiana, foi construída uma filegenia (Figura 9) e, conforme é possível observar, os resultados foram bem semelhantes ao se comparar com a filogenia com base no método de Máxima Verossimilhança.

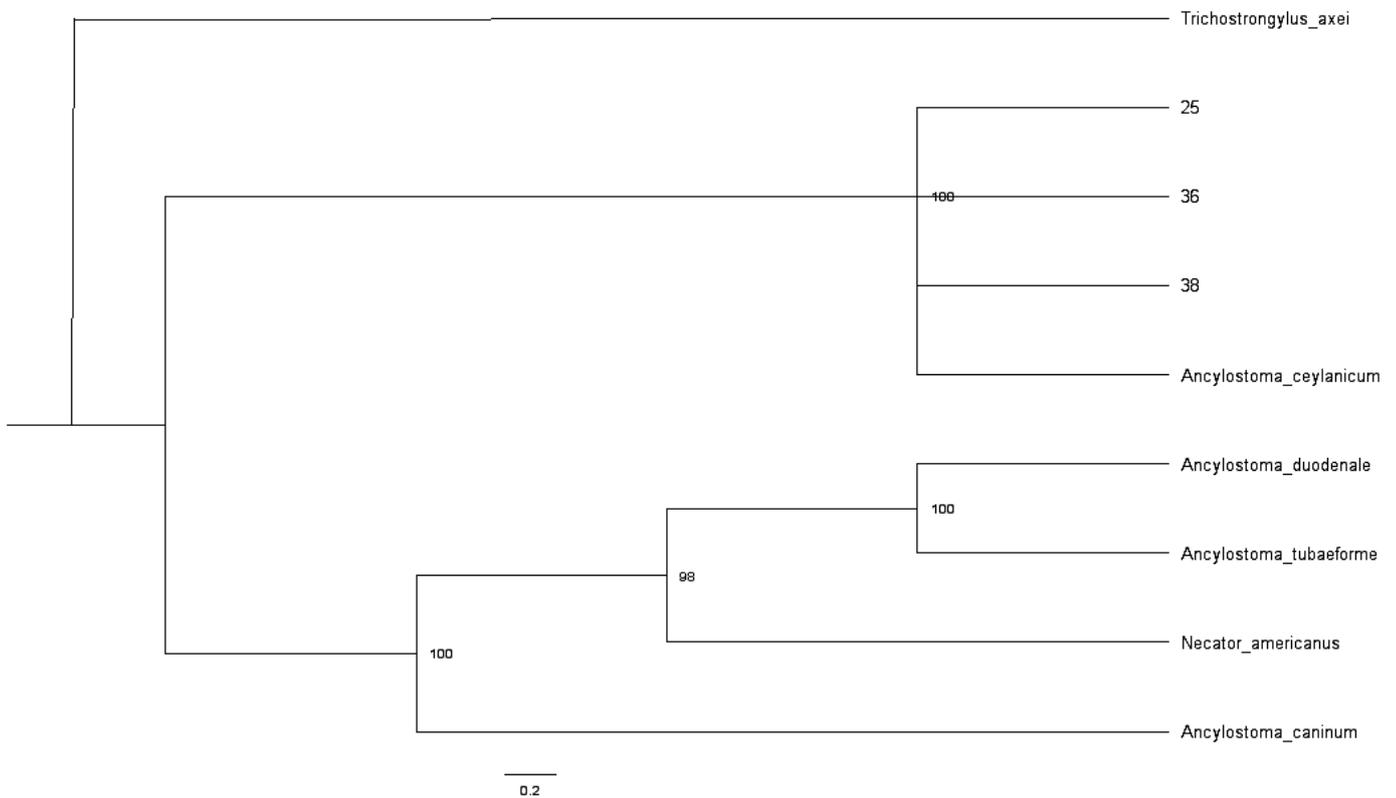


Figura 9: Árvore filogenética construída a partir da inferência bayesiana para a região do gene COI de *A. ceylanicum*. A construção desta filogenia foi realizada utilizando o software Mr.Bayes v.3.2.7.

5.2 Amplificação parcial do gene mitocondrial NAD1

5.2.1 Amplificação, purificação e sequenciamento

Todas as amostras de DNA genômico foram amplificadas por PCR, conforme os parâmetros descritos no item 4.6.1. O produto de PCR para amplificação de NAD1 corresponde a um fragmento de aproximadamente 503pb. Através de corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%, das 44 amostras, foram observadas amplificações em 36. Na Figura 10 é mostrado um gel representativo contendo produtos dessa amplificação.

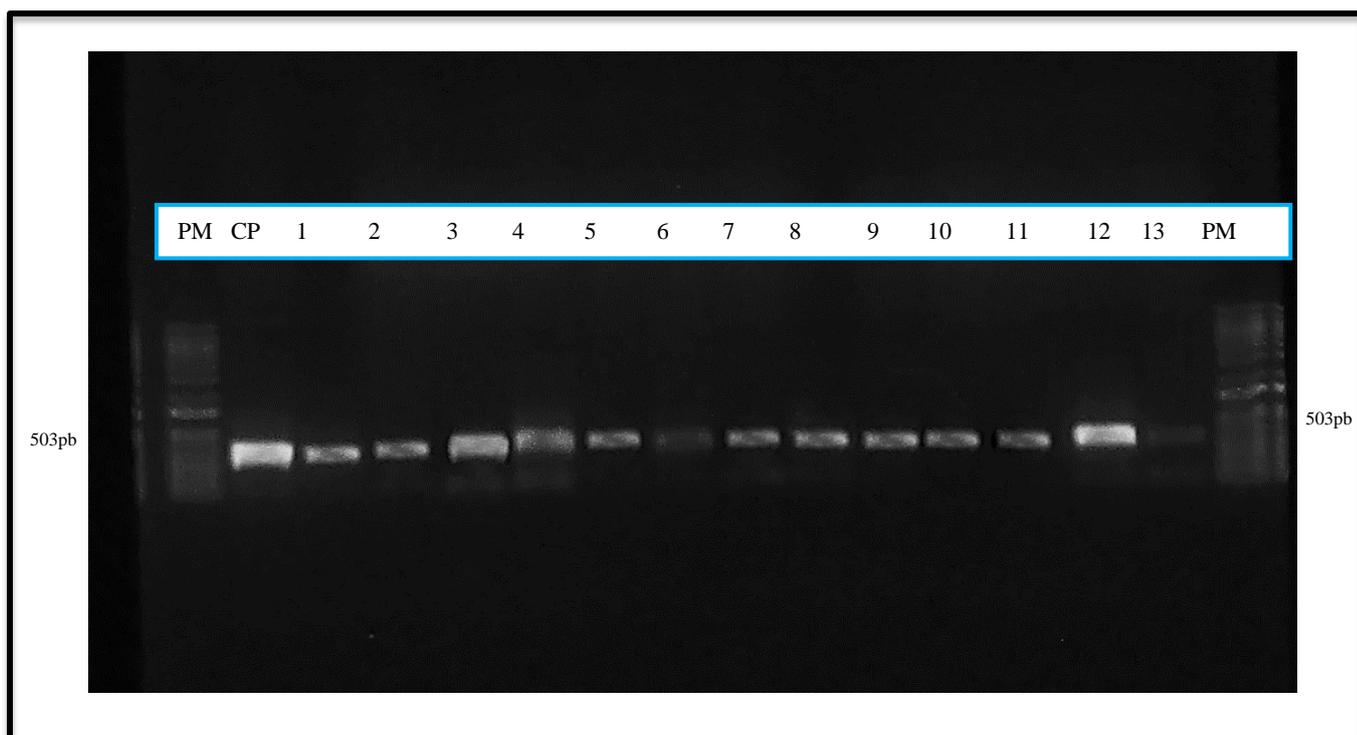


Figura 10: Amplificação da região do gene NAD1 utilizando DNA genômico de vermes machos resistentes de *A. ceylanicum*. PM = 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), CP = controle positivo, B = branco (água ultrapura). O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 0,8% e o produto amplificado gera um fragmento de 503pb.

Os iniciadores foram eficientes no sequenciamento das amostras e permitiram a obtenção de sequências de até 500 pb, porém, devido à baixa qualidade já esperada nas extremidades da fita, ambas foram retiradas e descartadas, resultando num fragmento de 398 pb. Essas sequências foram alinhadas e submetidas à construção de uma árvore filogenética utilizando o método Máxima Verossimilhança no software MEGA v11.0.13.

As sequências obtidas foram provenientes da terceira, quarta e quinta infecções do processo para a seleção da cepa resistente e, assim como para as amostras usadas para COI, foram também analisadas amostras da cepa resistente da infecção de março de 2023 e da cepa selvagem para atuar como controle. Dentre essas amostras, somente uma amostra da quarta infecção (amostra 46) apresentou polimorfismo, sendo identificado uma citosina onde, nas demais, é encontrada uma adenina na posição 48 (Figura 10) e trata-se de uma variabilidade de 0,25% (1/398). A sequência que apresentou polimorfismo foi traduzida e o códon ACT que codifica treonina, passou a ser CCT, codificando uma prolina, configurando uma mutação não silenciosa.

1. 24	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
2. 25	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
3. 27	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
4. 28	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
5. 34	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
6. 35	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
7. 37	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
8. 38	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
9. 40	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
10. 41	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
11. 46	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A C C T T T T A A A A A A
12. 47	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
13. 52	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
14. 55	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
15. 58	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
16. 59	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
17. 60	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
18. 61	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
19. 62	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
20. 63	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
21. R1	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
22. R2	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
23. R6	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
24. R8	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
25. R9	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
26. R16	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
27. R20	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
28. R34	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
29. S1	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
30. S2	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A
31. S3	A A A G T A A G T T T T A T A G G T G T T T T A C A G G C T T T A T T A G A T G G T G T T A A A C T T T T A A A A A A

Figura 11: Alinhamento de seqüências do gene NAD1 de *A. ceylanicum*. A amostra destacada, 46, apresentou uma alteração no nucleotídeo, apresentando uma citosina onde, nas demais amostras, aparece uma adenina na posição 48.

5.2.2 Análise filogenética

Para a avaliação da proximidade das amostras de diferentes gerações e diferentes fenótipos, foi construído uma árvore filogenética (Figura 12) com amostras “tipo” (amostra 25), a amostra que apresentou diferença nucleotídica (amostra 46) seqüência de *A. ceylanicum* da China depositada no Genbank (sob o nº de acesso NC035142.1), *A. caninum* (sob nº de acesso NC012309.1), *A. tubaeforme* (sob nº de acesso NC034289.1), *A. duodenale* (sob nº de acesso NC003415.1), *N. americanus* (sob nº de acesso NC003416.2) e *T. axei* (sob nº de acesso JX272234.1) como grupo externo e as seqüências foram submetidas à 1.000 replicatas.

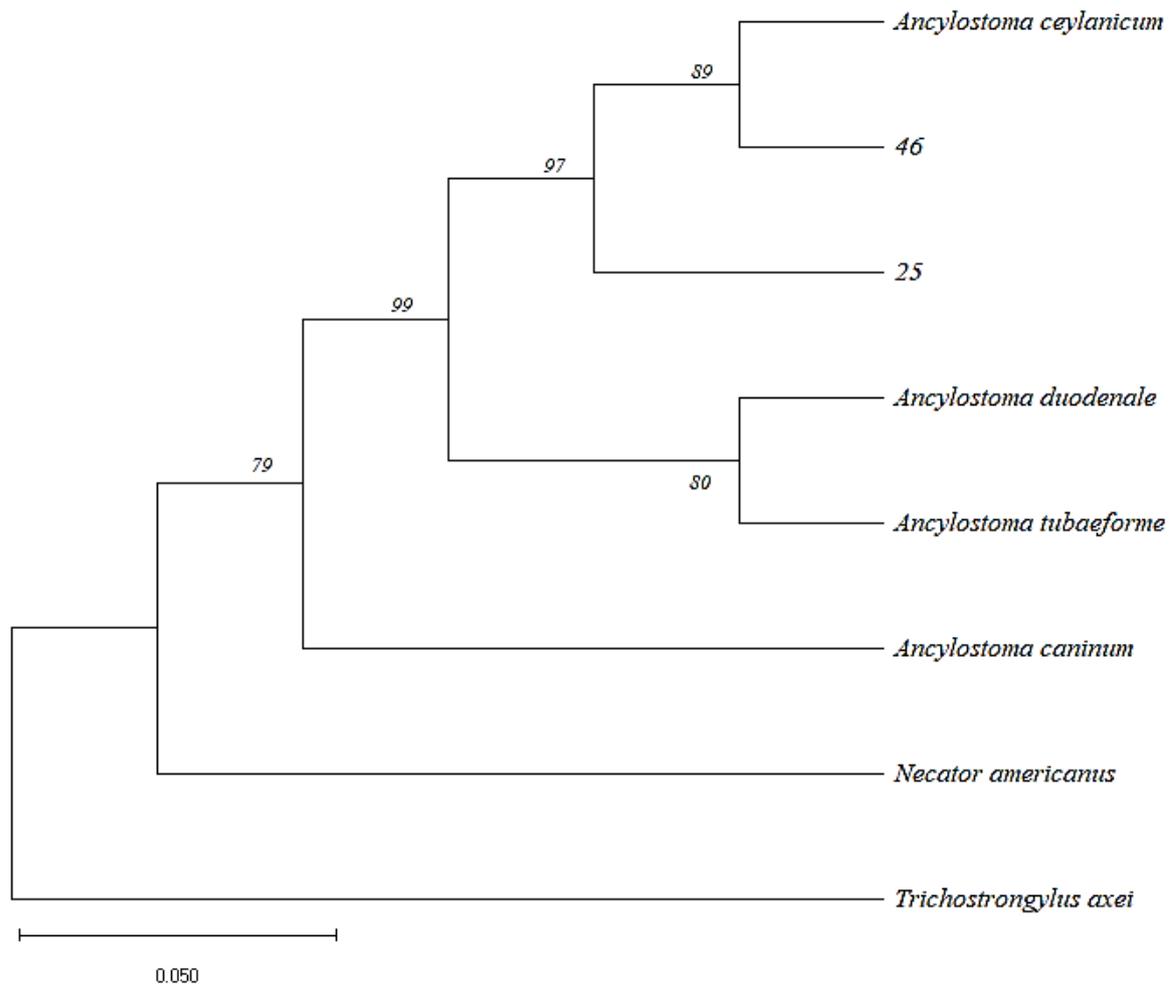


Figura 12: Árvore filogenética construída para as amostras de *A. ceylanicum* utilizando a região do gene NAD1 como marcador genético. A construção desta filogenia foi utilizando o método de Máxima Verossimilhança e o programa utilizado foi o MEGA v.11.0.13.

Em relação à inferência bayesiana para NAD, a filogenia (Figura 12) apresentou um padrão semelhante para as sequências do presente estudo, bem como para as demais, ao se comparar com o método de Máxima Verossimilhança, corroborando ainda mais a semelhança filogenética entre as amostras em questão em virtude de um valor alto de bootstrap.

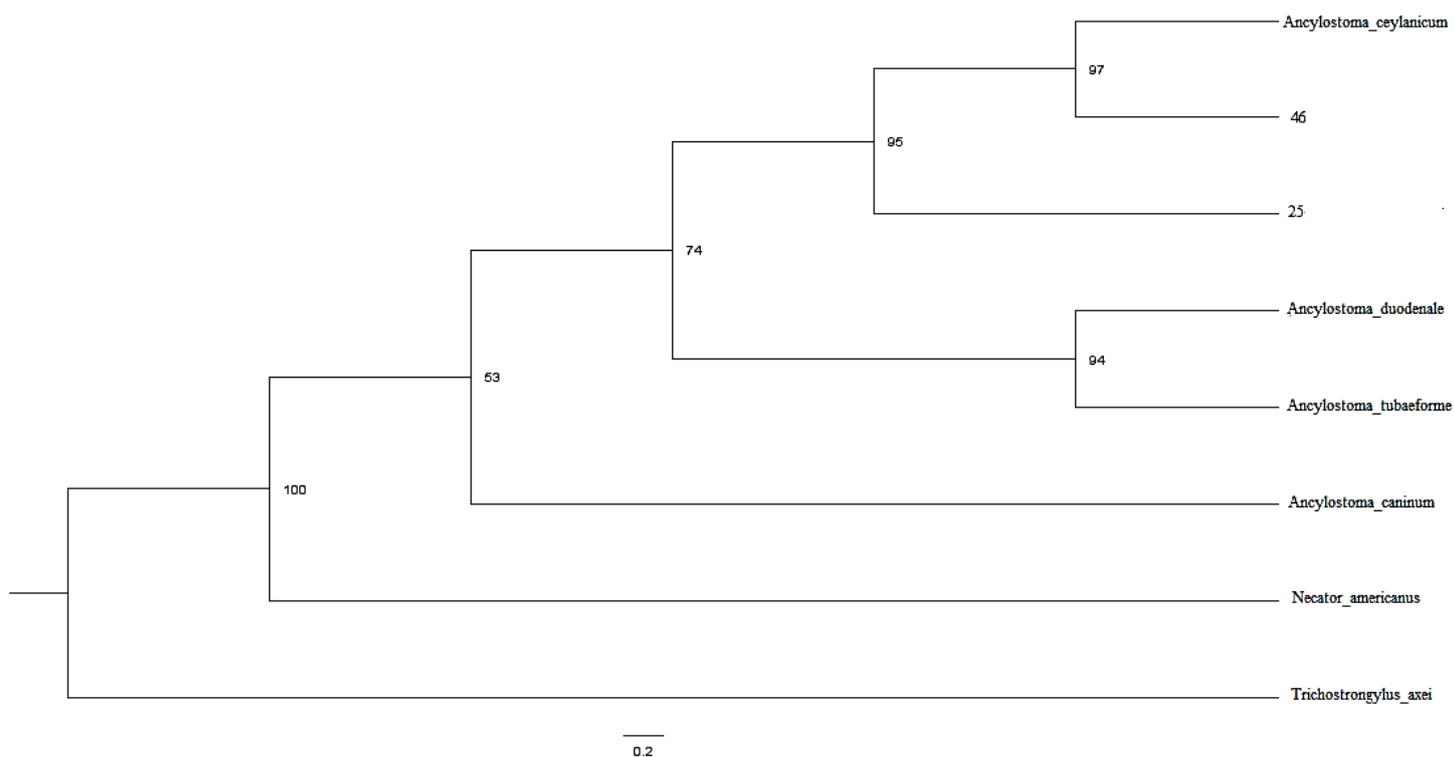


Figura 13: Árvore filogenética construída a partir da inferência bayesiana para a região do gene NAD1 de *A. ceylanicum*. A construção desta filogenia foi realizada utilizando o software Mr.Bayes v.3.2.7.

As sequências idênticas foram submetidas ao BLAST e apresentaram 100% de identidade com a sequência de n° de acesso AP017674.1, originária do Japão e 98,16% de identidade com as sequências sob n° de acesso NC035142.1 e KY640299.1, ambas originárias da China. A amostra 46, amostra que apresentou uma base nitrogenada diferente, apresentou 98,2% de identidade com a sequência AP017674.1 e 96,4% de identidade com as sequências NC035142.1 e KY640299.1.

O valor de bootstrap do agrupamento das sequências de *A. ceylanicum* foi relativamente alto, o que aumenta a confiabilidade deste agrupamento. O resultado da filogenia e do sequenciamento das amostras demonstra que, assim como para o gene COI, não apareceram mutações significativas nesta região do genoma mitocondrial da cepa, o que pode ser devido ao longo tempo que essa cepa foi isolada, não tendo a oportunidade de recombinações gênicas.

Não foi possível construir uma outra árvore filogenética com sequências completas ou parciais do gene NAD1 de *A. ceylanicum*, visto que existem, até a data deste estudo, apenas três sequências do genoma mitocondrial completo do parasito em questão (sequências sob n° de acesso NC035142.1, AP017674.1 e KY640299.1) e, ao realizar um BLAST, as sequências NC035142.1 e KY640299.1 ambas apresentam 100% de identificação entre si, enquanto a

sequência AP017674.1 apresenta 98,28% de identificação com as demais, encontrando 15 nucleotídeos diferentes em uma sequência de 873 pb.

5.3 Teste fenotípico

5.3.1 Primeiro teste

Conforme descrito no item 4.3.5, foi realizado um teste *in vivo* a fim de verificar a condição de resistência da cepa de *A. ceylanicum* mantida em laboratório três anos e meio após a seleção da cepa acerca da infecção de novembro de 2022. Após a infecção e acompanhamento de dois grupos de hamsters, foram recuperados 166 vermes do grupo infectado com a cepa selvagem, e 238 vermes do grupo infectado com a cepa resistente. Os dados referentes à recuperação dos vermes estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2: Quantitativo de parasitos recuperados antes e após o tratamento com 0,3mg de albendazol dos hamsters infectados com as cepas sensível e resistente de *A. ceylanicum* três anos e meio após a seleção da cepa. O hamster que não apresentou vermes está destacado em vermelho. H: hamster.

Cepa selvagem não tratado							Cepa resistente não tratado						
H1	H2	H3	H4	H5	H6	Total	H1	H2	H3	H4	H5	H6	Total
32	15	41	18	27	33	166	31	9	19	27	23	18	127
Cepa selvagem tratado							Cepa resistente tratado						
H1	H2	H3	H4	H5	H6	Total	H1	H2	H3	H4	H5	H6	Total
0	0	0	0	0	0	0	0	27	33	5	36	10	111

Com os resultados obtidos com esse teste, é possível observar que não houve reversão do fenótipo de resistência ao ABZ da cepa até o período de três anos e meio após a seleção da cepa, visto que mesmo após o tratamento com a dose letal de albendazol para a cepa selvagem, ainda foram recuperados vermes da cepa resistente.

Após o primeiro teste fenotípico, especificamente na infecção de maio, tivemos problemas técnicos relativos à manutenção da temperatura da estufa na qual as coproculturas

se encontravam, não possibilitando a eclosão satisfatória das larvas e, conseqüentemente, foram recuperados um número inferior de larvas da cepa resistente, sendo necessário macerar o útero de vermes adultos fêmeas junto com as fezes para garantir um maior número de larvas.

5.4 Sequenciamento do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 após 4 anos de obtenção da cepa

5.4.1 Amplificação e purificação

As amostras de DNA genômico foram amplificadas por Nested-PCR conforme parâmetros estabelecidos no item 4.5.3. Foram amplificados o DNA de 25 vermes da cepa resistente obtidos de uma infecção de março de 2023. Na reação de amplificação foram utilizados um controle positivo (DNA genômico obtido de um pool de vermes de *A. ceylanicum*) e branco (água). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 0,8%. Um gel demonstrativo dessas análises pode ser observado na Figura 14.

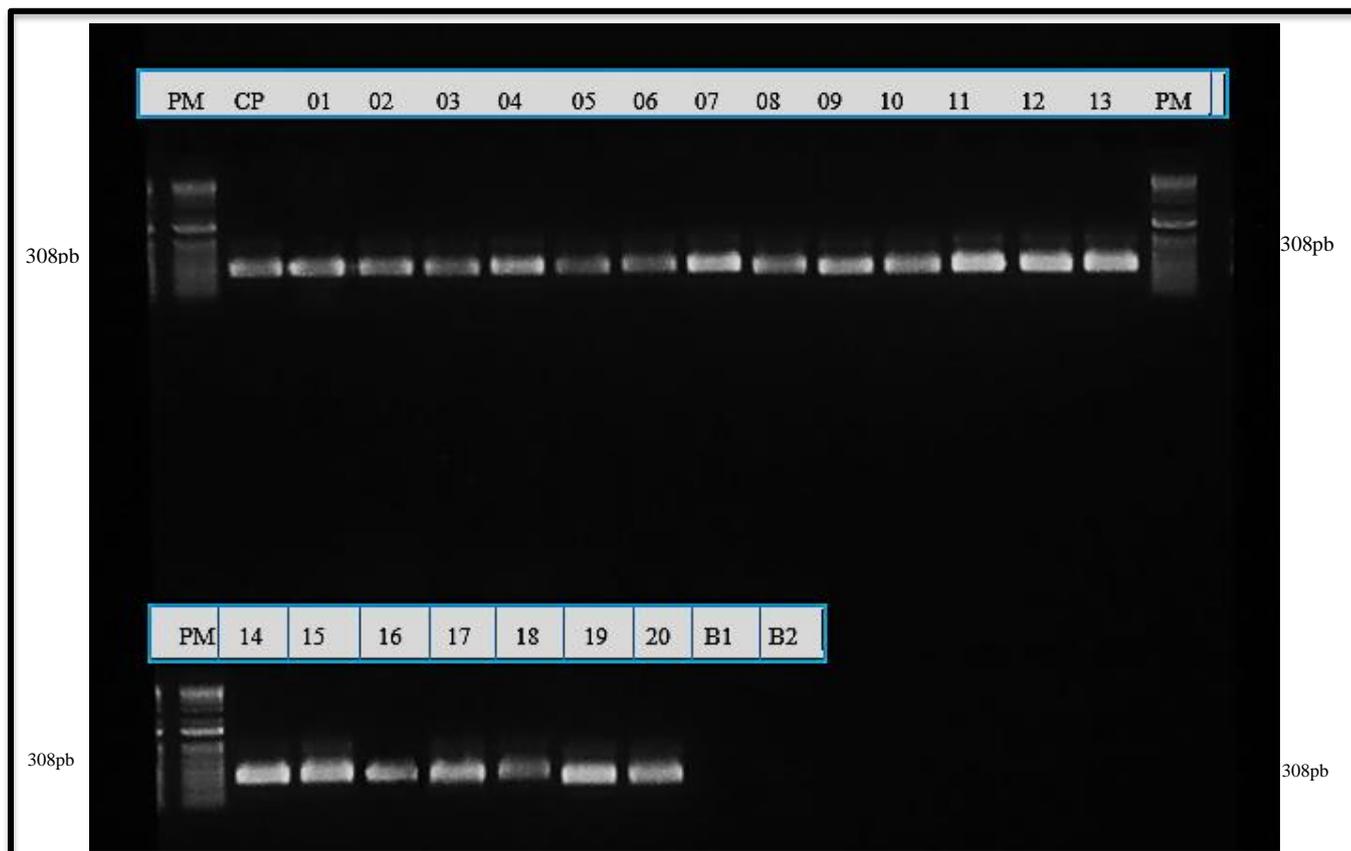


Figura 14: Amplificação dos códons 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 utilizando DNA genômico de machos adultos de *A. ceylanicum*. PM = 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), CP = controle positivo, B1 = branco da 1ª reação e B2 = branco da 2ª reação. O fragmento resultante da amplificação possui 308pb.

5.4.2 Análise de SNPs nos códons 198 e 200

Após a amplificação e purificação das amostras de β -tubulina isotipo 1, 30 amostras da cepa resistente foram sequenciadas. Adicionalmente, 10 amostras da cepa selvagem foram sequenciadas. Este procedimento teve como objetivo a comparação dos códons 198 e 200 em um contexto envolvendo a cepa resistente em momentos diferentes. Das 30 amostras da cepa resistente que foram sequenciadas, nenhuma apresentou mutação em nenhum dos códons analisados. Os mesmos resultados foram encontrados para a cepa selvagem. Complementarmente, para a confirmação do perfil obtido, foram sequenciadas mais 25 amostras da cepa selvagem para a confirmação do perfil obtido e para excluir a possibilidade de troca entre as duas cepas.

Na Figura 15 estão representados os cromatogramas do sequenciamento de amostras da região dos códons 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 da cepa selvagem (15A), resistente (15B) e de uma amostra sequenciada quando a cepa resistente foi selecionada em 2019 (15C).

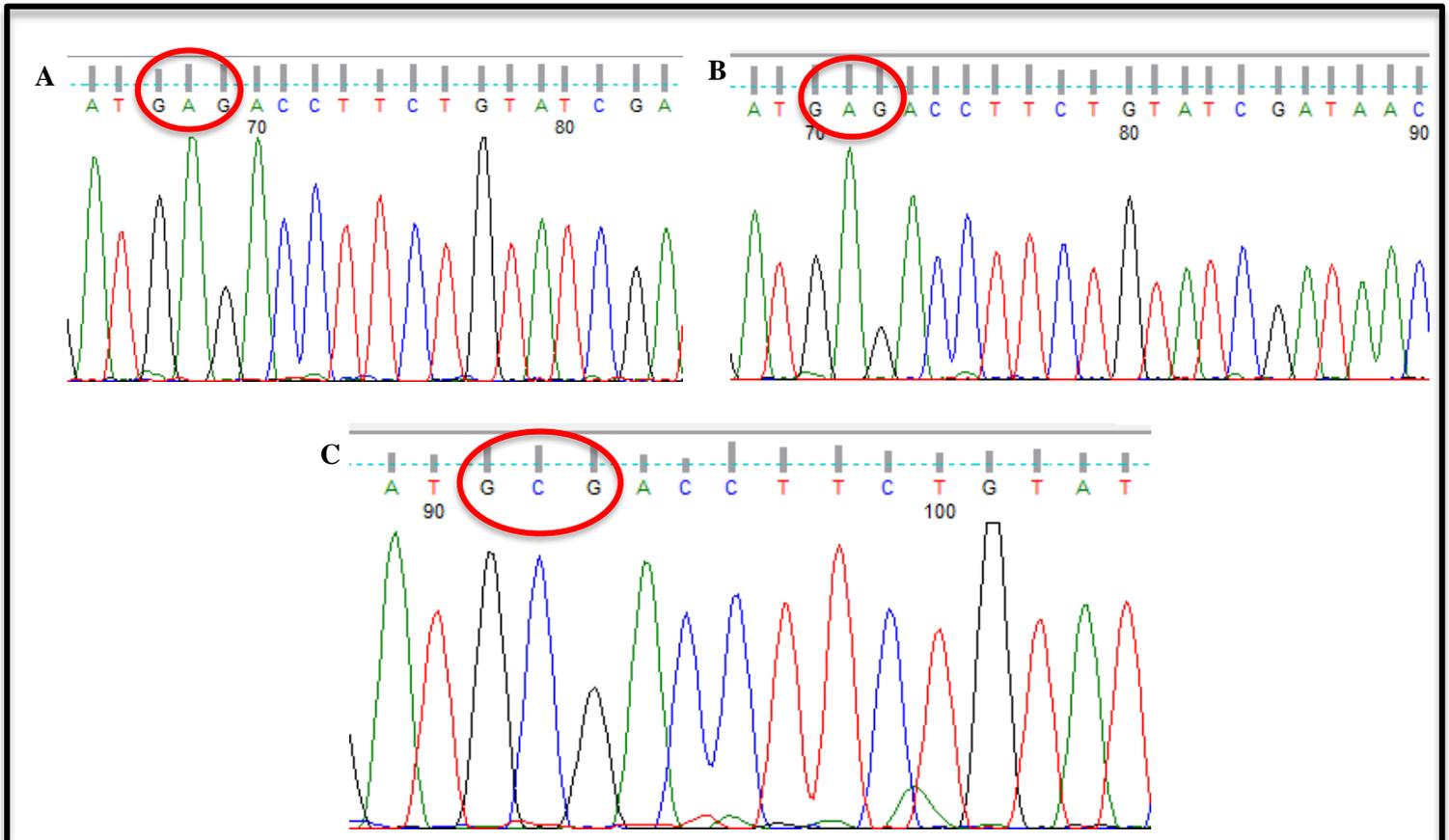


Figura 15: Cromatogramas do sequenciamento dos códons 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 para as cepas sensível e resistente de *A. ceylanicum*. A: Cromatograma de uma amostra da cepa resistente que não apresentou SNP no códon 198 (destacado em vermelho), apresentando o pico de adenina na segunda base, significando ausência de mutação; **B:** Cromatograma de uma amostra da cepa selvagem que não apresentou SNP no códon 198 (destacado em vermelho), apresentando pico de adenina na segunda base, significando ausência de mutação; **C:** Cromatograma de uma amostra da cepa resistente quando selecionada em 2019, apresentando um pico de citosina na segunda base GCG (destacado em vermelho), significando mutação homocigótica.

É possível visualizar que não existe o pico de citosina (GCG) no códon 198, que indica códon mutado, nas amostras da cepa selvagem e resistente, indicando perda do alelo contendo SNPs nesse códon que, quando a cepa resistente foi selecionada, estava presente em 100% das

amostras, em homozigose ou heterozigose. Nenhuma das amostras de ambas as cepas apresentaram SNP no códon 200, mutação identificada com uma frequência de 5,13% (5/94 amostras) quando houve seleção da cepa (Medeiros, 2022).

5.5 Realização do segundo teste fenotípico

5.5.1 Segundo teste fenotípico

Nesse teste, animais previamente infectados em julho de 2023 com a cepa resistente foram utilizados para verificar se vermes ainda seriam recuperados após o tratamento. Foram formados dois grupos, cada um composto por quatro hamsters infectados com a cepa resistente. Em um grupo, os animais foram submetidos ao tratamento, enquanto o outro grupo não foi tratado (controle não tratado). O segundo teste fenotípico confirmou os resultados do sequenciamento da cepa, uma vez que não houve a recuperação de vermes em nenhum dos animais tratados com albendazol da cepa “resistente”, conforme observado na Tabela 3. Concluimos que, devido às dificuldades encontradas na obtenção de larvas nas coproculturas anteriores, sendo as larvas obtidas oriundas de uma pequena quantidade de fêmeas, a cepa resistente foi perdida.

Tabela 3: Quantitativo de parasitos recuperados antes e após o tratamento com 0,3mg de albendazol dos hamsters infectados com a cepa resistente de *A. ceylanicum* quatro após a seleção da cepa. Um animal de cada grupo sucumbiu antes do tratamento, destacados em vermelho. H: hamster.

Cepa resistente não tratado					Cepa resistente tratado				
H1	H2	H3	H4	Total	H1	H2	H3	H4	Total
20	25	18	0	63	0	0	0	0	0

6. DISCUSSÃO

A ancilostomíase é considerada uma doença tropical negligenciada debilitante. A infecção crônica por ancilostomídeos pode acarretar algumas consequências a longo prazo, principalmente devido à hemorragia decorrente do processo de hematofagia e dilaceração causada no intestino (Bethony *et al.*, 2011; Pearson *et al.*, 2012). A anemia ferropriva e a queda nos níveis de hemoglobina de indivíduos infectados pode implicar em sintomas e manifestações clínicas mais severas em crianças e grávidas, visto que apresentam menor reserva de ferro, tornando-os mais vulneráveis em infecções por esses parasitos (Brooker *et al.*, 2008).

A estratégia de mitigação de geo-helmintoses adotada pela OMS visa eliminar a morbidade causada por essas doenças, desparasitando populações de risco com fármacos anti-helmínticos, principalmente o público mais acometido e com maiores chances de sequelas pós-infecção, como crianças em idade pré-escolar, escolares e mulheres em idade reprodutiva (Pilotte *et al.*, 2022).

Em regiões endêmicas, o tratamento em massa de toda a população é aplicado usando modelos matemáticos preditivos (Truscott *et al.*, 2016). Apesar de diminuir prevalência e intensidade de infecção, a administração do fármaco em massa pode levar à seleção de cepas que sejam resistentes ao tratamento. Existem vários estudos descrevendo a ocorrência da seleção de resistência para nematódeos de importância veterinária (Prichard, 2001; Kotze; Prichard, 2017; Soares *et al.*, 2023). Para nematódeos de importância médica, existem inúmeras descrições de achados de parasitos que apresentam genótipo de resistência em amostras de campo, principalmente para geo-helmintos, como ancilostomídeos (Diawara *et al.*, 2013; Furtado *et al.*, 2014; Orr *et al.*, 2019), *A. lumbricoides* (Zuccherato *et al.*, 2018; Furtado *et al.*, 2019) e *T. trichiura* (Oliveira *et al.*, 2022).

O presente estudo objetivou analisar a variabilidade de outros marcadores, além do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 na cepa resistente ao ABZ, em comparação com a cepa selvagem. A escolha de marcadores mitocondriais para esta análise foi estrategicamente feita com base em várias considerações. Em primeiro lugar, os marcadores mitocondriais são frequentemente utilizados em estudos filogenéticos e de variabilidade genética devido às suas características únicas. Os genes mitocondriais tendem a acumular mutações em uma taxa constante ao longo do tempo, o que os torna particularmente úteis para rastrear eventos evolutivos em escalas temporais mais profundas (Xu *et al.*, 2021).

No que tange os marcadores mitocondriais, COI e NAD1, a amplificação e sequenciamento das amostras foram bem-sucedidos, apesar da falha na amplificação de algumas amostras, podendo ter ocorrido falha no ensaio de PCR devido à baixa sensibilidade de iniciadores universais, como descrito por Ngui e colaboradores (2013) quando utilizaram iniciadores desenhados por Bowles e colaboradores (1992) e por Hu e colaboradores (2002), direcionados para a região do COI de nematódeos, para a amplificação da região COI de *A. ceylanicum*. Entretanto, isso não parece ser a causa no presente estudo, tendo em vista a alta conservação apresentada pelas sequências obtidas.

Os estudos relacionando a resistência aos BZs e a variabilidade genética utilizando marcadores moleculares mitocondriais são escassos. Leignel & Humbert (2001) analisaram a variabilidade no genoma mitocondrial, em específico a região de NAD4, de populações de *T. circumcincta* sensíveis e resistentes aos BZs e, ao comparar os resultados, não observaram nenhuma diferença significativa na diversidade nucleotídica no genoma mitocondrial dessas populações. Os autores discorrem que, embora não tenha uma diferença significativa nesse marcador entre ambas as populações, o efeito gargalo pode ser intensificado numa população durante o processo de seleção da resistência ao fármaco. Os autores levantam a hipótese de que a conservação das variações no genoma quando os vermes são selecionados pode ocorrer pelo fato de o fármaco não eliminar todos os vermes sensíveis no hospedeiro e, conseqüentemente, no ambiente existirá larvas que não foram submetidas à pressão seletiva do fármaco, não carregando o genótipo de resistência para gerações seguintes. Esse fato também pode ter ocorrido em nossos experimentos, embora a nossa população não fosse uma população de campo, as fezes dos animais infectados eram recuperadas para a obtenção de larvas e a realização de novas infecções.

Miranda (2007) cita que existem quatro fatores cruciais que explicam a estrutura genética populacional encontrada em populações de *A. caninum*, dentre esses i. a distância geográfica impede o fluxo gênico entre diferentes populações, ii. o fluxo gênico entre subpopulações, iii. a presença de subpopulações distintas com características que as tornam mais bem adaptadas à diferentes hospedeiros e iv. eventos genéticos adversos ocorrendo de maneira independente em cada subpopulação. O estudo em questão também sugere que o isolamento geográfico é um elemento responsável pela queda no fluxo gênico dessas populações e isso implica diretamente na baixa variabilidade genética encontrada em marcadores mitocondriais, como foi no caso do gene COI, reforçando a baixa diversidade

genética encontrada nos marcadores mitocondriais de *A. ceylanicum* analisados no presente estudo.

O ambiente isolado de laboratório pode agir na população de *A. ceylanicum* da mesma maneira que o isolamento geográfico. Há uma queda na similaridade gênica entre duas populações de diferentes localidades à medida que a distância aumenta (Poulin; Krasnov, 2010). Isso tem implicações diretamente na diversidade genética encontrada no genoma mitocondrial de indivíduos de uma mesma população.

O estudo de Li e colaboradores (2004) avaliaram o gene COI a partir de 100 gerações de *N. americanus* mantidas em hamsters a partir de infecções naturais e compararam com amostras isoladas de campo e determinaram a variabilidade entre ambos. O resultado sugeriu que a diversidade genética entre as amostras de laboratório foi insignificante quando comparadas com a encontrada entre as amostras de campo, resultado também encontrado por Moser e colaboradores (2007); ao analisar o genoma mitocondrial de uma população de *A. caninum* mantida em ambiente de laboratório, por Rabelo e colaboradores (2017); ao comparar a variabilidade genética em microsatélites presentes no genoma de *A. caninum* entre amostras de diferentes localidades no Brasil e por Silva (2005) que amplificou uma região do gene COI para analisar a diversidade genética em *A. braziliense* em amostras coletadas de diferentes áreas geográficas no Brasil, encontrando uma diversidade nucleotídica de 15,5% nas sequências analisadas.

Nos dados encontrados por Li e colaboradores (2004), os autores inferiram que, em razão da presença de apenas um haplótipo nos parasitos mantidos em laboratório, é provável que um efeito gargalo tenha ocorrido na população e isso fundamenta a perda de demais haplótipos no gene COI que estavam presentes na primeira geração da população. Os autores discutem que é improvável que o haplótipo resultante tenha sido selecionado e, provavelmente, o aumento da frequência se dá por conta do haplótipo resultante possivelmente estar atrelado com algum gene importante para o sucesso do parasitismo em hamsters. Nessa linha de raciocínio, nós também consideramos que poderíamos encontrar haplótipo nas diferentes passagens da cepa que pudessem ter sido selecionados, visto que poderiam estar associados à algum gene que conferisse essa seleção.

A baixa diversidade genética encontrada em COI e NAD1 da cepa selvagem e resistente de *A. ceylanicum* sugerem que a combinação do efeito gargalo, a deriva genética e ausência de fluxo gênico com populações do campo, levaram a uma baixa variabilidade genética entre as duas populações sendo responsáveis pelos resultados obtidos. Esses dados estão em

consonância com o trabalho de Hawdon e colaboradores (2001) que encontraram uma baixa diversidade genética no genoma mitocondrial de *N. americanus* na China. Em suma, apesar de termos conhecimentos desses relatos, nos pareceu pertinente a investigação desses marcadores, na hipótese de que poderia haver uma certa variabilidade nessa população, apesar do isolamento geográfico, uma vez que no trabalho da seleção da cepa, dois SNPs para o gene codificador da β -tubulina isotipo 1 terem sido identificados, principalmente pela identificação de um SNP raro, presente no códon 200 (TTC \rightarrow TAC), nunca descrito para nematódeos parasitos de humanos (Medeiros *et al.*, 2022).

A diversidade de haplótipos de nematódeos de importância médica e veterinária é relativamente bem estudada, principalmente para os ancilostomídeos. Miranda e colaboradores (2008) identificaram 30 haplótipos no gene COI em 164 amostras de *A. caninum* coletadas em diferentes regiões no Brasil. Em um trabalho semelhante, foram encontrados 23 haplótipos no gene COI de *N. americanus* em três diferentes localidades geográficas no Brasil (nos estados do Ceará e Piauí), encontrando, até mesmo, coinfeção de dois haplótipos distintos em um mesmo hospedeiro e a presença de um haplótipo, também encontrado na China (Monteiro *et al.*, 2019). Na Colômbia, foram identificados 59 haplótipos em 100 exemplares de *N. americanus* em um fragmento de 395pb do gene COI sem correlação entre os haplótipos e a localização geográfica da espécie no país (Hu *et al.*, 2008). No Vietnã, foram encontrados dois haplótipos de *A. ceylanicum* geneticamente distintos parasitando cães. Um desses haplótipos foi agrupado como semelhante à um haplótipo isolado que parasita unicamente canídeos e o outro haplótipo encontrado apresentou semelhança com um haplótipo isolado da Malásia e Comboja que infectam canídeos, felídeos e humanos (Nguyen *et al.*, 2015).

Diferentemente do presente estudo, vários estudos detectaram altos índices de variabilidade na análise do genoma mitocondrial quando analisadas amostras de campo. Em um estudo realizado na Tailândia, pioneiro no uso do marcador NAD1 no país, foram identificados dois haplótipos, com divergências em três posições do gene em um fragmento de 339 pb em três ancilostomídeos que foram recuperados de uma paciente (Eamsobhana *et al.*, 2020), indicando uma alta variabilidade genética em *N. americanus*. Lv e colaboradores (2017) obtiveram resultados semelhantes aos resultados de Eamsobhana e colaboradores (2020) ao encontrarem uma alta taxa de variabilidade nucleotídica em diferentes sítios de marcadores mitocondriais de *Angyostrongylus cantonesis* na China. Os autores encontraram uma taxa de variação de 39,8% em NAD1 e 5,3% em COI, apontando que NAD1 é um bom marcador para estudar sobre variações entre diferentes populações.

Em ascaridídeos de importância médica e veterinária também foram encontradas alta variabilidade genética em sequências parciais de marcadores mitocondriais COI, NAD1 e NAD4, comparando as amostras inter e intraespecificamente. É senso comum que a variabilidade entre diferentes espécies é muito maior quando comparada com a variabilidade dentro de populações de uma mesma espécie. Entretanto, nos trabalhos de Li e colaboradores (2008) nas análises de NAD1 e NAD4 para *Toxocara* spp. foi verificado que a variabilidade é alta em ambos os cenários, com mais de 20% de variabilidade intraespecífica e mais de 3% de variabilidade entre as espécies e, em contrapartida, COI teve menos de 12% de variabilidade intraespecífica e 2% de variabilidade interespecífica. Os resultados são semelhantes aos encontrados no estudo de Xu e colaboradores (2021) que identificaram 8,7% de variabilidade no gene NAD1 em isolados de *N. americanus* na China e 2,5% de variabilidade no gene COI.

O estudo mais aprofundado da diversidade genética no genoma mitocondrial é de crucial importância, tendo em vista que a variabilidade nos marcadores mitocondriais auxilia na definição de diferentes genótipos, como já foi demonstrado para a nova classificação do gênero *Echinococcus* (McManus, 2013).

A relação entre diferentes genótipos e a relação parasito-hospedeiro também é reportada em estudos com ancilostomídeos. Na Malásia foram encontrados dois grupos distintos de *A. ceylanicum* isolados de diferentes indivíduos (um grupo isolado de humanos e outro isolado de canídeos) com haplótipos de COI similares infectando canídeos, felídeos e humanos, levando à conclusão de que diferentes subpopulações de ancilostomídeos zoonóticos podem, seletivamente, infectar demais hospedeiros como humanos, por exemplo (Nguí *et al.*, 2013). Hu e colaboradores (2002) encontraram duas subpopulações geneticamente distintas de *A. caninum* na Austrália infectando cães com base em diferentes haplótipos no gene COI. Estudos clínicos e morfológicos demonstraram a capacidade dessas subpopulações geneticamente distintas de *A. caninum* infectarem hospedeiros não canídeos, como felídeos e humanos. Na Colômbia, foram encontrados diferentes haplótipos no gene COI de *N. americanus* (Hu *et al.*, 2008). Os autores sugerem que essa heterogeneidade pode estar interligada com diferenças na epidemiologia e nos aspectos da doença em populações de *N. americanus* geneticamente distintas, consolidando a importância de marcadores mitocondriais na epidemiologia da ancilostomíase.

Os marcadores moleculares mitocondriais podem também auxiliar na identificação e na reclassificação taxonômica de espécies e, um bom exemplo, é a classificação de *E. granulosus sensu lato* (Bowles & McManus, 1993). O uso de marcadores mitocondriais em conjunto com

demais metodologias, incluindo as características biológicas e da interação com diferentes hospedeiros, possibilitou reorganizar a espécie *E. granulosus sensu lato*, com a incorporação de novas espécies (McManus; Thompson, 2008; McManus *et al.*, 2012)

A resistência aos BZs é associada com a presença dos SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 de vários helmintos (Prichard, 2001). Os BZs atuam bloqueando a formação de microtúbulos, impactando na formação do citoesqueleto e interferindo na motilidade, além de atuar em outras vias, como inibindo a absorção de glicose e diminuindo a produção de ATP, interrompendo assim, o metabolismo energético (Bereda, 2022). Todavia, existem relatos de achados de nematódeos resistentes aos BZs com a ausência de mutação nos códons citados, como foi o caso do estudo de Palma e colaboradores (2020), que encontraram em uma população isolada de porcos, espécimes de *Ascaris* spp. sem os polimorfismos, corroborando os resultados encontrados no estudo de Diawara e colaboradores (2009) que não encontraram mutação no códon 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1 de *A. lumbricoides* em uma população resistente ao tratamento.

No que se diz respeito a patogenia entre uma cepa selvagem e resistente aos BZs, o estudo de Maclean e colaboradores (1987) concluiu, após inúmeros testes hematológicos avaliando diferenças entre duas cepas de *Trichostrongylus colubriformis*, uma sensível e outra resistente aos BZs, que a cepa selvagem era mais patogênica comparada com a cepa resistente. Outros estudos, como o de Furtado e colaboradores (2019), compararam uma cepa de *A. ceylanicum* selvagem, e resistente aos BZs em que ambas as cepas apresentaram padrões semelhantes de patogenicidade, resultado contrário comparado com o obtido por Kelly e colaboradores (1978), que observaram maior patogenicidade em uma cepa de *H. contortus* resistente do que na cepa sensível.

Furtado e colaboradores (2019) selecionaram uma cepa de *A. ceylanicum* resistente aos BZs a partir de uma cepa selvagem por pressão seletiva do fármaco. Entretanto, não foram encontrados SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene codificador da β -tubulina isotipo 1, sugerindo o envolvimento outros mecanismos de resistência. Nesse mesmo estudo não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos entre as cepas, no entanto, houve uma maior recuperação de vermes da cepa selvagem, e maior contagem de OPG comparado com a cepa resistente, logo, especulou-se que a cepa resistente era menos adaptada e com um menor “fitness”. O estudo de Elard e colaboradores (1990) comparou o fitness entre duas cepas de *T. circumcincta* resistente e selvagem e não encontraram diferenças significativas nos parâmetros analisados, como a oviposição, taxa de eclosão de larvas, estabelecimento da

infecção e recuperação de vermes adultos. Em contrapartida, em *H. contortus*, foram encontradas diferenças significativas na recuperação de ovos, com a cepa selvagem liberando mais ovos, sendo mais patogênica e tendo mais vermes recuperados em comparação com a cepa resistente (Maingi *et al.* 1990)

Os SNPs presentes na cepa resistente isolada por Furtado e colaboradores (2019) poderiam estar em frequência tão baixa que não foi possível identificá-los e, além do fato da cepa ser menos adaptada, o fato de não ter uma pressão seletiva contínua do fármaco sobre essa população, pode ter sucedido na queda exponencial de parasitos que apresentavam esses polimorfismos.

De fato, o tratamento contínuo com o fármaco parece ser importante para a manutenção do caráter de resistência da cepa, como demonstrado no estudo de Nunes e colaboradores (2013) em populações de ruminantes infectados com *H. contortus* que são submetidos à tratamento com BZs recorrentemente. Essa população de parasitos apresenta frequência de alelos resistentes mais alta quando comparada com populações que não são submetidas à pressão seletiva de maneira contínua. Esse estudo, juntamente com outros fatores, pode explicar a queda da frequência de parasitos que apresentavam SNPs associados com a resistência na cepa de *A. ceylanicum*, visto que desde a seleção da resistência não houve mais pressão seletiva do fármaco sob a população resistente.

Outro fator que pode explicar a perda da cepa resistente somando com os demais fatores anteriormente citados é o efeito gargalo. O efeito gargalo caracteriza-se por uma queda drástica no número de indivíduos de uma população mediante pressões externas em diferenças gerações (Griffiths *et al.*, 2013). Sendo assim, como a cepa resistente foi selecionada a partir de uma cepa selvagem que vem sendo mantida há mais de 15 anos no ambiente de laboratório, sem possibilidade de recombinação com demais cepas selvagens e fluxo gênico e a consequência do efeito gargalo se intensificam e restringem numa população submetida à uma pressão seletiva do fármaco e que foi selecionada a partir de uma população de origem que tinha poucas chances de apresentar variabilidade genética.

O declínio populacional encontrado na cepa resistente reflexo do efeito gargalo com o passar das gerações e o fato de a cepa ser menos adaptada ao parasitismo podem fortalecer ainda mais a deriva genética, visto que tal fenômeno tende a ser mais severo em populações pequenas. A deriva genética também pode ser responsável pela fixação ou perda de alelos numa população a depender da frequência e do tamanho da população (Griffiths *et al.*, 2013) e, tendo

isso em vista, é mais um fator a ser considerado que corroboram os resultados encontrados para a perda da cepa resistente.

Os dados apresentados por esse estudo contribuem para o entendimento de como os eventos genéticos como o efeito gargalo e a deriva genética influenciam a dinâmica populacional de ancilostomídeos e outros helmintos que estão sujeitos, frequentemente, à pressão seletiva em um ambiente isolado. Esses achados, em conjunto com demais dados obtidos na literatura para outros helmintos, auxiliam na identificação e reclassificação de novas espécies, no entendimento das relações parasito-hospedeiro, na melhoria nas estratégias de controle e contenção de parasitoses. Entretanto, é importante ressaltar que os estudos acerca da biologia, genética, resposta imune e interação parasito-hospedeiro não substituem a educação em saúde e melhores condições sanitárias que são as medidas profiláticas mais eficientes no controle dessas doenças. Por se tratar de doenças negligenciadas, o cenário de adoção de políticas públicas e incentivo financeiro para mitigação dessas doenças pode soar como uma ideia irrealizável e utópica, no entanto, o aumento progressivo em pesquisas sobre as parasitoses pode ter um reflexo positivo ao evidenciar todo o impacto, não somente financeiro, causado por essas doenças.

7. CONCLUSÕES

- Foi detectada uma baixa variabilidade entre as cepas resistente e selvagem de *A. ceylanicum* analisadas nesse trabalho, usando os marcadores mitocondriais NAD1 e COI;
- A baixa variabilidade encontrada entre as cepas analisadas no presente estudo foi também observada quando sequências de NAD1 e COI de *A. ceylanicum* de outras localidades foram comparadas com nossas sequências;
- A cepa resistente isolada anteriormente à esse trabalho manteve o caráter de resistência após 3 anos e meio desde seu isolamento, conforme demonstrado pelo teste fenotípico;
- Após 4 anos do isolamento da cepa resistente, houve uma reversão genotípica e fenotípica e a cepa perdeu o caráter de resistência, possivelmente devido às condições adversas de manutenção, causando a recuperação de um baixo número de larvas;
- A cepa selecionada não foi submetida à tratamento constante com o fármaco, o que pode ter contribuído para a reversão do fenótipo de resistência.

Perspectivas:

Como perspectivas para esse estudo, tem-se a intenção de identificar e selecionar uma nova cepa resistente ao albendazol. O objetivo principal será submeter essa cepa à uma manutenção contínua, expondo a população à pressão seletiva do fármaco de maneira recorrente. O propósito desse procedimento é observar se novos SNPs podem estar relacionados à resistência, incluindo os SNPs canônicos que são comumente encontrados em nematódeos, além daqueles já identificados anteriormente.

Essa cepa resistente ao albendazol será, então, empregada em testes de fármacos e proteínas isoladas de *Bacillus thuringiensis*. Esses testes visam desenvolver abordagens terapêuticas direcionadas ao tratamento de parasitos que apresentam resistência ao albendazol. A análise desses testes fornecerá importantes informações sobre a eficácia potencial de novos agentes terapêuticos e ajudará a compreender os mecanismos subjacentes à resistência, especialmente no que diz respeito a eventuais variações nos SNPs. Essa abordagem experimental não apenas contribuirá para a compreensão mais aprofundada da resistência à benzimidazóis em

nematódeos, bem como abrirá caminho para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle e tratamento de infecções por geo-helminhos. Além disso, ao explorar o potencial de substâncias provenientes de *B. thuringiensis*, este estudo pode oferecer alternativas terapêuticas inovadoras e sustentáveis para enfrentar a resistência aos tratamentos convencionais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGNKA, A. A. et al. Safety and immunogenicity of co-administered hookworm vaccine candidates Na-GST-1 and Na-APR-1 in Gabonese adults: a randomised, controlled, double-blind, phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 21, n. 2, p. 275-285, 2021.

ALBERTINI, C. et al. Mutations of the β -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia aciformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 64, n. 1, p. 17-31, 1999.

ALBERTS, B. et al. The self-assembly and dynamic structure of cytoskeletal filaments. In: *Molecular Biology of the Cell*. 4ed. Garland Science, 2002.

ALBONICO, M. et al. Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 81, p. 343-352, 2003.

ALVI, M. A et al. Revealing novel cytb and nad5 genes-based population diversity and benzimidazole resistance in *Echinococcus granulosus* of bovine origin. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 10, p. 1191271, 2023.

AMMANN, R. W. et al. Outcome after discontinuing long-term benzimidazole treatment in 11 patients with non-resectable alveolar echinococcosis with negative FDG-PET/CT and anti-EmII/3-10 serology. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 9, n. 9, p. e0003964, 2015.

AREEKUL, S.; SAENGHIRUN, C.; UKOSKIT, K. Studies on the pathogenicity of *Ancylostoma ceylanicum*. I. Blood loss in experimental dogs. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 6, n. 2, p. 235-40, 1975.

AVISE, J. C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, v. 18, n. 1, p. 489-522, 1987.

AVRAMENKO, R. W. et al. Assessing anthelmintic resistance risk in the post-genomic era: a proof-of-concept study assessing the potential for widespread benzimidazole-resistant gastrointestinal nematodes in North American cattle and bison. *Parasitology*, v. 147, n. 8, p. 897-906, 2020

BACELAR, P. A. A. et al. Cytochrome c oxidase subunit 1 gene reveals species composition and phylogenetic relationships of *Oesophagostomum* spp. infecting pigs in northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 31, p. e018421, 2022.

BEREDA, G.. Anthelmintic agents: vermicide and vermifuge. 2022.

BETHONY, J; BROOKER, S; ALBONICO, M; GEIGER, SM; LOUKAS, A; DIEMERT, D; HOTEZ, PJ. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet*, v. 367, n. 9521, p. 1521-1532, 2006.

BETHONY, J. M. et al. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunological reviews*, v. 239, n. 1, p. 237-270, 2011.

BLACKHALL, W. J. et al. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Veterinary Parasitology*, v. 152, n. 1-2, p. 101-107, 2008.

BLACKHALL, W.J. et al. β -Tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naïve Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. *Parasitology research*, v. 109, p. 1199-1203, 2011.

BLOUIN, M. S. et al. Unusual population genetics of a parasitic nematode: mtDNA variation within and among populations. *Evolution*, v. 46, n. 2, p. 470-476, 1992.

BLOUIN, M. S. et al. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics*, v. 141, n. 3, p. 1007-1014, 1995.

BOWLES, J. et al. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 54, n. 2, p. 165-173, 1992.

BOWLES, J.; MCMANUS, D. P. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *International journal for Parasitology*, v. 23, n. 7, p. 969-972, 1993.

BROOKER, S. et al. Epidemiology of *Plasmodium*-helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia and prospects for combining control. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 77, n. 6 Suppl, p. 88, 2007.

BROOKER, S. et al. Hookworm-related anaemia among pregnant women: a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 2, n. 9, p. e291, 2008.

BRUNTON, L.L; CHABNER, B.A; KNOLLMANN, B.C. Goodman e Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica, 12^a edição, Artmed/McGraw-Hill, Porto Alegre, Brasil. 2012

CAI, H. et al. Prevalence of *Echinococcus* species in wild foxes and stray dogs in Qinghai Province, China. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 106, n. 2, p. 718, 2022.

CALLEJÓN, R. et al. Molecular characterization and phylogeny of whipworm nematodes inferred from DNA sequences of cox1 mtDNA and 18S rDNA. *Parasitology Research*, v. 112, p. 3933-3949, 2013.

CDC - Center of Disease Control and Prevention. Intestinal Hookworm. Disponível em < <https://www.cdc.gov/parasites/hookworm/biology.html> >. Acesso em 15 de abril de 2022.

CHAN, A. H. E. et al. Assessing the suitability of mitochondrial and nuclear DNA genetic markers for molecular systematics and species identification of helminths. *Parasites & Vectors*, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2021.

CLEMENTS, A. C. A; ALENE, K. A. Global distribution of human hookworm species and differences in their morbidity effects: a systematic review. *The Lancet Microbe*, 2022.

COLELLA, V; BRADBURY, R; TRAUB, R. *Ancylostoma ceylanicum*. *Trends In Parasitology*, v. 37, n. 9, p. 844-845, 2021.

COLES, G. C. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary parasitology*, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992.

CRINGOLI, G. et al. *Ancylostoma caninum*: calibration and comparison of diagnostic accuracy of flotation in tube, McMaster and FLOTAC in faecal samples of dogs. *Experimental Parasitology*, v. 128, n. 1, p. 32-37, 2011.

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

CROMPTON, D. W. T.. The public health importance of hookworm disease. *Parasitology*, v. 121, n. S1, p. S39-S50, 2000.

DA SILVA, VJ; DIAS, SCR; ALVES, WP; FURTADO, LFV et al. Hookworm infection aggravates metabolic disorder in obesity. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 232, p. 111200, 2019.

DEMELER, J. et al. Phylogenetic characterization of β -tubulins and development of pyrosequencing assays for benzimidazole resistance in cattle nematodes. *PloS one*, v. 8, n. 8, p. e70212, 2013.

DERYCKE, S. et al. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PloS one*, v. 5, n. 10, p. e13716, 2010.

DIAWARA, A. et al. Assays to detect β -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 β -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 5, p. e2247, 2013.

DIEMERT, D. J. et al. Generalized urticaria induced by the Na-ASP-2 hookworm vaccine: implications for the development of vaccines against helminths. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 130, n. 1, p. 169-176. e6, 2012.

DIEMERT, D. J. et al. Safety and immunogenicity of the Na-APR-1 hookworm vaccine in infection-naïve adults. *Vaccine*, v. 40, n. 42, p. 6084-6092, 2022.

DRUDGE, J. H. et al. Field studies on parasite control in sheep: comparison of thia-bendazole, ruelene, and phenothiazine. *American journal of veterinary research*, v. 25, n. 108, p. 1512-1518, 1964.

DUSTIN, P. Complex microtubule assemblies: Axonemes, centrioles, basal bodies, cilia, and flagella. *Microtubules*, p. 127-170, 1984.

EAMSOBHANA, P. et al. Genetic variation of NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) mitochondrial gene sequence in adult *Necator americanus* hookworms recovered from a female patient in Thailand. *Tropical biomedicine*, v. 37, n. 2, p. 536-541, 2020.

ELARD, L et al. Fitness of benzimidazole-resistant and-susceptible worms of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Parasitology*, v. 117, n. 6, p. 571-578, 1998.

EYRE, A. W. et al. Does human mtDNA recombine?. *Journal of Molecular Evolution*, v. 53, p. 430-435, 2001.

FELEKE, BE. Epidemiology of hookworm infection in school-age children: a comparative cross-sectional study. *Iranian journal of parasitology*, v. 13, n. 4, p. 560, 2018.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994.

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

FURTADO, L. F. V. et al. Albendazole resistance induced in *Ancylostoma ceylanicum* is not due to single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at codons 167, 198, or 200 of the beta-tubulin gene, indicating another resistance mechanism. *Parasitology research*, v. 118, p. 837-849, 2019.

FURTADO, L. F. V. *et al.* Egg genotyping reveals the possibility of patent *Ancylostoma caninum* infection in human intestine. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 3006, 2020.

FUJIWARA, R. T. et al. Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite immunology*, v. 28, n. 7, p. 285-293, 2006.

FUJIWARA, RT. Ancylostomatidae. In: NEVES, DP; MELO, AL; LINARDI, PM; VITOR, RWA. *Parasitologia Humana*. 13. ed. Belo Horizonte: Atheneu, 2016. Cap. 30. p. 303-308.

GASSER, R.B. et al. NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome c oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda). *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 12, p. 1965-1970, 1999.

GASSER, R. B.; CANTACESSI, C.; CAMPBELL, B. E. Improved molecular diagnostic tools for human hookworms. *Expert review of molecular diagnostics*, v. 9, n. 1, p. 17-21, 2009.

GAUDET, M. et al. Allele-specific PCR in SNP genotyping. Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols, p. 415-424, 2009.

GHISI, M. et al.. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. Veterinary parasitology, v. 144, n. 3-4, p. 313-320, 2007.

GILLEARD, J. S.; BEECH, R. N. Population genetics of anthelmintic resistance in parasitic nematodes. Parasitology, v. 134, n. 8, p. 1133-1147, 2007.

GLOBAL HEALTH DATA. Hookworm disease—Level 4 cause. Global Health Metrics. Disponível em <https://www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019/hookworm-disease-level-4-cause> Acesso em 20 de junho de 2023

GOUD, G. N. et al. Expression, purification, and molecular analysis of the *Necator americanus* glutathione S-transferase 1 (Na-GST-1): a production process developed for a lead candidate recombinant hookworm vaccine antigen. Protein expression and purification, v. 83, n. 2, p. 145-151, 2012.

GRIFFITHS, A. J. F. Genética de Populações. In: GRIFFITHS, A. J. F et al. Introdução à genética. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, Cap. 18. p. 551-590

GUILL, M. A.; ODOM, R. B. Larva migrans complicated by Loeffler's syndrome. Archives of dermatology, v. 114, n. 10, p. 1525-1526, 1978.

HAWDON, J. M. et al. Genetic structure of populations of the human hookworm, *Necator americanus*, in China. Molecular Ecology, v. 10, n. 6, p. 1433-1437, 2001.

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

HASEGAWA, M. et al. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of molecular evolution, v. 22, p. 160-174, 1985.

HELD, M. R. et al. Dietary iron content mediates hookworm pathogenesis in vivo. Infection and immunity, v. 74, n. 1, p. 289-295, 2006.

HOTEZ, P. J. et al. Hookworm infection. New England Journal of Medicine, v. 351, n. 8, p. 799-807, 2004.

HOTEZ, P. J. Hookworm and poverty. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1136, n. 1, p. 38-44, 2008.

HU, M. et al. Single-strand conformation polymorphism-based analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 reveals significant substructuring in hookworm populations. Electrophoresis, v. 23, n. 1, p. 27-34, 2002.

HU, M. et al. Extensive and complex sequence diversity in mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 within *Necator americanus* from Colombia revealed by SSCP-coupled sequencing. *Molecular and cellular probes*, v. 22, n. 4, p. 234-237, 2008.

HUMPHRIES, D. et al. Effectiveness of albendazole for hookworm varies widely by community and correlates with nutritional factors: a cross-sectional study of school-age children in Ghana. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 96, n. 2, p. 347, 2017.

JACKSON, F. et al. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, v. 120, n. 7, p. 95-107, 2000.

JONES, B. P. et al. In Silico Docking of Nematode β -Tubulins With Benzimidazoles Points to Gene Expression and Orthologue Variation as Factors in Anthelmintic Resistance. *Frontiers in tropical diseases*, v. 3, p. 898814, 2022.

KELLY, J. D. et al. Physiological characteristics of free-living and parasitic stages of strains of *Haemonchus contortus*, susceptible or resistant to benzimidazole anthelmintics. *Research in Veterinary Science*, v. 25, n. 3, p. 376-385, 1978.

KHAN, S. N. et al. Cystic echinococcosis: an emerging zoonosis in southern regions of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *BMC Veterinary Research*, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2021.

KHURANA, S; SINGH, S; MEWARA, A. Diagnostic techniques for soil-transmitted helminths—Recent advances. *Research and Reports in Tropical Medicine*, v. 12, p. 181, 2021.

KIM, M. Y. et al. SNP identification and SNAP marker development for a GmNARK gene controlling supernodulation in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 110, p. 1003-1010, 2005.

KIM M.K, PYO KH, HWANG YS, et al. Effect of temperature on embryonation of *Ascaris suum* eggs in an environmental chamber. *Korean J Parasitol*. 2012;50(3):239-242.

KING, C. H. Helminthiasis epidemiology and control: Scoring successes and meeting the remaining challenges. *Advances in parasitology*, v. 103, p. 11-30, 2019.

KOENRAADT, Harrie et al. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, v. 82, n. 11, p. 1348-1354, 1992.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. *Advances in parasitology*, v. 93, p. 397-428, 2016.

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.

LACEY, E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, v. 6, n. 4, p. 112-115, 1990.

LEIGNEL, V.; HUMBERT, J.F. Mitochondrial DNA variation in benzimidazole-resistant and-susceptible populations of the small ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. Journal of Heredity, v. 92, n. 6, p. 503-506, 2001.

LEJAMBRE, L. F. et al. Polymorphism and egg-size in the sheep nematode, *Haemonchus contortus*. Evolution, p. 625-631, 1970.

LI, T. H. et al. Comparison of mitochondrial cytochrome oxidase 1 DNA sequences from *Necator americanus* hookworms maintained for 100 generations in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) and hookworms from natural human infections. Acta tropica, v. 92, n. 1, p. 71-75, 2004.

LI, M. W. et al. Electrophoretic analysis of sequence variability in three mitochondrial DNA regions for ascaridoid parasites of human and animal health significance. Electrophoresis, v. 29, n. 13, p. 2912-2917, 2008.

LOUKAS, A.; PROCIV, P. Immune responses in hookworm infections. Clinical microbiology reviews, v. 14, n. 4, p. 689-703, 2001.

LOUKAS, Alex et al. Hookworm vaccines: past, present, and future. The Lancet infectious diseases, v. 6, n. 11, p. 733-741, 2006.

LOUKAS, A.; HOTEZ, P.J.; DIEMERT, D. et al. Hookworm infection. Nature reviews Disease primers, v. 2, n. 1, p. 1-18, 2016.

LOUKOURI, A. et al. Impact of annual and semi-annual mass drug administration for Lymphatic Filariasis and Onchocerciasis on Hookworm Infection in Côte d'Ivoire. PLoS neglected tropical diseases, v. 14, n. 9, p. e0008642, 2020.

LV, S. et al. The genetic variation of *Angiostrongylus cantonensis* in the People's Republic of China. Infectious diseases of poverty, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2017.

MACLEAN, J. M. et al. The pathogenesis of benzimidazole-resistant and benzimidazole-susceptible strains of *Trichostrongylus colubriformis* in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). Journal of helminthology, v. 61, n. 2, p. 179-189, 1987.

MAINGI, N. et al. Effect of selection pressure for thiabendazole resistance on fitness of *Haemonchus contortus* in sheep. Parasitology, v. 100, n. 2, p. 327-335, 1990.

MARCOS, L. A. et al. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 102, n. 4, p. 314-318, 2008

MARWAL, A. et al. Molecular Markers. Animal Biotechnology, p. 289-305, 2014. Elsevier.

MCINTYRE, J. et al. Hidden in plain sight-Multiple resistant species within a strongyle community. Veterinary parasitology, v. 258, p. 79-87, 2018.

MCMANUS, D. P.; THOMPSON, R. C. A. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. Parasitology, v. 127, n. S1, p. S37-S51, 2003.

MCMANUS, D. P. et al. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. *Bmj*, v. 344, 2012.

MCMANUS, D. P. Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology*, v. 140, n. 13, p. 1617-1623, 2013.

MEDEIROS, C.S. *et al.* Moving beyond the state of the art of understanding resistance mechanisms in hookworms: confirming old and suggesting new associated SNPs. *Acta Tropica*, v. 233, p. 106533, 2022.

MEDEIROS, C. S.. CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO ALBENDAZOL EM UMA CEPA DE *Ancylostoma ceylanicum* SELECIONADA EM MODELO EXPERIMENTAL: integração de abordagens fenotípicas e genotípicas. 2022. 102 f. Tese (Doutorado) – Doutorado em Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

MELVILLE, L. A. et al. Large scale screening for benzimidazole resistance mutations in *Nematodirus battus*, using both pyrosequencing and deep amplicon sequencing, indicates the early emergence of resistance on UK sheep farms. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 12, p. 68-76, 2020.

MILHES, M. et al. A real-time PCR approach to identify anthelmintic-resistant nematodes in sheep farms. *Parasitology research*, v. 116, p. 909-920, 2017.

MIRANDA, R. R. C.. Variabilidade Molecular e Análise Filogeográfica de Populações Brasileiras de *Ancylostoma caninum*. 2007. 198 f. Tese (Doutorado) - Curso de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

MIRANDA, R. R. et al. Mitochondrial DNA variation of the dog hookworm *Ancylostoma caninum* in Brazilian populations. *Veterinary Parasitology*, v. 151, n. 1, p. 61-67, 2008.

MIREKU, M. O. et al. Impact of helminth infection during pregnancy on cognitive and motor functions of one-year-old children. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 9, n. 3, p. e0003463, 2015.

MONTEIRO, K. J. L. et al. Mitochondrial DNA reveals species composition and phylogenetic relationships of hookworms in northeastern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 68, p. 105-112, 2019.

MORAES, R.G.. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. *Rev Serv Espec Saúde Pública*, v. 1, p. 507-624, 1948.

MOSER, J. M. et al. Impact of population structure on genetic diversity of a potential vaccine target in the canine hookworm (*Ancylostoma caninum*). *Journal of Parasitology*, v. 93, n. 4, p. 796-805, 2007.

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

MUDENDA, N. B. *et al.* Modelling the ecological niche of hookworm in Brazil based on climate. *Geospatial health*, v. 6, n. 3, p. S111-S123, 2012.

NATH, T. C. *et al.* Molecular evidence of hookworms in public environment of Bangladesh. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 133, 2023.

NGCAMPHALALA, P. I. *et al.* Molecular identification of hookworm isolates from stray dogs, humans and selected wildlife from South Africa. *Journal of Helminthology*, v. 94, p. e39, 2020.

NGUI, R. *et al.* Genetic characterization of the partial mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I (cox 1) gene of the zoonotic parasitic nematode, *Ancylostoma ceylanicum* from humans, dogs and cats. *Acta tropica*, v. 128, n. 1, p. 154-157, 2013.

NG-NGUYEN, D. *et al.* Re-evaluation of the species of hookworms infecting dogs in Central Vietnam. *Parasites & vectors*, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2015.

NUNES, R. L. *et al.* Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from buffalo, goat and sheep herds. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, p. 548-553, 2013.

OJHA SC; JAIDE C; JINAWATH N. *et al.* Geohelminths: public health significance. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, n. 01, p. 005-016, 2014.

OLIVEIRA, V. N. G. M. *et al.* Detection of Benzimidazole Resistance-Associated Single-Nucleotide Polymorphisms in the Beta-Tubulin Gene in *Trichuris trichiura* from Brazilian Populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, p. tpmd220157-tpmd220157, 2022.

ORR, A. R. *et al.* Genetic markers of benzimidazole resistance among human hookworms (*Necator americanus*) in Kintampo North Municipality, Ghana. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, n. 2, p. 351, 2019.

PALEVICH, N.; MACLEAN, P. H. Sequencing and reconstructing helminth mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing data. *Parasite Genomics: Methods and Protocols*, p. 27-40, 2021.

PALMA, A. *et al.* Absence of mutations associated with resistance to benzimidazole in the beta-tubulin gene of *Ascaris suum*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 53, 2020.

PEARSON, M. S. *et al.* Molecular mechanisms of hookworm disease: stealth, virulence, and vaccines. *Journal of allergy and clinical immunology*, v. 130, n. 1, p. 13-21, 2012.

PILOTTE, N. *et al.* Community-wide mass drug administration for soil-transmitted helminths—risk of drug resistance and mitigation strategies. *Frontiers in Tropical Diseases*, v. 3, p. 897155, 2022.

- PLIESKATT, J. et al. Advances in vaccines against neglected tropical diseases: enhancing physical stability of a recombinant hookworm vaccine through biophysical and formulation studies. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 8, n. 6, p. 765-776, 2012.
- POON, R.W. S. et al. Molecular identification of cestodes and nematodes by cox1 gene real-time PCR and sequencing. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 89, n. 3, p. 185-190, 2017.
- POULIN, R.; KRASNOV, B. R. Similarity and variability of parasite assemblages across geographical space. *The biogeography of host-parasite interactions*, p. 115-127, 2010.
- PRICHARD, R. K. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *International Journal for Parasitology*, v. 3, n. 3, p. 409-417, 1973.
- PRICHARD, R.K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in parasitology*, v. 17, n. 9, p. 445-453, 2001.
- PRICHARD, R. K. Markers for benzimidazole resistance in human parasitic nematodes?. *Parasitology*, v. 134, n. 8, p. 1087-1092, 2007.
- PRIETO-PÉREZ, L; PÉREZ-TANOIRA, R; CABELLO-ÚBEDA, A. et al. Geohelminths. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 34, n. 6, p. 384-389, 2016.
- PROCIV, P.; CROESE, J. Human eosinophilic enteritis caused by dog hookworm *Ancylostoma caninum*. *The Lancet*, v. 335, n. 8701, p. 1299-1302, 1990.
- PROCIV, P.; CROESE, J.. Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*: hookworms reappraised in the light of a “new” zoonosis. *Acta tropica*, v. 62, n. 1, p. 23-44, 1996.
- RABELO, E. M. L. et al. Development of new microsatellites for the hookworm *Ancylostoma caninum* and analysis of genetic diversity in Brazilian populations. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 51, p. 24-27, 2017.
- RASHWAN, N. et al. Isothermal diagnostic assays for monitoring single nucleotide polymorphisms in *Necator americanus* associated with benzimidazole drug resistance. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 12, p. e0005113, 2016.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.
- RODRIGUES, M. S. et al. Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and closely related species. *Parasites & vectors*, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2017.
- RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes-Modificação do Método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 14, n. 1, p. 5-8, 1954.

SERAFIM, L. R. et al. The crowding effect in *Ancylostoma ceylanicum*: density-dependent effects on an experimental model of infection. *Parasitology research*, v. 113, p. 4611-4621, 2014.

SHI, W. et al. The first outbreak of *Taenia ovis* infection in China. *Parasitology international*, v. 65, n. 5, p. 422-423, 2016.

SIDOR, E. A.; ANDREYANOV, O. N. Effect of benzimidazole drugs on glycogen levels of mature *Fasciola hepatica*. 2021.

SILVA, L. M C. Caracterização molecular e diagnóstico diferencial entre *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense* utilizando a região ITS do rDNA: Instituto de Ciências Biológicas. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

SILVA, L. M. C. et al. Differential diagnosis of dog hookworms based on PCR-RFLP from the ITS region of their rDNA. *Veterinary Parasitology*, v. 140, n. 3-4, p. 373-377, 2006.

SIMON, D. J. et al. The microRNA miR-1 regulates a MEF-2-dependent retrograde signal at neuromuscular junctions. *Cell*, v. 133, n. 5, p. 903-915, 2008.

SOARES, S.C. P. et al. Resistance of gastrointestinal nematoids of goats and sheep to the anthelmintics levamisol, ivermectin and albendazole. *Ciência Animal Brasileira*, v. 24, p. e-75316E, 2023.

SORENSEN, E. et al. Variation in the sequence of a mitochondrial NADH dehydrogenase I gene fragment among six natural populations of *Schistosoma japonicum* from China. *International journal for parasitology*, v. 28, n. 12, p. 1931-1934, 1998.

SOULSBY, E.J.L. *Textbook of Veterinary Clinical Parasitology*. 1ª edição, Oxford: Blackwell Scientific Publications, Hoboken, Estados Unidos, 1965.

TCHAKOUNTÉ, BN; NKOUAYEP, VR; PONÉ, JW. Soil contamination rate, prevalence, intensity of infection of geohelminths and associated risk factors among residents in Bazou (west Cameroon). *Ethiopian Journal Of Health Sciences*, v. 28, n. 1, p.63, 2018. African Journals Online (AJOL).

THORN, C. S. et al. Population genomics of helminth parasites. *Journal of Helminthology*, v. 97, p. e29, 2023.

TRUSCOTT, J. E. et al. Soil-transmitted helminths: mathematical models of transmission, the impact of mass drug administration and transmission elimination criteria. *Advances in parasitology*, v. 94, p. 133-198, 2016.

VENKATESAN, A. et al. Molecular evidence of widespread benzimidazole drug resistance in *Ancylostoma caninum* from domestic dogs throughout the USA and discovery of a novel β -tubulin benzimidazole resistance mutation. ***Plos Pathogens***, v. 19, n. 3, p. e1011146, 2023.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Soil-transmitted helminth infections. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections#:~:text=More%20than%201.5%20billion%20people,soil%2Dtransmitted%20helminth%20infections%20worldwide>> Acesso em 03 de fevereiro de 2022.

XU, FF; NIU, YFi; CHEN, WQ; LIU, SS et al. Hookworm infection in central China: morphological and molecular diagnosis. *Parasites & Vectors*, v. 14, n. 1, p. 537-556, 2021. Springer Science and Business Media LLC.

ZHAN, B. et al. Species-specific identification of human hookworms by PCR of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 5, p. 1227-1229, 2001.

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

ZUCCHERATO, L. W. et al. PCR-RFLP screening of polymorphisms associated with benzimidazole resistance in *Necator americanus* and *Ascaris lumbricoides* from different geographical regions in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 12, n. 9, p. e0006766, 2018.