

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

LUIS FERNANDO VIANA FURTADO

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA
VARREDURA DE POLIMORFISMO RELACIONADO À RESISTÊNCIA AOS
BENZIMIDAZÓIS EM *Ancylostoma caninum*

Belo Horizonte

2014

LUIS FERNANDO VIANA FURTADO

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA
VARREDURA DE POLIMORFISMO RELACIONADO À RESISTÊNCIA AOS
BENZIMIDAZÓIS EM *Ancylostoma caninum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Parasitologia como requisito para
obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

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

Coorientação: Dr.^a Ana Cristina Passos de Paiva Bello

Belo Horizonte

2014

043

Furtado, Luis Fernando Viana.

Desenvolvimento e aplicação de uma metodologia para varredura de polimorfismo relacionado à resistência aos benzimidazóis em *Ancylostoma caninum* [manuscrito] / Luis Fernando Viana Furtado. - 2014.

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

Orientadora: Élide Mara Leite Rabelo. Co-orientadora: Ana Cristina Passos de Paiva Bello.

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

1. *Ancylostoma caninum* - Teses. 2. Benzimidazóis - Teses. 4. Drogas - Resistência - Teses. 5. Tubulina - Teses. 6. Parasitologia - Teses I. Rabelo, Élide Mara Leite. II. Bello, Ana Cristina Passos de Paiva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88./89

AGRADECIMENTOS

À Élide Rabelo, por ser mais que uma orientadora, pelo ensinamento e exemplo de profissionalismo, compromisso e ética;

À Ana Cristina, pela coorientação, pelo ombro e por ser uma das pessoas mais solícitas que eu já conheci;

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, em nome da coordenadora Érika Braga, pela minha formação enquanto pesquisador;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, em especial à professora Deborah Negrão-Corrêa, por ser quem primeiro me recebeu no Departamento, e ao professor Stefan Geiger, pelo fornecimento de alguns helmintos;

À professora Maria Raquel, do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG, pela colaboração;

Aos irmãos científicos do Laboratório de Parasitologia Molecular e agregados: Ana Flávia, Ana Maria, Bruna Silvestre, Carina Pacanaro, Ione Salim, Júlia Silveira, Luciana Serafim, Maria Luiza, Nayara Mendes, Thayse Batista, Vívian Jordania e William Alves, pelo convívio e ajuda de todos os dias;

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, em especial ao Hudson Santos, pela ajuda na identificação dos helmintos e à Sumara Ferreira, Sibebe Abreu e Manoel Carlos, pela disposição;

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses das cidades de Teresina e de Belo Horizonte, pela permissão na coleta dos intestinos e auxílio no procedimento;

Aos integrantes do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular, do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG, pela ajuda no sequenciamento;

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa de pesquisa e à FAPEMIG, pelo financiamento do projeto;

À turma de mestrado Parasito Lado B, por tornar a Pós-Graduação mais prazerosa e divertida;

Ao Antonio Mendes, pela prestatividade antes mesmo de me conhecer;

Ao João Pedro, pelas dicas na realização da mutagênese sítio-dirigida;

À Ana Carolina Melo e aos demais professores do Departamento de Biomedicina da UFPI/CMRV, por despertarem em mim o desejo de pesquisar;

Aos amigos e familiares, em especial à Marcinha Caetano, Marcus Vinícius, Paula Brito e Rafaela Monteiro, pelo encorajamento e torcida de sempre;

À minha família, Seu Carlito, Dona Rita, Michele e Júnior, razão maior da concretização dessa meta, em especial à minha mãe, por acreditar mais em mim do que eu mesmo; aos meus sobrinhos, Isabele e Luiz Neto, que minha ausência um dia possa ser motivo de orgulho;

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

"Não conseguimos encontrar resposta para todos os nossos problemas. As que encontramos nos levaram a formular novas questões. Sentimo-nos hoje tão confusos como antes. Acreditamos, entretanto, que estamos confusos em um nível mais alto e sobre coisas mais importantes."

Cartaz fixado em uma universidade na Escandinávia
(Autor desconhecido)

RESUMO

Ancylostoma caninum é considerado um importante parasito de canídeos, além de manifestar grande relevância zoonótica como agente de enterite eosinofílica e infecções cutâneas em humanos. A administração da droga em massa, sobretudo com benzimidazóis, corresponde ao principal método de controle dessa parasitose. Todavia, essa estratégia é considerada vulnerável por selecionar cepas de parasitos resistentes à droga. Mutações nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 já foram associadas com resistência aos benzimidazóis em alguns nematódeos, de modo que a mutação no códon 200 foi detectada inclusive em ancilostomídeos de humanos, mas não relatada ainda em *A. caninum*. O objetivo desse trabalho foi realizar uma varredura de polimorfismos nos códons 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* coletados em duas diferentes regiões do Brasil. Foram coletados 162 vermes de cães provenientes de Centros de Controle de Zoonoses da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, e 149 de Teresina, Piauí. Para análise do códon 200, foi desenvolvida uma ferramenta molecular baseada em ARMS-PCR, e para tanto, controles foram construídos tanto para ausência da mutação, por meio de PCR convencional, como para a presença da mutação, pela técnica de Megaprimer-PCR. Embora em baixa frequência (0,8%), a mutação no códon 200 foi observada apenas em vermes coletados em Minas Gerais, enquanto que as amostras provenientes do Piauí não apresentaram mutação para nenhum dos dois códons analisados. Um total de 75 amostras foram submetidas a sequenciamento, para validação da técnica padronizada e para varredura do códon 198. O sequenciamento validou a técnica desenvolvida e não mostrou correlação entre as mutações. Conclui-se que existe baixa frequência da mutação no códon 200 na população de *A. caninum* analisada. Esse é o primeiro relato que determina a presença dessa mutação em populações da espécie em questão, reforçando a necessidade de monitoramento de cepas de ancilostomídeos resistentes aos benzimidazóis, haja vista a emergência do problema em outras espécies.

Palavras-chave: *Ancylostoma caninum*; Resistência à droga; Benzimidazóis; β -tubulina.

ABSTRACT

Ancylostoma caninum is considered an important parasite of canids, and presents great relevance as zoonotic agent of eosinophilic enteritis and skin infections in humans. The mass drug administration, especially with benzimidazoles, corresponds to the main method of control of the disease caused by members of the hookworm's family. However, this strategy is considered vulnerable as it can lead to selection of drug resistant strains. Mutations in codons 167, 198 and 200 of isotype 1 β -tubulin gene have been associated with benzimidazoles resistance in some nematodes. The mutation at codon 200 has been detected in human's hookworm, but so far has not being reported in *A. caninum*. The aim of this study was to perform a scan of polymorphisms at codons 198 and 200 of isotype 1 β -tubulin gene in *A. caninum* collected from two different regions of Brazil. Were collected 162 worms from dogs originated from Centers for Zoonosis Control from the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, and 149 of Teresina, Piauí. For analyze the codon 200, a molecular tool based on ARMS-PCR has been developed. For that controls for the absence of mutation, using conventional PCR, and for the presence of mutation using Megaprimer-PCR technique, were developed. Although at low frequency (0.8%), the mutation at codon 200 was observed only in worms collected in Minas Gerais, while samples from Piauí showed no mutations. A total of 75 samples were subjected to sequencing to validate the technique developed and also to scan the region comprising the codon 198. The sequencing validated the technique developed and showed no correlation between the mutations. We conclude that there is a low frequency of mutation at codon 200 in the population of *A. caninum* analyzed. This is the first report that determines the presence of the mutation at codon 200 in this specie population. These data reinforce the need for monitoring for benzimidazole resistant hookworms strains, given the emergence of the problem in other species.

Key words: *Ancylostoma caninum*; Drug resistance; Benzimidazoles; β -tubulin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática do ciclo biológico de *A. caninum* (adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/hookworm.htm>).....19
- Figura 2** – Sequência parcial utilizada do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* para desenho dos iniciadores (DQ459314.1).....36
- Figura 3** – Esquema da síntese dos controles TubN e TubM.....38
- Figura 4** – Esquema da técnica de Tetraprimer ARMS-PCR.....41
- Figura 5** – Determinação do iniciador direto para o DNA sem mutação, apresentado em gel de agarose 1%. As canaletas 1 e 2 apresentam produto de PCR resultante da combinação de iniciadores *Fs0* e *Rc*, as canaletas 3 e 4 correspondem à combinação *Fs2* e *Rc*, as canaletas 5 e 6 à combinação *Fs3* e *Rc*, 7 e 8 à *Fs4* e *Rc*. TubN foi utilizado nas reações das canaletas 1, 3, 5 e 7; TubM, nas reações das canaletas 2, 4, 6 e 8. As demais canaletas correspondem aos respectivos “brancos” das reações.....48
- Figura 6** – Determinação do iniciador reverso para o DNA com mutação, apresentado em gel de agarose 1%. As canaletas 1 e 2 apresentam produto de PCR resultante da combinação de iniciadores *Rr0* e *Fa*, as canaletas 3 e 4 correspondem à combinação *Rr2* e *Fa*, as canaletas 5 e 6 à combinação *Rr3* e *Fa*, 7 e 8 à *Rr4* e *Fa*. TubN foi utilizado nas reações das canaletas 1, 3, 5 e 7; TubM, nas reações das canaletas 2, 4, 6 e 8. As demais canaletas correspondem aos respectivos brancos das reações.....48
- Figura 7** – Teste da concentração de iniciadores apresentado em gel de agarose 1%. A relação de iniciadores internos e externos foi de 0,5 μ M/0,1 μ M (A), 0,5 μ M/0,05 μ M (B) e 1 μ M/0,2 μ M (C). As canaletas 1 e 2 correspondem à combinação *Fa* e *Rc*, 3 e 4 à *Fs4* e *Rc*, e 5 e 6 à *Fa* e *Rr4*, com TubN presente nas canaletas 1, 3 e 5, e TubM nas canaletas 2, 4 e 6. As demais canaletas correspondem aos “brancos” das reações.....50

Figura 8 – Tetraprimer ARMS-PCR utilizando DNA plasmidial com diferentes concentrações de iniciadores, em gel de agarose 2%. As canaletas 1, 2, 3 e 4 correspondem a TubN, TubM, TubN+TubM e branco, respectivamente. A relação de iniciadores internos e externos foi de 0,5µM/0,1µM (A), 0,5µM/0,05µM (B) e 1µM/0,2µM (C).....50

Figura 9 – Teste da temperatura de anelamento dos iniciadores em termociclador de gradiente. A, B e C correspondem aos produtos das reações com combinação *Fa* e *Rc* (fragmento controle), *Fa* e *Rr4* (fragmento com mutação), e *Fs4* e *Rc* (fragmento sem mutação), respectivamente, apresentados em gel de agarose 1%. D corresponde ao produto da Tetraprimer ARMS-PCR, apresentado em gel de agarose 2%. TubN foi utilizado nas canaletas de 1 a 6. TubM foi utilizado nas canaletas de 7 a 12. De 1 a 6 e de 7 a 12, as reações foram feitas em ordem crescente de temperatura (60°C a 65°C).....51

Figura 10 – Produtos da técnica de Tetraprimer ARMS-PCR proveniente de uma primeira reação apresentados em géis de agarose 2%. Nas canaletas 1, 2, 3 e 4 foram aplicados produtos de reações com TubN, TubM, TubN+TubM e branco, respectivamente. O gel A corresponde às reações utilizando 20ng de DNA plasmidial, enquanto o B, às reações com 10ng.....52

Figura 11 – Produtos da Touchdown Tetraprimer ARMS-PCR apresentados em gel de agarose 2%. Nas canaletas 1, 2, 3 e 4 foram aplicados produtos de reações com TubN, TubM, TubN+TubM e branco, respectivamente.....53

Figura 12 – Produtos da reação com os iniciadores internos de menor tamanho, apresentados em gel de agarose 2%. As canaletas 1 e 2 correspondem ao produto da reação com combinação *Fa* e *Rc*; as canaletas 3 e 4, à combinação *Fs4* e *Rc*; 5 e 6 à combinação *Fa* e *Rr4*. Nas canaletas 7, 8 e 9 foram aplicados os produtos da reação de Tetraprimer ARMS-PCR. Nas canaletas 1, 3, 5 e 7 foi aplicado produto da reação com TubN; nas canaletas 2, 4, 6 e 8, produto da reação com TubM. A canaleta 9 apresenta

produto da reação com TubN+TubM. As demais canaletas correspondem aos brancos das reações.....53

Figura 13 – Produtos da Tetraprimer ARMS-PCR utilizando DNA genômico, apresentados em gel de agarose 2%. Nas canaletas de 1 a 6 foram aplicados produtos provenientes das reações utilizando seis amostras diferentes. A canaleta 7 corresponde ao “branco” da reação.....54

Figura 14 – Gel de agarose 1% demonstrativo da varredura da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* coletados em Minas Gerais. As canaletas identificadas com número ímpar correspondem ao produto de PCR com combinação para detectar o fragmento sem mutação (*Fs4* e *Rc*). As canaletas de número par correspondem ao produto da PCR com a combinação para detectar a mutação (*Fa* e *Rr4*). Nas canaletas de 1 a 4 foram utilizados controles (1 e 3: TubN; 2 e 4: TubM). Das canaletas 5 a 52, os produtos das duas reações para a mesma amostra de DNA genômico se encontram uma ao lado da outra. As canaletas 53 e 54 correspondem aos brancos das reações.....55

Figura 15 – Gel de agarose 1% demonstrativo da varredura da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* coletados no Piauí. As canaletas identificadas com número ímpar correspondem ao produto de PCR com combinação para detectar o fragmento sem mutação (*Fs4* e *Rc*). As canaletas de número par correspondem ao produto da PCR com a combinação para detectar a mutação (*Fa* e *Rr4*). Nas canaletas de 1 a 4 foram utilizados controles (1 e 3: TubN; 2 e 4: TubM). Das canaletas 5 a 52, os produtos das duas reações para a mesma amostra de DNA genômico se encontram uma ao lado da outra. As canaletas 53 e 54 correspondem aos “brancos” das reações.....56

Figura 16 – Cromatograma correspondente ao sequenciamento da porcentagem dos helmintos que não apresentaram mutação no códon 200. A presença de apenas um pico para a segunda timina do códon destacado revela um helminto homozigoto dominante.....57

Figura 17 – Cromatograma correspondente ao sequenciamento da única amostra que apresentou mutação no códon 200. A presença de dois picos para a adenina no códon destacado revela um helminto heterozigoto.....57

Figura 18 – Cromatograma correspondente ao sequenciamento da varredura realizada no códon 198.....58

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Estrutura comum e a variação nos radicais de alguns componentes do grupo dos benzimidazóis (adaptado de Brunton et al. 2012).....20
- Quadro 2** – SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 relacionados à resistência aos benzimidazóis em helmintos.....25
- Quadro 3** – Iniciadores utilizados, suas respectivas temperaturas de anelamento e posições das substituições (quando se aplica). As posições em que foram feitas alterações encontram-se em negrito.....35
- Quadro 4** – Combinações de iniciadores e respectivos tamanhos do amplicon.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Adenina

ADM: Administração da Droga em Massa

ARMS-PCR: *Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction*

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CCZ: Centro de Controle de Zoonose

C: Citosina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EHT: *Egg Hatch Test*

FECRT: *Faecal Egg Count Reduction Test*

G: Guanina

h: hora

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

L1: Larva de primeiro estágio

L2: Larva de segundo estágio

L3: Larva de terceiro estágio

L4: Larva de quarto estágio

min: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar

MG: Minas Gerais

ng: nanograma

NaCl: cloreto de sódio

pb: pares de base

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

pH: potencial de hidrogênio

Phe: Fenilalanina

PI: Piauí

Pm: Padrão de peso molecular

qPCR: *Real Time - Polymerase Chain Reaction*

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

SDS: Duodecil sulfato de sódio

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

TAE: Tris/Ácido Acético/EDTA

Tris-HCL: Tris hidrocloreto

T: Timina

Tyr: Tirosina

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

xg: Força centrífuga relativa

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

µg: micrograma

µl: microlitro

µm: micrômetro

µM: micromolar

°C: grau Celsius

(Phe/Phe)₂₀₀: homozigose dominante no códon 200

(Tyr/Phe)₁₆₇: heterozigose no códon 167

(Tyr/Phe)₂₀₀: heterozigose no códon 200

(Tyr/Tyr)₁₆₇: homozigose recessiva no códon 167

(Tyr/Tyr)₂₀₀: homozigose recessiva no códon 200

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Os ancilostomídeos	16
1.1.1. <i>Considerações gerais</i>	16
1.1.2. <i>A. caninum como modelo para estudo dos ancilostomídeos</i>	17
1.1.3. <i>Ciclo biológico</i>	17
1.2. Aspectos sobre os benzimidazóis e a resistência ao tratamento	19
1.2.1. <i>Os benzimidazóis</i>	19
1.2.2. <i>O problema da resistência a anti-helmínticos e os fatores predisponentes</i>	21
1.2.3. <i>Diferenças entre cepas resistentes e sensíveis a anti-helmínticos</i>	23
1.2.4. <i>Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência</i>	24
1.2.5. <i>Métodos para detecção de resistência aos benzimidazóis</i>	27
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Considerações éticas	33
4.2. Populações do estudo e obtenção de vermes adultos	33
4.3. Extração e dosagem de DNA	33
4.4. Desenho dos iniciadores	34
4.5. Síntese de controles para o SNP no códon 200	36
4.6. Clonagem	38
4.7. Recuperação do DNA plasmidial	39
4.8. Padronização da técnica molecular para detecção da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1	40
4.8.1. <i>Seleção dos iniciadores para a ARMS-PCR</i>	40
4.8.2. <i>Padronização da Tetraprimer ARMS-PCR</i>	41
4.8.2.1. <i>Alteração na concentração dos iniciadores</i>	42
4.8.2.2. <i>PCR em termociclador de gradiente</i>	42
4.8.2.3. <i>Eliminação da sequência dos plasmídeos</i>	43

4.8.2.4. Touchdown Tetraprimer ARMS-PCR	43
4.8.2.5. Alteração da temperatura dos iniciadores internos	43
4.8.2.6. Utilização de DNA genômico.....	44
4.9. Varredura da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 por ARMS-PCR.....	44
4.10. Sequenciamento para validação da técnica padronizada e para análise dos códons 167 e 198	44
4.11. Purificação do DNA.....	45
5. RESULTADOS	47
5.1. Seleção dos iniciadores a partir da ARMS-PCR	47
5.2. Padronização da Tetraprimer ARMS-PCR.....	49
5.2.1. Alteração na concentração dos iniciadores	49
5.2.2. PCR em termociclador de gradiente	51
5.2.3. Eliminação da sequência dos plasmídeos	52
5.2.4. Touchdown Tetraprimer ARMS-PCR.....	52
5.2.5. Alteração da temperatura dos iniciadores internos	53
5.2.6. Utilização de DNA genômico	54
5.3. Varredura da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>A. caninum</i> a partir da técnica de ARMS-PCR	54
5.4. Validação da técnica molecular padronizada através do sequenciamento	57
5.5. Varredura do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>A. caninum</i> a partir do sequenciamento.....	58
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO.....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO.....	80

1. INTRODUÇÃO

1. 1. Os ancilostomídeos

1.1.1 Considerações gerais

Os ancilostomídeos infectam cerca de 740 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO 2012), podendo causar a doença tropical negligenciada denominada ancilostomose, intimamente relacionada com precárias condições de vida (Furtado & Melo 2011). Além da deficiência em saneamento básico, a prevalência desses helmintos também depende das condições climáticas e da composição do solo da região, uma vez que para a ocorrência do ciclo, se fazem necessárias condições ambientais adequadas (Hotez 2008).

Inclusos no Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongylida e Família Ancylostomatidae (Blaxter et al. 1998, Blaxter et al. 2000), atualmente existem descritas mais de 100 espécies de ancilostomídeos, os quais parasitam algumas ordens de vertebrados, como humanos, canídeos e felídeos (Hotez et al. 2006). Dentre as principais espécies, podem ser citadas *Necator americanus* (Stiles 1902), *Ancylostoma braziliense* (Faria 1909), *Ancylostoma caninum* (Ercolani 1859), *Ancylostoma ceylanicum* (Loos 1911) e *Ancylostoma duodenale* (Dubini 1943).

Os ancilostomídeos podem acarretar em diversas patologias ao hospedeiro, de maneira que o grau de patogenicidade é diretamente proporcional à quantidade de parasitos albergados (Hotez et al. 2006). Dentre as principais consequências do parasitismo, destacam-se anemia, hemorragias e lesões intestinais, que em casos mais graves podem levar o hospedeiro a óbito (Hotez et al. 2004, Pearson et al. 2012).

Vários levantamentos epidemiológicos denotam altas prevalências de ancilostomose humana e animal em diferentes partes no mundo, evidenciando a necessidade de adoção de medidas de controle (Ajanga et al. 2006, Eijk et al. 2009, Ndibazza et al. 2010, Eguía-Aguilar et al. 2005). Dentre as possíveis adoções dessas medidas, podem ser citadas melhorias na qualidade de vida populacional, com educação em saúde e saneamento básico adequado (Albonico 1999, Hotez 2008). Todavia, considerando as reduções globais de prevalência e intensidade de infecção, o principal método de controle é a Administração de Drogas em Massa (ADM), usando principalmente os benzimidazóis (Hotez et al. 2005, Paveley & Bickle 2013).

1.1.2. *A. caninum* como modelo para estudo dos ancilostomídeos

O estudo de ancilostomídeos humanos muitas vezes é limitado pela dificuldade de obtenção de parasitos adultos, que exigiria necropsia ou administração de laxantes. Associado a isso, também tem o fato da dificuldade de manutenção de ancilostomídeos humanos em laboratório, com restritos hospedeiros permissivos (Ray et al. 1972).

Segundo Fujiwara et al. (2006), levando em consideração que os cães são hospedeiros naturais de *A. caninum*, esses mamíferos representam o modelo animal mais adequado para as infecções por parasitos humanos. Dessa forma, muitas pesquisas têm utilizado esse nematódeo como modelo para estudos de biologia, patologia, imunidade e vacinação (Fujiwara et al. 2007, Schwenkenbecher & Kaplan 2009, Tong et al. 2012, Dias et al. 2013). Além do mais, *A. caninum* apresenta grande relevância em estudos de importância veterinária.

1.1.3. *Ciclo biológico*

No que diz respeito ao ciclo biológico, ancilostomídeos adultos encontram-se fixados na mucosa do intestino delgado do hospedeiro, alimentando-se de tecido e sangue. Após a cópula, as fêmeas depositam seus ovos, que são liberados juntos com as fezes do hospedeiro. Entre 24 e 48h, sob condições adequadas de umidade, temperatura e oxigenação, a L1 eclode do ovo, se alimentando de microrganismos e detritos orgânicos presentes nas fezes e no solo. Entre cinco e oito dias, a L1 sofre duas mudas e se transforma em L3, estágio infectante do parasito (Soulsby 1965). Devido à presença de uma bainha que oblitera a cavidade bucal, resultante do estágio precedente, a L3 não se alimenta, porém possui uma resistência muito maior que as demais formas, sendo capaz de sobreviver no ambiente, dependendo da espécie, por até 49 dias, com grande capacidade de movimentação (Mark 1975).

A infecção pelas espécies do gênero *Ancylostoma* pode acontecer pela penetração das L3 através da pele ou pela ingestão das mesmas. No caso de *N. americanus*, a infecção se dá predominantemente pela penetração das L3 (Hotez et al. 2005). No tocante à infecção percutânea, a penetração das L3 ocorre via folículos pilosos, alcançando os capilares sanguíneos e/ou linfáticos. Durante a penetração,

perdem a bainha resultante da L2 e se alimentam de componentes do plasma do hospedeiro (Hawdon & Shad 1990). Após a penetração na pele, as larvas ganham o sistema circulatório, sendo carreadas para o lado direito do coração e, em seguida, para a vasculatura pulmonar. As L3 migram dos capilares para o parênquima pulmonar, onde são carreadas pelos alvéolos, bronquíolos e brônquios até a laringe, podendo ser deglutidas e ganhar o trato gastrointestinal. Chegando ao intestino delgado, sofrem duas mudas e se tornam vermes adultos (Pearson et al. 2012).

Em algumas espécies de ancilostomídeos, como *A. caninum*, o contato das L3 com a pele de hospedeiros não usuais, como humanos, pode acarretar em uma infecção cutânea na qual o parasito não consegue dar continuidade ao ciclo. Outra peculiaridade, é que após penetração na pele pelas larvas de *A. caninum*, pode ocorrer também o fenômeno de migração somática, de modo que essas larvas se dispersam, se instalando em tecidos musculares esqueléticos, onde permanecem em hipobiose ainda na forma de L3 (Cury & Lima 2002). Isso corresponde à capacidade do helminto de adotar um estado de latência, como uma estratégia para fugir de condições adversas (Schad 1979).

No tocante à infecção oral, devido à ação do suco gástrico, as L3 ingeridas perdem a cutícula externa ao passar pelo estômago do hospedeiro. Por volta de três dias de infecção, as L3 migram para o intestino delgado e penetram nas células de Lieberkühn, onde ocorre a muda para L4 (Haas et al. 2005). Depois de um a dois dias, as L4 voltam à luz do intestino, transformam-se em adultos jovens, fixando-se à mucosa intestinal por meio das suas cápsulas bucais para realizar hematofagia e cópula. A Figura 1 mostra uma representação esquemática do ciclo biológico de *A. caninum*.

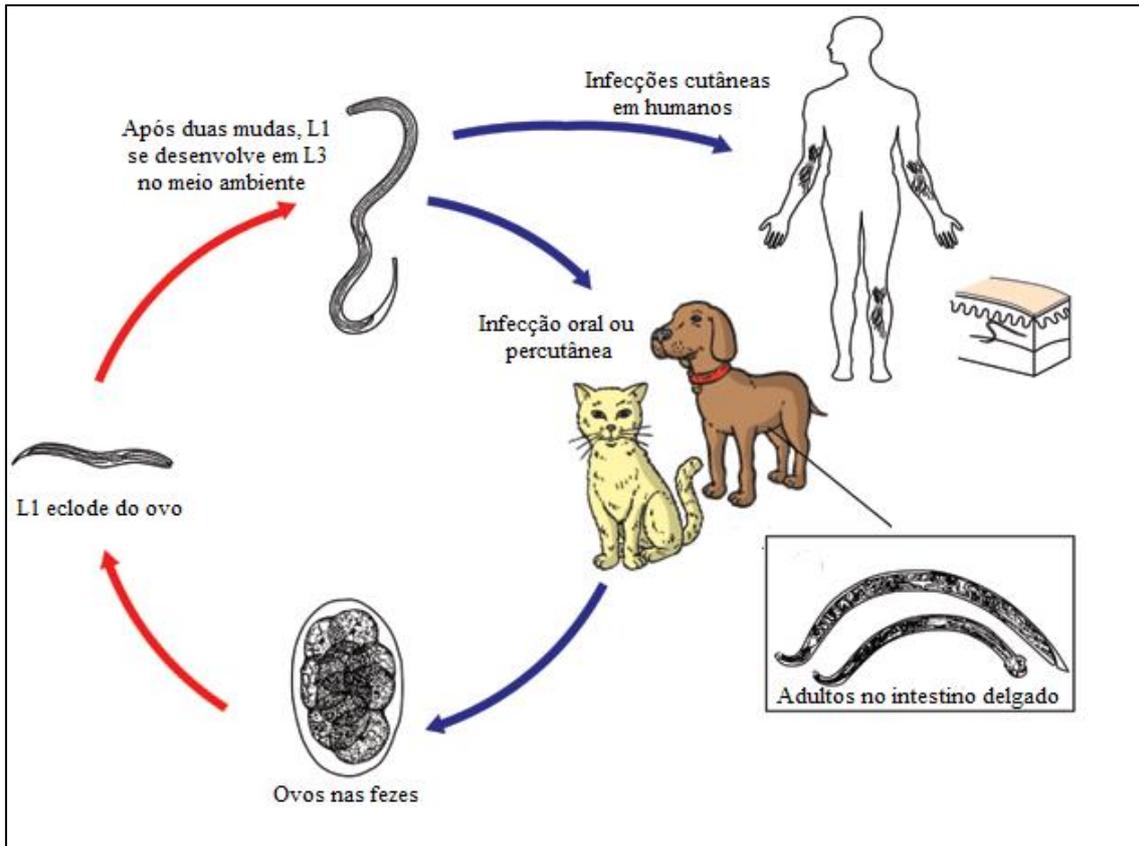


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo biológico de *A. caninum* (adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/hookworm.htm>).

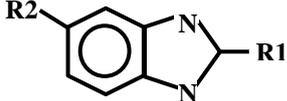
1.2. Aspectos sobre os benzimidazóis e a resistência ao tratamento

1.2.1 Os benzimidazóis

A partir do sucesso da produção de tiabendazol na década de 60 por Brown et al. (1961), ocorreu um estímulo para produção de outras formulações químicas semelhantes, caracterizando um grupo de drogas denominado benzimidazol. Devido ao seu baixo custo, amplo espectro, ação contra helmintos, fungos e protozoários e facilidade de administração, os benzimidazóis são fármacos muito utilizados na ADM (Melo 2005, Dembele et al. 2010, Swanson et al. 2012). Febendazol, mebendazol, oxfendazol e oxibendazol são alguns representantes desse grupo, sendo o albendazol um dos fármacos mais conhecidos, pelo seu uso muito difundido na medicina humana e na veterinária (Prichard et al. 2012, Swanson et al. 2012, Barrère et al. 2012). Esses fármacos apresentam uma estrutura química em comum, com variação apenas em seus

radicais, que estão diretamente relacionados com a toxicidade da droga. O Quadro 1 mostra a estrutura comum e a variação nos radicais de alguns componentes do grupo.

Quadro 1 – Estrutura comum e a variação nos radicais de alguns componentes do grupo dos benzimidazóis (adaptado de Brunton et al. 2012).

Estrutura química em comum		
		
R1	R2	Derivado
	H—	Tiabendazol
—NHCO ₂ CH ₃		Mebendazol
—NHCO ₂ CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ S—	Albendazol

Os benzimidazóis agem inibindo a formação dos microtúbulos, que são estruturas ocas e formadas por heterodímeros de α - β -tubulina (Friedman 1979). Duas grandes famílias de genes codificam as subunidades α e β e cada família é formada por diferentes genes que codificam isotipos de proteínas, as quais apresentam domínios muito conservados, sofrendo principalmente modificações pós-transducionais (Ludueña 1998). Além do mais, esses isotipos podem ser expressos preferencialmente em determinadas células e tecidos. Acredita-se que as possíveis combinações entre os isotipos α e β possam explicar as diversas funções biológicas dos microtúbulos, como mitose, motilidade celular, transporte intracelular e secreção (Huzil et al. 2006, Fuchs et al. 2013).

Os microtúbulos são estruturas que se encontram em constante polimerização, com a adição de um heterodímero de α - β -tubulina num extremo da cadeia e a perda de outro heterodímero no lado oposto (Alberts et al. 2002). A ligação dos benzimidazóis com a β -tubulina ocorre ao mesmo tempo em que o microtúbulo está perdendo o heterodímero no outro extremo, ocasionando o encurtamento e o desaparecimento do

microtúbulo (Lacey 1988). Como essa estrutura desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase celular, isso acaba inibindo uma série de mecanismos, levando à morte todas as formas parasitárias do helminto (Silva et al. 1997, Nogales 2000).

O sítio exato de ligação da droga na proteína β -tubulina não é conhecido, mas regiões do grupo N-terminal dos isotipos 2 e, especialmente do 1, são descritos como locais de alta afinidade de ligação da droga. Secundariamente, os benzimidazóis apresentam outros mecanismos de ação, como inibição da enzima fumarato redutase mitocondrial, redução do transporte de glicose e desacoplamento da fosforilação oxidativa (Lacey 1988, Lacey 1990, Oxberry et al. 2001).

Alguns trabalhos demonstram alta eficácia de benzimidazóis contra ancilostomídeos (Jongsuksuntigul et al. 1993, Reynoldson et al. 1998, Keiser & Utzinger 2008, Tian et al. 2011, Vercruysse et al. 2011). No entanto, há relatos de falha no uso dessas drogas no tratamento da ancilostomose (Flohr et al. 2007, Humphries et al. 2011, Soukhathammavong et al. 2012), evidenciando a possibilidade da seleção de parasitos resistentes.

1.2.2. O problema da resistência a anti-helmínticos e os fatores predisponentes

A resistência anti-helmíntica tem sido descrita como a situação em que a dosagem normal de um medicamento não promove uma redução consistente de vermes e de ovos excretados (Silvestre et al. 2002). Assim, o primeiro indício de resistência se dá pelo aumento de parasitos capazes de sobreviver a uma dose da droga que seria letal para a maioria da população sensível da mesma espécie (Melo 2005).

Hoje já existem evidências de resistência aos três grupos de anti-helmínticos existentes: benzimidazóis/pró-benzimidazóis, imidazotiazóis/tetra-hidropirimidinas e lactonas macrocíclicas (Melo 2005, Barrère et al. 2012, Bentounsi et al. 2012, Veríssimo et al. 2012, Canul-Ku et al. 2012, Falzon et al. 2013). O problema se agrava tendo em vista a limitação para o desenvolvimento de novas formulações anti-helmínticas (Waller 2006). Segundo Shalaby (2013), mesmo que novos medicamentos sejam desenvolvidos, inevitavelmente, também serão afetados pelo problema de

resistência. Até mesmo para o monepantel, um anti-helmíntico relativamente novo no mercado, já existe relato de falha em seu uso (Scott et al. 2013).

De acordo com Jabbar et al. (2006), o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica é influenciado por fatores que podem ser classificados como genéticos, biológicos ou operacionais, dentro os quais os mais importantes são os fatores operacionais, porque formam as bases dos programas de controle. Na veterinária, por exemplo, alguns esquemas de controle são propostos, como o tratamento estratégico (Kaplan & Vidyashankar 2012, Molento 2004). Nesse tipo de esquema, os animais são tratados quando as condições ambientais são desfavoráveis para o desenvolvimento do parasito, ou seja, toda a fauna helmintológica é exposta à droga. Isso pode acarretar em uma grande pressão de seleção, levando ao estabelecimento de cepas resistentes, uma vez que não existe uma subpopulação em estágio de vida livre, denominada refugia, contaminando o ambiente, impossibilitando a diluição do genótipo relacionado à resistência (Molento 2004).

Além do curto intervalo entre tratamentos, outros fatores operacionais predisõem ao estabelecimento da resistência, como a administração de doses incorretas (Silvestre et al. 2002). A dosagem a ser ministrada para animais depende do peso do mesmo, porém, muitas vezes o cálculo do peso é estimado visualmente, segundo uma média do rebanho. Assim, pode ocorrer administração de doses incorretas que não serão efetivas no tratamento, permitindo a sobrevivência de parasitos resistentes e medianamente resistentes (Craig 1993). Esse processo também pode ser influenciado pelo uso frequente de uma única droga, sem rotação e sem associação entre os fármacos de diferentes mecanismos de ação (Shalaby 2013). Consequentemente, a não resposta ao tratamento ameaça a sustentabilidade da indústria pecuária, comprometendo a sanidade animal e, consequentemente, o mercado financeiro (Prichard 2001, Roeber et al. 2013).

Apesar do processo de resistência consistir em um problema bem caracterizado em nematódeos de ruminantes, esse evento não se restringe somente aos parasitos de importância veterinária. Nos últimos anos, alguns trabalhos ressaltaram a importância desse problema em helmintos de humanos, evidenciando, inclusive, mecanismos moleculares semelhantes envolvidos no processo (Diawara et al. 2009, Diawara et al. 2013a). Indício de resistência ao tratamento já foi relatado em *Schistosoma mansoni* à

oxamniquina e ao praziquantel, ancilostomídeos aos benzimidazóis e também ao praziquantel, *Taenia saginata* ao albendazol, *Mansonella ozzardi* à dietilcarbamazina e *Onchocerca volvulus* à ivermectina (Bartholomew et al. 1978, Reynoldson et al. 1997, Oliveira 2005, Osei-Atweneboana et al. 2011, Soukhathammavong et al. 2012, Márquez-Navarro et al. 2012).

Segundo Humphries et al. (2012), a ADM em humanos é um meio de controle com potencial para limitar a transmissão desses helmintos. Em grupos de risco, essa estratégia garante que os níveis de infecção sejam mantidos abaixo dos associados com morbidade, frequentemente resultando em melhorias na saúde e no desenvolvimento infantil (Tchuenté 2011). Entretanto, como a diversidade de drogas disponíveis no mercado é restrita, a ADM periódica se torna uma estratégia arriscada, já que induz forte pressão de seleção de cepas resistentes (Prichard et al. 2012).

1.2.3. Diferenças entre cepas resistentes e sensíveis a anti-helmínticos

Apesar de não se saber como realmente ocorre, acredita-se que genótipos relacionados à resistência anti-helmíntica possam ser acompanhados por alterações que influenciam em outras características dos nematódeos, como sobrevivência de ovos e de larvas no ambiente, patogenicidade e infectividade (Hennon 1993). Melo e Bevilaqua (2005) levantam a hipótese de que parasitos resistentes podem apresentar um perfil mais patogênico, o que levaria à morte do hospedeiro e, conseqüentemente, diminuiria a frequência dos genótipos relacionados à resistência; contudo, os parasitos resistentes, através de mecanismos como a alta capacidade de sobrevivência dos estágios de vida livre, compensariam a morte prematura do hospedeiro e, assim, disseminariam seus alelos na população.

De fato, para *Teladorsagia circumcincta* já foi descrito que adultos sensíveis aos benzimidazóis apresentam-se maiores em comprimento do que adultos resistentes, esperando-se um aumento da fertilidade nas fêmeas (Leignel & Cabaret 2001). Contrariamente, cepas resistentes de *Caenorhabditis elegans* possuem disfunções na motilidade, oviposição e musculatura da faringe, as quais chegam até mesmo a serem letais para esse nematódeo (Prichard 2001). Esses dados corroboram com Leignel e Cabaret (2001), que afirmam que o uso maciço de anti-helmínticos pode acarretar em

diversas mudanças na vida do nematódeo. Todavia, Elard et al. (1998), analisando características de populações de *T. circumcincta* sensíveis e resistentes aos benzimidazóis, observaram que não houve diferença significativa na oviposição, taxa de desenvolvimento de ovos até L3, capacidade de estabelecimento das larvas no hospedeiro e sobrevivência dos vermes adultos.

1.2.4. Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência

Os mecanismos envolvidos no processo de resistência aos benzimidazóis já estão bem estabelecidos para alguns nematódeos (Elard et al. 1998, Silvestre et al. 2009, Blackhall et al. 2011). Como visto no subitem 1.2.1, os benzimidazóis agem na β -tubulina do parasito, de maneira que o gene codificador dessa proteína apresenta expressão de diversos isotipos, com diferentes afinidades ligadas aos benzimidazóis. Mutações no isotipo 1 desse gene já foram descritas para helmintos e fungos que não responderam ao tratamento com essas drogas (Lubega & Prichard 1991, McKay & Cooke 1997).

Alterações que caracterizam polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 estão relacionadas com o perfil de resistência aos benzimidazóis (Beech et al. 2011, Blackhall et al. 2011). Parasitos com esses SNPs possuem uma alteração conformacional na β -tubulina, acarretando em diferentes modificações bioquímico-moleculares, o que impede a associação da droga com o seu sítio de ligação (Lubega & Prichard 1991).

A alteração no códon 200 geralmente é a mais frequentemente relacionada com o perfil de resistência, enquanto que no códon 198 é menos frequente. Helmintos sensíveis aos benzimidazóis apresentam o códon TTC na posição 200, codificando uma fenilalanina. A substituição da segunda timina por uma adenina causa alteração no códon, com substituição da fenilalanina por uma tirosina, podendo caracterizar o polimorfismo de resistência (Rufener et al. 2009, Blackhall et al. 2011, Barrère et al. 2012). Mamíferos apresentam naturalmente uma tirosina no códon 200, caracterizando um dos motivos pelos quais a droga não apresenta alta toxicidade para os mesmos (Lewis et al. 1985).

A alteração no códon 167 é semelhante a que ocorre no códon 200, também acarretando na substituição de uma fenilalanina por uma tirosina (Prichard 2001, Diawara et al. 2013a). No caso da mutação no códon 198, que também é caracterizada pela substituição de apenas uma base, a trinca GAG, codificante para um ácido glutâmico, sofre mutação e passa a ser GCG, codificando uma alanina (Ghisi et al. 2007). O Quadro 2 apresenta os SNPs associados à resistência em alguns nematódeos.

Quadro 2 – SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 relacionados à resistência aos benzimidazóis em helmintos.

Número do códon	Troca de aminoácido	Helminto	Referência
167	Phe → Tyr	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Diawara et al. 2013a
		<i>Cylicocyclus catinatum</i>	Blackhall et al. 2011
		<i>Cylicocyclus nassatus</i>	Blackhall et al. 2011
		<i>Haemonchus contortus</i>	Prichard 2001
		<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Elard et al. 1998
		<i>Trichuris trichiuria</i>	Diawara et al. 2013a
198	Glu → Ala	<i>Haemonchus contortus</i>	Prichard 2001
		<i>Trichuris trichiuria</i>	Diawara et al. 2013a
200	Phe → Tyr	Ancilostomídeos	Diawara et al. 2013a
		<i>Cooperia oncophora</i>	Njue & Prichard 2003
		<i>Haemonchus contortus</i>	Melo 2005
		<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Silvestre et al. 2009
		<i>Trichostrongylus axei</i>	Palcy et al. 2010
		<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Roos et al. 1995
		<i>Trichuris trichiura</i>	Diawara et al. 2009
		<i>Wuchereria bancrofti</i>	Schwab et al. 2005

No que diz respeito ao surgimento desses polimorfismos relacionados à resistência na veterinária, três hipóteses foram levantadas por Silvestre et al. (2009): (1) o alelo resistente pode ter existido como um alelo ancestral, o qual foi introduzido em fazendas, no início da formação do rebanho, (2) mutação espontânea pode ter gerado

novos alelos após a constituição do rebanho e (3) a recombinação sexual entre alelos suscetíveis e resistentes pode ter gerado novas variantes de um alelo resistente existente.

Independente desse surgimento, já é bem esclarecido que uma população sensível de nematódeos contém uma subpopulação de indivíduos com capacidade genética para sobreviver ao tratamento (Melo & Bevilaqua 2005). Assim, a droga não é o agente da alteração. O frequente uso do fármaco causa uma pressão de seleção, na qual parasitos com a mutação podem tolerar a dosagem administrada, enquanto os que não apresentam a mutação sofrem o efeito da droga (Prichard 2007). Com a eliminação da população sensível, a próxima geração consistirá da progênie dos parasitos que sobreviveram ao tratamento, herdando a capacidade de sobrevivência à exposição anti-helmíntica (Nunes 2012).

Mutações que conferem resistência aos benzimidazóis podem se apresentar de forma isolada ou em combinações, resultando em diferentes níveis de resistência, e variam entre populações de uma mesma espécie (Blackhall et al. 2011). Segundo Silvestre e Cabaret (2002), três situações podem ser descritas dentre as relações que podem existir entre os dois códons mais comumente relacionados (167 e 200): a homozigose para uma das duas mutações é suficiente para conferir resistência; a dupla homozigose permite tolerância a doses mais elevadas do que a homozigose para uma única mutação e, por fim, a dupla heterozigose confere maior grau de resistência do que heterozigose para uma única mutação.

Em relação ao SNP na posição 198, este foi descrito pela primeira vez por Ghisi et al. (2007) em *H. contortus*, detectando também mutação no códon 200, mas não no 167. No que diz respeito à associação desses dois SNPs detectados, nunca foi observado dupla mutação homozigótica para o mesmo helminto. Pesquisas já tentaram associar essa mutação com resistência em outros helmintos, mas além de *H. contortus*, o polimorfismo no códon 198 foi detectado apenas em *Trichuris trichiura* (Diawara et al. 2013a, Schwenkenbecher & Kaplan 2009, Barrère et al. 2012). Em fungos, o SNP no códon 198 já foi detectado para *Helminthosporium solani* resistente a tiabendazol (McKay & Cooke 1997).

No que concerne aos parasitos de humanos, como filarídeos, doses anuais de albendazol coadministrado com dietilcarbamazina ou ivermectina são usadas em áreas endêmicas para filariose linfática, a fim de tratar e interromper a transmissão da doença.

Possivelmente, essa ADM seleciona helmintos resistentes. Entretanto, Hoti et al. (2003) não encontraram a alteração para *Wuchereria bancrofti* no códon 200, enquanto que Schwab et al. (2005) detectaram mutação no códon 200 para esse parasito em uma frequência de 2,7% em Gana.

Recentemente em *T. trichiura* foram detectados SNPs nos códons 167, 198 e 200 em amostras coletadas a campo, enquanto que para *Ascaris lumbricoides* a mutação foi observada apenas no códon 167 (Diawara et al. 2013a). Em trabalho semelhante também foi observado SNP no códon 200 em *T. trichiura*, mas não para *A. lumbricoides*, levantando a hipótese que a baixa sensibilidade observada no tratamento da tricurose com benzimidazol pode ser devido à alta frequência desse SNP. De acordo com Kotze et al. (2005) é importante que se faça um monitoramento da sensibilidade de ancilostomídeos aos benzimidazóis, em função da implementação de programas para o controle da filariose e oncocercose com essas drogas, em áreas de sobreposição dessas parasitoses, a fim de detectar quaisquer alterações em resposta ao tratamento.

Schwenkenbecher et al. (2007) relataram mutação no códon 167 e 200 em *N. americanus* de crianças que receberam tratamento de forma periódica, todavia, numa frequência muito baixa, associando esses dados com possível erro experimental. Schwenkenbecher e Kaplan (2009) analisando o códon 198 de *A. caninum* não detectaram qualquer alteração, enquanto que estudos mais recentes demonstraram que o SNP no códon 200 está presente em ancilostomídeos de humanos do Quênia, porém em uma baixa frequência (Diawara et al. 2013a).

1.2.5. Métodos para detecção de resistência aos benzimidazóis

Alguns métodos foram elaborados no sentido de estabelecer um diagnóstico fenotípico ou genotípico de resistência a anti-helmínticos. Nos últimos anos, testes de bioensaio *in vitro*, como o Teste de Eclosão de Ovos (EHT) e testes *in vivo*, como o Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (FECRT), têm sido descritos para diagnóstico fenotípico de resistência aos benzimidazóis, utilizados principalmente em animais de produção (Lyndal-Murphy et al. 2014). Todavia, apesar de serem indicados pela “*World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*”, esses métodos apenas detectam resistência quando, no mínimo, 25% da população de

nematódeos apresentam genótipo de resistência, ou seja, quando já houve o estabelecimento da população resistente (Papadopoulos 2008).

De acordo com Prichard (2007), é difícil confirmar resistência em parasitos de humanos, especialmente os que não têm fases de vida livre, como *W. bancrofti*, e os que não podem ser cultivados em modelos. Por essas razões, somado ao fato da baixa sensibilidade dos testes fenotípicos, existe uma necessidade de estabelecer métodos moleculares para diagnóstico de resistência anti-helmíntica (Barrère et al. 2013).

Alguns métodos moleculares têm sido propostos como novas alternativas para o diagnóstico de resistência anti-helmíntica, os quais podem ser capazes de compensar as limitações encontradas no EHT e no FECRT. De acordo com Roeber et al. (2013), apesar do progresso, não existe um teste molecular prático para a detecção de resistência a mais de uma classe de anti-helmíntico. Além disso, segundo o mesmo autor, a maioria dos ensaios moleculares utilizados requer o uso de L3 ou de nematódeos adultos. Todavia, recentemente Diawara et al. (2013a) avaliaram SNPs relacionados à resistência em amostras de ovos de *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e ancilostomídeos coletadas a campo, entretanto, relataram limitações quanto ao teste para análise individual do ovo pela dificuldade de extração de DNA.

Atualmente, existem descritos alguns ensaios baseados em análise molecular para detecção de SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1. Para Várady e Čorba (1999), algumas desvantagens são citadas em termos de custo, aplicabilidade, interpretação e reprodutibilidade, principalmente quando se extrapola protocolos espécie-específicos. Contudo, é através das análises moleculares que o estudo dos mecanismos envolvidos no processo pode ser elucidado e a frequência dos alelos determinada. Segundo Torres-Acosta et al. (2012), a falta de diagnóstico de resistência em muitos países do continente americano pode ser atribuída, em parte, à falta de conhecimento técnico e/ou recursos financeiros para realizar os levantamentos.

A maioria desses testes moleculares são baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que de acordo com Roos et al. (1995), pode detectar resistência até quando apenas 1% da população parasitária for resistente. Dentre essas técnicas, a PCR baseada no Sistema de Reação de Amplificação Refratária (ARMS-PCR) é uma das mais relatadas, a qual se baseia no princípio de que a Taq DNA polimerase não apresenta atividade 3'-5' exonuclease, de maneira que o mau pareamento na

extremidade 3' do iniciador e o DNA molde resulta na impossibilidade de amplificação (Kubask 2012). Essa técnica utiliza apenas um par de iniciador por reação, enquanto que sua variante, a Tetraprimer ARMS-PCR, utiliza quatro iniciadores na mesma reação (dois iniciadores externos e dois internos), um para se anelar na sequência correspondente ao alelo sem mutação e um iniciador para o alelo com mutação. Nessa reação podem ser produzidos dois ou três fragmentos de tamanhos diferentes: um fragmento que é o controle da amplificação e mais um fragmento caso o indivíduo seja homocigoto para um dos alelos ou mais dois fragmentos caso o indivíduo seja heterocigoto (Nunes 2012).

Alvarez-Sánchez et al. (2005) descreveram a técnica de PCR em tempo real (qPCR) como método para detecção de resistência aos benzimidazóis em tricostrongilídeos de ovinos, a qual permite calcular a proporção de cada variante alélica, não requerendo processamento pós-PCR. Para os autores, essa técnica melhora substancialmente os métodos de detecção de resistência, particularmente em termos de tempo, em comparação com a PCR alelo-específico e de sensibilidade, em comparação com os bioensaios. Os trabalhos publicados utilizando essa técnica são mais escassos, porém mostram eficácia satisfatória (von Samson-Himmelstjerna et al. 2002, Walsh et al. 2007, Schwenkenbecher et al. 2007, Santos et al. 2014).

Como polimorfismos de resistência aos benzimidazóis são caracterizados por uma mutação de ponto, essa alteração pode criar ou desfazer um sítio de ligação para enzimas de restrição. Dessa maneira, é possível usar a técnica de Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP-PCR), se baseando na ideia de que a mudança de base permitirá o corte do fragmento somente de um dos alelos, assim como realizado por Tiwari et al. (2006). É importante ressaltar que nem sempre o uso desse método é possível, uma vez que, dependendo da sequência, a troca de base pode não criar ou desfazer sítios, a não ser que seja realizada uma etapa inicial de criação do sítio para clivagem, conforme realizado por Shayan et al. (2007), mas que adiciona mais uma PCR na metodologia do processo.

O sequenciamento também tem sido utilizado para detectar SNPs a partir de amostras de campo. Drogemuller et al. (2004), por exemplo, obtiveram a sequência completa para o cDNA do gene da β -tubulina isotipo 1 de ciatostomíneos, encontrando mutação no códon 167. A vantagem dessa técnica é permitir a análise de múltiplos

SNPs no gene, sem necessidade de uma PCR pra cada mutação. Variantes da técnica de sequenciamento convencional, como o pirosequenciamento, têm sido descritas como um método eficaz na detecção dessas mutações. Para Diawara et al. (2009), essa técnica é confiável, rápida e fácil, permitindo a análise de SNPs de grandes números de amostras de ovo ou outras fases do parasito, num curto período de tempo. Von Samson-Himmelstjerna et al. (2009), avaliando mutação no códon 200 em *H. contortus* por meio de qPCR e por pirosequenciamento, relataram uma boa concordância entre os métodos, ressaltando que o ensaio de pirosequenciamento é mais rápido e de mais fácil execução, todavia, o equipamento necessário é mais caro e menos disponível do que o necessário para qPCR. Segundo Diawara et al. (2013b), uma das principais limitações na utilização do pirosequenciamento, num contexto de campo, é o custo do equipamento, entretanto, permite uma avaliação precisa dos SNPs em um período curto de tempo.

2. JUSTIFICATIVA

A análise sistemática dos mecanismos relacionados à resistência aos benzimidazóis em ancilostomídeos tem se mostrado aquém dos estudos envolvendo outros nematódeos intestinais. Falha no tratamento contra esses helmintos já foi descrita tanto em animais quanto em humanos, todavia, as bases genéticas envolvidas nesse processo ainda necessitam de maiores estudos.

Mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 tem sido associada com resistência aos benzimidazóis em muitas espécies de importância humana e/ou veterinária, inclusive em ancilostomídeos de humanos coletados a campo, mas ainda não existem relatos para *A. caninum*. O único trabalho na literatura que detectou mutação no códon 200 em ancilostomídeos relata baixa frequência dessa mutação em parasitos de população humana do Quênia, porém não mostra associação dessa alteração com outros SNPs relacionados à resistência. No códon 198 a mutação nunca foi descrita para os ancilostomídeos. Levando em consideração que esses mecanismos variam inclusive entre populações de uma mesma espécie, é possível que em *A. caninum* haja associação entre esses SNPs ou entre outros ainda não descritos.

Não há relatos, até o momento, sobre estudos dessas alterações em populações brasileiras de ancilostomídeos. Desse modo, uma varredura dos SNPs de duas populações brasileiras, separadas geograficamente, permitirá pesquisar qual a frequência alélica dessas mutações e se existe correlação entre os genótipos. Para tanto, é fundamental a padronização de uma técnica molecular sensível, específica e de baixo custo, no intuito de auxiliar no monitoramento de populações de ancilostomídeos resistentes. Quanto mais prontamente esse monitoramento for feito, maiores são as chances de retardar o estabelecimento de uma população de parasito que não responda mais ao tratamento com benzimidazóis, aumentando a vida útil dos produtos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Padronizar uma metodologia para determinar a frequência de SNP no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 relacionado à resistência aos benzimidazóis em *A. caninum* coletados a campo.

3.2. Objetivos específicos

- Padronizar uma técnica molecular para a detecção da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*;
- Sintetizar controles positivo e negativo para mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1;
- Realizar uma varredura, através da técnica molecular desenvolvida, da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* coletados a campo;
- Validar o teste molecular padronizado através de sequenciamento das amostras coletadas;
- Realizar uma varredura, por sequenciamento, da mutação no códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* coletados a campo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Considerações éticas

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 328/12). O certificado de aprovação encontra-se em anexo.

4.2. Populações do estudo e obtenção de vermes adultos

Os vermes utilizados nesse trabalho foram provenientes de 9 cães de Teresina (PI) e 10 cães de Belo Horizonte (MG), os quais foram eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) das respectivas cidades. A eutanásia dos cães já é um procedimento de rotina do CCZ, dessa forma, coube aos médicos veterinários a realização dessa etapa, obedecendo à legislação vigente. Após eutanásia, esses cães foram postos em decúbito dorsal e tiveram suas cavidades abdominais abertas. O intestino delgado foi então retirado, acondicionado em caixas de isopor com gelo e transportado ao Laboratório de Helminologia do ICB/UFMG.

Os intestinos foram abertos longitudinalmente, seguido de uma raspagem da mucosa. O material proveniente dessa raspagem foi então transferido para um tamis de 25µm, lavado com água corrente e transferido para um recipiente com fundo escuro. Os vermes foram coletados, identificados em microscópio estereoscópico e lavados com solução salina 0,85%. Os vermes identificados como *A. caninum* foram sexados e armazenados, individualmente, em tubos de microcentrífuga de 1,5ml, sendo conservados a -20°C, para posterior extração de DNA. As características morfológicas utilizadas para identificação foram analisadas segundo Burrows (1962).

4.3. Extração e dosagem de DNA

Foi realizada extração de DNA de 149 vermes coletados no Piauí (53 machos e 96 fêmeas) e de 162 vermes coletados em Minas Gerais (78 machos e 84 fêmeas), totalizando 311 vermes (131 machos e 180 fêmeas). A extração de DNA ocorreu

segundo protocolo padronizado no Laboratório de Parasitologia Molecular do ICB/UFMG.

Inicialmente, os tubos contendo os vermes foram submersos em nitrogênio líquido, seguido de maceração mecânica individual com auxílio de pistilo de vidro. Ao macerado, foram adicionados 400µl de tampão de lise (50mM de EDTA, 100mM de Tris-HCl pH 7,4, 100mM de NaCl e SDS 10%), seguido de digestão com 100µg/ml de proteinase K (Promega, USA), a 65°C por 30min. Posteriormente, foram adicionados 400µl de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, seguido de centrifugação a 12.000xg, a 25°C por 5min. A fase superior foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5ml e submetida à digestão de RNA com 100µg/ml de RNase A (Ludwig Biotec, Brasil), a 37°C por 30min. Foram adicionados mais 400µl da solução de clorofórmio e álcool isoamílico seguido de centrifugação, conforme parâmetros mencionados anteriormente. A fase superior foi novamente transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5ml, com adição de 400µl de isopropanol e consequente precipitação do DNA, o qual foi armazenado a -20°C. Após cerca de 16h, o tubo foi centrifugado a 14.000xg, a 4°C por 30min. O precipitado foi lavado com 400µl de etanol 70% e centrifugado a 12.000xg, a 4 °C por 10min. Essa etapa de lavagem foi repetida, o DNA ressuspense em 20µl de água ultrapura e armazenado a 4°C. A dosagem de DNA foi determinada por espectrofotometria através do aparelho NanoDrop® ND-1000 (ThermoScientific, USA) levando em conta a relação 260/280 e 260/230 para controle de qualidade.

4.4. Desenho dos iniciadores

Todos os iniciadores utilizados nesse trabalho foram desenhados através do programa Oligo Explorer 1.4 (Gene link, USA) com base na sequência nucleotídica do Genbank, sob número de acesso DQ459314.1. As substituições das bases ocorreram conforme descritas por Ye et al. (2001), de acordo com a necessidade da técnica utilizada. A nomenclatura adotada foi baseada no sentido do iniciador, se Direto (*F*) ou Reverso (*R*), se sensível (*s*) ou resistente (*r*), no fragmento controle (*c*) e na inserção da alteração na técnica de Megaprimer-PCR (*m*). Os iniciadores utilizados para a primeira reação apresentam a letra “a”, enquanto que os números correspondem ao local da

adição da segunda incompatibilidade na extremidade 3' do iniciador. O símbolo “<” indica que o iniciador foi desenhado em um menor tamanho do que o original.

Para o método de Megaprimer-PCR, uma alteração foi feita na posição 8 da extremidade 3' do iniciador *Rm*, com a finalidade de adicionar um erro proposital e mimetizar a sequência mutada. Os iniciadores *Fs0*, *Fs2*, *Fs3*, *Fs4* e *Fs4<* foram desenhados para se anelar somente na ausência da mutação, enquanto que *Rr0*, *Rr2*, *Rr3*, *Rr4* e *Rr4<*, para a presença da mutação. Os iniciadores *Fs4*, *Fs4<*, *Rr4* e *Rr4<* foram desenhados com a segunda incompatibilidade nas mesmas posições, com diferenças de tamanho, como forma estratégica explicada posteriormente. Em *Fs0* e *Rr0* não foi adicionado um segundo erro, visando determinar se somente a presença ou ausência da mutação seria fator suficiente para especificidade desses iniciadores.

O Quadro 3 mostra todos os iniciadores, suas respectivas temperaturas de anelamento e, quando se aplica, posição e alteração das bases. A Figura 2 representa parte da sequência utilizada para desenho dos iniciadores, bem como a região de anelamento dos mesmos. As cores utilizadas para sublinhar a sequência na Figura 2 correspondem às regiões de anelamento dos iniciadores do Quadros 3. O Quadro 4 mostra o tamanho dos amplicons nas diferentes combinações de iniciadores.

Quadro 3 – Iniciadores utilizados, suas respectivas temperaturas de anelamento e posições das substituições (quando se aplica). As posições em que foram feitas alterações encontram-se em negrito.

Iniciador (5' - 3')	Alteração	Temperatura de anelamento (°C)
<i>Fa</i> : <u>TGT AGT GAA AAA GCA GTC TCG</u>		60
<i>Fs0</i> : <u>TTG AGA ATA CAG ATG AGA CCT T</u>		60
<i>Fs2</i> : <u>TTG AGA ATA CAG ATG AGA CCA T</u>	T → A	60
<i>Fs3</i> : <u>TTG AGA ATA CAG ATG AGA CGT T</u>	C → G	60
<i>Fs4</i> : <u>TTG AGA ATA CAG ATG AGA GCT T</u>	C → G	60
<i>Fs4<</i> : <u>GAA TAC AGA TGA GAG CT T</u>	C → G	50
<i>Ra</i> : <u>AGC CGA AAG TGG AGC AAA TC</u>		60
<i>Rc</i> : <u>AGG TAG TGA CAC CGG ACA TT</u>		60
<i>Rr0</i> : <u>GAG CCT CGT TAT CAA TAC AGT</u>		60
<i>Rr2</i> : <u>GAG CCT CGT TAT CAA TAC ACT</u>	G → C	60
<i>Rr3</i> : <u>GAG CCT CGT TAT CAA TAC TGT</u>	A → T	60
<i>Rr4</i> : <u>GAG CCT CGT TAT CAA TAG AGT</u>	C → G	60
<i>Rr4<</i> : <u>CCT CGT TAT CAA TAG AGT</u>	C → G	50
<i>Rm</i> : <u>GTT ATC AAT ACA GTA GGT CTC</u>	A → T	58

Quadro 4 – Combinações de iniciadores e respectivos tamanhos do amplicon.

Par de iniciador	Tamanho do amplicon (pb)
<i>Fa + Ra</i>	441
<i>Fa + Rc</i>	331
<i>Fa + Rr0</i>	164
<i>Fa + Rr2</i>	
<i>Fa + Rr3</i>	
<i>Fa + Rr4</i>	
<i>Fa + Rr4<</i>	161
<i>Fa + Rm</i>	157
<i>Fs0 + Rc</i>	209
<i>Fs2 + Rc</i>	
<i>Fs3 + Rc</i>	
<i>Fs4 + Rc</i>	
<i>Fs4< + Rc</i>	205

```

AAATCGCACGTTTAAATGTAGTGAAAAAGCAGTCTCGCTCCTGAATGTGGTTTGTAAATATGTTTCTATG
GACATTTTTATAGGTTTCTGACACTGTGGTGGAGCCATACAATGCTACACTTTCTGTGCACCAGTTGGTT
Códon 198 Códon 200
GAGAATACAGATGAGACCTTCGTATTGATAACGAGGCTCTGTATGATATTTGCTTCCGAACCTTGA AAC
TCACAAACCCAACTACGGAGATCTGAACCACCTCGGTAAGCTAGCAAGCTACTCATAGACTTTTCATAG
CTTAGCACCGAATTCCTAATATGAGCATAATTTTCAGTGTCTGTAACAATGTCCGGTGTCACTACCTGCC
TTCGCTTCCCTGGCCAGTTGAATGCTGATCTCCGCAAATTTGGCTGTAAACATGGTTCCATTTCCACGCTCT
TCACTTCTTCATGCCTGGATTTGCTCCACTTTTCGGCTAAAGGTGCTCAGGCTTACCGTGCTCTCACTGTT
GCCGAGCTTACTCAGCAGGTACGTCGCCTTTCTCGTGGCAGGCATCTTATCTGGCTCAGGGTGCACAAA

```

Figura 2 – Sequência parcial utilizada do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* para desenho dos iniciadores (DQ459314.1).

4.5. Síntese de controles para o SNP no códon 200

As PCRs para síntese dos controles foram realizadas em produto final de 25 μ l, constando de 12,5 μ l de GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA), 0,5 μ l de cada iniciador (com concentração final de 0,2 μ M/iniciador), 9,5 μ l de água ultrapura e 2 μ l de DNA (cerca de 20ng). As amplificações ocorreram em um termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Germany) obedecendo ao seguinte programa: 95°C por 5min para desnaturação inicial da dupla fita de DNA, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1min, 60°C por 1min, 72°C por 1min e um passo final de extensão a 72°C por 8min. Nas

reações, foi incluso o “branco”, com a substituição do DNA por água, para avaliar a presença de possíveis contaminantes.

Para síntese do controle do alelo sem mutação no códon 200, doravante chamado TubN (*Tub* = *tubulina*; *N* = *normal*), inicialmente foi realizada uma primeira reação de PCR com a combinação de iniciadores *Fa* e *Ra*, utilizando DNA genômico de *A. caninum*. O volume de 2µl do produto da primeira reação foi utilizado em uma reação de seminested-PCR, com a combinação *Fa* e *Rc*, seguido de sequenciamento para confirmação da ausência da mutação. Esse fragmento foi clonado com kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, USA), o produto da ligação, transformado em células da linhagem XL1-blue (Phoneutria, Brasil) e recuperado por minipreparação com Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA).

No caso da síntese do controle positivo da mutação, denominado TubM (*Tub* = *tubulina*; *M* = *mutado*), foi realizado uma mutagênese sítio-dirigida através da técnica de Megaprimer-PCR. O plasmídeo recombinante TubN foi utilizado para a realização de uma PCR com a combinação de iniciadores *Fa* e *Rm*. O produto dessa reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) (Midsci, USA), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, USA). O fragmento foi então excisado do próprio gel com uma lâmina de bisturi, purificado com o kit GFX® PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, UK) e dosado. Cerca de 25,0ng do produto da primeira reação foi usado como um megaprimer de outra reação, que combinando com *Rc*, resultou em um amplicon de 331pb. O produto dessa reação foi purificado, sequenciado, submetido à clonagem e recuperado, nas mesmas condições de TubN. A Figura 3 esquematiza a síntese desses controles. O detalhamento dos métodos de clonagem, transformação e extração de DNA plasmidial estão detalhados nos tópicos 4.6 e 4.7.

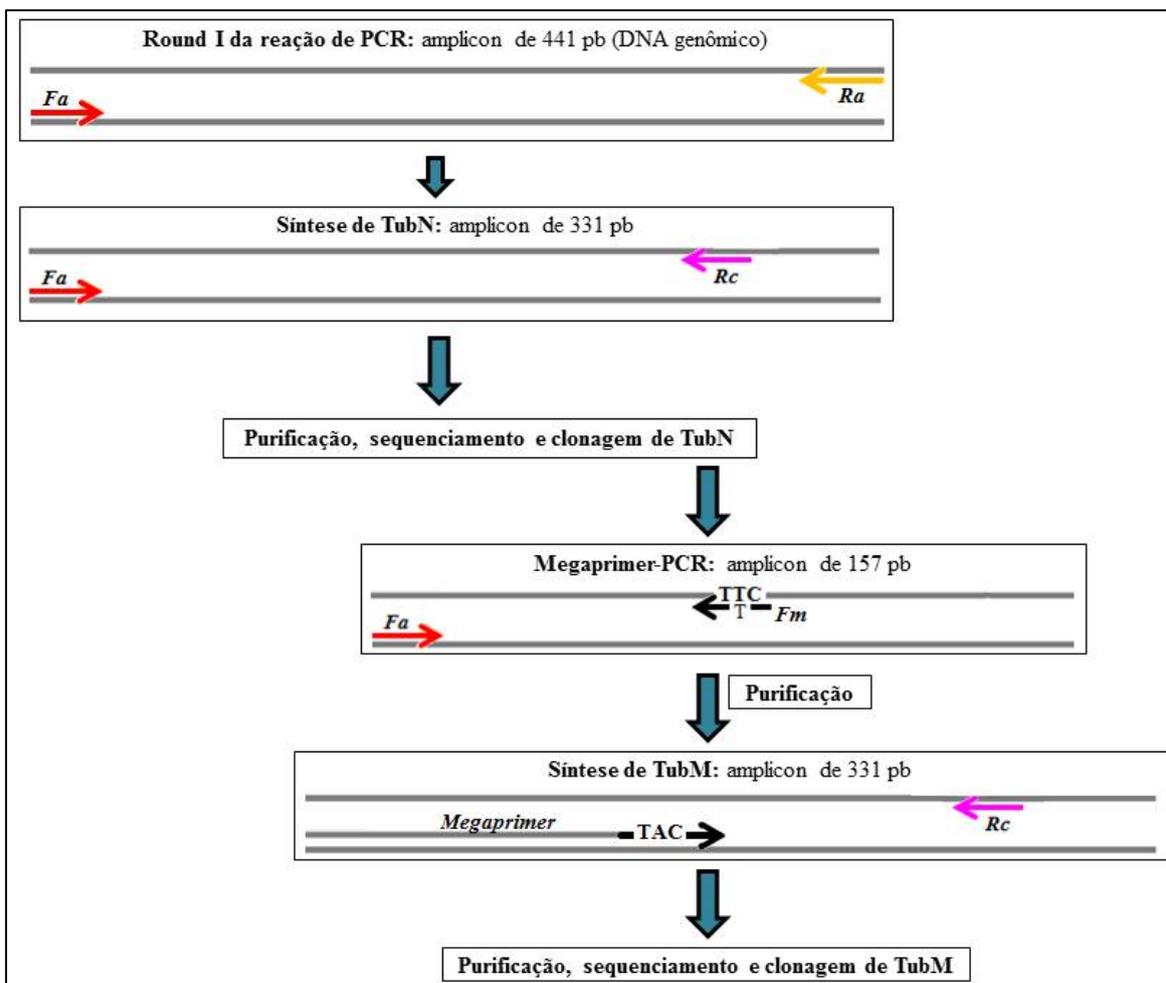


Figura 3 – Esquema da síntese dos controles TubN e TubM.

4.6. Clonagem

Os controles TubN e TubM foram clonados com o kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, USA). O volume de 1,5µl do produto de PCR que se desejava clonar foi incubado a 4°C, por cerca de 16h, na presença de 2,5µl do tampão de ligação, 0,5µl de vetor e 0,5µl de DNA ligase. Posteriormente, foi realizada a termostransformação. O volume de 2µl do produto de ligação foi transformado em 30µl de células quimiocompetentes *E. coli* da linhagem XL1-blue (Phoneutria, Brasil). As amostras foram transformadas com incubação em gelo por 10min, seguida de choque térmico por 1,5min a 42°C e nova incubação em gelo por mais 2min. As células bacterianas potencialmente transformadas foram incubadas por 1h a 37°C em 500µl de meio líquido circlegrow® (MP Biomedicals, USA) pH 7,0, com posterior plaqueamento

das mesmas em meio sólido seletivo circlegrow® (MP Biomedicals, USA), contendo ampicilina (100µg/ml), IPTG (100mM) e X-gal (500µg/ml).

As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 16h. A presença dos insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foi confirmada por meio de uma reação de PCR de colônia, utilizando diretamente uma pequena amostra de algumas colônias brancas retirada com o auxílio de um palito de madeira estéril. Essas amostras foram transferidas para um tubo contendo 5µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA), 0,2 µl de cada iniciador M13 direto (5' - CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC - 3') e reverso (5' - TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C - 3'), com concentração final de 0,2µM/iniciador e 4,6µl de água ultrapura. Da mesma forma, foram preparadas reações de PCR com colônias azuis que funcionaram como controle negativo da clonagem. A PCR de colônia ocorreu a 95°C por 5min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 1min, 52°C por 1min, 72°C por 1min e um passo final de extensão a 72°C por 8min. Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese de gel de agarose 1,0% (m/v), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, USA).

Após a confirmação da presença dos insertos recombinantes, com o auxílio de palitos de madeira estéreis, foram inoculados fragmentos das colônias em tubos de 15ml do tipo Falcon contendo 3ml de meio de cultura líquido circlegrow® (MP Biomedicals) com 3µl de ampicilina (100µg/ml) em cada tubo, os quais foram incubados por cerca de 22h, a 37°C, sob agitação constante (5.000xg).

4.7. Recuperação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi recuperado através do kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA). A cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000xg em tubo de microcentrífuga de 1,5ml. O sobrenadante foi descartado e o restante da cultura novamente centrifugada no mesmo tubo. O sobrenadante foi então removido por inversão e o pellet bacteriano foi ressuspensão em 250µl de solução de ressuspensão de célula. Foram adicionados 250µl de solução de lise para romper a membrana das bactérias, com 10µl de protease alcalina para quebra de ligações peptídicas. O produto foi incubado por 5min a temperatura ambiente, com adição de 350µl de solução de neutralização. O lisado bacteriano foi centrifugado a 14.000xg por 10min. O

sobrenadante (aproximadamente 850µl) foi transferido para a coluna (inserida em um tubo coletor) e centrifugado a 14.000xg por 1min a temperatura ambiente. Foi descartado o líquido do tubo coletor e adicionado 750µl de solução de lavagem na coluna, a qual foi centrifugada a 14.000xg. O líquido do tubo coletor foi descartado e a coluna foi reinserida. Esse procedimento de lavagem foi repetido usando 250µl de solução de lavagem, centrifugado a 14.000xg por 2min a temperatura ambiente. A coluna foi inserida em um novo tubo coletor e o DNA plasmidial foi eluído em 40µl de água ultrapura. Esse volume foi novamente centrifugado a 14.000xg por 1min a temperatura ambiente e estocado a -20°C.

4.8. Padronização da técnica molecular para detecção da mutação no códon 200 do gene da β-tubulina isotipo 1

4.8.1. Seleção dos iniciadores para a ARMS-PCR

Essa metodologia foi escolhida pela possibilidade da detecção simultânea dos dois alelos possíveis para o códon 200 do gene da β-tubulina isotipo 1. Os iniciadores foram desenhados tanto para o alelo sem mutação, com a extremidade 3' do iniciador direto apresentando uma timina (T), pareando com uma adenina (A) quando na ausência da mutação; e um iniciador reverso com a extremidade 3' apresentando uma T, pareando com uma A na presença da mutação. Para que não houvesse amplificação inespecífica, outra alteração de base foi também inserida nos iniciadores. Essas alterações variaram de local, ocorrendo na posição 2, 3, e 4 da extremidade 3' ou ainda sem alteração.

De posse dos controles TubN e TubM, foram realizadas ARMS-PCRs, nas mesmas condições descritas no tópico 4.5, com produto final de 10µl, para seleção dos iniciadores desenhados. Para detecção do fragmento sem mutação, foram testados quatro iniciadores diretos (*Fs0*, *Fs2*, *Fs3*, *Fs4*) com o iniciador reverso *Rc*, em reações individuais. Similarmente, para detecção do fragmento com mutação, foram testados o iniciador direto *Fa* com quatro iniciadores reversos com diferentes locais de incompatibilidade (*Rr0*, *Rr2*, *Rr3*, *Rr4*), também em reações individuais. Para cada combinação de iniciador foram realizadas reações com os plasmídeos TubN e TubM, de maneira que foram selecionados os iniciadores que apresentavam maior especificidade.

O produto dessa reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) (Midsci, USA), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, USA).

4.8.2. Padronização da Tetraprimer ARMS-PCR

Selecionados os iniciadores, foi realizada uma reação de Tetraprimer ARMS-PCR. Assim, em uma mesma reação foram utilizados quatro iniciadores: o direto *Fs4* e o reverso *Rr4*, determinados no item anterior, além do iniciadores *Fa* e *Rc*, ou seja, o produto de uma mesma reação sempre constaria o fragmento resultante da combinação *Fa* e *Rc*. Dependendo do genótipo, essa mesma reação também apresentaria o(s) produto(s) resultante da combinação de iniciador para detectar a ausência e/ou presença da mutação nos dois alelos, permitindo concluir se o verme analisado seria homocigoto recessivo, homocigoto dominante ou heterocigoto. A Figura 4 mostra um esquema da técnica de Tetraprimer ARMS-PCR. Os subtópicos seguintes correspondem às estratégias adotadas para adequar a reação em questão.

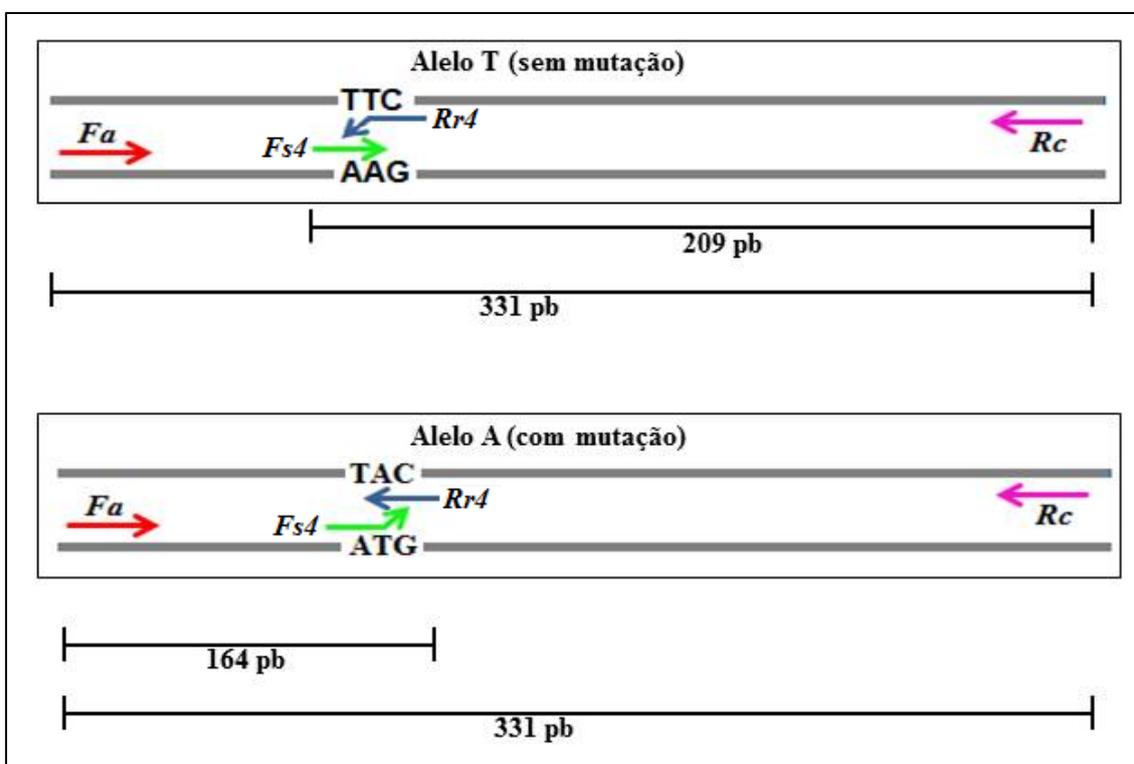


Figura 4 – Esquema da técnica de Tetraprimer ARMS-PCR.

4.8.2.1. Alteração na concentração dos iniciadores

Foram trabalhadas diferentes concentrações dos iniciadores selecionados, de modo que os iniciadores internos sempre apresentaram uma maior concentração quando comparados aos iniciadores externos. Na relação iniciadores internos/iniciadores externos, foram testadas três combinações de concentração: 0,5 μ M/0,1 μ M, 0,5 μ M/0,05 μ M e 1 μ M/0,2 μ M. As reações aconteceram em volume final de 10 μ l, sob as mesmas condições descritas no item 4.5. Para a mesma mix (com os quatro iniciadores), foram realizadas três reações, mimetizando os possíveis genótipos existentes: homocigoto recessivo, utilizando 20ng de TubM; homocigoto dominante, com 20ng de TubN; e heterocigoto, com 10ng de TubN mais 10ng de TubM. Similarmente, servindo como um controle de cada combinação de iniciador, nessa mesma reação foram utilizados os iniciadores em pares. O produto da reação dos iniciadores em pares foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v), enquanto o produto da Tetraprimer ARMS-PCR foi corrido em gel de agarose 2,0% (Midsci, USA), ambos com tampão TAE 0,5x, corados com GelRed® (Biotium, USA).

4.8.2.2. PCR em termociclador de gradiente

Foi realizada uma PCR em termociclador de gradiente, em temperaturas de anelamento variando 1°C, de 60°C a 65°C, com a combinação de iniciadores em pares. Foi utilizada uma relação de concentração de iniciadores internos/iniciadores externos igual a 1 μ M/0,2 μ M, em volume final de 10 μ l, sob as mesmas condições descritas no item 4.5. Foi realizada uma Tetraprimer ARMS-PCR, com *Fa*, *Fs4*, *Rc* e *Rr4*, para as diferentes temperaturas. O produto da reação dos iniciadores em pares foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v), enquanto o produto da Tetraprimer ARMS-PCR foi corrido em gel de agarose 2,0% (Midsci, USA), ambos com tampão TAE 0,5x, corados com GelRed® (Biotium, USA).

4.8.2.3. Eliminação da sequência dos plasmídeos

Foi realizada uma reação de PCR em duas etapas, a primeira reação de 15 ciclos com TubN e TubM, usando os iniciadores *Fa* e *Rc*, nas concentrações de 0,2 μ M. Do produto da primeira reação, foi adicionado 1 μ l na Tetrapimer ARMS-PCR, com os iniciadores *Fa*, *Fs4*, *Rc* e *Rr4*, temperatura de anelamento de 60°C, concentração de 1 μ M de iniciadores internos e 0,2 μ M de iniciadores externos, com 20ng e 10ng de DNA plasmidial. Essas reações ocorreram em volume final de 10 μ l, nas condições citadas no item 4.5. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2,0% (m/v) (Midsci, USA), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, USA).

4.8.2.4. Touchdown Tetraprimer ARMS-PCR

Utilizando TubN e TubM, foi realizada uma Touchdown Tetraprimer ARMS-PCR com *Fa*, *Fs4*, *Rc* e *Rr4*. As reações ocorreram em concentração de 1 μ M de iniciadores internos e 0,2 μ M de iniciadores externos, em volume final de 10 μ l, obedecendo as mesmas condições do item 4.5, submetidas ao seguinte programa: 95°C por 5min para desnaturação inicial, 94°C por 1min, temperatura de anelamento inicial de 65°C por 1min, diminuindo 2°C a cada ciclo, extensão a 72°C por 1min, repetindo cada etapa uma vez, estabilizando em 49°C, com 14 repetições e um passo final de extensão a 72°C por 8min. O produto da reação foi corrido em gel de agarose 2,0% (Midsci, USA), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, USA).

4.8.2.5. Alteração da temperatura dos iniciadores internos

Foi realizada uma reação de Tetraprimer ARMS-PCR, para TubN e TubM, utilizando os iniciadores *Fa*, *Fs4*<, *Rc* e *Rr4*<, com o programa apresentando temperatura de anelamento de 50°C, em volume final de 10 μ l, nas condições descritas no item 4.5. As concentrações dos iniciadores internos e externos foram de 1 μ M e 0,2 μ M, respectivamente. O produto da Tetraprimer ARMS-PCR foi corrido em gel de agarose 2% (Midsci, USA), ambos com tampão TAE 0,5x, corados com GelRed® (Biotium, USA).

4.8.2.6. Utilização de DNA genômico

Utilizando DNA genômico, foi realizada uma primeira reação de PCR com os iniciadores *Fa* e *Ra*, nas concentrações de 0,1µM, seguida de uma segunda reação com *Fa*, *Fs4*, *Rc* e *Rr4*, nas concentrações dos iniciadores internos e externos de 1µM e 0,2µM, respectivamente, e temperatura de anelamento de 60°C. O volume de 1µl da primeira reação foi transferido para a segunda reação, de maneira que as reações ocorreram em volume final de 10µl, nas mesmas condições descritas no item 4.5. O produto da reação foi corrido em gel de agarose 2,0% (Midsci, USA), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, USA).

4.9. Varredura da mutação no códon 200 do gene da β-tubulina isotipo 1 por ARMS-PCR

Na impossibilidade do uso da técnica de Tetraprimer ARMS-PCR, para cada verme analisado nesse trabalho, foram realizadas duas ARMS-PCRs provenientes de uma primeira reação com os iniciadores *Fa* e *Ra*, nas concentrações de 0,1µM: uma com a combinação *Fa* e *Rr4*, para detectar o alelo mutado e outra com a combinação *Fs4* e *Rc*, para detectar o alelo sem mutação. As concentrações dos iniciadores com incompatibilidade foram de 1µM, enquanto que as concentrações dos iniciadores sem incompatibilidade foi de 0,2µM. As reações ocorreram em volume final de 10µl, nas mesmas condições descritas no item 4.5. O produto foi corrido em gel de agarose 1,0% (Midsci, USA), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, USA).

4.10. Sequenciamento para validação da técnica padronizada e para análise dos códons 167 e 198

Para validação da técnica molecular desenvolvida, foi realizado sequenciamento de 75 amostras de DNA (35 do Piauí e 40 de Minas Gerais). Para tal, do produto da primeira reação de PCR utilizada na técnica padronizada, foi realizada uma seminested-PCR em duplicata de 25µl, com os iniciadores *Fa* e *Rc*, sob as mesmas condições e

concentrações utilizadas no item 4.5. As duplicatas de uma mesma amostra foram transferidas para o mesmo tubo, purificadas com PEG (Promega, USA) e dosada.

Os amplicons produzidos foram sequenciados segundo método descrito originalmente por Sanger et al. (1977). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o DYEnamic® ET dye terminator cycle sequencing kit (GE Healthcare, UK) e ocorreram em placas de 96 poços, com volume final de 10µl contendo 0,5µM do iniciador *Fa* ou *Rc*, aproximadamente 100ng do fragmento de DNA purificado, 4µl de ETkit e água ultrapura suficiente para completar o volume. As reações foram realizadas em um termociclador com 30 ciclos de 95°C por 20s, 60°C por 15s e 60°C por 1min. Posteriormente, os nucleotídeos não incorporados foram retirados, adicionando-se 1µl de acetato de amônio (7,5M) e 25µl de etanol absoluto e, após incubação a 25°C por 15min, foi feita centrifugação a 4.000xg por 45min a 25°C. O sobrenadante foi descartado e 150µl de etanol 70% foram adicionados às amostras, seguindo de centrifugação a 4.000xg por 15min a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso por agitação em vórtex com 10µl do tampão de solubilização contendo 70% de formamida e 1mM de EDTA.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos à leitura no sequenciador automático capilar MegaBACE 1000® Long Read Matrix (GE Healthcare, UK) com uma injeção de 2kV por 100s e corrida de 6kV por 240min. Cada amostra foi sequenciada no sentido direto e reverso, e a análise do cromatograma foi feita utilizando o software Sequence Scanner® (Life Technologies, USA), pela possibilidade da existência de helmintos heterozigotos. Como esse trabalho também objetivou fazer uma varredura do códon 198, essas análises foram feitas a partir das 75 amostras sequenciadas na validação da técnica para o códon 200, uma vez que o fragmento sequenciado contém a região do códon 198.

4.11. Purificação do DNA

Para purificação do DNA excisado do gel, foi utilizado o kit GFX® PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, UK), segundo recomendação do fabricante. Inicialmente, utilizando uma lâmina de bisturi, a banda foi excisada do gel, transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5ml e pesada em balança semianalítica, com a

devida tara. Foram adicionados 10µl de tampão de captura para cada 10mg de gel, seguida de incubação a 60°C até completa dissolução. Essa mistura foi vortexizada, transferida para uma coluna inserida em um tubo coletor e incubada por 1min a temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 16.000xg por 30s, para associação do DNA na membrana da coluna. O filtrado presente no tubo coletor foi descartado e a coluna foi reinserida no tubo. Foram adicionados 500µl de tampão de lavagem na coluna, com centrifugação a 16.000xg por 30s, para remoção dos sais e outros contaminantes da membrana. O tubo coletor foi descartado e a coluna foi inserida em um tubo de microcentrífuga de 1,5µl, para eluição do DNA. Foram adicionados 15µl do tampão de eluição no centro da membrana da coluna, seguido de incubação por 1min à temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 16.000xg por mais 1min. O DNA eluído foi estocado a -20°C.

As amostras para sequenciamento foram purificadas com PEG (Promega, USA) (20% polietileno glicol 8.000 em solução de NaCl 2,5M). Esse procedimento foi adotado em função do seu baixo custo/benefício sem prejuízo dos resultados quando comparado com os kits industrializados. A precipitação com o sistema PEG foi realizada misturando-se, em um tubo de microcentrífuga de 0,5ml, 1 volume do produto amplificado com 1 volume de PEG, seguido de uma intensa homogeneização em um vortex. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 13.000xg, 25°C por 45min, com o subseqüente descarte do sobrenadante e adição de 125µl de etanol 80%. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 13.000xg, 25°C por 15min, descarte do sobrenadante, adição de igual volume de etanol 80% e centrifugação sob os mesmos parâmetros para retirada do excesso de sal. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 15µl de água ultrapura.

5. RESULTADOS

5.1. Seleção dos iniciadores a partir da ARMS-PCR

Com o objetivo de estabelecer a metodologia para detecção do SNP relacionado à resistência aos benzimidazóis no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1, dois plasmídeos controles foram sintetizados. Os plasmídeos denominados TubN e TubM correspondem, respectivamente, aos fragmentos do gene contendo a sequência normal e ao fragmento de gene contendo a sequência mutada. Foram desenhados iniciadores para serem usados na metodologia da Tetraprimer ARMS-PCR. Pelo princípio da técnica, esses iniciadores devem ter o final da extremidade 3' pareando exatamente no local avaliado para a presença ou não da mutação. Outro ponto importante seria testar se os iniciadores internos apresentavam especificidade para a sequência-alvo. Dessa forma, os diferentes iniciadores desenhados, apresentando ou não uma segunda incompatibilidade em diferentes regiões, foram testados com os plasmídeos construídos para determinar quais iniciadores seriam utilizados na análise do SNP no códon 200 em DNA genômico.

A Figura 5 mostra o gel com diferentes combinações de iniciadores, no intuito de determinar o melhor iniciador direto, desenhado para detectar o alelo sem a mutação. As amostras utilizadas foram os plasmídeos TubN e TubM. Foi verificado que o iniciador sem a alteração de nucleotídeo de segurança, bem como a alteração na posição 2, não correspondiam a bons iniciadores: o primeiro por não apresentar especificidade, amplificando ambos os plasmídeos, e o segundo por não amplificar nenhum dos plasmídeos controles. Tanto os iniciadores *Fs3* e *Fs4* apresentaram boa especificidade, se anelando somente na presença de TubN. Entretanto, optou-se pelo uso de *Fs4*, pela presença da trava no local mais distante da extremidade 3'.

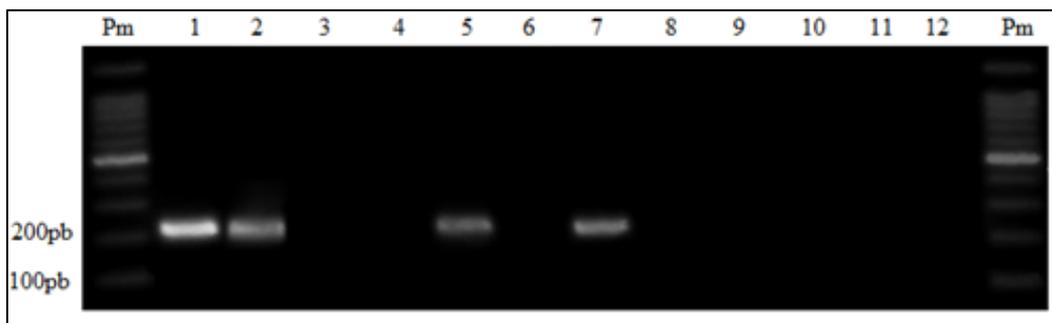


Figura 5 – Determinação do iniciador direto para o DNA sem mutação, apresentado em gel de agarose 1%. As canaletas 1 e 2 apresentam produto de PCR resultante da combinação de iniciadores *Fs0* e *Rc*, as canaletas 3 e 4 correspondem à combinação *Fs2* e *Rc*, as canaletas 5 e 6 à combinação *Fs3* e *Rc*, 7 e 8 à *Fs4* e *Rc*. TubN foi utilizado nas reações das canaletas 1, 3, 5 e 7; TubM, nas reações das canaletas 2, 4, 6 e 8. As demais canaletas correspondem aos respectivos “brancos” das reações.

A Figura 6, de modo semelhante, mostra o gel com diferentes combinações de iniciadores, entretanto, com a finalidade de avaliar qual iniciador reverso, por sua vez desenhado para detectar a mutação, seria o ideal para esse fim. Todos os diferentes iniciadores reversos foram usados em combinação com o iniciador direto *Ra*. Semelhante ao resultado dos iniciadores diretos, as combinações com os iniciadores *Rr0* e *Rr2*, não apresentaram resultados satisfatórios. Apesar de *Rr3* também se anelar somente na presença da mutação, o iniciador de escolha foi *Rr4*, pela presença da trava no local mais distante da extremidade 3’.

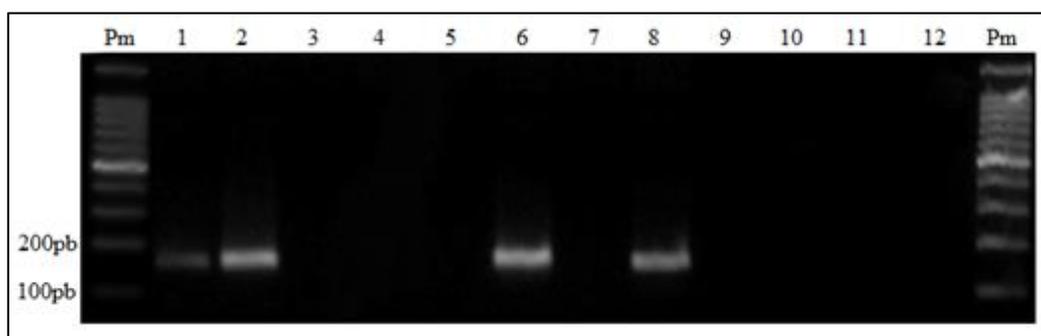


Figura 6 – Determinação do iniciador reverso para o DNA com mutação, apresentado em gel de agarose 1%. As canaletas 1 e 2 apresentam produto de PCR resultante da combinação de iniciadores *Rr0* e *Fa*, as canaletas 3 e 4 correspondem à combinação *Rr2* e *Fa*, as canaletas 5 e 6 à combinação *Rr3* e *Fa*, 7 e 8 à *Rr4* e *Fa*. TubN foi utilizado nas reações das canaletas 1, 3, 5 e 7; TubM, nas reações das canaletas 2, 4, 6 e 8. As demais canaletas correspondem aos respectivos brancos das reações.

5.2. Padronização da Tetraprimer ARMS-PCR

5.2.1. Alteração na concentração dos iniciadores

Como os iniciadores internos selecionados apresentavam incompatibilidade, foi necessário aumentar a concentração dos mesmos, no intuito de tentar favorecer o seu anelamento. Mesmo com a adoção dessa estratégia, não foi obtido um resultado satisfatório na técnica de Tetraprimer ARMS-PCR. Entretanto, na reação utilizando os iniciadores em pares, foi observada uma melhor resolução das bandas quando se utilizou concentração dos iniciadores internos e externos de $1\mu\text{M}$ e $0,2\mu\text{M}$, respectivamente.

A Figura 7 mostra os géis com as combinações de iniciadores em pares, com diferentes concentrações, enquanto que a Figura 8 mostra os géis para a Tetraprimer ARMS-PCR. A relação de concentrações da Figura 7C foi considerada a mais eficiente, e por isso passou a ser usada nos experimentos subsequentes. Entretanto, quando foi testada a Tetraprimer ARMS-PCR, usando os quatro iniciadores, não foi obtido um resultado esperado. Foram visualizadas bandas não esperadas, abaixo de 300pb e para a combinação com o iniciador reverso resistente não foi produzida a banda para o alelo mutado. Na concentração de iniciador da Figura 8C foi também produzido o melhor resultado, mas ainda insatisfatório, mostrando que os iniciadores não funcionaram bem quando usados em conjunto.

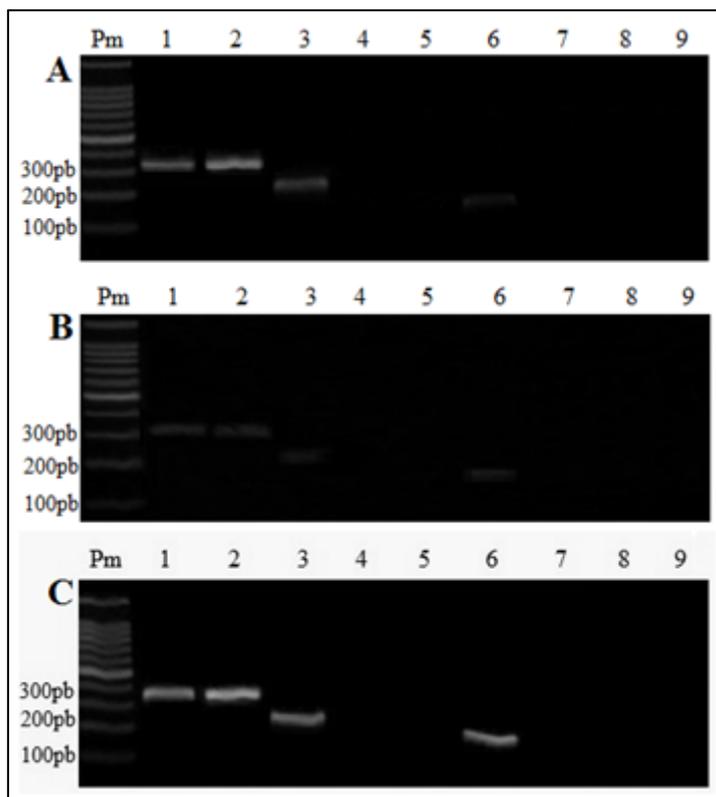


Figura 7 – Teste da concentração de iniciadores apresentado em gel de agarose 1%. A relação de iniciadores internos e externos foi de 0,5 μ M/0,1 μ M (A), 0,5 μ M/0,05 μ M (B) e 1 μ M/0,2 μ M (C). As canaletas 1 e 2 correspondem à combinação *Fa* e *Rc*, 3 e 4 à *Fs4* e *Rc*, e 5 e 6 à *Fa* e *Rr4*, com TubN presente nas canaletas 1, 3 e 5, e TubM nas canaletas 2, 4 e 6. As demais canaletas correspondem aos “brancos das reações”.

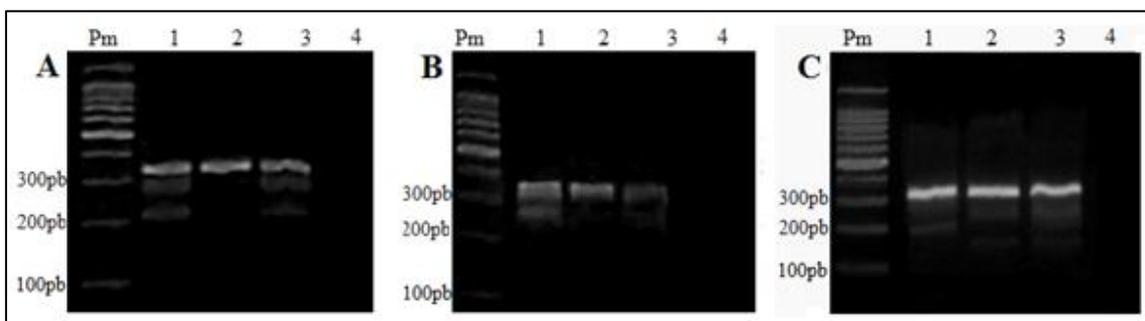


Figura 8 – Tetraprimer ARMS-PCR utilizando DNA plasmidial com diferentes concentrações de iniciadores, em gel de agarose 2%. As canaletas 1, 2, 3 e 4 correspondem a TubN, TubM, TubN+TubM e branco, respectivamente. A relação de iniciadores internos e externos foi de 0,5 μ M/0,1 μ M (A), 0,5 μ M/0,05 μ M (B) e 1 μ M/0,2 μ M (C).

5.2.2. PCR em termociclador de gradiente

Não obtendo um resultado satisfatório mesmo com a combinação de diferentes concentrações, o próximo passo foi aumentar a temperatura de anelamento desses iniciadores, no intuito de tentar tornar a reação mais específica. Assim, foi realizada uma PCR em termociclador de gradiente, em temperaturas de anelamento variando de 60°C a 65°C, com a combinação de iniciadores em pares, para determinar a temperatura ideal com uma boa definição de banda em todas as combinações. Também foi realizada uma reação com os quatro iniciadores da Tetraprimer ARMS-PCR.

A Figura 9 mostra que a PCR realizada em termociclador de gradiente apresentou produtos em todas as temperaturas testadas. Todavia, para a combinação com os iniciadores internos, foi observado que com o aumento da temperatura, os iniciadores ficaram menos sensíveis. Não foram obtidos resultados satisfatórios na Tetraprimer ARMS-PCR.

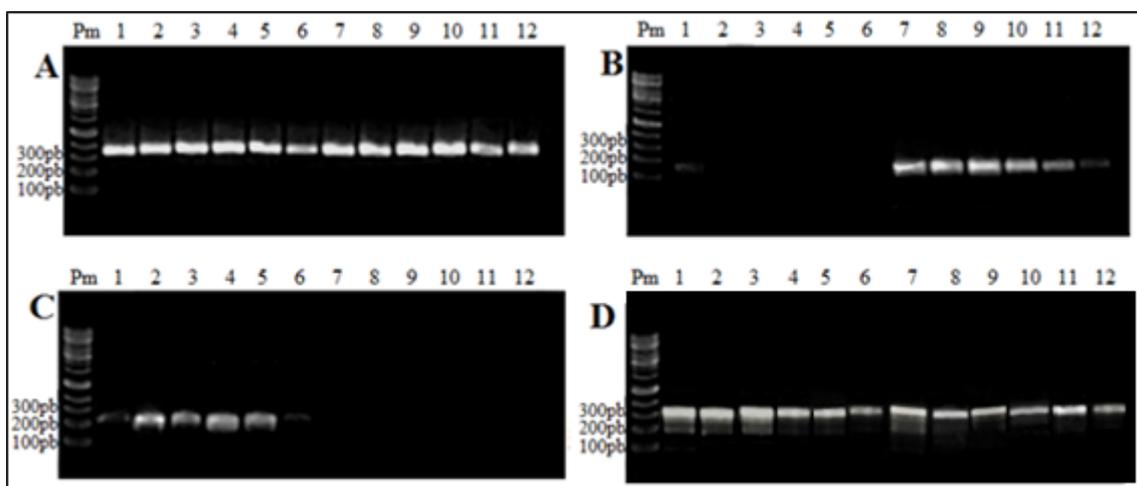


Figura 9 – Teste da temperatura de anelamento dos iniciadores em termociclador de gradiente. A, B e C correspondem aos produtos das reações com combinação *Fa* e *Rc* (fragmento controle), *Fa* e *Rr4* (fragmento com mutação), e *Fs4* e *Rc* (fragmento sem mutação), respectivamente, apresentados em gel de agarose 1%. D corresponde ao produto da Tetraprimer ARMS-PCR, apresentado em gel de agarose 2%. TubN foi utilizado nas canaletas de 1 a 6. TubM foi utilizado nas canaletas de 7 a 12. De 1 a 6 e de 7 a 12, as reações foram feitas em ordem crescente de temperatura (60°C a 65°C).

5.2.3. Eliminação da sequência dos plasmídeos

Na eventualidade da sequência do plasmídeo influenciar negativamente na dinâmica de anelamento dos iniciadores, foi realizada uma primeira reação de PCR com TubN e TubM com finalidade de eliminar o DNA plasmidial, seguido de uma Tetraprimer ARMS-PCR, com duas concentrações de DNA diferentes. A Figura 10 mostra que mesmo com a eliminação da sequência dos plasmídeos, a técnica não apresentou resultado satisfatório.

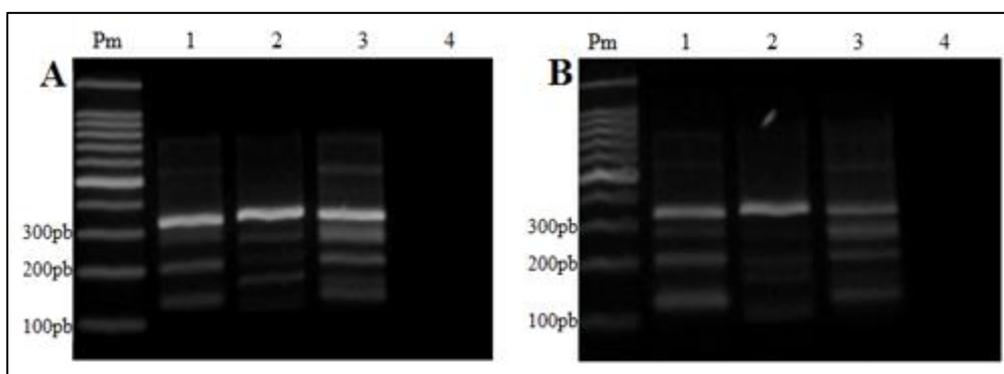


Figura 10 – Produtos da técnica de Tetraprimer ARMS-PCR proveniente de uma primeira reação apresentados em géis de agarose 2%. Nas canaletas 1, 2, 3 e 4 foram aplicados produtos de reações com TubN, TubM, TubN+TubM e “branco”, respectivamente. O gel A corresponde às reações utilizando 20ng de DNA plasmidial, enquanto o B, às reações com 10ng.

5.2.4. Touchdown Tetraprimer ARMS-PCR

Objetivando otimizar a reação e anular a presença de bandas inespecíficas, foi realizada uma reação Touchdown Tetraprimer ARMS-PCR utilizando TubN e TubM. A Figura 11 mostra que houve uma diminuição da quantidade de bandas inespecíficas da reação, entretanto, a banda do alelo mutado também passa a não ser visível.

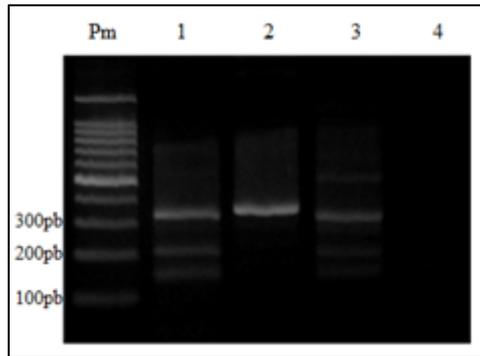


Figura 11 – Produtos da Touchdown Tetraprimer ARMS-PCR apresentados em gel de agarose 2%. Nas canaletas 1, 2, 3 e 4 foram aplicados produtos de reações com TubN, TubM, TubN+TubM e “branco”, respectivamente.

5.2.5. Alteração da temperatura dos iniciadores internos

Com a finalidade de favorecer a amplificação do produto interno, os iniciadores internos direto e reverso foram sintetizados com um tamanho menor, para que a temperatura dos mesmos fosse diminuída em relação aos iniciadores externos. A Figura 12 mostra um gel com o produto resultante dessa reação, na qual não se obteve êxito. Embora os iniciadores funcionem bem em pares, eles não funcionam na combinação de quatro iniciadores. A banda do alelo mutado desaparece quando os quatro iniciadores são colocados juntos.

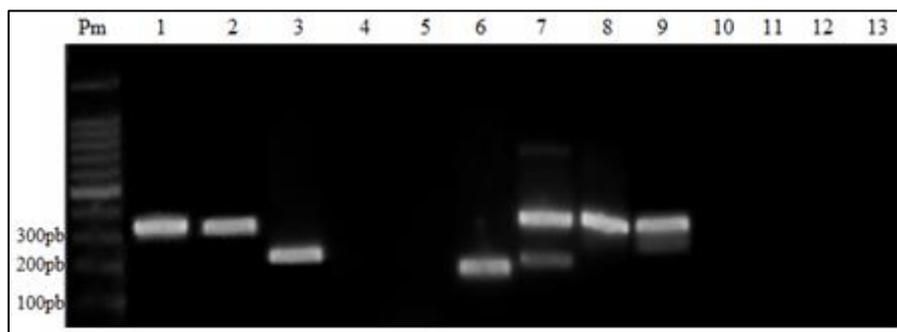


Figura 12 – Produtos da reação com os iniciadores internos de menor tamanho, apresentados em gel de agarose 2%. As canaletas 1 e 2 correspondem ao produto da reação com combinação *Fa* e *Rc*; as canaletas 3 e 4, à combinação *Fs4<* e *Rc*; 5 e 6 à combinação *Fa* e *Rr4<*. Nas canaletas 7, 8 e 9 foram aplicados os produtos da reação de Tetraprimer ARMS-PCR. Nas canaletas 1, 3, 5 e 7 foi aplicado produto da reação com TubN; nas canaletas 2, 4, 6 e 8, produto da reação com TubM. A canaleta 9 apresenta produto da reação com TubN+TubM. As demais canaletas correspondem aos “brancos” das reações.

5.2.6. Utilização de DNA genômico

Apesar de todas as estratégias adotadas, não se obteve êxito com a reação de Tetraprimer ARMS-PCR utilizando DNA plasmidial. Ainda assim, essa técnica foi testada utilizando DNA genômico isolado de vermes individuais, que também não apresentou resultado satisfatório. A Figura 12 mostra o resultado da Tetraprimer ARMS-PCR utilizando DNA genômico.

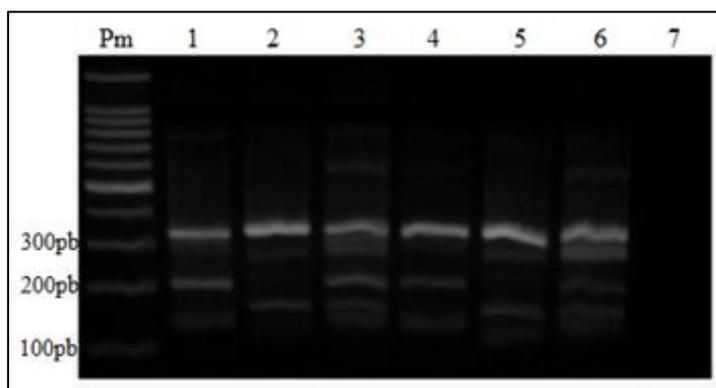


Figura 13 – Produtos da Tetraprimer ARMS-PCR utilizando DNA genômico, apresentados em gel de agarose 2%. Nas canaletas de 1 a 6 foram aplicados produtos provenientes das reações utilizando seis amostras diferentes. A canaleta 7 corresponde ao “branco” da reação.

5.3. Varredura da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* a partir da técnica de ARMS-PCR

Tendo em vista que todas as tentativas de padronização da Tetraprimer ARMS-PCR não resultaram em resultados confiáveis, optou-se pela realização da ARMS-PCR, no formato de duas reações individuais para determinação da frequência alélica das populações em estudo. Dos 162 vermes coletados em Minas Gerais, ocorreu amplificação de 124 amostras (66 machos e 58 fêmeas), de modo que a mutação estava presente em apenas um verme (frequência de 0,8%). Das 142 amostras do Piauí, 110 amplificaram (38 machos e 72 fêmeas), sendo que não foi observada mutação no códon 200 dessa população. A Figura 14 e 15 mostram um gel demonstrativo da varredura da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* coletados em Minas Gerais e no Piauí, respectivamente.

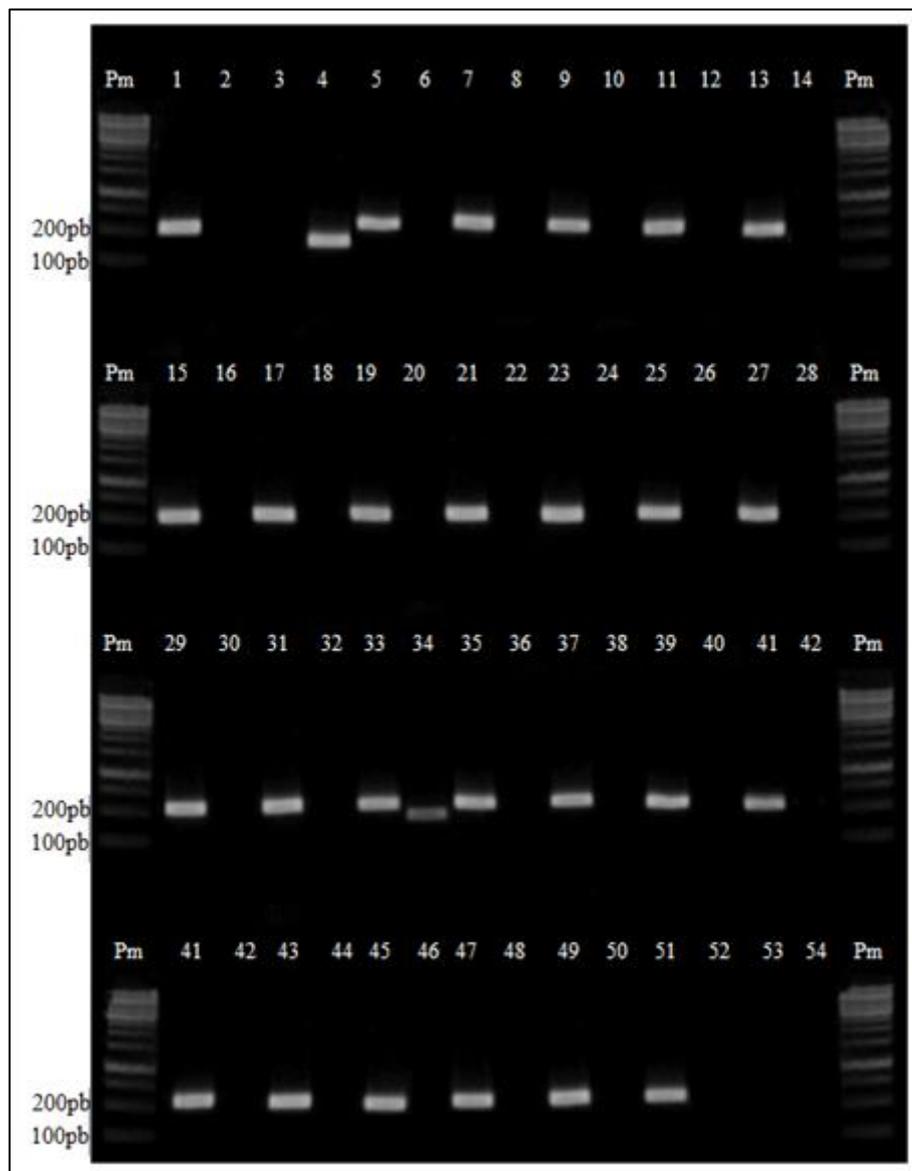


Figura 14 – Gel de agarose 1% demonstrativo da varredura da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* coletados em Minas Gerais. As canaletas identificadas com número ímpar correspondem ao produto de PCR com combinação para detectar o fragmento sem mutação (*Fs4* e *Rc*). As canaletas com número par correspondem ao produto da PCR com a combinação para detectar a mutação (*Fa* e *Rr4*). Nas canaletas de 1 a 4 foram utilizados controles (1 e 3: TubN; 2 e 4: TubM). Das canaletas 5 a 52, os produtos das duas reações para a mesma amostra de DNA genômico se encontram uma ao lado da outra. As canaletas 53 e 54 correspondem aos “brancos” das reações.

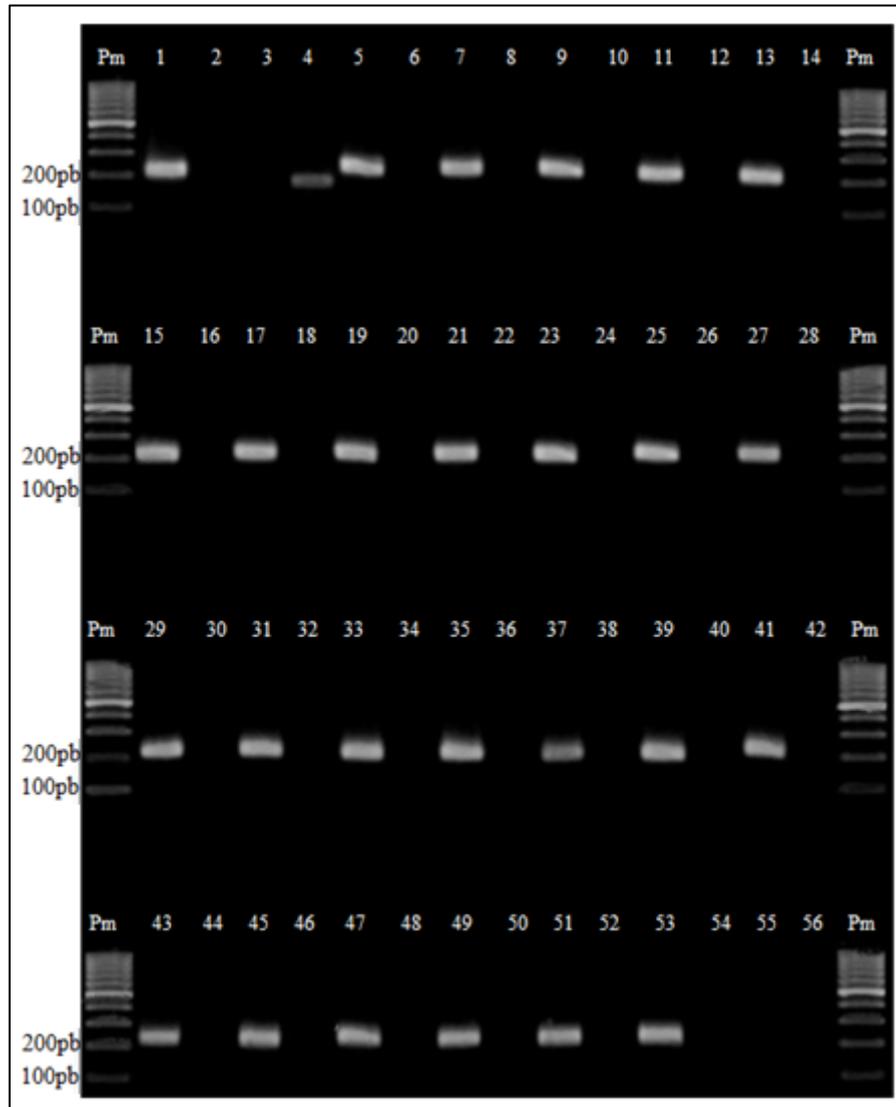


Figura 15 – Gel de agarose 1% demonstrativo da varredura da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* coletados no Piauí. As canaletas identificadas com número ímpar correspondem ao produto de PCR com combinação para detectar o fragmento sem mutação (*Fs4* e *Rc*). As canaletas com número par correspondem ao produto da PCR com a combinação para detectar a mutação (*Fa* e *Rr4*). Nas canaletas de 1 a 4 foram utilizados controles (1 e 3: TubN; 2 e 4: TubM). Das canaletas 5 a 52, os produtos das duas reações para a mesma amostra de DNA genômico se encontram uma ao lado da outra. As canaletas 53 e 54 correspondem aos “brancos” das reações.

5.4. Validação da técnica molecular padronizada através do sequenciamento

O sequenciamento da região do códon 200 de 75 vermes (35 do Piauí e 40 de Belo Horizonte) permitiu validar a técnica padronizada, confirmando a eficácia da mesma. A Figura 16 mostra um cromatograma representativo da porcentagem dos helmintos que não apresentou mutação, enquanto a Figura 17 mostra um cromatograma correspondente à única amostra que apresentou mutação. Na Figura 17, os dois picos na região do códon 200 correspondem aos dois alelos, um mutado e um normal.

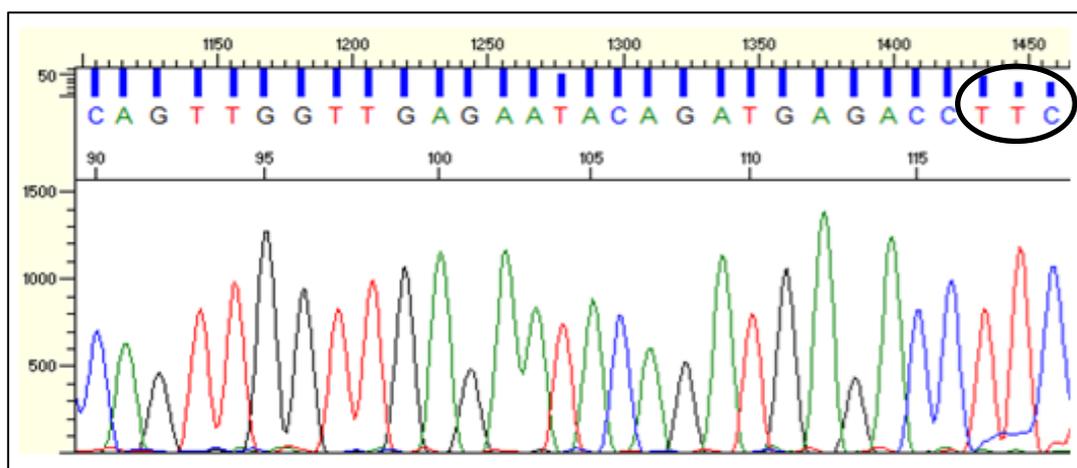


Figura 16 – Cromatograma correspondente ao sequenciamento da porcentagem dos helmintos que não apresentaram mutação no códon 200. A presença de apenas um pico para a segunda timina do códon destacado revela um helminto homozigoto dominante.

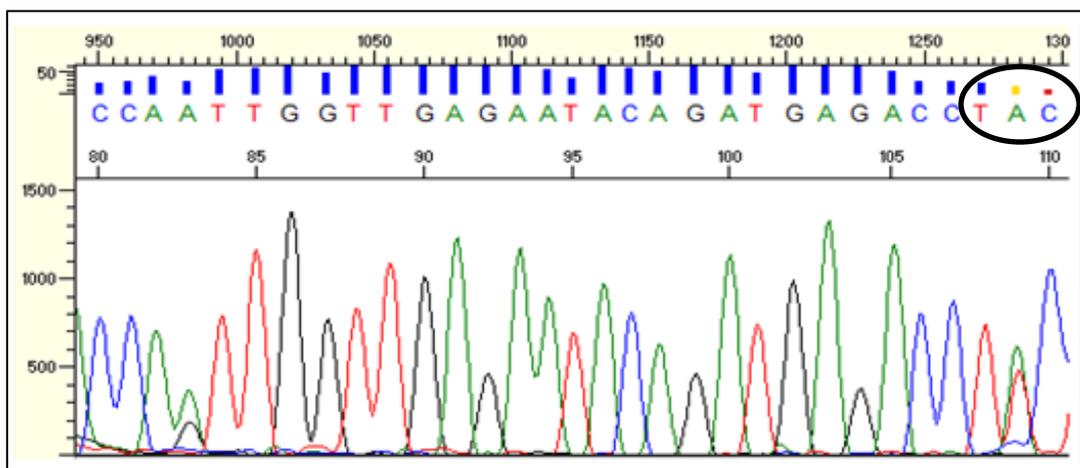


Figura 17 – Cromatograma correspondente ao sequenciamento do único helminto que apresentou mutação no códon 200. A presença de dois picos para a adenina no códon destacado revela um helminto heterozigoto.

5.5. Varredura do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* a partir do sequenciamento

Para o códon 198 foram analisadas as mesmas sequências utilizadas na validação da técnica desenvolvida para o códon 200. A varredura da mutação do códon 198 não mostrou nenhuma alteração nas populações analisadas. A Figura 18 mostra um cromatograma representativo do sequenciamento da região do códon 198, com a sequência correspondente ao alelo sem mutação GAG.

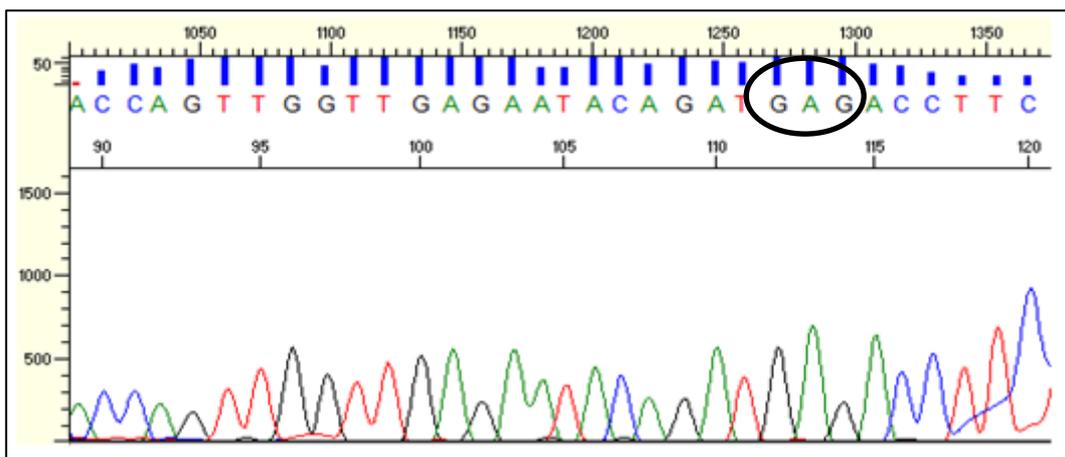


Figura 18 – Cromatograma correspondente ao sequenciamento da varredura realizada no códon 198.

6. DISCUSSÃO

A resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis tem se mostrado um problema cada vez mais frequente, principalmente em nematódeos de importância veterinária. Nos últimos anos, trabalhos vêm ressaltando a relevância desse problema em helmintos de humanos, inclusive evidenciando mecanismos moleculares semelhantes, os quais estão relacionados com SNPs no gene da β -tubulina (Schwab et al. 2005; Diawara et al. 2013a). Considerando que quanto mais precoce for a detecção desses SNPs, maior é a possibilidade de intervenção para retardar esse processo, com a realização de testes que sejam sensíveis a ponto de detectar níveis mínimos de resistência (Roeber et al. 2013).

A padronização de uma técnica molecular nem sempre é simples e a extrapolação de protocolos espécie-específicos podem não funcionar. Por exemplo, para análise do códon 200 de *N. americanus* através de ARMS-PCR, Albonico et al. (2004) não adicionaram uma segunda incompatibilidade nos iniciadores, enquanto que Ye et al. (2001) evidenciaram a necessidade de adição de uma incompatibilidade na posição 2 da extremidade 3'. Esses dados contrariam os resultados obtidos no presente trabalho. Os iniciadores sem incompatibilidade não apresentaram boa especificidade, se anelando na sequência independente de haver mutação ou não. Enquanto que iniciadores com incompatibilidade na posição 2 da extremidade 3' não permitiram o anelamento dos mesmos, independente da sequência-alvo. Os resultados somente foram satisfatórios quando usados iniciadores com incompatibilidade na posição 3 ou na posição 4 da extremidade 3'.

No tocante às estratégias adotadas, em pares e em reações individuais, foi necessário o favorecimento dos iniciadores internos. De fato, alguns trabalhos relataram essa necessidade quando utilizados iniciadores com incompatibilidade (Ye et al. 2001, Muñoz et al. 2009). De forma semelhante, nas outras tentativas de aperfeiçoar a Tetraprimer ARMS-PCR, não se obteve êxito, todavia, a ARMS-PCR permitiu a análise do SNP do códon 200 das populações estudadas. Para Jabbar et al (2006), essa técnica corresponde a um importante meio para investigar as frequências de SNPs em nematódeos. É importante salientar que o processo seria mais rápido e mais barato se fosse utilizada a Tetraprimer ARMS-PCR, entretanto, isso não comprometeu o resultado final do trabalho.

Para *A. caninum*, alguns testes moleculares para detecção de SNPs já foram propostos (Schwenkenbecher et al. 2007; Schwenkenbecher & Kaplan 2009). Entretanto, esses testes funcionaram eficientemente apenas para o controle produzido artificialmente, impedindo que a técnica fosse validada, uma vez que a ocorrência de alelos naturais para o fenótipo de resistência não foram encontrados. Além disso, essas metodologias exigem aparelhagem adequada para qPCR e a análise dos resultados podem induzir a erros. Por outro lado, para a execução da ARMS-PCR, o uso de um termociclador convencional é suficiente e o resultado é obtido de forma direta, sem necessidade de análise de gráficos. Assim, considerando que o sequenciamento realizado nesse trabalho confirmou os resultados obtidos, pode-se afirmar que a técnica molecular desenvolvida corresponde a um método sensível, específico, reprodutível e de baixo custo para detecção da mutação no códon 200.

A sistematização dessa ferramenta molecular se torna crucial tendo em mente que, aliado ao fato de testes fenotípicos serem poucos sensíveis, a maior quantidade de ovos liberados nas fezes dos cães não necessariamente significa uma maior carga parasitária. Dependendo do grau de aglomeração no hospedeiro, o próprio *A. caninum* modula a oviposição (Krupp 1961). Dessa maneira, em cães, fazer o diagnóstico fenotípico de resistência desse helminto, baseado apenas na quantificação dos ovos antes e pós-tratamento pode não condizer aos reais níveis de resistência. De modo semelhante, outros testes *in vitro* também já foram propostos para diagnóstico fenotípico de resistência em ancilostomídeos (Kotze et al. 2004, Albonico et al. 2005, Kotze et al. 2009). Contudo, com bioensaios, o processo de resistência somente é detectado quando a população resistente já está estabelecida (Papadopoulos 2008).

Apesar de não ter sido realizada PCR para genes constitutivos, o fato de que nem todas as amostras amplificaram para pelo menos uma combinação de iniciador, leva a crer que o método de extração de DNA não foi 100% eficiente. Todavia, isso não comprometeu o resultado do experimento. Além do mais, pelo fato de também ter sido utilizado DNA de vermes fêmeas, caso fosse detectada a mutação nesse sexo, seria possível que o DNA dos ovos no útero estivesse relacionado com esse fenômeno (Schwenkenbecher & Kaplan 2009). Entretanto, a detecção da mutação nesse experimento ocorreu apenas em verme macho.

Padronizada a técnica, foi realizada uma varredura para mutações no gene da β -tubulina relacionadas à resistência aos benzimidazóis, utilizando parasitos obtidos de dois estados brasileiros separados geograficamente. A varredura realizada nesse trabalho detectou uma baixa frequência da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. Esses dados corroboram os resultados de Diawara et al. (2013a), que detectaram frequência da mutação no códon 200 em 2,3% de ovos de ancilostomídeos coletados de fezes de humanos do Quênia, enquanto que, no mesmo trabalho, no Haiti e no Panamá esse mutação não foi encontrada. Dessa forma, a presente pesquisa foi a primeira a detectar mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*.

A frequência da mutação no códon 200 identificada nesse trabalho foi inferior às frequências relatadas para outros nematódeos. Por exemplo, Beech et al. (1994) determinaram uma frequência de 46% de *H. contortus* (Tyr/Tyr)₂₀₀ antes de receberem uma nova dose de tratamento, enquanto que Santos et al. (2014) determinaram frequência de 36,42% para esse códon, nessa mesma espécie. Entretanto, vale ressaltar que as populações naturais de *H. contortus*, presentes em diferentes regiões do mundo, já apresentam uma alta frequência de resistência aos benzimidazóis, tendo em vista que essas drogas já vêm sendo usada em rebanhos há vários anos (Barrère et al. 2012). Schwab et al. (2005) detectaram essa alteração em *W. bancrofti*, de maneira que esse polimorfismo foi 31,6% maior na população tratada quando comparada com a população não-tratada, evidenciando a vulnerabilidade da ADM como estratégia de controle. Recentemente também foram relatadas mutações no códon 167, 198 e 200 em *T. trichiura* coletados a campo em diferentes regiões, de modo que para (Tyr/Tyr)₂₀₀ de helmintos coletados do Haiti, a frequência desse genótipo em indivíduos antes do tratamento foi de 3,1%, com aumento para 55,3% no pós-tratamento (Diawara et al. 2013a).

A presença da mutação relatada nesse trabalho demonstra que dentro da população analisada, existe uma subpopulação de indivíduos com possível capacidade genética para sobreviver ao tratamento com benzimidazóis (Melo & Bevilaqua 2005). Conseqüentemente, caso essa população seja exposta à droga, a população sensível pode ser eliminada, de maneira que a próxima geração consistirá da progênie somente dos parasitos que sobreviveram ao tratamento, herdando a capacidade de sobreviver na

presença da droga (Prichard et al. 2012). Essa questão se torna premente quando no Brasil o tratamento com anti-helmínticos de animais domésticos, principalmente os de companhia, vem sendo indicada com intervalos curtos e pré-determinados sem um acompanhamento de exames de fezes.

Falhas nos tratamentos com benzimidazóis contra ancilostomídeos têm sido relatadas em países como Mali, Tanzânia e Vietnã (De Clercq et al. 1997, Albonico et al. 2003, Flohr et al. 2007). Em Gana, ensaios de eclosão de larvas *in vitro* mostraram uma tendência de redução da sensibilidade ao albendazol no pós-tratamento de crianças infectadas com *N. americanus* (Humphries et al. 2013). Na Ilha de Pemba, Albonico et al. (2004) relataram reduzida sensibilidade de *N. americanus* e *A. duodenale* ao albendazol em escolares submetidos à ADM periódica, mas não detectaram alteração no aminoácido 200 da β -tubulina, levantando a hipótese que, se presente na população, o alelo mutado apresenta baixa frequência, possivelmente menor que 1%.

No Brasil, não existem trabalhos publicados que abordem esse assunto em ancilostomídeos. Portanto, os dados obtidos nessa pesquisa reforçam a necessidade de monitoramento de populações brasileiras. Inclusive, é possível que um quadro semelhante ocorra em ancilostomídeos de humanos, porém, outros trabalhos são necessários para confirmar essa hipótese. Isso tende a agravar o quadro de parasitoses, principalmente em áreas com baixos níveis de saneamento básico, uma vez que os indivíduos, em constante exposição, podem se reinfetar, aumentando a carga parasitária albergada, que não é efetivamente eliminada pelo tratamento.

No que concerne à varredura realizada no códon 198, não foi observada alteração nas populações estudadas. Schwenkenbecher e Kaplan (2009) também não relataram mutação no códon 198 de *A. caninum* coletados de cães dos Estados Unidos. Essa mutação somente foi descrita para *H. contortus* e para *T. trichiuria* (Ghisi et al. 2007, Diawara et al. 2013a). Apesar de alguns trabalhos tentarem relacionar essa mutação com outros nematódeos, isso ainda não foi descrito, como por exemplo, para ancilostomídeos de humanos, *A. lumbricoides* e ciatostomíneos de equinos (Blackhall et al. 2011, Diawara et al. 2013a).

Nesse trabalho, as amostras sequenciadas para validar a técnica molecular desenvolvida para o códon 200 foram as mesmas para fazer a varredura da mutação no códon 198. Dessa forma, o número de amostras foi restrito, o que pode ter influenciado

na ausência de detecção desse SNP. É possível que essa mutação não seja geralmente descrita para outros nematódeos pela própria escassez de investigação.

Das amostras analisadas nesse trabalho, a amostra que apresentou mutação no códon 200 era (Tyr/Phe)₂₀₀, a qual não apresentou alteração no códon 198. Diawara et al. (2013a) relataram em ancilostomídeos de humanos apenas (Tyr/Tyr)₂₀₀, não detectando alteração nos outros dois códons. Em *H. contortus*, Barrère et al. (2012) não detectaram mutação no códon 198, todavia, observaram polimorfismos no códon 167 e 200, evidenciando que a heterozigose simultânea pode resultar em altos níveis de resistência. Mutações homozigóticas recessivas simultâneas nunca foram encontradas em nenhuma espécie, o que sugere que a β -tubulina pode tolerar uma mutação, mas duas mutações a tornam disfuncional e incompatível com a vida (Hodgkinson et al. 2008). Os resultados de Mottier e Prichard (2008) corroboram essa ideia.

Elard e Humbert (1999) demonstraram que, após tratamento com benzimidazol de pequenos ruminantes infectados com *T. circumcincta*, apenas (Tyr/Tyr)₂₀₀ resistiram ao tratamento, sendo que os genótipos (Tyr/Tyr)₂₀₀, (Tyr/Phe)₂₀₀ e (Phe/Phe)₂₀₀ estavam inicialmente presentes. Enquanto que para a mesma espécie, Silvestre e Cabaret (2002) relataram sobrevivência de populações (Phe/Phe)₂₀₀, mas que eram mutadas na posição 167, sendo (Tyr/Tyr)₁₆₇ ou (Tyr/Phe)₁₆₇, concluindo que apenas a mutação no códon 167, tanto em homozigose recessiva como em heterozigose, foi suficiente para permitir resistência ao tratamento. Para *A. lumbricoides*, foi relatada sobrevivência de populações desse helminto quando se apresenta em (Tyr/Phe)₁₆₇, com ausência da mutação nos outros dois códons (Diawara et al. 2013a). Assim, é possível que a alteração em apenas um dos alelos do códon 200 de *A. caninum*, como observado no presente trabalho, seja fator suficiente para conferir resistência ao tratamento.

Em ciatostomíneos de equinos, divergindo da maioria dos achados para outras espécies, o polimorfismo no códon 167 foi mais frequente do que no códon 200 (Blackhall et al. 2011). Pela proximidade filogenética, é possível que o mesmo também ocorra em ancilostomídeos. Schwenkenbecher et al. (2007) detectaram o SNP no códon 167 e 200 em *N. americanus* e *A. duodenale* obtidos de crianças em área submetida a ADM periódica, todavia, numa frequência muito baixa, associando esses dados com possível variação experimental e não propriamente com presença dos alelos. Portanto, sugere-se que mais trabalhos relacionados a esse códon sejam realizados.

Pelo fato dos vermes genotipados nesse trabalho serem provenientes de cães errantes capturados e sacrificados pelos CCZ de cada cidade, não foi possível levantar o histórico de vermifugação desses animais. Por se tratarem de cães de rua, acredita-se que são animais que nunca foram submetidos ou foram submetidos poucas vezes a tratamentos anti-helmínticos. Assim, já era esperada uma menor frequência dos SNPs nessa população quando comparada com as frequências observadas em nematódeos de ruminantes, os quais são submetidos periodicamente a tratamentos anti-helmínticos (Molento 2004). Vale reforçar que, mesmo sem sofrerem uma pressão de seleção por uso de drogas, alguma proporção da população de vermes albergados pode apresentar polimorfismo relacionado à resistência.

Ainda considerando que os cães utilizados nesse trabalho se tratam de animais errantes, podem ser levantados dois pressupostos. O primeiro é que, embora a mutação exista na população de *A. caninum* analisada, pela baixa probabilidade de terem sofrido qualquer seleção por uso de anti-helmínticos, esse alelo mutado tende a ser diluído na população. Isso, por sua vez, tende a retardar o acúmulo de alelos de resistência na população em questão. Por outro lado, como segundo pressuposto, pelo fato dos cães vagarem pelas ruas, isso aumenta a possibilidade de disseminação do alelo mutado, com constante contaminação do ambiente.

É provável que cães domiciliados apresentem uma maior frequência de vermes resistentes, uma vez que a possibilidade de ter sido submetido a um tratamento periódico é maior. O próprio controle preconizado para helmintos em cães constitui um potencial meio de seleção de parasitos resistentes. Por exemplo, cadelas prenhas infectadas por *A. caninum* podem transmitir o parasito aos filhotes por via lactogênica (Arasu & Heller 1999). Altas dosagens de benzimidazóis e aplicações diárias por um período prolongado podem prevenir ou reduzir significativamente essa via de transmissão (Krämer et al. 2009). Há a indicação de tratamento anti-helmíntico no período periparto de cadelas prenhas, e da ninhada, pelo menos em dois momentos, uma por volta de duas semanas de vida e outra duas semanas após, de modo que filhotes desmamados e cães adultos devem ser tratados a cada três ou seis meses, conforme risco epidemiológico.

Como mencionado anteriormente, *A. caninum* é um nematódeo agente de infecções cutâneas em humanos e, de acordo com Caumes (2003), o tratamento pode ser

feito com benzimidazóis, seja em uso tópico ou oral. É possível que a larva migrans cutânea causada por parasitos com SNPs no gene da β -tubulina não respondam a esse tratamento, acarretando em uma maior persistência da infecção, uma vez que os benzimidazóis apresentam o mesmo mecanismo de ação para diferentes formas evolutivas do helminto.

Não pode ser descartada também a hipótese de que outros mecanismos estejam envolvidos no processo de resistência aos benzimidazóis em ancilostomídeos. Albonico et al. (2004) tentaram selecionar uma cepa de ancilostomídeos resistente, após purificação dos ovos e exposição dos mesmos ao tiabendazol. As análises moleculares não detectaram mutação no códon 200 das larvas provenientes desses ovos. A seleção de cepa de *Giardia lamblia* resistente aos benzimidazóis também foi realizada por Argüello-García et al. (2009), que não detectaram mutações no gene da β -tubulina. Em fungos, resistência aos benzimidazóis já foi associada com mutação no gene da β -tubulina isotipo 1, nos códons 6, 50, 134, 165, 167, 198, 200 e 240 (Robinson et al. 2004; Ma et al. 2005). É possível que essas alterações estejam presentes em nematódeos, haja vista o mesmo mecanismo de ação da droga nesses diferentes organismos.

Kopp et al. (2007) relataram altos níveis de resistência ao tratamento com pirantel em cães infectados com *A. caninum*, destacando a necessidade de vigilância e uso mais criterioso de anti-helmínticos em pequenos animais. Fato semelhante foi relatado em humanos infectados com *A. duodenale* na Austrália, também tratados com pirantel (Reynoldson et al. 1997). Não se sabe ao certo os mecanismos que estão relacionados a esse evento, mas estudos sugerem que sejam causados por mudanças nos receptores nicotínicos de acetilcolina dos helmintos (Martin et al. 2012). No presente trabalho, o fato de ter sido encontrada uma porcentagem de parasitos com alelo relacionado à resistência aos benzimidazóis pode sugerir que essa subpopulação não responda, inclusive, ao tratamento com outras classes de medicamentos. Existem relatos de outras drogas que não fazem parte do grupo dos benzimidazóis, mas que podem não ser efetivas na presença de alterações na β -tubulina, como por exemplo, as avermectinas (Mottier & Prichard 2008).

No tocante à frequência dos SNPs por estado, a porcentagem descrita com mutação no códon 200 somente foi encontrada em uma única amostra de Belo

Horizonte. Não há razões óbvias para acreditar que essa mutação não esteja presente no Piauí ou em outros estados brasileiros, porém são necessários mais estudos com um maior número de amostras para corroborar essa hipótese. O próprio fato de ter coletado esses helmintos de um número reduzido de cães caracteriza-se como um viés do trabalho, uma vez que a diversidade genética pode ser menor numa população albergada pelo mesmo hospedeiro.

A introdução de um animal albergando subpopulações de parasitos resistentes em um novo grupo pode ser um dos fatores relacionados ao surgimento desses genótipos em determinada região. Por exemplo, o primeiro relato de resistência na Espanha foi descrito após importação de caprinos do Reino Unido (Requejo-Fernández et al. 1997). Várady et al (1994) relataram importação internacional de parasitos resistentes de pequenos ruminantes da Nova Zelândia. Isso pode ser extrapolado inclusive para parasitos de humanos de regiões que passam por constante ADM, que ao se deslocarem, por motivos de trabalho ou lazer, podem dispersar os alelos relacionados à resistência (Diawara et al. 2013a).

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que existe uma baixa frequência da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 na população de *A. caninum* analisada de Belo Horizonte, entretanto, sem associação com SNP no códon 198. Em contraste, não foram observadas mutações na população de Teresina. Isso não torna o problema de resistência menos grave em *A. caninum*. Existindo a mutação, embora em baixa frequência, é possível que um tratamento recorrente selecione cepas de parasitos resistentes, evidenciando a necessidade de monitoramento do processo.

A sistematização das análises moleculares realizadas nesse trabalho possibilita o conhecimento precoce do estabelecimento ou do aumento da frequência de polimorfismos relacionados à resistência. Sugere-se que novas pesquisas sejam feitas no intuito de realizar uma pressão de seleção em cães experimentalmente infectados com *A. caninum*, para caracterizar, de forma mais detalhada, os mecanismos genéticos envolvidos no processo de resistência aos benzimidazóis nessa espécie.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajanga A, Lwambo NJ, Blair L, Nyandindi U, Fenwick A, Brooker S 2006. *Schistosoma mansoni* in pregnancy and associations with anaemia in northwest Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 59-63.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4^a Ed, Garland Science, Nova York, 1616 p.
- Albonico M, Bickle Q, Ramsan M, Montresor A, Savioli L, Taylor M 2003. Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. *Bull World Health Organ* 81(5): 343-352.
- Albonico M, Crompton DW, Savioli L 1999. Control strategies for human intestinal nematode infections. *Adv Parasitol* 42: 277-341.
- Albonico M, Wright V, Bickle Q 2004. Molecular analysis of the beta-tubulin gene of human hookworms as a basis for possible benzimidazole resistance on Pemba Island. *Mol Biochem Parasitol* 134(2): 281-284.
- Albonico M, Wright V, Ramsan M, Haji HJ, Taylor M, Savioli L, Bickle Q 2005. Development of the egg hatch assay for detection of anthelmintic resistance in human hookworms. *Int J Parasitol* 35(7): 803-811.
- Alvarez-Sánchez MA, Pérez-García J, Cruz-Rojo MA, Rojo-Vázquez FA 2005. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. *Vet Parasitol* 129(3-4): 291-298.
- Arasu P, Heller A 1999. Antibody responses in pregnancy-induced transmammary transmission of *Ancylostoma caninum* hookworm larvae. *Vet Immunol Immunopathol* 70: 289-298.
- Argüello-García R, Cruz-Soto M, Romero-Montoya L, Ortega-Pierres G 2009. *In vitro* resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: variability and variation in gene expression. *Infect Genet Evol* 9(6): 1057-1064.
- Barrère V, Alvarez L, Suarez G, Ceballos L, Moreno L, Lanusse C, Prichard RK 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 186: 344-349.
- Barrère V, Keller K, von Samson-Himmelstjerna G, Prichard RK 2013. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. *Parasitol Int* 62(5): 464-470.

- Bartholomew CF, Nathan MB, Tikasingh ES 1978. The failure of diethylcarbamazine in the treatment of *Mansonella ozzardi* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72(4): 423-424.
- Beech RN, Prichard RK, Scott ME, 1994. Genetic variability of the β -tubulin genes in benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics* 38: 103-110.
- Beech RN, Skuce P, Bartley DJ, Martin RJ, Prichard RK, Gilleard JS 2011. Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? *Parasitol* 138: 160-174.
- Bentounsi B, Khaznadar A, Cabaret J 2012. Resistance of *Trichostrongylus* spp. (Nematoda) to benzimidazole in Algerian cattle herds grazed with sheep. *Parasitol Res* 110: 1021-1023.
- Blackhall WJ, Kuzmina T, von Samson-Himmelstjerna G 2011. β -Tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naive Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. *Parasitol Res* 109: 1199-1203.
- Blaxter ML 2000. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. *Int J Parasitol* 30: 347-355.
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392(6671): 71-75.
- Brown HD, Matzuk AR, Ilves IR, Peterson LH, Harris AS, Sarett LH, Egerton JR, Yaksts JJ, Campbell WC, Cuckler AC 1971. Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *J Am Chem Soc* 83: 1764-1765.
- Brinton LL, Chabner BA, Knollmann BC 2012. *Goodman e Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica*, 12^a ed., Artmed/McGraw-Hill, Porto Alegre, 1821 p.
- Burrows RB 1962. Comparative morphology of *Ancylostoma tubaeforme* (ZEDER, 1800) and *Ancylostoma caninum* (ERCOLANI, 1859). *J Parasitol* 48(5): 715-718.
- Canul-Ku HL, Rodríguez-Vivas RI, Torres-Acosta JF, Aguilar-Caballero AJ, Pérez-Cogollo LC, Ojeda-Chi MM 2012. Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. *Vet Parasitol* 183: 292-298.
- Caumes E 2003. Treatment of cutaneous larva migrans and *Toxocara* infection. *Fundam Clin Pharmacol* 17: 213-216.
- Craig TM 1993. Anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 46: 121-131.
- Cury MC, Lima WS 2002. Helminthos de cães e gatos. *Cad Téc Vet Zootec* 39: 12-35.

De Clercq D, Sacko M, Behnke J, Gilbert F, Dorny P, Vercruyse J 1997. Failure of mebendazole in treatment of human hookworm infections in the southern region of Mali. *Am J Trop Med Hyg* 57(1): 25-30.

Dembele B, Coulibaly YI, Dolo H, Konate S, Coulibaly SY, Sanogo D, Soumaoro L, Coulibaly ME, Doumbia SS, Diallo AA, Traore SF, Diaman Keita A, Fay MP, Nutman TB, Klion AD 2010. Use of high-dose, twice-yearly albendazole and ivermectin to suppress *Wuchereria bancrofti* microfilarial levels. *Clin Infect Dis* 51: 1229-1235.

Dias SR, Cunha DE, da Silva SM, Dos Santos HA, Fujiwara RT, Rabelo EM 2013. Evaluation of parasitological and immunological aspects of acute infection by *Ancylostoma caninum* and *Ancylostoma braziliense* in mixed-breed dogs. *Parasitol Res* 112(6): 2151-2157.

Diawara A, Drake LJ, Suswillo RR, Kihara J, Bundy DA, Scott ME, Halpenny C, Stothard JR, Prichard RK 2009. Assays to detect beta-tubulin codon 200 polymorphism in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e397.

Diawara A, Halpenny CM, Churcher TS, Mwandawiro C, Kihara J, Kaplan RM, Streit TG, Idaghdour Y, Scott ME, Basáñez MG, Prichard RK 2013a. Association between response to albendazole treatment and β -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. *PLoS Negl Trop Dis* 7(5): e2247.

Diawara A, Schwenkenbecher JM, Kaplan RM, Prichard RK 2013b. Molecular and biological diagnostic tests for monitoring benzimidazole resistance in human soil-transmitted helminths. *Am J Trop Med Hyg* 88(6): 1052-1061.

Drogemuller M, Schnieder T, von Samson-Himmelstjerna G 2004. Beta-tubulin complementary DNA sequence variations observed between cyathostomins from benzimidazole-susceptible and -resistant populations. *J Parasitol* 90(4): 868-870.

Eguía-Aguilar P, Cruz-Reyes A, Martínez-Maya JJ 2005. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. *Vet Parasitol* 127(2): 139-146.

Eijk AM, Lindblade KA, Odhiambo F, Peterson E, Rosen DH, Karanja D, Ayisi JG, Shi YP, Adazu K, Slutsker L 2009. Geohelminth Infections among Pregnant Women in Rural Western Kenya; a Cross-Sectional Study. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e370.

Elard L, Humbert JF 1999. Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol Res* 85(6): 452-456.

Elard L, Sauve C, Humbert JF 1998. Fitness of benzimidazole-resistant and -susceptible worms of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Parasitology* 117: 571-578.

Falzon LC, Menzies PI, Shakya KP, Jones-Bitton A, Vanleeuwen J, Avula J, Stewart H, Jansen JT, Taylor MA, Learmount J, Peregrine AS 2013. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 193(1-3): 150-162.

Flohr C, Tuyen LN, Lewis S, Minh TT, Campbell J, Britton J, Williams H, Hien TT, Farrar J, Quinnell RJ 2007. Low efficacy of mebendazole against hookworm in Vietnam: two randomized controlled trials. *Am J Trop Med Hyg* 76: 732-736.

Friedman, PA 1979. *The molecular mechanism of action of benzimidazole drugs in embryos of Ascaris suum*, Dissertação de Mestrado, Universidade da Califórnia, Riverside, 164 p.

Fuchs MA, Ryan LA, Chambers EL, Moore CM, Fairweather I, Trudgett A, Timson DJ, Brennan GP, Hoey EM 2013. Differential expression of liver fluke β -tubulin isoforms at selected life cycle stages. *Int J Parasitol* 43(14): 1133-1139.

Fujiwara RT, Geiger SM, Bethony J, Mendez S 2006. Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite Immunol* 28(7): 285-293.

Fujiwara RT, Zhan B, Mendez S, Loukas A, Bueno LL, Wang Y, Plieskatt J, Oksov Y, Lustigman S, Bottazzi ME, Hotez P, Bethony JM 2007. Reduction of worm fecundity and canine host blood loss mediates protection against hookworm infection elicited by vaccination with recombinant Ac-16. *Clin Vaccine Immunol* 14(3): 281-287.

Furtado LFV, Melo ACFLM 2011. Prevalência e aspectos epidemiológicos de enteroparasitoses na população geronte de Parnaíba, Estado do Piauí. *Rev Soc Bras Med Trop* 44(4): 513-515.

Ghisi M, Kaminsky R, Mäser P 2007. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 144: 313-320.

Haas W, Haberl B, Syafruddin, Idris I, Kallert D, Kersten S, Stiegeler P 2005. Behavioural strategies used by the hookworms *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale* to find, recognize and invade the human host. *Parasitol Res* 95(1): 30-39.

Hawdon JM, Schad GA 1990. Serum-stimulated feeding in vitro by third-stage infective larvae of the canine hookworm *Ancylostoma caninum*. *J Parasitol* 76: 394-398.

Hennon PS 1993. *Les résistances aux anthelminthiques: synthèse bibliographique des connaissances actuelles*, Tese de Doutorado, École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, 67 p.

Hodgkinson JE, Clark HJ, Kaplan RM, Lake SL, Matthews JB 2008. The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *Int J Parasitol* 38(10): 1149-1160.

- Hotez, PJ 2008. Hookworm and poverty. *Ann N Y Acad Sci* 1136: 38-44.
- Hotez PJ, Bethony J, Bottazzi ME, Brooker S, Buss P 2005. Hookworm: "the great infection of mankind". *PLoS Med* 2: 177-181.
- Hotez PJ, Bethony J, Bottazzi ME, Brooker S, Diemert D, Loukas A 2006. New technologies for the control of human hookworm infection. *Trends Parasitol* 22: 327-331.
- Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM, Bottazzi ME, Loukas A, Xiao S 2004. Hookworm Infection. *N Engl J Med* 351: 799-807.
- Hoti SL, Subramaniam K, Das PK 2003. Detection of codon for amino acid 200 in isotype 1 beta-tubulin gene of *Wuchereria bancrofti* isolates, implicated in resistance to benzimidazoles in other nematodes. *Acta Trop* 88: 77-81.
- Humphries D, Mosites E, Otchere J, Twum WA, Woo L, Jones-Sanpei H, Harrison LM, Bungiro RD, Benham-Pyle B, Bimi L, Edoh D, Bosompem K, Wilson M, Cappello M 2011. Epidemiology of hookworm infection in Kintampo North Municipality, Ghana: patterns of malaria coinfection, anemia, and albendazole treatment failure. *Am J Trop Med Hyg* 84: 792-800.
- Humphries D, Nguyen S, Boakye D, Wilson M, Cappello M 2012. The promise and pitfalls of mass drug administration to control intestinal helminth infections. *Curr Opin Infect Dis* 25: 584-589.
- Humphries D, Simms BT, Davey D, Otchere J, Quagraine J, Terryah S, Newton S, Berg E, Harrison LM, Boakye D, Wilson M, Cappello M 2013. Hookworm infection among school age children in Kintampo north municipality, Ghana: nutritional risk factors and response to albendazole treatment. *Am J Trop Med Hyg* 89(3): 540-548.
- Jabbar A, Iqbal Z, Kerboeuf D, Muhammad G, Khan MN, Afaq M 2006. Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci* 79(26): 2413-2431.
- Jongsuksuntigul P, Jeradit C, Pornpattanakul S, Charanasri U 1993. A comparative study on the efficacy of albendazole and mebendazole in the treatment of ascariasis, hookworm infection and trichuriasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 24: 724-729.
- Kaplan RM, Vidyashankar AN 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 186: 70-78.
- Keiser J, Utzinger J 2008. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 299: 1937-1948.
- Kopp SR, Kotze AC, McCarthy JS, Coleman GT 2007. High-level pyrantel resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Vet Parasitol* 143(3-4): 299-304.

- Kotze AC, Clifford S, O'Grady J, Behnke JM, McCarthy JS 2004. An in vitro larval motility assay to determine anthelmintic sensitivity for human hookworm and *Strongyloides* species. *Am J Trop Med Hyg* 71(5): 608-616.
- Kotze AC, Coleman GT, Mai A, McCarthy JS 2005. Field evaluation of anthelmintic drug sensitivity using in vitro egg hatch and larval motility assays with *Necator americanus* recovered from human clinical isolates. *Int J Parasitol* 35(4): 445-453.
- Kotze AC, Lowe A, O'Grady J, Kopp SR, Behnke JM 2009. Dose-response assay templates for in vitro assessment of resistance to benzimidazole and nicotinic acetylcholine receptor agonist drugs in human hookworms. *Am J Trop Med Hyg* 81(1): 163-170.
- Krämer F, Epe C, Mencke N 2009. Investigations into the prevention of neonatal *Ancylostoma caninum* infections in puppies by application of imidacloprid 10% plus moxidectin 2.5% topical solution to the pregnant dog. *Zoonoses Public Health* 56: 34-40.
- Krupp IM 1961. Effects of crowding and of superinfection on habitat selection and egg production in *Ancylostoma caninum*. *J Parasitol* 47: 957-961.
- Kubask F 2012. *Padronização de um protocolo para identificação de mutações da GALNS em pacientes com MPS IVA através das técnicas de PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System) e sequenciamento*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 75 p.
- Lacey E 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 18: 885-936.
- Lacey E 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 6: 112-115.
- Leignel V, Cabaret J 2001. Massive use of chemotherapy influences life traits of parasitic nematodes in domestic ruminants. *Funct Ecol* 15: 569-574.
- Lewis SA, Lee MG, Cowan NJ 1985. Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J Cell Biol* 101(3): 852-861.
- Lubega GW, Prichard RK 1991. Beta-tubulin and benzimidazole resistance in the sheep nematode *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 47: 129-137.
- Ludueña RF 1998. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 178: 207-275.
- Lyndal-Murphy M, Swain AJ, Pepper PM 2014. Methods to determine resistance to anthelmintics when continuing larval development occurs. *Vet Parasitol* 199(3-4): 191-200.

- Ma Z, Yoshimura MA, Holtz BA, Michailides TJ 2005. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Manag Sci* 61: 449–457.
- Mark DL 1975. Survival of *Ancylostoma caninum* on bluegrass pasture. *J Parasitol* 63(3): 484-488.
- Márquez-Navarro A, Cornejo-Coria Mdel C, Cebada-López F, Sánchez-Manzano RM, Díaz-Chiguer DL, Noguera-Torres B 2012. *Taenia saginata*: failure treatment in a child with 5-year long-lasting infection. *Gastroenterol Nurs* 35(2): 125-127.
- Martin RJ, Robertson AP, Buxton SK, Beech RN, Charvet CL, Neveu C 2012. Levamisole receptors: a second awakening. *Trends Parasitol* 28(7): 289-296.
- McKay GJ, Cooke LR 1997. A PCR-based method to characterise and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. *FEMS Microbiol Lett* 152(2): 371-378.
- Melo ACFL 2005. *Caracterização do nematóide de ovinos, Haemonchus contortus, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil*, Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 83 p.
- Melo ACFL, Bevilaqua CML 2005. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*. *Rev Port Cienc Vet* 100: 141-146.
- Molento MB 2004. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. *Rev Bras Parasitol Vet* 13: 82-86.
- Mottier ML, Prichard RK 2008. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet Genomics* 18(2): 129-40.
- Muñoz C, Gómez Talquenca S, Volpe ML 2009. Tetra primer ARMS-PCR for identification of SNP in beta-tubulin of *Botrytis cinerea*, responsible of resistance to benzimidazole. *J Microbiol Methods* 78(2): 245-246.
- Ndibazza J, Muhangi L, Akishule D, Kiggundu M, Ameke C, Oweka J, Kizindo R, Duong T, Kleinschmidt I, Muwanga M, Elliott AM 2010. Effects of deworming during pregnancy on maternal and perinatal outcomes in Entebbe, Uganda: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 50: 531-540.
- Njue AI, Prichard RK 2003. Cloning two full-length beta-tubulin isotype cDNAs from *Cooperia oncophora*, and screening for benzimidazole-resistance-associated mutations in two isolates. *Parasitology* 127(6): 579-588.
- Nogales E 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69: 277-302.

- Nunes RL 2012. *Análise genética de isolados do Haemonchus sp. de ruminantes domésticos para identificação da resistência ao anti-helmíntico Benzimidazol*, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 70 p.
- Oliveira FA 2005. *Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de Schistosoma mansoni*, Dissertação de Mestrado, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 98 p.
- Osei-Atweneboana MY, Awadzi K, Attah SK, Boakye DA, Gyapong JO, Prichard RK 2011. Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*. *PLoS Negl Trop Dis* 5(3): e998.
- Oxberry ME, Gear TG, Prichard RK 2001. Assessment of benzimidazole binding to individual recombinant tubulin isoforms from *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 122(6): 683-687.
- Palcy C, Silvestre A, Sauve C, Cortet J, Cabaret J 2010. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. *Vet J* 183: 68-74.
- Papadopoulos E 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Rumin Res* 76: 99-103.
- Paveley RA, Bickle QD 2013. Automated Imaging and other developments in whole-organism anthelmintic screening. *Parasite Immunol* 35(9-10): 302-313.
- Pearson MS, Tribolet L, Cantacessi C, Periago MV, Valerio MA, Jariwala AR, Hotez P, Diemert D, Loukas A, Bethony J 2012. Molecular mechanisms of hookworm disease: Stealth, virulence, and vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 130: 13-21.
- Prichard RK 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol* 17: 445-453.
- Prichard RK 2007. Markers for benzimidazole resistance in human parasitic nematodes? *Parasitology* 134(8): 1087-1092.
- Prichard RK, Basáñez MG, Boatman BA, McCarthy JS, García HH, Yang GJ, Sripa B, Lustigman S 2012. A Research Agenda for Helminth Diseases of Humans: Intervention for Control and Elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 6: 1-14.
- Requejo-Fernández JA, Martínez A, Meana A, Rojo-Vázquez FA, Osoro K, Ortega-Mora LM 1997. Anthelmintic resistance in nematode parasites from goats in Spain. *Vet Parasitol* 73(1-2): 83-88.
- Ray DK, Bhopale KK, Shrivastava VB 1972. Partial development of human hookworm, *Necator americanus* in albino mice (*Mus musculus*). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66(2): 361-362.

Reynoldson JA, Behnke JM, Gracey M, Horton RJ, Spargo R, Hopkins RM, Constantine CC, Gilbert F, Stead C, Hobbs RP, Thompson RCA 1998. Efficacy of albendazole against *Giardia* and hookworm in a remote Aboriginal community in the north of Western Australia. *Acta Trop* 71: 27–44.

Reynoldson JA, Behnke JM, Pallant LJ, Macnish MG, Gilbert F, Giles S, Spargo RJ, Thompson RC 1997. Failure of pyrantel in treatment of human hookworm infections (*Ancylostoma duodenale*) in the Kimberley region of north west Australia. *Acta Trop* 68(3): 301-312.

Robinson MW, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I 2004. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J Mol Graph Model* 23: 275-284.

Roeber F, Jex AR, Gasser RB 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasit Vectors* 27(6): 153.

Roos MH, Kwa MSG, Grant WN 1995. New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitol Today* 11: 148-150.

Rufener L, Kaminsky R, Mäser P 2009. In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of β -tubulin. *Mol Biochem Parasitol* 168: 120-122.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74: 5463–5467.

Santos JM, Monteiro JP, Ribeiro WL, Macedo IT, Camurça-Vasconcelos AL, Vieira Lda S, Bevilaqua CM 2014. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 199(3-4): 160-164.

Schad GA 1979. *Ancylostoma duodenale*: maintenance through six generations in helminth-native pups. *Exp Parasitol* 47(2): 246-53.

Schwab AE, Boakye DA, Kyelem D, Prichard RK 2005. Detection of benzimidazole resistance-associated mutations in the filarial nematode *Wuchereria bancrofti* and evidence for selection by albendazole and ivermectin combination treatment. *Am J Trop Med Hyg* 73: 234-238.

Schwenkenbecher JM, Albonico M, Bickle Q, Kaplan RM 2007. Characterization of beta-tubulin genes in hookworms and investigation of resistance-associated mutations using real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 156: 167-174.

Schwenkenbecher JM, Kaplan RM 2009. Real-time PCR assays for monitoring benzimidazole resistance-associated mutations in *Ancylostoma caninum*. *Exp Parasitol* 122: 6-10.

Scott I, Pomroy WE, Kenyon PR, Smith G, Adlington B, Moss A 2013. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol* 198(1-2): 166-171.

Shalaby HA 2013. Anthelmintics Resistance; How to Overcome it? *Iran J Parasitol* 8(1): 18-32.

Shayan P, Eslami A, Borji H 2007. Innovative restriction site created PCR-RFLP for detection of benzimidazole resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol Res* 100(5): 1063-1068.

Silva N, Guyatt H, Bundy D 1997. Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs* 53: 769-788.

Silvestre A, Cabaret J 2002. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol Biochem Parasitol* 120: 297-300.

Silvestre A, Leignel V, Berrag B, Gasnier N, Humbert JF, Chartiere C, Cabaret J 2002. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Vet Res* 33: 465-80.

Silvestre A, Sauve C, Cortet J, Cabaret J 2009. Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. *Mol Ecol* 18(24): 5086-5100.

Soukhathammavong PA, Sayasone S, Phongluxa K, Xayaseng V, Utzinger J, Vounatsou P, Hatz C, Akkhavong K, Keiser J, Odermatt P 2012. Low efficacy of single-dose albendazole and mebendazole against hookworm and effect on concomitant helminth infection in Lao PDR. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1417.

Soulsby EJJ 1965. *Textbook of Veterinary Clinical Parasitology*. Vol. I, F. A. Davis Company, Philadelphia.

Swanson SJ, Phares CR, Mamo B, Smith KE, Cetron MS, Stauffer WM 2012. Albendazole therapy and enteric parasites in United States-bound refugees. *N Engl J Med* 66: 1498-1507.

Tchuenté LAT 2011. Control of soil-transmitted helminths in sub-Saharan Africa: diagnosis, drug efficacy concerns and challenges. *Acta Trop* 120 Suppl 1: S4-11.

Tian LG, Cheng GJ, Wang FF, Guo J, Cai YC, Wang TP, Chen JX, Zhou XN 2011. Efficacy of tribendimidine in treatment of hookworm infection. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi* 23: 202-203.

Tiwari J, Kumar S, Kolte AP, Swarnkar CP, Singh D, Pathak KM 2006. Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. *Vet Parasitol* 138(3-4): 301-307.

Tong Y, Zhou J, Mao M, Gao J, Yuan L 2012. Generation of bioactive recombinant *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide c2. *Protein Expr Purif* 81(1): 49-54.

Torres-Acosta JF, Mendoza-de-Gives P, Aguilar-Caballero AJ, Cuéllar-Ordaz JA 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. *Vet Parasitol* 189(1): 89-96.

Huzil JT, Ludueña RF, Tuszynski J 2006. Comparative modelling of human β tubulin isoforms and implications for drug binding. *Nanotechnology* 17(4): 90-100.

Várady M, Čorba J 1999. Comparison of six *in vitro* tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Vet Parasitol* 80(3): 239-249.

Várady M, Praslicka J, Corba J 1994. Treatment of multiple resistant field strain of *Ostertagia* spp. in Cashmere and Angora goats. *Int J Parasitol* 24(3): 335-340.

Vercruysse J, Behnke JM, Albonico M, Ame SM, Angebault C, Bethony JM, Engels D, Guillard B, Nguyen TV, Kang G, Kattula D, Kotze AC, McCarthy JS, Mekonnen Z, Montresor A, Periago MV, Sumo L, Tchuenté LA, Dang TC, Zeynudin A, Levecke B 2011. Assessment of the anthelmintic efficacy of albendazole in school children in seven countries where soil-transmitted helminths are endemic. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e948.

Veríssimo CJ, Niciura SC, Alberti AL, Rodrigues CF, Barbosa CM, Chiebao DP, Cardoso D, da Silva GS, Pereira JR, Margatho LF, da Costa RL, Nardon RF, Ueno TE, Curci VC, Molento MB 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Vet Parasitol* 187: 209-216.

von Samson-Himmelstjerna G, Walsh TK, Donnan AA, Carrière S, Jackson F, Skuce PJ, Rohn K, Wolstenholme AJ 2009. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology* 136(3): 349-58.

von Samson-Himmelstjerna G, Witzendorff C, Sievers G, Schnieder T 2002. Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. *Vet Parasitol* 3: 227-235.

Waller PJ 2006. From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Vet Parasitol* 139: 1-14.

Walsh TK, Donnan AA, Jackson F, Skuce P, Wolstenholme AJ 2007. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. *Vet Parasitol* 144(3-4): 304-312.

WHO, 2012. Hookworm Disease: Disease Burden. In: Research, I.f.V., (Ed.), Parasitic Diseases, pp. prevalence stats for hookworm worldwide.

Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29(17): e88.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 328 / 2012, relativo ao projeto intitulado "Caracterização molecular dos mecanismos envolvidos na resistência a anti-helmínticos em ancilostomídeos", que tem como responsável ÉLIDA MARA LEITE RABELO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 08/11/2012. Este certificado expira-se em 08/11/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 328 / 2012, related to the Project entitled "Molecular characterization of the mechanisms involved in resistance to anthelmintics in hookworms", under the supervision of ÉLIDA MARA LEITE RABELO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 08/11/2012. This certificate expires in 08/11/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 08/11/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br