

**Variabilidade Molecular e Análise  
Filogeográfica de Populações  
Brasileiras de *Ancylostoma caninum***

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Belo Horizonte

2007

---

**RODRIGO RODRIGUES CAMBRAIA DE MIRANDA**

**Variabilidade Molecular e Análise  
Filogeográfica de Populações  
Brasileiras de *Ancylostoma caninum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Élide Mara Leite Rabelo/UFMG

Co-Orientador: Dr. Rodrigo Redondo/UFMG

Colaboração: Dr. Michael S. Blouin/OSU/EUA

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Belo Horizonte

2007

As instituições que contribuíram para a realização deste trabalho foram:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Center for Genome Research and Biocomputing (CGRB), Oregon State University/Corvallis/Oregon/EUA;

Nevada Genomics Center (NGC), Reno/Nevada/EUA.

Oregon State University (OSU), Corvallis/Oregon/EUA

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/Minas Gerais.

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG e no laboratório do Dr. Michael S. Blouin da Oregon State University em Corvallis/OR/EUA.

Aos meus pais, a quem devo tudo em minha vida.  
Aos meus irmãos, pelo apoio em todos os momentos.  
À Cris, pelo amor, incentivo e por estar sempre ao meu lado  
há tantos anos.

**AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo carinho, ajuda e incentivo.

Aos meus irmãos Ricardo e Cristiane, pela convivência e amizade.

À Cris, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos desde a graduação, a quem gostaria de agradecer de forma especial por tudo que vivemos juntos.

À Prof. Élide Mara Leite Rabelo pela confiança, ensinamentos e amizade em todos os momentos.

Ao Dr. Rodrigo Redondo por ter aceitado o convite de participar desta tese como co-orientador.

Aos amigos do laboratório de Parasitologia Molecular, Carina, Leandra, Ana Flávia, Ariadna, Fábio Júnior, Sílvia, Denílson e Erlisson.

Ao Lívio e novamente à Professora Élide por terem me ajudado na obtenção dos vermes das localidades estudadas.

Ao Mike por me aceitar em seu laboratório e me orientar durante o período em que estive como bolsista no exterior.

Aos amigos do departamento de Zoologia da Oregon State University, em especial ao Jacob e à Becky que contribuíram diretamente para a realização desta tese.

Ao Dr. Francisco Prosdocemi pela amizade e ajuda na identificação dos *loci* de microssatélites de DNA.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG.

À todos os funcionários do Departamento de Parasitologia ICB/UFMG, em especial ao Hudson, por estar sempre interessado e disposto a ajudar, contribuindo com sua experiência no processo de identificação dos helmintos.

Aos amigos do laboratório de Laboratório de Genética-Bioquímica do Departamento de Bioquímica do ICB/UFMG pela ajuda e atenção em todos os momentos.

À todos os integrantes do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG que colaboraram no sequenciamento dos marcadores ITS e COI, em especial ao prof. Fabrício Rodrigues dos Santos por conceder esta oportunidade.

À todos os meus amigos e familiares de Santana e Campo Belo, por participarem da trajetória de minha vida.

No mais, agradeço a todos que participaram de alguma forma desse projeto e me acompanharam durante esse percurso.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASP – *Ancylostoma secreted protein*

AcAP – *Ancylostoma caninum anticoagulant protein*

AMOVA – Análise de variância molecular

BH – Belo Horizonte (Estado de Minas Gerais)

BLAST – **B**asic **l**ocal **a**lignment **s**earch **t**ool

C+ – controle positivo

C- – controle negativo

CG – Campo Grande (Estado do Mato Grosso do Sul)

COI – Citocromo C oxidase subunidade 1

CT – Curitiba (Estado do Paraná)

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo 5' fosfato

ES – produtos de excreção e secreção

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EUA – Estados Unidos da América

FAM – 6-carboxi-fluoresceína

$\Phi$ ST – Índice de fixação de alelos (phi ST)

*h* – diversidade haplotípica

HEX – Hexacloro-6-carboxi-fluoresceína

Indel – “buraco”, espaço

ITS – *Internal transcribed spacer* (espaço transcrito interno)

ITS-1 – *Internal transcribed spacer 1* (primeiro espaço transcrito interno)

ITS-2 – *Internal transcribed spacer 2* (segundo espaço transcrito interno)

*k* – Número médio de diferenças nucleotídicas par a par

NCBI – **N**ational **C**enter for **B**iot**e**chnology

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

PEG – Polietileno glicol

$\pi$  – Diversidade nucleotídica

PM – Peso molecular

MJ – algoritmo matemático *median-joining*



mtDNA – DNA mitocondrial

RNase - Ribonuclease

RNA – ácido ribonucléico

RFLP – *restriction fragment length polymorphism* (fragmento de restrição para análise de polimorfismo de tamanho)

RP – Ribeirão Preto (Estado de São Paulo)

ROX – 6-carboxi-X-rodamina

rY1 – coeficiente de correlação entre distância geográfica e genética

SDS – Duodecil sulfato de sódio

SL – São Luís (Estado do Maranhão)

Taq – *Thermophilus aquaticus*

TBE – Tampão tris-borato EDTA

TET – tetracloro-6-carboxi- fluoresceína

UV – luz ultra violeta

URL – *Uniform Resource Locator*

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Patologias ocasionadas pelo agente zoonótico *Ancylostoma caninum* em humanos. Em (A) são apresentados alguns casos clínicos de larva migrans cutânea e em (B) a infecção de um verme adulto no intestino delgado responsável por enterites eosinofílicas na Austrália.....05
- FIGURA 2:** Distribuição mundial das infecções humanas de ancilostomídeos.....06
- FIGURA 3:** Esquema representativo da unidade repetitiva do rDNA de eucariotos.....10
- FIGURA 4:** Representação esquemática do genoma mitocondrial do *Ancylostoma duodenale*, exemplificando a organização dos 12 genes codificadores de proteínas (atp6, cob, co1-3, nad1-6 e 4L), dois genes ribossomais (rrnS e rrnL), 22 RNAs transportadores (representado pelas diferentes letras), uma região não codificadora (AT) e o sentido da transcrição monocistrônica (modificado de Hu et al., 2004).....14
- FIGURA 5:** (a) Diagrama tridimensional em fita da proteínas Na-ASP-2 colorida de azul (N terminal) a vermelho (C terminal). A Na-ASP-2 é formada por várias camadas polipeptídicas ( $\alpha\beta\alpha$ ), consistindo-se de uma camada intermediária de três folhas  $\beta$  antiparalelas flanqueadas por uma camada única de  $\alpha$  hélice e duas camadas paralelas de  $\alpha$  hélice. Ser70 (rosa) é incapaz de interagir com His129 (azul) e Glu106 (vermelho) para formar a provável triade catalítica. (b) Distribuição de cargas na superfície da Na-ASP-2 apresentando a provável cavidade de ligação carregada negativamente (seta). (a) e (b) estão na mesma orientação.....16
- FIGURA 6:** Localização das populações brasileiras de *A. caninum* utilizadas neste estudo. **BH** = lat. S 19°55', long. W 43°56'; **CG** = lat. S 20°26', long. W 54°38'; **CT** = lat. S 25°25', long. W 49°14'; **RP** = lat. S 21°12', long. W 47°48'; **SL** = lat. S 2°31', long. W 44°16'.....28

**FIGURA 7:** Esquema representativo da reação de *nested* PCR em tubo único para marcação de amplicons com produtos fluorescentes, segundo SCHUELKE (2000). As caixas hachuradas representam os iniciadores específicos para a amplificação dos *loci* de microssatélites (A e B) e as caixas cinzas onduladas (C, E e F) representam o iniciador universal M13 (-21) marcado com uma substância fluorescente. Nos primeiros ciclos (D) o iniciador com “cauda M13” é incorporado aos produtos de PCR. Estes produtos são, posteriormente, alvo para a amplificação do iniciador universal M13 marcado com substância fluorescente (E) os quais são incorporados nos ciclos subsequentes devido a mudança na temperatura de anelamento para 53°C e ao esgotamento do iniciador direto específico utilizado nos primeiros ciclos da reação. (F) O produto final pode ser analisado em um sistema de eletroforese acoplado com detector a *laser*.....35

**FIGURA 8:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a qualidade dos DNAs genômicos obtidos. PM = 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen)..... 45

**FIGURA 9:** Amplificação de *COI* utilizando amostras de DNA genômico de *A. caninum*. PM = 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), C- = controle negativo, C+ = controle positivo e B = branco.....46

**FIGURA 10:** Distribuição dos 30 haplótipos de *COI* encontrados nas populações brasileiras de *A. caninum*. Os haplótipos estão numerados de h1-h30 e suas freqüências apresentadas em cada população (números entre parênteses).....50

**FIGURA 11:** Relação filogenética entre os haplótipos brasileiros de *COI* identificados. Foram incluídos outros haplótipos de *A. caninum* de outras localidades (AcLab1 e AcLab2: EUA e AcChina: China) e haplótipos de *A. duodenale* e *N. americanus*. Os números de cópias dos hapótipos estão apresentados entre parênteses (alelos com mais de uma cópia). A área de cada círculo é proporcional à abundância relativa dos haplótipos e os traços representam as substituições nucleotídicas adjacentes entre os alelos.....53

- FIGURA 12:** Mapa com as distâncias (Km) entre as localidades brasileiras utilizadas para o teste de Mantel.....55
- FIGURA 13:** Amplificação de ITSs utilizando amostras de DNA genômico de *A. caninum*. PM = 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), C+ = controle positivo, C- = controle negativo e B = branco.....56
- FIGURA 14:** *ScoreCard* exemplificando a qualidade dos sequenciamentos de ITSs. Os valores apresentados nos respectivos “poços” representam o tamanho e a qualidade da seqüências, respectivamente. Os valores demarcados pelo círculo vermelho (827/93), indicam estes parâmetros na maior seqüência de ITS produzida.....57
- FIGURA 15:** (A) Rede *Median-Joining* representando as relações filogenéticas entre os diversos haplótipos de ITSs identificados nas populações brasileiras de *A.caninum*. As áreas dos círculos são proporcionais à freqüência de cada haplótipo e as cores representam indivíduos pertencentes às diversas populações, conforme indicado em (B). Em (A), os números sobre as linhas indicam as posições mutantes que diferenciam os haplótipos.....59
- FIGURA 16:** Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de PCR amplificados dos *loci* Acmic30, Acmic31 e Acmic32. Os números de 1-16 representam amostras de DNA de diferentes indivíduos de *A. caninum*. PM representa o padrão de peso molecular (1Kb DNA Ladder - INVITROGEN).....62
- FIGURA 17:** Identificação (*scoring*) de alelos utilizando o programa Genotyper 3.7 NT. Em (A) e (B) são apresentados dois indivíduos, respectivamente homozigoto e heterozigoto para o *locus* Acmic31.....64
- FIGURA 18:** Número de alelos identificados nas populações brasileiras de *A. caninum*.....65

- FIGURA 19:** Número de alelos exclusivos presentes nas populações brasileiras de *A. caninum*.....65
- FIGURA 20:** Proporção de indivíduos aparentados nas populações brasileiras de *A. caninum* amostradas.....72
- FIGURA 21:** Análises de *PCA* (*principal component analyses*) utilizando-se os dados genotípicos dos vermes das cinco populações brasileiras de *A. caninum*. Cada quadrado representa um indivíduo com seus dados genotípicos multi-locus e suas cores indicam a origem populacional. Os círculos coloridos demonstram o agrupamento da maioria dos vermes de cada população.....74
- FIGURA 22:** Esquema ilustrativo das regiões sequenciadas do gene Ac-ASP-2. As porções hachuradas do éxon A e íntron B representam as regiões não sequenciadas destes segmentos.....77
- FIGURA 23:** Estrutura do mRNA codificante da proteína Ac-ASP-2 (AF089728). Após o sequenciamento de 245 nucleotídeos genômicos foram indentificados dois éxons (denominados de éxon A em vermelho e éxon B em azul) e dois íntrons. Os iniciadores utilizados estão apresentados nos retângulos com setas, representando a direção da amplificação.....79
- FIGURA 24:** Distribuição dos genótipos formados pelos 149 alelos identificados nos 245 nucleotídeos sequenciados (considerando-se os éxons e íntrons) de Ac-ASP-2 nas populações brasileiras de *A. caninum*. As freqüências absolutas dos genótipos em cada população estão apresentadas entre os parênteses.....81
- FIGURA 25:** Distribuição dos genótipos formados pelos 27 alelos identificados nos 135 nucleotídeos das regiões codificantes (somente os éxons) de Ac-ASP-2 nas populações brasileiras de *A. caninum*. As freqüências absolutas dos genótipos em cada população estão apresentadas entre os parênteses.....84

**FIGURA 26:** Distribuição dos 27 alelos identificados nos 135 nucleotídeos das regiões codificantes (somente os éxons) de Ac-ASP-2 nas populações brasileiras de *A. caninum*. As frequências absolutas dos genótipos em cada população estão apresentadas entre os parênteses.....85

**FIGURA 27:** Relação filogenética entre os 27 alelos identificados nas regiões codificantes sequenciadas do gene Ac-ASP-2. Estas inferências evolutivas foram realizadas utilizando-se o algoritmo median-joining do programa Network 4.0. Um passo mutacional caracteriza a divergência entre alelos adjacentes ou hipotéticos (pequenos pontos), exceto entre o alelo 24 e o alelo homólogo em *N. americanus* (*outgroup*), onde os eventos mutacionais estão representados em forma traços.....87

**FIGURA 28:** Aminoácidos codificados pelos 27 alelos identificados nas regiões exônicas sequenciadas do gene Ac-ASP-2. A proximidade entre as tonalidades de cores dos aminoácidos reflete a similaridade bioquímica dos mesmos.....88

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>QUADRO 1:</b> Principais espécies de parasitos do gênero <i>Ancylostoma</i> : hospedeiros definitivos, características morfológicas e morfométricas.....	03
<b>TABELA 1:</b> Espécies de nematódeos parasitos com o genoma mitocondrial completo, quase completo e parcialmente conhecido.....	13
<b>TABELA 2:</b> Iniciadores utilizados para amplificação dos marcadores ITSs e COI.....	30
<b>TABELA 3:</b> <i>Locus</i> de microssatélites selecionados e seus respectivos iniciadores sintetizados para a triagem inicial quanto a capacidade de amplificação por PCR de acordo com metodologia descrita por SCHUELKE (2000).....	36
<b>TABELA 4:</b> Dados de diversidade molecular e testes de neutralidade para avaliar a diversidade molecular das populações brasileiras de <i>Ancylostoma caninum</i> .....	51
<b>TABELA 5:</b> Resultado das análises de variância molecular (AMOVA) realizadas com os haplótipos de COI encontrados nas populações brasileiras de <i>A. caninum</i> . Todos os valores de <i>P</i> calculados, tanto para os componentes da variância quanto para os índices de diferenciação entre as populações ( $\Phi_{ST}$ ) são significativos ( $P < 0.05$ ).....	54
<b>TABELA 6:</b> Estimativa par a par dos valores de $\Phi_{ST}$ entre as populações brasileiras de <i>A. caninum</i> .....	54
<b>TABELA 7:</b> Frequência de ocorrência dos haplótipos de ITS (640 nucleotídeos) encontrados nas cinco populações brasileiras de <i>A. caninum</i> , com os índices de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e haplotípica ( <i>h</i> ) e as composições de nucleotídeos, calculados para cada uma das população e para a espécie toda.....	59

<b>TABELA 8:</b> <i>Loci</i> caracterizados e alelos identificados na genotipagem de populações brasileiras de <i>A. caninum</i> .....	63
<b>TABELA 9:</b> Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), $F_{IS}$ , e índice Garza-Williamson (G-W) para cada <i>loci</i> utilizado nas cinco populações brasileiras de <i>A. caninum</i> .....	67
<b>TABELA 10:</b> Análises de alelos nulos na população BH.....	69
<b>TABELA 11:</b> Análises de alelos nulos na população CG.....	69
<b>TABELA 12:</b> Análises de alelos nulos na população CT.....	70
<b>TABELA 13:</b> Análises de alelos nulos na população SL.....	70
<b>TABELA 14:</b> Estimativa par a par dos valores de $R_{ST}$ (diagonal abaixo) e $F_{ST}$ (diagonal acima) entre as populações brasileiras de <i>A. caninum</i> utilizando os microssatélites de DNA.....	73
<b>TABELA 15:</b> Resultado das análises de variância molecular (AMOVA) realizadas nas populações brasileiras de <i>A. caninum</i> utilizando-se os sete <i>loci</i> de microssatélites de DNA.....	75
<b>TABELA 16:</b> Iniciadores sintetizados para amplificação genômica de Ac-ASP-2....	78
<b>TABELA 17:</b> Dados de diversidade molecular e testes de neutralidade dos éxons e íntrons sequenciados de Ac-ASP-2 nas populações brasileiras de <i>Ancylostoma caninum</i> .....	82
<b>TABELA 18:</b> Dados de diversidade molecular e testes de neutralidade dos éxons sequenciados de Ac-ASP-2 nas populações brasileiras de <i>Ancylostoma caninum</i> ...	86



**TABELA 19:** Resultado das análises de variância molecular (AMOVA) realizadas nas populações brasileiras de *A. caninum* utilizando-se os 245 nucleotídeos sequenciados do gene Ac-ASP-2.....90

## RESUMO

O *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) possui uma ampla distribuição geográfica, representando um risco para a saúde animal e humana. Além disso, representa um importante modelo de estudo para as demais espécies antropofílicas de ancilostomídeos. Presentemente, está sendo realizado um projeto para desenvolver uma vacina anti-ancilostomídeos o qual está sendo executado pelos laboratórios do *Sabin Vaccine Institute* em conjunto com a *George Washington University* / EUA e outras instituições. Considerando os grandes esforços e investimentos financeiros que estão sendo empregados na tentativa de se formular uma vacina contra ancilostomídeos, se faz necessário a implementação de projetos para estudar a variabilidade molecular e a diversidade e estrutura genética populacional destes patógenos. Este trabalho teve como objetivo investigar a estrutura genética e a variabilidade molecular de populações brasileiras de *A. caninum*, utilizando-se marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, incluindo um gene codificante de uma proteína importante para estratégias imunoproliféricas, a *Ancylostoma secreted protein*, Ac-ASP-2. Foram coletadas amostras de *A. caninum* em centros de controle de zoonoses de cinco localidades brasileiras: Belo Horizonte/MG (BH = 37 indivíduos), Campo Grande/MS (CG = 46 indivíduos), Curitiba/PR (CT = 35 indivíduos), Ribeirão Preto/SP (11 indivíduos) e São Luís/MA (42 indivíduos). Os vermes foram identificados morfológicamente e submetidos individualmente à extração de DNA. Posteriormente, avaliou-se a diversidade e estrutura genética de populações brasileiras de *A. caninum* utilizando o marcador mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI), marcadores nucleares conhecidos como espaços transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) e microssatélites de DNA. Os níveis de diversidade molecular foram intermediários e constantes nas populações brasileiras de *A. caninum*. Os resultados revelaram ainda moderada diferenciação entre as populações avaliadas. Os dados obtidos com os marcadores ribossômicos ITS-1 e ITS-2 se mostraram inadequados para o estudo de genética populacional em *A. caninum* devido ao baixo número de sítios polimórficos encontrados. Alguns fatores foram discutidos para explicar a estrutura genética observada nas populações brasileiras de *A. caninum*: (i) distância geográfica evitando o evento de panmixia entre as localidades avaliadas; (ii) fluxos gênicos

parciais entre subpopulações amostradas, incluindo a influência de movimentos recentes de hospedeiros; (iii) a presença de subpopulações distintas geneticamente melhores adaptadas à diferentes hospedeiros e/ou a presença de espécies crípticas dentro de uma mesma localização geográfica; e (iv) outros eventos genéticos (por exemplo, deriva genética) ocorrendo independentemente em cada subpopulação. Além dos estudos com os marcadores neutros, um fragmento genômico do gene Ac-ASP-2 para as mesmas amostras, foi também seqüenciado. As análises revelaram um considerável polimorfismo nucleotídico. A maior parte da variabilidade foi encontrada nos íntrons devido a menor pressão seletiva destes segmentos. As regiões codificantes também revelaram polimorfismos nucleotídicos e aminoacídicos distribuídos de forma não homogênea entre os éxons avaliados. Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão da ecologia, padrões de transmissão, desenvolvimento de resistência à drogas e desenvolvimento de vacinas contra ancilostomídeos.

## **ABSTRACT**

The hookworm *Ancylostoma caninum* has a worldwide distribution representing an animal and human health risk. Furthermore, this worm is an important biological model for anthrophilic species of hookworms. Presently a project to develop a hookworm vaccine is under way, being executed in the Sabin Vaccine Institute laboratories jointly with the George Washington University/USA and other institutions. Considering the great efforts and financial investments that have been made in the attempt of formulating a vaccine against hookworms, it makes necessary the implementation of projects to study the molecular diversity and population genetic structure of these nematodes. This work had the aim to investigate the genetic structure and the molecular diversity of Brazilian populations of *A. caninum*, using mitochondrial and nuclear markers, including a gene coding protein important to immunotherapeutic strategies, the *Ancylostoma* secreted protein, Ac-ASP-2. The *A. caninum* samples were collected from Zoonosis Control Centers (CCZ) at five different sites in Brazil: Belo Horizonte/MG (BH = 37 individuals), Campo Grande/MS (CG = 46 individuals), Curitiba/PR (CT = 35 individuals), Ribeirão Preto/SP (11 individuals) and São Luís/MA (42 individuals). These worms were morphological identified and submitted individually for extraction. The diversity and genetic structure of Brazilian populations were assessed using cytochrome C oxidase subunit 1 gene (COI), internal transcribed spacers (ITS-1 and ITS-2) and microsatellite DNA markers. Moderate levels of molecular diversity and genetic structure in Brazilian populations of *A. caninum* were observed. It was shown that the ITS markers are not ideal for population studies in hookworms due to the low number of polymorphic sites found in these sequences. We suggest some events driving the genetic structure of *A. caninum* in Brazilian populations: (i) the importance of geographic distance as a component of the moderate substructuring found; (ii) partial gene flow between the subpopulations sampled, including the influence of the human migrations in the last century in Brazil; (iii) possible cryptic speciation and/or the formation of host races; and (iv) other genetic events independently occurring in each subpopulation such as random genetic drift. Besides the studies with neutral markers, we have also sequenced and evaluated a genomic fragment of the gene Ac-ASP-2. The results revealed an extensive polymorphism at this fragment

especialmente nos íntrons, de acordo com uma baixa pressão genética presente nessas sequências. No entanto, a distribuição irregular de nucleotídeos, e aminoácidos polimorfismos, também foram encontrados na região codificante deste gene. Juntos, os resultados apresentados nesta tese contribuem para uma melhor compreensão da ecologia, padrões de transmissão, resistência a drogas e desenvolvimento de vacinas contra os helmintos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	X
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b> .....	XV
<b>RESUMO</b> .....	XVIII
<b>ABSTRACT</b> .....	XX
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. MORFOLOGIA E POSIÇÃO TAXONÔMICA DO <i>ANCYLOSTOMA CANINUM</i> .....	2
1.2. CICLO BIOLÓGICO .....	3
1.3. OCORRÊNCIA E PREVALÊNCIA .....	6
1.4. MODELO DE ESTUDO E FILOGENIA .....	8
1.5. GENES E MARCADORES MOLECULARES DE ANCILOSTOMÍDEOS.....	9
1.5.1 MARCADORES UTILIZADOS EM FILOGENIA E DIVERSIDADE MOLECULAR .....	9
1.5.2 GENES RELACIONADOS COM OS PROCESSOS HEMATOFÁGICO E PARASITÁRIO .....	15
1.6. VNTRS .....	18
1.6.1 MICROSSATÉLITES.....	18
1.7. SEQUENCIAMENTO, FILOGEOGRAFIA E DIVERSIDADE MOLECULAR DE ANTÍGENOS.....	20
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	24
3.1. OBJETIVO GERAL .....	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
4.1. POPULAÇÕES DE ESTUDO.....	27
4.2. OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS.....	27
4.3. EXTRAÇÃO DE DNA .....	29
4.4. MARCADORES MITOCONDRIAIS E NUCLEARES.....	30
4.4.1 AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS MARCADORES COI E ITSS .....	30

4.4.2 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS <i>LOCI</i> DE MICROSSATÉLITES DE DNA DE <i>A. CANINUM</i> , SÍNTESE DE INICIADORES, <i>NESTED</i> PCR E GENOTIPAGEM.....	32
4.4.3 AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE AC-ASP-2.....	32
4.5. ANÁLISE DOS DADOS.....	41
4.5.1. SEQÜÊNCIAS DE DNA .....	41
4.5.2. GENOTIPAGEM.....	42
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
5.1. OBTENÇÃO DOS VERMES E EXTRAÇÃO DE DNA .....	45
5.2. CITOCROMO C OXIDASE SUBUNIDADE 1 (COI).....	46
5.2.1. AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO .....	46
5.2.2. SEQUENCIAMENTO E PRODUÇÃO DOS CONSENSOS.....	47
5.2.3. DIVERSIDADE GENÉTICA.....	47
5.2.4. ESTRUTURA GENÉTICA E GEOGRÁFICA .....	52
5.3. ESPAÇOS TRANSCRITOS INTERNOS (ITSS) .....	55
5.3.1. AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO .....	55
5.3.2. SEQUENCIAMENTO E PRODUÇÃO DOS CONSENSOS.....	57
5.3.3. DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA.....	58
5.4. MICROSSATÉLITES DE DNA.....	61
5.4.1. IDENTIFICAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE <i>LOCI</i> DE MICROSSATÉLITES.....	61
5.4.2. GENOTIPAGEM E ANÁLISE DOS DADOS .....	62
5.5. ACASP-2.....	76
5.5.1. INICIADORES, PCR E ARQUITETURA GENÔMICA IDENTIFICADA .....	76
5.5.2. DIVERSIDADE GENÉTICA E AMINOACÍDICA.....	80
5.5.3. ESTRUTURA POPULACIONAL .....	89
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>101</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>103</b>
<b>9. APÊNDICE 1 .....</b>	<b>119</b>
<b>10. APÊNDICE 2 .....</b>	<b>144</b>

<b>11. APÊNDICE 3.....</b>	<b>152</b>
<b>12. APÊNDICE 4.....</b>	<b>177</b>



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

**1 – INTRODUÇÃO**

## 1.1. Morfologia e taxonomia do *Ancylostoma caninum*

A espécie *Ancylostoma caninum* (ERCOLANI, 1859) é um parasito que possui a seguinte classificação zoológica: Eukaryota; Metazoa; Nematoda; Chromadorea; Rhabditida; Strongylida; Ancylostomatoidea; Ancylostomatidae; Ancylostomatinae; Ancylostoma. Caracterizam-se morfologicamente por apresentarem uma cápsula bucal bem desenvolvida, armada com dentes ou lâminas quitinosas cortantes em sua margem ventral. Os integrantes da família Ancylostomatidae (ou Ancylostomidae) apresentam um nítido dimorfismo sexual, sendo os machos possuidores de uma bolsa copuladora bem desenvolvida na região posterior. Diversas espécies parasitam o intestino delgado, alimentando-se de sangue de seu hospedeiro. Dentre as subfamílias existentes, destacam-se duas de interesse para a parasitologia médica e/ou veterinária: *Ancylostomatinae* e *Bunostomatinae*. Os indivíduos pertencentes à subfamília *Ancylostomatinae* caracterizam-se por apresentarem, na margem da cápsula bucal, um a quatro pares de dentes quitinosos, destacando-se os gêneros *Ancylostoma* e *Agriostomum*. Na subfamília *Bunostomatinae*, além de outras características diferenciais, ocorre a substituição dos dentes por lâminas cortantes. São integrantes desta subfamília os gêneros *Necator*, *Bunostomum* e *Uncinaria*.

Dentre as espécies de interesse em medicina humana e/ou veterinária, podemos citar os seguintes parasitos: *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859), *Ancylostoma braziliense* (Faria, 1909), *Ancylostoma duodenale* (Dubini, 1943), *Ancylostoma ceylanicum* (Loos, 1911), *Ancylostoma tubaeforme* (Zeder, 1800), *Necator americanus* (Stiles, 1902) e *Uncinaria stenocephala* (Railliet, 1884).

O *Ancylostoma caninum* possui três pares de dentes na margem ventral da cápsula bucal. No fundo desta estrutura há um par de dentes triangulares dorsais e um par de dentes ventro-laterais. As fêmeas apresentam a abertura do aparelho genital localizada próxima à interface do segundo com o terceiro terço do corpo e os ovários encontram-se dispostos enrolados em torno do tubo digestivo. Os ovos medem 55 – 72,5µm de comprimento por 34 – 44,7µm de largura. Estes são eliminados com um embrião contendo oito células. Os machos possuem gubernáculo e as espículas variam de 0,73 a 0,96mm (BURROWS, 1962).

O QUADRO 1 apresenta os principais parasitos do gênero *Ancylostoma* com suas características morfológicas, morfométricas, e hospedeiros definitivos.

**QUADRO 1:** Principais espécies de parasitos do gênero *Ancylostoma*: hospedeiros definitivos, características morfológicas e morfométricas.

Espécie	Comprimento (mm)		Número de dentes na cavidade bucal	Hospedeiros
	Macho	Fêmea		
<i>A. caninum</i>	11 - 13	14 – 20	6 grandes	canídeos, felídeos
<i>A. duodenale</i>	8 - 11	10 – 18	4 grandes e 2 pequenos	humanos
<i>A. braziliense</i>	5 - 7,5	6,5 – 9	2 grandes e 2 pequenos	canídeos, felídeos
<i>A. ceylanicum</i>	5 - 7,5	6,5 – 9	2 grandes e 2 pequenos	canídeos, felídeos, humanos
<i>A. tubaeforme</i>	9,5 - 11	12 – 15	6 grandes	felídeos

(adaptado de CURY & LIMA, 2002)

## 1.2. Ciclo biológico

Os vermes adultos localizam-se principalmente no intestino delgado dos hospedeiros definitivos fixados à mucosa intestinal por meio de suas cápsulas bucais. As fêmeas, após a cópula, realizam a oviposição de milhares de ovos por dia, os quais são liberados para o meio exterior juntamente com as fezes dos hospedeiros. Estes ovos, encontrando condições favoráveis para o desenvolvimento, como oxigenação, umidade e temperatura adequadas, originam, num período de 24 a 48 horas, uma larva rabditóide de primeiro estágio conhecida como larva L1. Esta larva eclode do ovo e em contato direto com o meio ambiente alimenta-se de matéria orgânica e microrganismos para uma posterior transformação em dois estádios larvais: larva L2 (rabditóide) e larva L3 (filarióide e infectante). A larva filarióide não se alimenta mais, entretanto, possui uma resistência muito maior que as demais formas, sendo capaz de sobreviver no ambiente por até 49 dias (MARK, 1975).

1 Os hospedeiros definitivos podem se infectar por diversas vias: oral,  
2 percutânea, transplacentária e lactogênica. O modo de infecção mais comum é por  
3 via oral, passivamente. Ao serem ingeridas, as larvas L3 passam pelo estômago e  
4 perdem a cutícula externa pela ação do suco gástrico. Após, aproximadamente, três  
5 dias de infecção, migram para o intestino delgado e penetram nas células de  
6 Lieberkühn onde ocorre a muda para a larva L4. Posteriormente, estas voltam a luz  
7 do intestino, transformam-se em adultos jovens, fixando-se à mucosa intestinal por  
8 meio de suas cápsulas bucais para realizar a hematofagia e a cópula. Após 14 a 21  
9 dias de infecção os ovos podem ser encontrados nas fezes de seus hospedeiros.

10 A larva infectante L3 pode infectar seus hospedeiros ativamente pelo contato  
11 e penetração via folículos pilosos e, eventualmente, atingir os capilares sangüíneos  
12 e/ou linfáticos. Essa larva recomeça a alimentação e retoma o crescimento quando é  
13 exposta ao plasma (HAWDON & SHAD, 1990). Após atingir a circulação sangüínea  
14 é carregada passivamente para a microcirculação pulmonar e, posteriormente, segue  
15 uma rota conhecida como “clássica”, onde as larvas L3 penetram pelos alvéolos  
16 pulmonares passam pelo sistema respiratório (migração traqueal) e chegam ao  
17 intestino delgado, onde ocorre a implantação dos vermes adultos. Alternativamente,  
18 estas larvas podem atingir a circulação sistêmica e se dispersarem pelos tecidos  
19 (migração somática), ficando instaladas em fibras musculares esqueléticas como  
20 larvas L3 hipobióticas, ou seja, dormentes (CURY & LIMA, 2002).

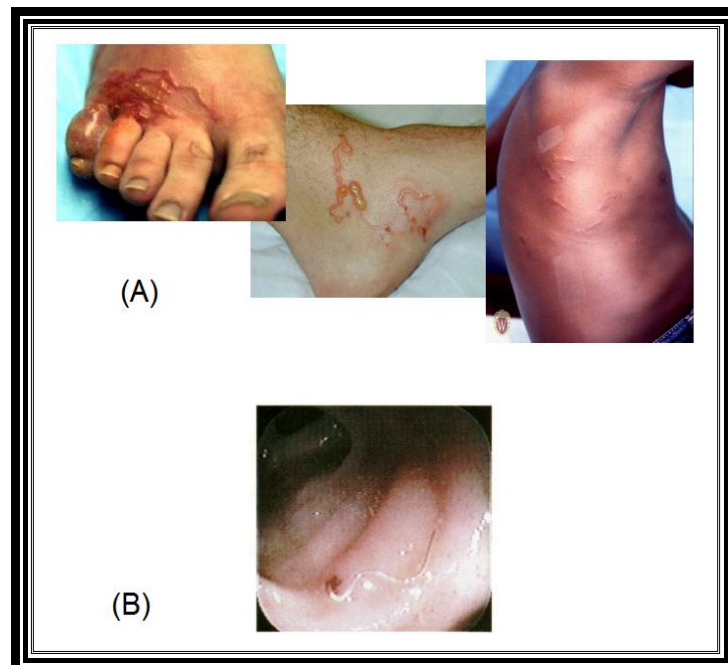
21 As larvas hipobióticas podem ser reativadas para o desenvolvimento,  
22 provavelmente por estímulos endógenos e/ou exógenos, levando à formação de  
23 vermes adultos no intestino, possivelmente quando as condições ambientais são  
24 favoráveis, como por exemplo, em períodos de maior umidade e calor. Além disso,  
25 estas larvas podem promover infecções transplacentárias e transmamarianas as  
26 quais são influenciadas por mudanças hormonais durante o parto, assumindo  
27 uma importância epidemiológica muito elevada, sobretudo em infecções de cães  
28 com menos de seis meses de idade (KALKOFEN, 1987; OLIVEIRA-SIQUEIRA et al.,  
29 2002).

30 Os vermes adultos ao se fixarem ao intestino podem provocar diversas  
31 patologias, destacando-se anemia, hemorragias e lesões intestinais. Fenômenos  
32 patológicos podem ocorrer tanto em hospedeiros definitivos quanto em seres  
33 humanos (PROCIV & CROESE, 1990).

1 Em cães, pode-se observar patologias relacionadas com a penetração ativa  
2 de larvas L3 através da pele, pulmões e músculos. Dessa forma, ocorre no local da  
3 penetração uma ação traumática e irritativa, levando a um processo inflamatório. As  
4 larvas de 3º estágio, ao penetrarem na pele, produzem lesões pruriginosas. As  
5 larvas de 4º estágio, no pulmão, e os adultos, no intestino, causam pneumonite  
6 hemorrágica e lesão de mucosa, respectivamente. Podem ocorrer lesões ulcerativas  
7 na mucosa intestinal, devido à fixação dos vermes adultos neste local (CURY &  
8 LIMA, 2002). A patogenia mais importante é a anemia decorrente do espólio  
9 sangüíneo durante a hematofagia dos vermes, provocando simultaneamente um  
10 quadro de hipoproteïnemia.

11 Além de sua importância em saúde animal este parasito tem se destacado  
12 como agente causador de zoonoses, com diversos relatos de larva migrans cutânea  
13 (LIMA et al., 1984; NUNES et al., 2000), caracterizada por dermatites que podem  
14 desencadear infecções bacterianas secundárias, além de estar envolvido como  
15 agente causador de enterites eosinofílicas na Austrália (PROCIV & CROESE, 1990;  
16 CROESE et al., 1994; PROCIV & CROESE, 1996), como ilustrado na FIGURA 1.

17

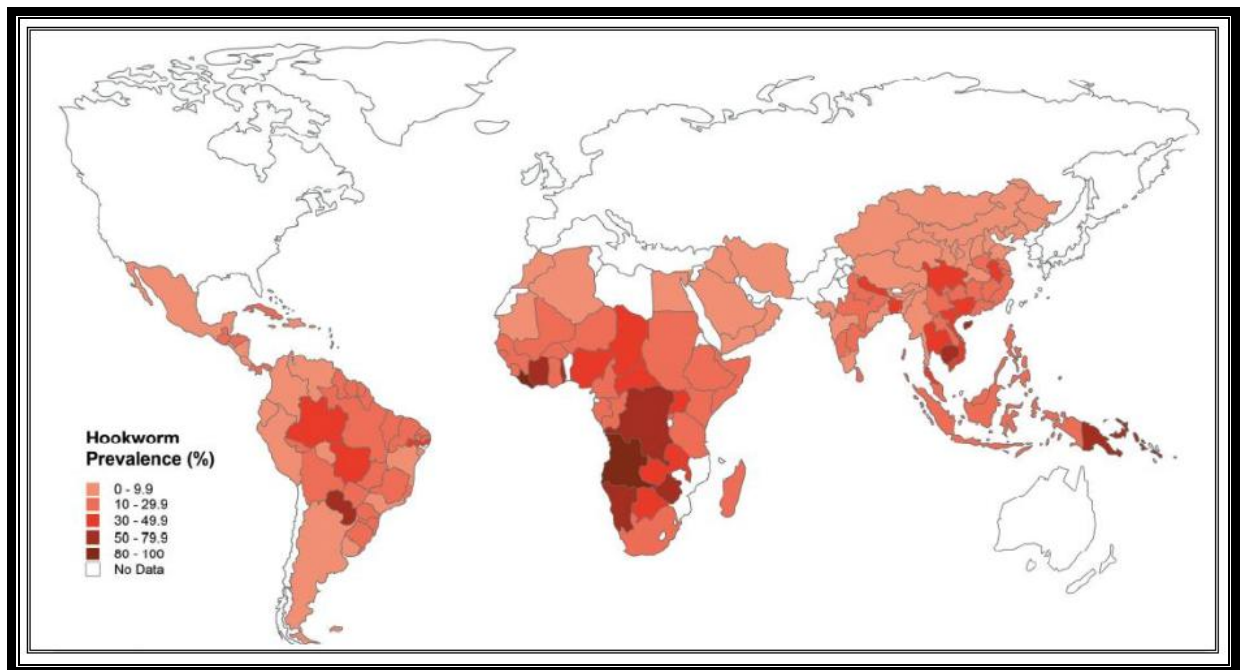


18

19 **FIGURA 1:** Patologias ocasionadas pelo agente zoonótico *Ancylostoma caninum* em  
20 humanos. Em (A) são apresentados alguns casos clínicos de larva migrans cutânea  
21 e em (B) a infecção de um verme adulto no intestino delgado responsável por  
22 enterites eosinofílicas na Austrália.

### 1.3. Ocorrência e prevalência

Ancilostomídeos são nematódeos hematófagos que infectam aproximadamente entre 546 e 740 milhões de pessoas em diferentes regiões tropicais e subtropicais do globo, acarretando diversos problemas para a saúde como anemia, retardo mental e deficiência cognitiva em crianças (DE SILVA et al., 2003). A FIGURA 2 ilustra a distribuição destes helmintos.



(HOTEZ et al., 2005)

**FIGURA 2:** Distribuição mundial das infecções humanas de ancilostomídeos.

O *A. caninum* é um parasito de distribuição mundial, encontrado nos cinco continentes. Há diversos estudos que tentam estimar a prevalência ou mesmo relatar a presença deste helminto não somente em animais domésticos como também em animais silvestres.

Em um trabalho realizado na capital do Kênia, Nairobi, foram necropsiados 156 cães dentre os quais 88% estavam infectados por *A. caninum* (WACHIRA et al., 1993). A mesma prevalência de cães infectados com este helminto foi relatada na

1 província de Gauteng, África do Sul, a partir da necropsia de 69 cães (MINNAAR et  
2 al., 2001). No norte do Uruguai a prevalência deste parasito em cães vadios foi  
3 ainda maior, chegando a 96,3 % (MALGOR et al., 1996).

4 Além do parasitismo de animais domésticos o *A. caninum* infecta também  
5 animais silvestres como lobos, *Canis lupus* (SEGOVIA et al., 2001; GUBERTI et al.,  
6 1993) e coiotes, *Canis latrans* (VAN DEN BUSSCHE et al., 1987; RADOMSKI &  
7 PENCE, 1993).

8 GORDON & YOUNG (1922), em um estudo no estado do Amazonas,  
9 encontraram 100% dos cães infectados com este helminto. Desde então, diversos  
10 estudos têm sido realizados para estimar a prevalência do *A. caninum* em vários  
11 estados brasileiros, encontrando-se geralmente, uma porcentagem elevada de  
12 animais infectados (ZAGO FILHO & BARRETO, 1957; COSTA et al., 1986; FARIAS  
13 et al., 1995).

14 Os cães são susceptíveis às infecções com ancilostomídeos por toda a vida,  
15 entretanto, a prevalência e o nível de infecção tendem a ser maiores em animais  
16 mais jovens devido, principalmente, a imaturidade de seu sistema imunológico e às  
17 infecções lactogênicas (KALKOFEN, 1987).

18 OLIVEIRA-SIQUEIRA et al. (2002) sugerem que o período sazonal e o sexo  
19 dos animais interferem na dinâmica da prevalência de *Ancylostoma spp.* em cães no  
20 Estado de São Paulo, sendo mais freqüente a infecção em animais adultos do sexo  
21 masculino durante o verão e o outono.

22 A prevalência e intensidade das infecções variam consideravelmente com  
23 relação aos fatores regionais e locais, podendo ser influenciada pelo clima,  
24 composição do solo, educação e condição socioeconômica (MABASO, et al., 2003;  
25 SINUON et al., 2003; TOMONO et al., 2003; UTZINGER et al., 2003; VAN DER  
26 HOEK et al., 2003; TRAUB et al., 2004).

27

#### 1 1.4 Modelo de estudo e filogenia

2  
3 O *A. caninum*, apesar de apresentar uma importância secundária na  
4 epidemiologia das ancilostomoses humanas com os casos de enterites eosinofílicas  
5 e larva migrans cutânea, representa um importante modelo biológico para as  
6 espécies antropofílicas, uma vez que as principais espécies que infectam humanos  
7 são de difícil obtenção e manutenção em laboratório (FUJIWARA et al., 2006). Em  
8 decorrência destas limitações, o *A. caninum* representa uma alternativa de estudo  
9 para as principais espécies de importância para a parasitologia humana, além de  
10 sua incontestável relevância para a parasitologia veterinária.

11 Diante da possibilidade de um organismo ser considerado um modelo de  
12 estudo para outras espécies é de fundamental importância uma proximidade  
13 filogenética entre os organismos estudados. Sabe-se que apesar de haver uma  
14 diferença biológica e morfológica entre os organismos que compõem a Ordem  
15 Strongilida, dentro da qual está inserida a família Ancilostomidae, é relativamente  
16 baixa a diversidade genética encontrada neste táxon (BLAXTER et al., 1998;  
17 DORRIS et al., 1999). Análises filogenéticas moleculares sugerem que as espécies  
18 que compõem a ordem Strongilida resultaram de uma radiação recente,  
19 possivelmente ocupando um nicho ausente com a radiação dos mamíferos  
20 terrestres, ou provavelmente por meio de uma linhagem antiga na qual a evolução  
21 molecular têm sido lenta, ou ainda, a combinação destas duas hipóteses (DORRIS  
22 et al., 1999). Entretanto, a ausência de fósseis limita a confirmação destas  
23 hipóteses.

24 Existem poucos trabalhos utilizando caracteres moleculares para o estudo da  
25 sistemática da família *Ancilostomidae* (BLAXTER et al., 1998; BLAXTER, 2000; HU  
26 et al., 2004), e estes, podem ser considerados como resultados preliminares,  
27 entretanto alguns aspectos filogenéticos estão relativamente bem consolidados.  
28 Primeiramente, como os dados morfológicos sugeriam, os gêneros *Necator* e  
29 *Ancylostoma* estão alocados em dois grupos separados porém geneticamente  
30 similares avaliando-se marcadores nucleares (ITS-1 e ITS-2) e mitocondrial (COI)  
31 (BLAXTER et al., 2000; HU et al., 2004), subfamílias Bunostominae e  
32 Ancylostominae, respectivamente. Entretanto, as análises do segundo espaço  
33 interno transcrito (ITS-2) do rDNA, apresentaram uma incerteza quanto à existência



1 de um ramo monofilético entre *Bunostomum* e *Necator* (BLAXTER et al., 2000).  
2 Dessa forma, para uma melhor compreensão de diversos aspectos filogenéticos dos  
3 ancilostomídeos, torna-se evidente a necessidade de outros estudos.

4 Diante da incontestável proximidade filogenética entre *A. caninum* e as  
5 demais espécies de ancilostomídeos antropofílicos, sugerida tanto por marcadores  
6 moleculares mitocondriais quanto nucleares (BLAXTER, 2000; HU et al., 2004),  
7 admite-se a possibilidade de estudos comparativos entre estas espécies. Assim,  
8 diante da grande importância que estas espécies representam para saúde animal e  
9 humana, reunir informações moleculares sobre um determinado ancilostomídeo  
10 pode ser importante também para conhecer e traçar futuras estratégias de controle  
11 para as demais espécies relacionadas.

## 13 **1.5 Genes e marcadores moleculares de ancilostomídeos**

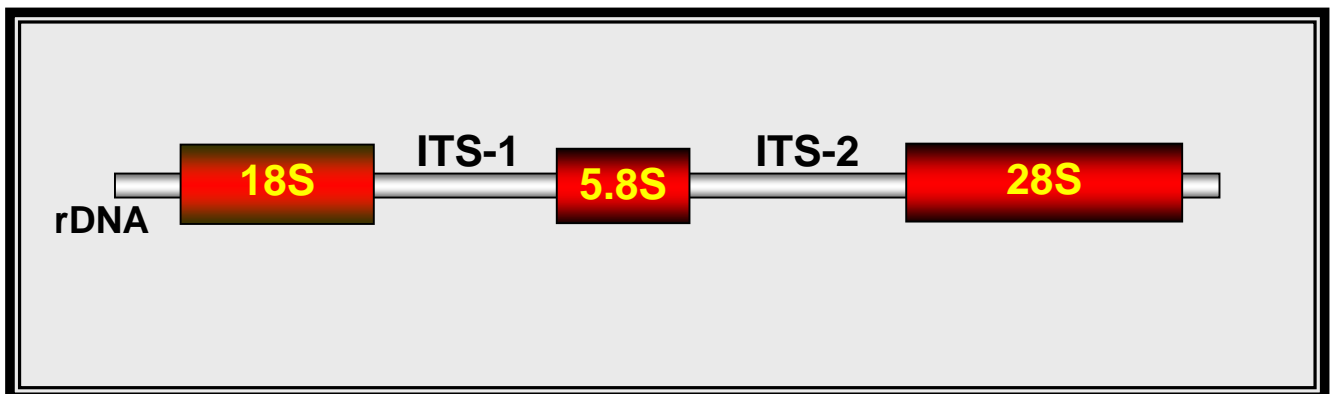
14  
15 Existem relativamente poucos genes e marcadores moleculares  
16 caracterizados em ancilostomídeos. Estes podem ser agrupados em três categorias  
17 principais: (1) genes mitocondriais e marcadores ribossômicos utilizados em estudos  
18 de filogenia e diversidade genética, (2) genes relacionados com os processos  
19 hematofágico e parasitário como genes codificadores de proteases, anticoagulantes  
20 e uma classe de proteína conhecida como ASPs (*Ancylostoma secreted protein*) e  
21 (3) uma terceira classe que englobaria todos os demais genes que não pertencem  
22 as duas primeiras como, por exemplo, o gene da beta-tubulina e da calreticulina  
23 (BLAXTER, 2000).

### 25 **1.5.1 Marcadores utilizados em filogenia e diversidade molecular**

26  
27 Como já citado no item 1.4, dados moleculares podem fornecer informações  
28 importantes para a reconstrução da filogenia e avaliação da diversidade inter e  
29 intraespecífica. Os principais marcadores moleculares atualmente disponíveis em  
30 bancos de dados de seqüências (GenBank) para estudo de filogenia e diversidade  
31 molecular entre os ancilostomídeos são os marcadores ribossômicos e mitocondriais.  
32 Uma outra classe de marcadores de grande importância para estudos de  
33 variabilidade genética seria os VNTRs (*variable number of tandem repeats*), ainda

1 pouco explorados nos genomas de ancilostomídeos. Em um outro tópico mais  
2 adiante (1.6.1), algumas considerações importantes sobre estes marcadores  
3 moleculares serão realizadas.

4 O rDNA nuclear de eucariotos é composto por uma grande família gênica de  
5 seqüências repetitivas (com centenas de repetições concatenadas), geralmente  
6 concentradas em um cromossomo específico de um organismo. O rDNA é  
7 caracterizado por sofrer um processo evolutivo não independente das seqüências  
8 repetitivas, resultando em uma grande similaridade entre as unidades que o  
9 compõem, exibindo padrões de evolução em concerto. Cada unidade repetitiva é  
10 composta pelos genes codificadores ribossomais 18S, 5.8S e 28S, intercalados por  
11 dois espaçadores, conhecidos como ITS-1 e ITS-2 (ELDER & TURNER, 1995). A  
12 FIGURA 3 apresenta um desenho esquemático ilustrando a unidade repetitiva do  
13 rDNA de eucariotos.



14  
15 **FIGURA 3:** Esquema representativo da unidade repetitiva do rDNA de eucariotos

16  
17  
18 Em ancilostomídeos, o primeiro e segundo espaço interno transcrito (ITS-1 e  
19 ITS-2) do rDNA são utilizados como marcadores moleculares em diversas situações.  
20 Podem ser úteis para avaliar a existência de espécies crípticas (morfologicamente  
21 similares, mas geneticamente distintas) (ROMSTAD et al., 1998) e a diversidade  
22 molecular interespecífica (BLAXTER, 2000), além de contribuir para a identificação  
23 de diversas espécies, devido à baixa variabilidade intraespecífica, constituindo-se  
24 em ferramentas moleculares para diagnóstico (GASSER et al., 1996; GASSER et al.,  
25 1998).

1 Entretanto, se o objetivo de um estudo for avaliar a variabilidade molecular  
2 intraespecífica de ancilostomídeos a utilização outros marcadores como VNTRs ou  
3 marcadores mitocondriais seria mais adequado. Sequências mitocondriais, por  
4 exemplo, acumulam substituições com uma taxa muito maior que os ITSs (BLOUIN,  
5 2002), adequando-se melhor a este propósito, embora algumas espécies  
6 apresentem polimorfismos úteis para estudos de variabilidade intraespecífica na  
7 região ITS (BELL et al., 2001).

8 Genomas mitocondriais possuem importantes implicações para diversas  
9 áreas básicas como bioquímica e fisiologia, além de fornecerem importantes  
10 marcadores para a genética de população e estudos de sistemática. Marcadores  
11 mitocondriais são considerados de grande importância para estudos de variabilidade  
12 intraespecífica devido ao seu alto grau de mutações e à sua herança materna  
13 (ANDERSON et al., 1998; AVISE et al., 1987; AVISE, 1991; BLOUIN, 1998;  
14 BLOUIN, 2002).

15 O primeiro genoma mitocondrial de um nematódeo parasito completamente  
16 seqüenciado foi o do *Ascaris suum* (OKIMOTO et al., 1992). A TABELA 1 apresenta  
17 um resumo sobre o atual conhecimento dos genomas mitocondriais de nematódeos.

18 O genoma mitocondrial dos ancilostomídeos é de aproximadamente 13-14  
19 Kb, sendo composto por 12 genes codificadores de proteínas relacionadas com o  
20 processo de fosforilação oxidativa (atp6, cob, cox1-3, nad1-6 e 4L), dois genes  
21 ribossomais (rrnS e rrnL), 22 genes de RNA transportador e uma região não  
22 codificadora AT (responsável pelo controle da transcrição dos genes) (FIG. 4).  
23 Vários destes marcadores mitocondriais vem sendo usados para investigar a  
24 estrutura genética populacional de espécies de nematódeos (BLOUIN et al., 1995;  
25 HAWDON et al., 2001; LEIGNEL & HUMBERT, 2001). Dentre os principais  
26 marcadores utilizados para esta finalidade destacam-se os genes COI (citocromo C  
27 oxidase subunidade 1) e o NAD4 (NADH desidrogenase mitochondrial subunidade  
28 4) (BLOUIN et al., 1995; HAWDON et al., 2001).

29 A genética de populações “procura entender as relações genéticas dentro e  
30 entre populações de uma espécie e os processos que geram estes padrões”  
31 (VINEY, 1998). Desta forma, considerando que os ancilostomídeos proporcionam  
32 significativo impacto sobre a saúde de animais e humanos, deve-se considerar a  
33 valiosa capacidade de informação do genoma mitocondrial para a genética de

1 população destes parasitos, criando subsídios científicos para melhor compreensão  
2 de sua ecologia, padrões de transmissão, resistência à drogas e desenvolvimento de  
3 vacinas, contribuindo para traçar futuras estratégias de controle contra estas  
4 parasitoses.

5

6

7

8

1 **TABELA 1:** Espécies de nematódeos parasitos com o genoma mitocondrial  
 2 completo, quase completo e parcialmente conhecido.

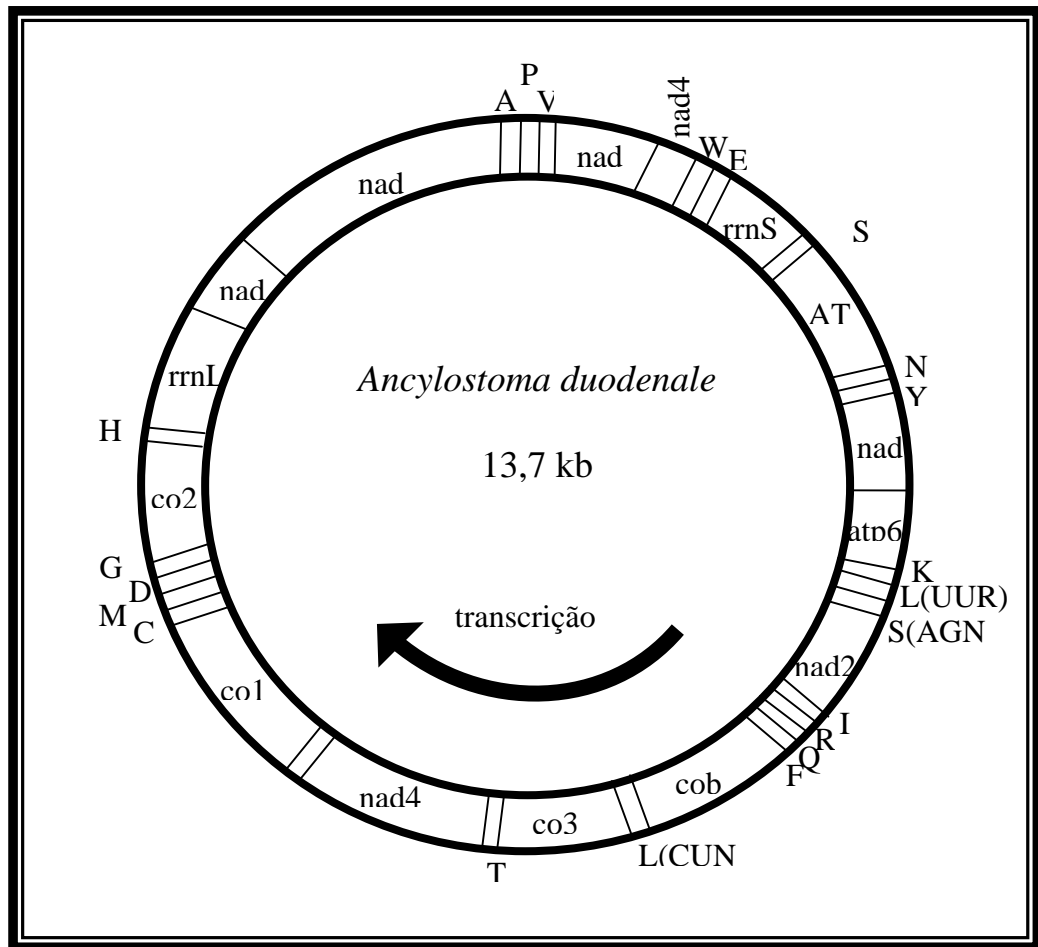
Ordem	Espécie	Seqüência	Tamanho (Kb)	Nº de acesso GeneBank
Ascaridida	<i>Ascaris sum</i>	completo	14.3	X54253
Strongylida	<i>Ancylostoma duodenale</i>	completo	13.7	AJ417718
	<i>Necator americanus</i>	completo	13.6	AJ417719
	<i>Onchocerca volvulus</i>	completo	13.7	AF015193
Spirurida	<i>Brugia malayi</i>	completo	13.7	AF538716
Rhabditida	<i>Dirofilaria immitis</i>	completo	13.8	AJ537512
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	completo	13.8	X54252
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	completo	13.8	AJ558163
Tylenchida	<i>Meloidogyne javanica</i>	parcial	~ 21	X57625
	<i>Globodera pallida</i>	multipartial	~ 6.3 – 9.5	AJ249395
Stichosomida	<i>Romanomermis culicivorax</i>	Parcial	~ 26	L08174
Enoplida	<i>Trichinella spiralis</i>	quase completo	~ 21 – 24	AF293969

(adaptado de HU et al., 2004)

3

4

1



(modificado de Hu et al., 2004)

7 **FIGURA 4:** Representação esquemática do genoma mitocondrial do *Ancylostoma*  
 8 *duodenale*, exemplificando a organização dos 12 genes codificadores de proteínas  
 9 (atp6, cob, co1-3, nad1-6 e 4L), dois genes ribossomais (rrnS e rrnL), 22 RNAs  
 10 transportadores (representado pelas diferentes letras), uma região não codificadora  
 11 (AT) e o sentido da transcrição monocistrônica.

12

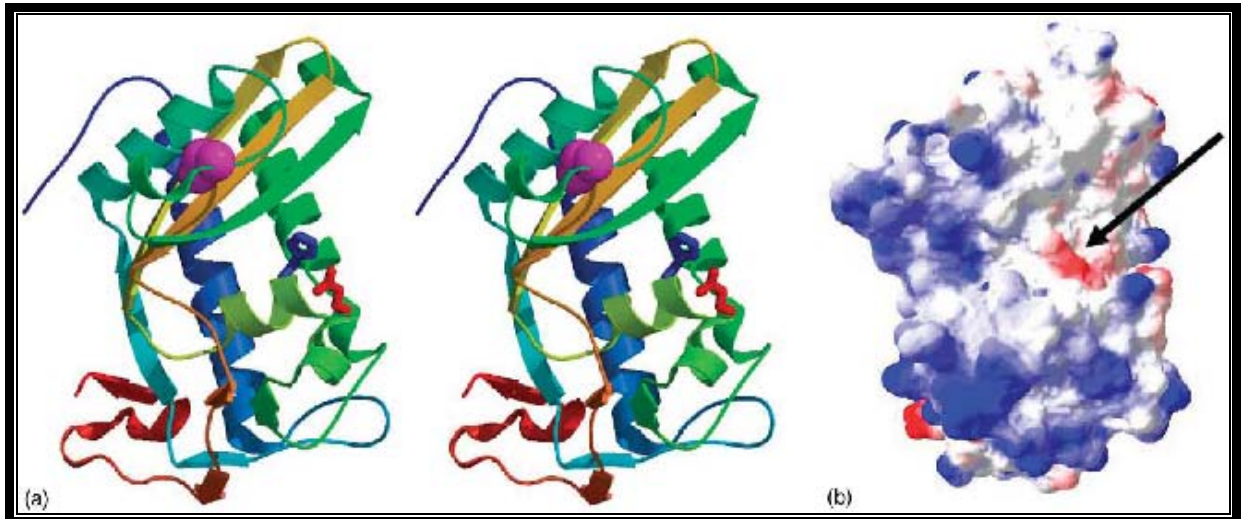
13

## 1.5.2 Genes relacionados com os processos hematofágico e parasitário

Durante a invasão de seus hospedeiros, as larvas L3 dos parasitos nematódeos encontram sinais fisicoquímicos que iniciam uma reação programada de eventos resultando no estabelecimento da relação parasitária (HAWDON et al., 1999). Dentre estes eventos podemos mencionar a liberação da cutícula que envolve a larva de terceiro estágio, a expressão de genes codificadores de proteínas necessárias para o desenvolvimento do parasito e a liberação de produtos ES (*excretory/secretory products*). Além disso, parasitos hematófagos empregam uma bateria de enzimas proteolíticas para a digestão de seus conteúdos alimentares. A hemoglobina de seus hospedeiros é o principal substrato para essas proteases, direcionando a evolução das moléculas proteolíticas parasitárias (WILLIAMSON et al., 2003).

Produtos de excreção/secreção (ES) larvais tem sido foco de interesse de vários pesquisadores, principalmente após a descoberta da família protéica conhecida como ASP (*Ancylostoma secreted-protein*), relacionada filogeneticamente à uma gama de proteínas de origem animal e vegetal, incluindo venenos alergênicos de Hymenoptera e proteínas epididimais e testiculares de mamíferos (HENRIKSEN, et al., 2001), além de possuírem proteínas homólogas em outras espécies de nematódeos como *Caenorhabditis elegans*, *Haemonchus contortus*, *Dirofilaria immitis* (GASSER & NEWTON, 2000) e outros. Estas ASPs larvais são compostas principalmente pelas proteínas Ac-ASP-1 (HAWDON et al., 1996) e Ac-ASP-2 (HOWDON et al., 1999). A primeira é uma proteína de 45 KDa que apresenta dois domínios ricos em resíduos de cisteína, conhecidos como PRP (*pathogenesis related protein*) e a segunda é uma proteína de 22kDa com apenas um domínio PRP. A FIGURA 5 ilustra a estrutura tridimensional da proteína ASP-2 de *Necator americanus*.

Outras proteases já foram descritas em produtos ES larvais de *A. caninum* como uma metaloprotease dependente de zinco (Ac-MTP-1) de 62 KDa (ZHAN et al., 2002) semelhante às proteínas astacinas de um peixe (*Astacus astacus*). Estudos avaliando a possibilidade da Ac-MTP-1 compor uma vacina anti-ancilostomídeos vem sendo realizados pelo grupo do Dr. Peter Hotez em Washington-DC/EUA.



Adaptado de Asojo et al., 2005

**FIGURA 5:** (a) Diagrama tridimensional em fita da proteínas Na-ASP-2 colorida de azul (N terminal) a vermelho (C terminal). A Na-ASP-2 é formada por várias camadas polipeptídicas ( $\alpha\beta\alpha$ ), consistindo-se de uma camada intermediária de três folhas  $\beta$  antiparalelas flanqueadas por uma camada única de  $\alpha$  hélice e duas camadas paralelas de  $\alpha$  hélice. Ser70 (rosa) é incapaz de interagir com His129 (azul) e Glu106 (vermelho) para formar a provável triade catalítica. (b) Distribuição de cargas na superfície da Na-ASP-2 apresentando a provável cavidade de ligação carregada negativamente (seta). (a) e (b) estão na mesma orientação.

O complexo H-gal-GP do canal alimentar do nematódeo *H. contortus* é composto por inúmeras proteínas como metaloendopeptidases da família neprilisina, de proteases aspárticas, de cisteíno proteases, de cistatina, de um ortólogo de trombospondina e de galectina (KNOX, 2000). Muitas dessas proteínas já demonstraram ter a capacidade de conferir altos níveis de proteção contra *H. contortus* em ovinos (KNOX, 2000; KNOX & SMITH, 2001). É interessante ressaltar que muitos ortólogos dessas proteínas em ancilostomídeos já foram clonados e caracterizados e vem sendo testados para comporem uma vacina. Incluem-se nesta lista a *A. caninum*-metalopectidase-1 (Ac-MEP-1) (JONES & HOTEZ, 2001), *A. caninum*-cisteíno proteases (Ac-CP-1 e Ac-CP-2) (HARROP et al., 1995; LOUKAS et al., 2000) e *A. caninum*- proteases aspárticas (Ac-APR-1 e Ac-APR-2) (HARROP et al., 1996; WILLIAMSON et al., 2002; WILLIAMSON et al., 2003). Estudos de



1 imunolocalização foram realizados tanto com estas proteínas quanto com as  
2 proteínas ortólogas de *H. contortus*, onde foi confirmada a expressão dessas  
3 proteínas nas células do canal alimentar de vermes adultos de *A. caninum*. Acredita-  
4 se que estas proteases possam atuar no processo de degradação da hemoglobina  
5 durante a hematofagia (BRINKWORTH et al., 2000; BRINKWORTH et al., 2001)

6 Entre os diversos grupos de moléculas produzidas por ancilostomídeos vários  
7 desencadeiam respostas imunológicas. Dentre estas podemos mencionar: o fator  
8 inibidor de neutrófilos, lectinas tipo-c, inibidores de proteases, antioxidantes,  
9 acetilcolinesterase, proteínas de ancilostomídeos com domínios de seis-cisteínas e  
10 calcirreticulinas. Entretanto, proteínas anticoagulantes têm-se destacado como alvo  
11 de interesse de pesquisadores, tanto por se constituírem em alvos para a criação de  
12 vacinas contra ancilostomídeos, bem como para o desenvolvimento de terapias  
13 antitrombônicas em medicina humana e veterinária (LOUKAS & PROCIV, 2001).  
14 Vermes adultos de *A. caninum* expressam um grande repertório de peptídeos  
15 anticoagulantes que, interferem nos mecanismos moleculares da cascata de  
16 coagulação sanguínea dos hospedeiros facilitando a hematofagia. Com a utilização  
17 de técnicas de clonagem molecular, foi descrita uma família de pequenos peptídeos  
18 secretados por vermes adultos, conhecidos como AcAPs (*A. caninum anticoagulant*  
19 *protein*). Estes peptídeos apresentam uma estrutura molecular diferente dos  
20 peptídeos anticoagulantes encontrados em outros parasitos hematófagos ou  
21 hospedeiros mamíferos, e são potentes inibidores do fator de coagulação Xa  
22 (STASSENS et al., 1996).

23 O arsenal protéico sintetizado tanto por larvas e/ou vermes adultos de  
24 ancilostomídeos vem sendo intensamente estudado na tentativa de se estabelecer  
25 uma vacina contra ancilostomídeos, uma vez que muitas destas proteínas possuem  
26 a capacidade de conferir proteção (LOUKAS et al., 2006). Entretanto, existem alguns  
27 aspectos que necessitam ser resolvidos ou mesmo ainda conhecidos, tais como:  
28 otimizar a produção de proteínas recombinantes sem a perda de atividade biológica  
29 e com um menor custo; testar e procurar por adjuvantes alternativos para  
30 potencializar uma resposta imunológica mais protetora; conhecer o polimorfismo dos  
31 diversos candidatos à comporem uma vacina contra ancilostomídeos em diferentes  
32 regiões do mundo e muitos outros aspectos. Um exemplo de estudo de variabilidade  
33 molecular em proteínas candidatas a vacina contra ancilostomídeos é o trabalho de

1 QIANG et al. (2000) avaliando o polimorfismo da proteína ASP-1 de amostras norte-  
2 americana e chinesa de *A. caninum*.

## 3 4 **1.6 VNTRs**

5  
6 Os VNTRs, número variável de repetições concatenadas (*Variable Number*  
7 *Tandem Repeats*), são compostos por duas classes: minissatélites e microsatélites.

8 Os minissatélites são uma classe de VNTRs com repetições concatenadas  
9 que apresentam polimorfismos originados basicamente de duas maneiras: *crossing*  
10 *over* desigual ou conversão gênica (JEFFREYS et al., 1999). Sinteticamente, a  
11 análise por minissatélites envolve a digestão do DNA total com enzimas de restrição  
12 e hibridizações com sondas para a geração de um “código de barras” (impressão  
13 digital de DNA) e realização das análises. Apesar do seu alto grau polimórfico e do  
14 seu grande sucesso em medicina forense e testes de paternidade, minissatélites não  
15 são comumente utilizados para estudos de genética populacional e/ou mapeamento  
16 genético, devido ao complexo padrão de bandeamento, dificultando estas análises  
17 (SCHLÖTTERER, 2004).

### 18 19 20 **1.6.1 Microsatélites**

21  
22 Os microsatélites, também conhecidos como SSRs (*Simple Sequence*  
23 *Repeats*) ou STRs (*Short Tandem Repeats*), semelhantes aos minissatélites de  
24 DNA, são constituídos também por motivos repetitivos, porém mais curtos  
25 (geralmente 1-6 nucleotídeos). São abundantes e amplamente distribuídos pelos  
26 genomas de eucariotos (TAUTZ & RENZ, 1984; DEBRAUWERE et al., 1997), sendo  
27 frequentemente não traduzidos, apresentando-se geralmente polimórficos devido à  
28 acumulação de mutações, *crossing over* desigual e/ou derrapagem da polimerase  
29 (mecanismo comentado a seguir).

30 Como um *locus* de microsatélites típico possui um tamanho inferior a 100 pb  
31 torna-se possível a análise destas regiões utilizando-se a técnica de PCR. A  
32 possibilidade de variação no número de repetições em um determinado *locus*  
33 permite a genotipagem de distintos alelos após a amplificação por PCR e a

1 constatação de cada alelo em um sistema de eletroforese. Esta característica tem  
2 feito dos microssatélites um dos mais populares marcadores genéticos para estudos  
3 de mapeamento molecular, testes de paternidade e genética de populações  
4 (GOLDSTEIN & SCHLÖTTERER, 1999).

5 Os fatores que influenciam a gênese e a distribuição genômica destes  
6 marcadores ainda são pouco entendidos. Entretanto, alguns autores têm encontrado  
7 evidências que retrotransposons possam contribuir para a dispersão de  
8 microssatélites (WILDER & HOLLOCHER, 2001).

9 Existem duas teorias principais que tentam explicar os mecanismos geradores  
10 de mutação em microssatélites. A primeira teoria argumenta que o processo de  
11 mutação seria causado por uma grande taxa de *crossing over* desigual, assim como  
12 proposto para os minissatélites. A presença de muitas unidades repetitivas  
13 aumentaria a probabilidade de ocorrência de erros de pareamento entre  
14 cromossomos homólogos, levando à deleção ou à inserção de unidades repetitivas  
15 ao final do processo de recombinação (GOLDSTEIN & SCHLÖTTERER, 1999).  
16 Entretanto, uma segunda teoria acredita que a derrapagem (*slippage*) da DNA  
17 polimerase durante o processo de replicação é que seria responsável por adicionar  
18 ou retirar estas unidades repetitivas. Neste modelo, como os *loci* de microssatélites  
19 são formados por unidades repetitivas, uma fita nascente durante o processo de  
20 replicação, poderia se reanelar fora de fase com a fita molde, provocando um *loop*.  
21 Assim, quando a replicação for retomada após cada anelamento incorreto entre as  
22 fitas, uma nova fita nascente pode estar eventualmente mais longa ou mais curta  
23 que a atual fita molde, permitindo a adição ou deleção de unidades repetitivas  
24 (LEVINSON & GUTMAN, 1987)

25 Existem basicamente dois mecanismos para se isolar *loci* de microssatélites:  
26 por bibliotecas genômicas ou por bioinformática. Na primeira, mais tradicional e  
27 antiga, utiliza-se a sondagem por hibridização com sondas complementares a  
28 repetições de interesse para vasculhar bibliotecas genômicas de um determinado  
29 organismo (RASSMANN et al., 1991). Nesta estratégia, geralmente se faz  
30 necessário a triagem de um número muito elevado de clones para a obtenção de um  
31 *locus*. Apesar de terem surgido estratégias alternativas de grande sucesso, como,  
32 por exemplo, a construção de bibliotecas enriquecidas com seqüências de  
33 microssatélites (OLIVEIRA et al., 1998), estas ainda, são técnicas relativamente

1 laboriosas e de alto custo. Diante da implementação de inúmeros projetos genomas  
2 e do crescente aumento de seqüências de DNA de vários organismos, uma  
3 estratégia alternativa tem surgido com auxílio de programas de bioinformática para  
4 procura de *loci* de microssatélites. Assim, as seqüências de DNA depositadas em  
5 bancos de dados podem ser submetidas à procura de *loci* de microssatélites com as  
6 características desejadas (dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, etc),  
7 minimizando o tempo e o gasto na identificação destes marcadores moleculares.

8 Entretanto, a análise populacional de nematódeos parasitos utilizando  
9 marcadores de microssatélites ainda é pouco utilizada. Dentre os poucos trabalhos  
10 realizados com parasitos podemos destacar os trabalhos de LeJAMBRE (1993) com  
11 *Trichostrongylus columbriformes*, GRENIER et al. (1996) com nematódeos  
12 entomopatogênicos das famílias *Steinernematidae* e *Heterorhadtidae*, FISHER &  
13 VINEY (1996) com *Strongyloides ratti* e HOEKSTRA et al. (1997) com *H. contortus*  
14 onde foram isolados 12 *loci* CA/GT e um CT/GA.

15 Recentemente, SCHWENKENBECHER & KAPLAN (2007) identificaram os  
16 primeiros microssatélites de DNA para ancilostomídeos, embora não os tenha ainda  
17 utilizados para estudos de Biologia Populacional. Ampliar a identificação e  
18 caracterização destes marcadores em nematódeos disponibilizaria novas  
19 ferramentas para o estudo de Biologia Populacional destes organismos.  
20 Conseqüentemente, estes dados poderiam ser úteis tanto a estudos de ecologia  
21 molecular quanto na avaliação e monitoramento de estratégias de controle como  
22 vacinação e utilização de drogas antihelmínticas.

### 24 **1.7. Sequenciamento, filogeografia e diversidade molecular de antígenos**

25  
26 Análises de variações tanto ao nível de proteínas quanto ao de DNA têm sido  
27 amplamente utilizadas para o estudos de variabilidade genética em várias espécies  
28 utilizando diferentes métodos. Entretanto, o sequenciamento de DNA possui a  
29 vantagem de permitir uma análise mais ampla da variabilidade genética,  
30 proporcionando tanto a obtenção de dados de diversidade e estruturação genética  
31 quanto a possibilidade de inferir relações evolutivas entre os alelos (AVISE, 1989;  
32 AVISE, 1994). Desta forma, o sequenciamento de DNA tem sido amplamente  
33 utilizado em diversas áreas da Biologia. Como os nucleotídeos constituem-se em

1 unidades básicas de informações nos organismos, a obtenção de suas seqüências e  
2 interpretação dos dados permitem inferências de processos evolutivos realizados  
3 sobre estas moléculas (HILLIS et al., 1996).

4 Com o advento do sequenciamento de DNA foi possível estudar a genética de  
5 populações sobre uma nova óptica. AVISE et al. (1987) propuseram a designação  
6 do termo “filogeografia” para “o campo de estudo envolvido com os princípios que  
7 governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas de alelos,  
8 especialmente em nível intraespecífico”. Ou seja, a filogeografia é a ciência que  
9 estuda a filogenia dos alelos e a distribuição geográfica entre eles. Assim, avaliar os  
10 padrões filogeográficos de alelos mitocondriais e nucleares em populações de *A.*  
11 *caninum* pode contribuir, juntamente com a análise molecular de um antígeno  
12 candidatos à vacina, para uma interpretação da ecologia molecular e o  
13 desenvolvimento de futuros métodos de controle contra este organismo.

14

15

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

**2 – JUSTIFICATIVA**

1 O *Ancylostoma caninum* possui uma ampla distribuição geográfica,  
2 representando um risco para a saúde animal e humana. Além disso, representa um  
3 importante modelo de estudo para as demais espécies antropofílicas de  
4 ancilostomídeos.

5 Considerando os grandes investimentos que estão sendo realizados na  
6 tentativa de se formular uma vacina contra ancilostomídeos, se faz necessário a  
7 implementação de projetos para estudar a variabilidade antigênica e a diversidade e  
8 estrutura genética populacional destes patógenos, seja utilizando marcadores  
9 moleculares disponíveis atualmente ou mesmo identificando e caracterizando novas  
10 ferramentas que possam contribuir para melhor compreensão da genética de  
11 populações destes organismos patogênicos.

12 O *A. caninum* é o ancilostomídeo com o maior número de seqüências de DNA  
13 depositadas no GenBank (mais de 100.000). Frente a esta situação, observa-se a  
14 abundância de “matéria prima” ainda pouco explorada para a identificação e  
15 caracterização de novos marcadores, como por exemplo microssatélites de DNA,  
16 que poderão contribuir, de forma significativa, para a compreensão da estrutura  
17 populacional de ancilostomídeos. Atualmente, estudos de microssatélites de DNA  
18 possuem uma grande vantagem sobre vários outros marcadores moleculares devido  
19 à capacidade de aliar a técnica de PCR com a genotipagem em seqüenciadores  
20 capilares automáticos, aumentando a precisão e confiabilidade dos resultados e  
21 diminuindo o tempo de realização dos experimentos.

22 Em virtude de um crescente interesse em moléculas de ancilostomídeos com  
23 potencial imunoprotetor, este projeto avaliou ainda o a distribuição da variabilidade  
24 molecular de fragmentos de um gene responsável pela codificação de um importante  
25 candidato a uma vacina anti-ancilostomídeos.

26 Esta tese possibilitou o estudo da diversidade e estrutura genética de  
27 populações brasileiras de *A. caninum* após a identificação e caracterização de  
28 microssatélites de DNA. Além disso, a biologia populacional deste organismo foi  
29 ainda avaliada utilizando-se marcadores nucleares e mitocondrial previamente  
30 descritos na literatura. Estes resultados contribuem para o entendimento da Ecologia  
31 Molecular de um importante nematódeo parasito, disponibilizando dados e novas  
32 ferramentas para auxiliar em futuras estratégias de controle.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

**3 – OBJETIVOS**



1 **3.1. Geral**

- 2
- 3 1. Avaliar a diversidade e estrutura genética populacional utilizando-se marcadores  
4 mitocondrial e nucleares em populações brasileiras de *A. caninum*.

5

6 **3.2. Específicos**

- 7
- 8 1. Avaliar a diversidade e estrutura genética de populações brasileiras de *A.*  
9 *caninum* utilizando-se o gene mitocondrial COI;
- 10
- 11 2. Avaliar a diversidade e estrutura genética de populações brasileiras de *A.*  
12 *caninum* utilizando-se os marcadores nucleares ITS-1 e ITS-2;
- 13
- 14 3. Identificar *loci* de microssatélites no genoma de *A. caninum in silico*, utilizando-se  
15 ferramentas de bioinformática;
- 16
- 17 4. Caracterizar os *loci* de microssatélites de DNA identificados;
- 18
- 19 5. Avaliar a estrutura genética de populações brasileiras de *A. caninum* utilizando-  
20 se os microssatélites de DNA caracterizados;
- 21
- 22 6. Avaliar a distribuição da diversidade molecular de uma sequência parcial do gene  
23 codificante da proteína antigênica (Ac-ASP-2) em populações brasileiras de *A.*  
24 *caninum*.
- 25
- 26

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

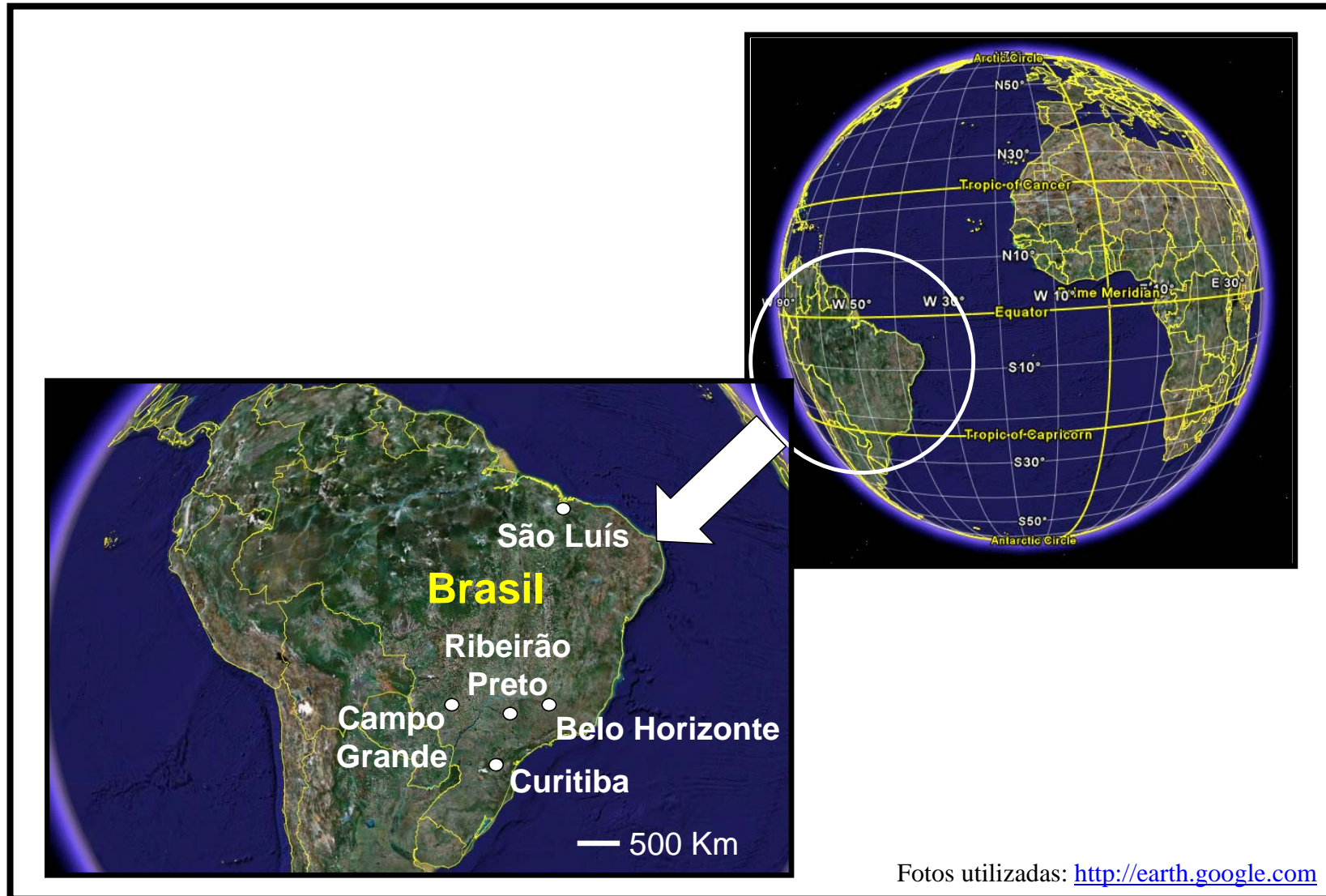
**4 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 1 **4.1. Populações de estudo**

2  
3 As populações de *A. caninum* analisadas neste estudo são provenientes de  
4 centros de controle de zoonoses (CCZs) de cinco localidades brasileiras. Sendo  
5 elas: Belo Horizonte/MG, Campo Grande/MS, Curitiba/PR, Ribeirão Preto/SP e São  
6 Luís/MA. A FIGURA 6 apresenta um mapa com a localização das populações  
7 brasileiras avaliadas nesta tese.

#### 8 9 **4.2. Obtenção de vermes adultos**

10  
11 Os vermes adultos de *A. caninum* foram obtidos após sacrifício, em cada  
12 localidade, de cinco cães sem raça definida conforme legislação e procedimentos  
13 vigentes nos respectivos CCZs. Após a realização das necropsias, os intestinos  
14 delgados foram acondicionados em caixas de isopor com gelo e transportados para  
15 o Laboratório de Helmintologia no ICB/UFMG. Posteriormente, estes órgãos foram  
16 seccionados longitudinalmente em salina 0,85%, seguido de uma raspagem da  
17 mucosa intestinal para desprendimento dos vermes adultos fixados e lavagem do  
18 conteúdo intestinal em tamis de 0,25mm. O material filtrado foi transferido para um  
19 recipiente transparente, sob jato de água, para separação dos vermes adultos  
20 machos e fêmeas e posterior identificação, utilizando um microscópio estereoscópio  
21 e óptico, sem o uso de fixadores ou diafanizadores. As características morfológicas  
22 utilizadas para identificação específica foram analisadas conforme BURROWS  
23 (1962).



**FIGURA 6:** Localização das populações brasileiras de *A. caninum* utilizadas neste estudo. **BH** = lat. S 19°55', long. W 43°56'; **CG** = lat. S 20°26', long. W 54°38'; **CT** = lat. S 25°25', long. W 49°14'; **RP** = lat. S 21°12', long. W 47°48'; **SL** = lat. S 2°31', long. W 44°16'.

1 Após a separação e identificação, os vermes foram lavados com solução  
2 salina 0,85% e observados em microscópio estereoscópio para visualizar se a  
3 cápsula bucal e o conteúdo intestinal apresentam-se desprovidos de material  
4 exógeno aparente. Posteriormente, cada verme foi individualizado em um tubo de  
5 microcentrífuga, nomeado e congelado em *freezer* -86°C para posterior extração  
6 de DNA genômico.

### 7 8 **4.3. Extração de DNA**

9  
10 A extração de DNA genômico foi realizada utilizando-se um protocolo de  
11 extração padrão do Laboratório de Parasitologia Molecular do ICB/UFMG.  
12 Primeiramente, foi utilizada uma maceração mecânica com bastões de vidro em  
13 presença de nitrogênio em tubos de microcentrífuga de 1,5ml, seguido de  
14 digestão com 100µg/ml de proteinase K (SIGMA) por 30 min. a 65°C na presença  
15 de 400µl de tampão de lise contendo 50mM de EDTA, 100mM de Tris-HCl pH 7,4,  
16 100mM de NaCl e 1% de SDS. Posteriormente, foram adicionados 400µl de  
17 clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, seguido de centrifugação a  
18 12.000g, 25°C por 5 min. A fase superior foi transferida para um novo tubo de  
19 microcentrífuga de 1,5ml e submetida à digestão de RNAs “contaminantes” com  
20 100µg/ml de RNase (INVITROGEN) a 37°C, por 30 min. Novamente, foram  
21 adicionados mais 400µl de clorofórmio e álcool isoamílico seguido de  
22 centrifugação, conforme parâmetros mencionados anteriormente, para a  
23 eliminação da RNase. A fase superior foi mais uma vez transferida para um novo  
24 tubo de microcentrífuga de 1,5ml para a adição de 400µl de isopropanol e  
25 precipitação do DNA após incubação por, aproximadamente, 16 horas a -20°C  
26 seguido de uma centrifugação a 14.000g, 4°C por 30 min. Posteriormente, o  
27 precipitado foi lavado duas vezes com 400µl de etanol 70%, centrifugando-se as  
28 amostras a 12.000g, 4°C por 10 min e ressuspendendo-as em 20µl de água  
29 ultrapura (MILIQ).

30 As amostras obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose  
31 0,8% (SAMBROOK, 1989) e comparadas com padrões de concentração definidos  
32 para estimar a concentração e avaliar a integridade dos DNAs genômicos obtidos.

33

#### 4.4. Marcadores mitocondriais e nucleares

##### 4.4.1 Amplificação, purificação e sequenciamento dos marcadores COI e ITSs

Os iniciadores para amplificação e sequenciamento dos marcadores ITS-1/ITS-2 e COI bem como os respectivos tamanhos esperados de amplicons estão apresentados na TABELA 2. Estes iniciadores foram selecionados e sintetizados em virtude de estarem bem estabelecidos na literatura (GASSER et al., 1996; FOLMER et al. 1994).

**TABELA 2:** Iniciadores utilizados para amplificação dos marcadores ITSs e COI

Marcadores	Iniciadores	Sequências	Temperatura anelamento (°C)	Amplicon (nts)
ITS-1/ITS-2	NC2*	5' GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT 3'	55	≈ 770
	NC5*	5' TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT 3'		
COI	LCO1490*	5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3'	50	≈ 650
	HCO2198*	5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'		

nts = nucleotídeos

\*(GASSER et al., 1996; FOLMER et al. 1994)

As reações de amplificação destes marcadores foram realizadas em 50µl contendo 10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton®X-100, 200µM de cada dNTP, 0,6µM de cada par de iniciador e 1 unidade de Taq DNA Polimerase (PHONEUTRIA, MG, Brasil). As amplificações ocorreram em um termociclador (Mastercycler®-EPPENDORF) obedecendo aos seguintes parâmetros: 95°C por 5 min. para desnaturação inicial da dupla fita de DNA genômico, seguido de 30 ciclos à 95°C por 1 min, temperatura específica de cada

1 par de iniciador por 1 min., 72°C por 1 min. e um passo final de extensão à 72°C  
2 por 8 min. Em todas as reações realizadas, foram incluídos controle positivo (DNA  
3 genômico de *A. caninum*), negativo (DNA genômico de *Canis familiares*) e branco  
4 (água) para avaliar a presença e/ou ausência de possíveis contaminantes ou  
5 inibidores durante o processo de extração de DNA e/ou preparação das reações  
6 de PCR.

7 A visualização dos amplicons foi realizada em gel de agarose 0,8% corado  
8 com brometo de etídio (0,3 µg/ml) (SAMBROOK, 1989) ou gel de poliacrilamida  
9 6% em condições não desnaturantes corado com nitrato de prata (SANTOS et al.,  
10 1993).

11 Os amplicons foram purificados com PEG (PROMEGA) (20% polietileno  
12 glicol 8000 em solução de NaCl 2,5M). Este procedimento foi adotado em função  
13 do seu baixo custo/benefício sem prejuízo dos resultados quando comparado com  
14 os kits industrializados. A precipitação com o sistema PEG foi realizada  
15 misturando-se, em um tubo de microcentrífuga de 0,5ml, um volume (1V) do  
16 produto amplificado com 1V de PEG, seguido de uma intensa homogeneização  
17 em um agitador vortex. Posteriormente, executou-se uma centrifugação a  
18 13.000g, 25°C por 45 min., com o subsequente descarte do sobrenadante e  
19 adição de 125µl de etanol 80%. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a  
20 13.000g, 25°C por 15 min., descarte do sobrenadante e adição de igual volume de  
21 etanol 80% e centrifugação sob os mesmos parâmetros para retirada do excesso  
22 de sal. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em  
23 10-20µl de água ultrapura (MILLIQ).

24 As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método de  
25 incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTP) descrito originalmente por  
26 SANGER et al. (1977), utilizando-se o *DYEnamic<sup>TM</sup>ET dye terminator kit*  
27 *MegaBACE<sup>TM</sup>* (AMERSHAN BIOSCIENCES), em tubos de microcentrífuga de  
28 0,5ml ou placas de sequenciamento (96 poços) com um volume final de 10µl. As  
29 reações ocorreram com 0,5µM de cada iniciador direto ou reverso utilizado na  
30 reação de amplificação por PCR, aproximadamente 100ng do amplicon, 4µl de  
31 ETKit (premix para sequenciamento) e água ultrapura suficiente para completar o  
32 volume. As reações foram realizadas em um termociclador (Mastercycler® -  
33 EPPENDORF) com 35 ciclos a 95°C por 25 segundos, temperatura de

1 anelamento específica de cada iniciador por 15 segundos e 60°C por 3 min.  
2 Posteriormente, os nucleotídeos não incorporados foram precipitados com a  
3 adição de 1µl de acetato de amônio (7,5M) e 25µl de etanol 95% (MERCK),  
4 seguido de um período de incubação de 15 minutos a 25°C e subsequente  
5 centrifugação a 3500g, 25°C por 45 min. O sobrenadante foi descartado e 150µl  
6 de etanol 80% (MERCK) adicionados às amostras com posterior centrifugação a  
7 3500g, 25°C por 15 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento  
8 resuspendido por agitação em vórtex com 10µl do tampão de ressuspensão  
9 contendo 70% de formamida e 1mM de EDTA.

10 As amostras foram submetidas à leitura no seqüenciador automático  
11 capilar *MegaBACE 1000™ sequencing system* com uma injeção de 2 Kv por 100  
12 segundos e corrida de 6 Kv por 230 minutos.

13 O sequenciamento foi realizado em quadruplicata para cada marcador  
14 molecular utilizado, sendo duas vezes com o iniciador direto e duas com o  
15 reverso, o que permitiu uma maior confiabilidade das seqüências consensos  
16 obtidas.

#### 17 18 **4.4.2 Identificação e seleção dos *loci* de microssatélites de DNA de *A.*** 19 ***caninum*, síntese de iniciadores, *nested* PCR e genotipagem**

20  
21 Todos os *loci* de microssatélites utilizados neste estudo foram identificados  
22 e selecionados por ferramentas de bioinformática. Primeiramente, foram obtidas  
23 cerca de 104.000 seqüências de *A. caninum* depositadas no GenBank  
24 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), utilizando-se a expressão de busca “*Ancylostoma*  
25 *caninum* [organism]” dentro da base de dados *nucleotide*. Posteriormente, estas  
26 seqüências foram salvas em formato FASTA e submetidas à análise pelo  
27 programa *Tandem Repeats Finder* (TRF) (<http://tandem.bu.edu/trf.html>)  
28 (BENSON, 1999).

29 Foram selecionados 38 *loci* de microssatélites de di, tri e tetranucleotídeos  
30 para serem submetidos à uma triagem inicial quanto a capacidade de  
31 amplificação dos mesmos por *nested* PCR em tubo único, segundo metodologia  
32 descrita por SCHUELKE (2000). Esta técnica permite a amplificação de



1 fragmentos de DNA com diferentes fluorocromos de forma menos onerosa para  
2 genotipagem *multiplex*.

3 A maioria das genotipagens são realizadas pela reação em cadeia da  
4 polimerase (PCR) utilizando-se iniciadores específicos. Com o objetivo de se  
5 analisar o tamanho dos respectivos alelos amplificados em um sistema de  
6 eletroforese acoplado com detecção a *laser*, tradicionalmente, marca-se um dos  
7 iniciadores utilizados na PCR com moléculas fluorescentes. A marcação de cada  
8 iniciador com estas moléculas é um procedimento muito oneroso. SCHUELKE  
9 (2000) descreveu uma metodologia para a redução destes custos. Nesta técnica o  
10 autor utiliza uma reação de *nested* PCR em tubo único com três iniciadores: um  
11 iniciador direto, fusionado em sua extremidade 5' com uma sequência de 18  
12 nucleotídeos (iniciador universal M13 (-21): 5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3')  
13 formando uma "cauda de M13", um iniciador reverso e um segundo iniciador  
14 direto, correspondendo-se ao iniciador universal M13 (-21) marcado, em sua  
15 extremidade 5', com diferentes substâncias fluorescentes. A FIGURA 7 apresenta  
16 uma ilustração esquemática desta metodologia que se baseia em dois pontos  
17 fundamentais: concentrações diferentes de iniciadores e ciclos com diferentes  
18 temperaturas de anelamento. A concentração do iniciador direto (com "cauda  
19 M13") deve ser um quarto das concentrações dos iniciadores reverso e direto M13  
20 (marcado com a substância fluorescente). Nos primeiros ciclos, os quais são  
21 realizados com a temperatura de anelamento específica para o iniciador direto  
22 com "cauda M13", ocorre a incorporação deste iniciador aos produtos de PCR.  
23 Posteriormente, em função de sua concentração inferior, ocorre o esgotamento do  
24 iniciador direto com "cauda M13". A partir desse momento, altera-se também a  
25 temperatura de anelamento da reação de *nested* PCR para 53°C, permitindo o  
26 anelamento do iniciador direto M13 (marcado com substância fluorescente) sobre  
27 os amplicons previamente formados nos primeiros ciclos da reação, gerando  
28 produtos de PCR marcados com substâncias fluorescentes. Estas moléculas  
29 fluorescentes são detectadas em um sistema de eletroforese acoplado com  
30 detecção a *laser* para a genotipagem de alelos.

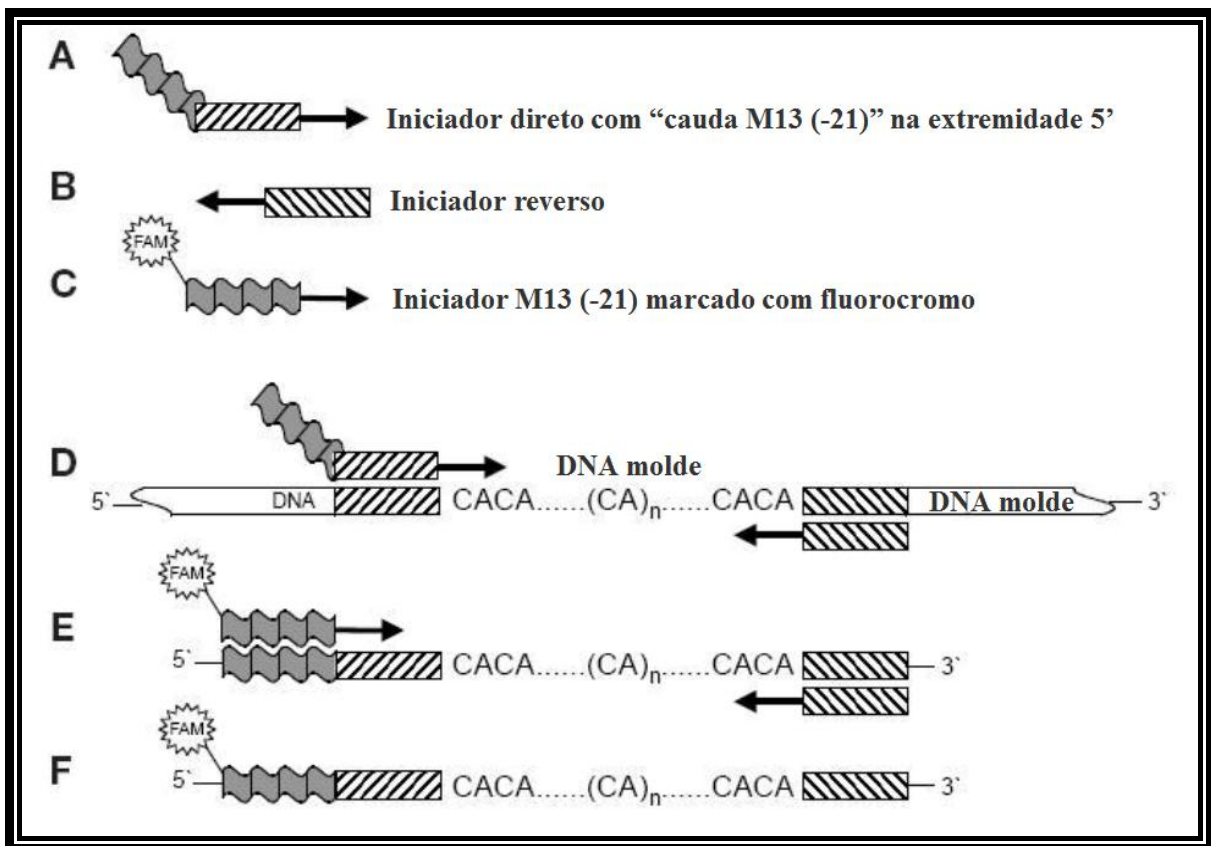
31 As reações de *nested* PCR foram realizadas em 15µl contendo 10mM Tris-  
32 HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton®X-100, 200µM de cada dNTP,  
33 0,19µM do iniciador direto com "cauda M13", 0,75µM do iniciador reverso,

1 0,75 $\mu$ M do iniciador M13 marcado com uma substância fluorescente (6-FAM ou  
2 VIC ou NED ou PET<sup>®</sup>, APLLYED BIOSYSTEM) e 1 unidade de *Taq* DNA  
3 Polimerase (PROMEGA). As amplificações ocorreram em um termociclador  
4 (Mastercycler<sup>®</sup>-EPPENDORF) obedecendo aos seguintes parâmetros: 94°C (5  
5 min.) para desnaturação inicial da dupla fita de DNA genômico, seguido de 30  
6 ciclos à 94°C (30 seg.), temperatura específica dos iniciadores com “cauda M13” e  
7 reverso (45 seg.), 72°C (45 seg.), seguido por oito ciclos à 94°C (30 seg.), 53°C  
8 (45 seg.), 72°C (45 seg.) e um passo final de extensão à 72°C por 10 min.  
9 Previamente à genotipagem, uma alíquota de 5 $\mu$ l de cada amostra amplificada  
10 pela nested PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose 2% corado com  
11 brometo de etídio (0,3  $\mu$ g/ml) (SAMBROOK, 1989).

12 A genotipagem *multiplex* dos vermes foi realizada no *Center for Genome*  
13 *Research and Biocomputing (CGRB)*, Oregon State University, Corvallis, Oregon,  
14 EUA, enviado-se uma *mix* de até 4 $\mu$ l, contendo 1 $\mu$ l do produto de amplificação de  
15 quatro *loci* diferentes (amplificados com diferentes substâncias fluorescentes).

16 A TABELA 3 apresenta os *loci* avaliados neste estudo, os iniciadores  
17 sintetizados e as temperaturas de anelamento utilizadas na reação de *nested*  
18 PCR para a genotipagem dos vermes. As sequências de *A. caninum* do banco de  
19 dados (GenBank) utilizadas para a identificação *loci* de microssatélites e síntese  
20 dos iniciadores utilizados neste estudo estão apresentadas no APÊNDICE 1.

21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

1  
23  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

**FIGURA 7:** Esquema representativo da reação de *nested* PCR em tubo único para marcação de amplicons com produtos fluorescentes, segundo SCHUELKE (2000). As caixas hachuradas representam os iniciadores específicos para a amplificação dos *loci* de microsatélites (A e B) e as caixas cinzas onduladas (C, E e F) representam o iniciador universal M13 (-21) marcado com uma substância fluorescente. Nos primeiros ciclos (D) o iniciador com "cauda M13" é incorporado aos produtos de PCR. Estes produtos são, posteriormente, alvo para a amplificação do iniciador universal M13 marcado com substância fluorescente (E) os quais são incorporados nos ciclos subsequentes devido a mudança na temperatura de anelamento para 53°C e ao esgotamento do iniciador direto específico utilizado nos primeiros ciclos da reação. (F) O produto final pode ser analisado em um sistema de eletroforese acoplado com detector a *laser*.

1 **TABELA 3:** *Locus* de microssatélites selecionados e seus respectivos iniciadores  
 2 sintetizados para a triagem inicial quanto a capacidade de amplificação por PCR  
 3 de acordo com metodologia descrita por SCHUELKE (2000).

4

<i>Locus</i>	Repetição	Iniciadores	Sequências dos iniciadores	Temperaturas de anelamento
Acmic1	CA	Acmic1U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGA TAT TCT TGG CGA TGC T 3'	55°C*/53°C♦
		Acmic1L	5' CAG ACT GTA TGT TGC GTT TG 3'	
Acmic2	GA	Acmic2U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACC ACT TGC GAC CGT TCC AT 3'	61°C*/53°C♦
		Acmic2L	5' CAC CTC CCG TAC CGA CAC C 3'	
Acmic3	GT	Acmic3U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTA GTG CGC GTC AAA CTA AC 3'	54°C*/53°C♦
		Acmic3L	5' GCG CTT TAT CTA ATG GGT T 3'	
Acmic4	TGAA	Acmic4U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTC AGG AAG AAC GGG ACT TT 3'	55°C*/53°C♦
		Acmic4L	5' CCA GAT CAG ATT CGG ACT TG 3'	
Acmic5	CA	Acmic5U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCT TTC ACA GTC GCT TTC 3'	53°C*/53°C♦
		Acmic5L	5' CAT AGT CTG ACA CGC ATC AC 3'	
Acmic6	TAA	Acmic6U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAA GCC AAT CAA CGT CTA 3'	52°C*/53°C♦
		Acmic6L	5' TAC TGT ATC TAC CGC ATT CC 3'	
Acmic7	TAA	Acmic7Ub M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGC TCC CTT CTA CAC ATT GC 3'	58°C*/53°C♦

		Acmic7L	5' CAG CGT GGA GTC GTT TGA 3'	
Acmic8	CA	Acmic8U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGG CTG GTT CTC GTG 3'	52°C*/53°C♦
		Acmic8L	5' AAA GGG CAG TGT ATA AGC TC 3'	
Acmic9	CA	Acmic9U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTT TCT TCG GTC TAG GC 3'	48°C*/53°C♦
		Acmic9L	5' TTA TAA TAA AGG GCG TAG TCT 3'	
Acmic10	TAA	Acmic10U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT GTC AAT TGT GTT TTT ATT TCG G 3'	55°C*/53°C♦
		Acmic10L	5' AAA TCA CAT CGT TGT ATC CC 3'	
Acmic11	TGAA	Acmic11U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCT GAG TAC GAG ACC GAA AT 3'	54°C*/53°C♦
		Acmic11L	5' TTC TGA TGG CGC ACC TAT 3'	
Acmic12	CA	Acmic12U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TAT TTT CCG TTT TCG ATG 3'	50°C*/53°C♦
		Acmic12L	5' ATC ATA CTT CTT CTT AAT TGG C 3'	
Acmic13	TGAA	Acmic13U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGA GGA AAG CGA ACA GTA 3'	51°C*/53°C♦
		Acmic13L	5' ATT GCG TGC CAT ATA AGA 3'	
Acmic14	TTCA	Acmic14U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG CGT GCG TAT GAT GC 3'	55°C*/53°C♦
		Acmic14L	5' CCG GAC CCG TTA ATA ACC 3'	
Acmic16	TTA	Acmic16U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TAT GAT GTA GCC AAG GTA AT 3'	50°C*/53°C♦
		Acmic16L	5' GGG CGT GGT AGT CAG 3'	
Acmic17	CA	Acmic17U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCC ACC TGC AGA GTG ACG 3'	59°C*/53°C♦

		Acmic17L	5' GGG TGG TCT GGC AAC TGT 3'	
Acmic19	TGAA	Acmic19U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAA GGT CGC GTT TAG TCC 3'	53°C*/53°C♦
		Acmic19L	5' CGT CGC TTT CTG CTA TGT T 3'	
Acmic20	TTCA	Acmic20U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAT GCG CGA CTG AC 3'	49°C*/53°C♦
		Acmic20L	5' CCC GTT AAT AAC CTT ATG T 3'	
Acmic21	TGAA	Acmic21U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGT TCA GGA AGA ACG GGA CT 3'	59°C*/53°C♦
		Acmic21L	5' TGC TGG GTT TCA AAG TGT CC 3'	
Acmic22	TTGA	Acmic22U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATT TGG CAG CCC AGT TGT 3'	58°C*/53°C♦
		Acmic22L	5' AAA CTC AG TCA GAT GCG TCC 3'	
Acmic23	TGAA	Acmic23U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGC TGG AAA GCT TCT GGA 3'	59°C*/53°C♦
		Acmic23L	5' TTG TGA GCT CGG ATG TGA 3'	
Acmic24	TGAA	Acmic24U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAG TTG GGC TCA ATC CAT GA 3'	59°C*/53°C♦
		Acmic24L	5' ATG ACT TCT GAT GGC GCA 3'	
Acmic25	TTCA	Acmic25U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT AAA CTT GGG CGA AAG GAA GC 3'	61°C*/53°C♦
		Acmic25L	5' TGC GTG CTT GTT ATG GAA GG 3'	
Acmic26	TACA	Acmic26U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG GAT TTG CCG GTA GTA GC 3'	59°C*/53°C♦
		Acmic26L	5' ATG CCG AGG TCC AAT GAA AG 3'	

Acmic27	TGAA	Acmic27U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT AAG TGT CCC TTC AAG CCA 3'	57°C*/53°C♦
		Acmic27L	5' AGC CAC CAG TTG CTC ATT 3'	
Acmic28	TGAA	Acmic28U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAG CAG AAA GGC AAT GAG 3'	52°C*/53°C♦
		Acmic28L	5' GCT GCA CCA AAC ACT GAA 3'	
Acmic29	TGAA	Acmic29U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATT GGT GGA GGA AAG CGA 3'	58°C*/53°C♦
		Acmic29L	5' AAA CAG AAA CGG AGC CCA 3'	
Acmic30	TTCA	Acmic30U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGG AGC ATT TGG CAG TGA 3'	58°C*/53°C♦
		Acmic30L	5' AGG GAC CTG CTC ATA CGA TA 3'	
Acmic31	TTCA	Acmic31U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCA GTC TTC CTT TCT GGC AA 3'	60°C*/53°C♦
		Acmic31L	5' CCA TCA AAC GCA CGC ATC TA 3'	
Acmic32	TGAA	Acmic32U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATC AGA AGA CCC ACT GAC GA 3'	59°C*/53°C♦
		Acmic32L	5' CGG CTC CAA TTG TAC AAC GA 3'	
Acmic33	TGAA	Acmic33U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT CGG GTT GAT TGG ACA ATT CG 3'	61°C*/53°C♦
		Acmic33L	5' TTC GTG CAT TCA GCC GAT 3'	
Acmic34	TTCA	Acmic34U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAG CGT GCA CAC AGA TCT TA 3'	58°C*/53°C♦
		Acmic34L	5' TTC CTG GAA CGT TCA TGC TC 3	
Acmic35	TTCA	Acmic35U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCT GAA TAG GGA GGA AGG 3'	51°C*/53°C♦

		Acmic35L	5' ACT TAG GGA GTC TTG TGG 3'	
Acmic36	TGAA	Acmic36U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATC CAC GCA GTT CTG CAA 3'	57°C*/53°C♦
		Acmic36L	5' TTT CCG TCG CTT TCT GCT 3'	
Acmic37	TTCA	Acmic37U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC TTA CCC ACA GTC CAA 3'	54°C*/53°C♦
		Acmic37L	5' AGT TGT CCA GCT GCT TGT 3'	
Acmic38	TGAA	Acmic38U M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCA TGA CAC CGG TTA GGT 3'	57°C*/53°C♦
		Acmic38L	5' TAT CAG AGC GAC GAA CGA CA 3'	

1 \* Temperatura de anelamento dos primeiros 30 ciclos; ♦ Temperatura de anelamento dos  
 2 últimos 8 ciclos. Os nucleotídeos assinalados em azul correspondem a “cauda de M13”  
 3 adicionada na extremidade 5' dos iniciadores diretos.

4

5

6

#### 7 4.4.3 Amplificação, purificação e sequenciamento do gene Ac-ASP-2

8

9 A amplificação de um fragmento do gene codificante da proteína secretada  
 10 Ac-ASP-2 foi realizada utilizando-se os iniciadores *SET 3 U* e *SET 3 L* (TABELA  
 11 16), após síntese e seleção dos iniciadores mais adequados para este propósito  
 12 (conforme apresentado nos resultados).

13 As reações ocorreram em 15µl contendo 10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM  
 14 KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton®X-100, 200µM de cada dNTP, 0,6µM de cada par  
 15 de iniciador e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (PROMEGA), em um  
 16 termociclador (Mastercycler®-EPPENDORF) obedecendo aos seguintes  
 17 parâmetros: 94°C (5 min.), seguido de 35 ciclos à 94°C (1 min.), 60 (1 min.) e  
 18 72°C (1 min.), seguido de um passo final com extensão à 72°C por 8 min.

19 Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos a um processo de  
 20 purificação utilizando-se o kit GFX (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH INC.),  
 21 conforme instruções do fabricante, para remoção dos nucleotídeos e iniciadores  
 22 não incorporados durante a PCR. Subseqüentemente, uma alíquota de 5µl de



1 cada amostra purificada foi submetida a eletroforese em gel de agarose 2%  
2 corado com brometo de etídio (0,3 µg/ml) (SAMBROOK, 1989).

3 Aliquotas de, aproximadamente, 50ng de cada produto de PCR purificado e  
4 10pmol de um dos iniciadores (*SET 3 U* ou *SET 3 L*) foram enviadas ao *Nevada*  
5 *Genomics Center*, Reno, NV, EUA, para o sequenciamento dos amplicons.

#### 7 **4.5. Análise dos dados**

##### 9 **4.5.1. Seqüências de DNA**

11 Para obtenção das seqüências de DNA, os fragmentos oriundos das  
12 reações de sequenciamento foram submetidos à eletroforeses em seqüenciador  
13 automático capilar *MegaBACE 1000™ sequencing system*, conforme mencionado  
14 anteriormente. Após esta etapa, foram produzidos arquivos com extensão “.esd”,  
15 onde ficaram armazenados os cromatogramas, representando o espectro óptico  
16 de emissão de cada base marcada por fluorocromos específicos ao serem  
17 excitados pelo *laser* do seqüenciador, permitindo-se conhecer a seqüência de  
18 bases de uma molécula de DNA. A partir dos quatro cromatogramas referentes ao  
19 sequenciamento dos marcadores moleculares de cada indivíduo analisado, foram  
20 produzidas seqüências consenso utilizando-se os programas Phred v.0.20425  
21 (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998), Phrap v.0.990319  
22 (<http://www.phrap.org/>) e Consed 12.0 (GORDON et al., 1998). Todas seqüências  
23 consenso produzidas tiveram seus cromatogramas analisados visualmente com o  
24 auxílio do programa Consed para aumentar a confiabilidade das seqüências  
25 obtidas. Além disso, os cromatogramas e a qualidade das bases foram  
26 averiguadas pelos programas *Sequence Analyzer* e *Scorecard*, disponibilizados  
27 pelo fabricante do seqüenciador *MegaBACE 1000™* (AMERSHAN  
28 BIOSCIENCES), antes da geração dos consensos para uma maior confiabilidade  
29 de cada base sequenciada.

30 As seqüências de Ac-ASP-2, produzidas no *Nevada Genomic Center*,  
31 foram enviadas eletronicamente sob o formato ab1 (extensão ab1). As análises  
32 dos cromatogramas e a produção das seqüências consensos foram realizadas  
33 utilizando-se o programa Bioedit versão 7.0.8 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>)

1 [bioedit.html](#)). As análises Bayesianas para a definição dos alelos (“haplótipos”) do  
2 gene Ac-ASP-2 foram realizadas com o programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER et  
3 al., 2005).

4 O alinhamento entre os diversos consensos de um mesmo marcador foi  
5 realizado usando o algoritmo ClustalW implementado no programa Mega 3.0  
6 (KUMAR et al., 2001) e/ou Bioedit versão 7.0.8.

7 Os testes de neutralidade Fu’s F (FU, 1997) e Tajimas’s D (TAJIMA, 1989)  
8 bem como os dados estatísticos que descrevem a diversidade de nucleotídeos  
9 ( $\pi$ ), diversidade haplotípica ( $h$ ), números de substituições, tipo de substituições e  
10 composição de bases entre os haplótipos e foram obtidos pelos programas Mega  
11 3.0, DNASP versão 4.0 e Arlequin 3.11 (KUMAR et al., 2001; ROZAS et al., 2003;  
12 SCHNEIDER et al., 2000).

13 Foram construídas redes haplotípicas (*networks*) para observar a  
14 distribuição geográfica e a filogenia dos haplótipos nucleares e mitocondrial. Para  
15 a construção da rede de haplótipo com os marcadores mitocondriais foram  
16 incluídas seqüências de outros ancilostomídeos (*A. duodenale* e *N. americanus*),  
17 uma seqüência de *A. caninum* da China e duas dos Estados Unidos (número de  
18 acesso do Genbank: EU007444 – EU007447 e AJ417719 posições  
19 compreendidas entre os nucleotídeos 948-1414 do gene Na-COI). Para a  
20 construção da rede de haplótipos de Ac-ASP-2 foi adicionada uma seqüência de  
21 Na-ASP-2 (número de acesso do Genbank: AY288089) proveniente de *N.*  
22 *americanus* (*out-group*). Estes dados foram gerados pelo algoritmo *median-joining*  
23 (BANDELT et al., 1999) utilizando-se o programa Network 4.0.

24 As análises de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992)  
25 foram realizadas programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005) para avaliar a  
26 distribuição da variabilidade genética encontrada nas populações e estimar o grau  
27 de fixação alélica utilizando-se o índice de  $\Phi_{ST}$ .

#### 30 **4.5.2. Genotipagem**

31  
32 Os dados brutos oriundos da genotipagem em *ABI Prism 3100 Genetic*  
33 *Analyzer* foram analisados utilizando-se o programa Genotyper versão 3.7 NT  
34 (APPLIED BIOSYSTEMS) para a determinação dos diversos alelos.

1 Os dados que descrevem a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) (não  
2 influenciada pelo tamanho populacional; NEI, 1978), heterozigosidade observada  
3 ( $H_o$ ), número médio de alelos por *locus* e  $F_{IS}$  foram calculados pelo programa  
4 Arlequin 3.11 (EXCOFFIER et al., 1992). Os testes de equilíbrio de Hardy-  
5 Weinberg e de desequilíbrio de ligação (utilizando o teste exato de Fisher, 10.000  
6 “corridas”) foram realizados com o mesmo programa.

7 As estimativas de alelos nulos foram realizadas utilizando o programa  
8 MicroChecker (<http://www.microchecker.hull.ac.uk/>, OOSTERHOUT et al., 2006).  
9 As análises de parentesco (*relatedness*) entre os vermes amostrados foram  
10 realizadas utilizando-se o programa Identix versão 1.1 (BELKHIR et al., 2002). Os  
11 dados de  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$  e variância molecular (AMOVA) foram calculados utilizando-se  
12 o programa Arlequin 3.11.

13 A correlação entre filogenia intraespecífica e estruturação geográfica com  
14 dados de microssatélites foram realizadas utilizando-se uma análise de  
15 componentes principais (*Principal components analysis – PCA*). Esta técnica  
16 estatística é utilizada para reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados.  
17 Matematicamente é definida como uma transformação linear ortogonal que  
18 transforma dados em um novo sistema de coordenadas. As análises de *PCA*  
19 foram executadas com o programa Genetix ([www.univ-montp2.fr/~genetix/  
20 genetix.htm](http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm)).

21  
22

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

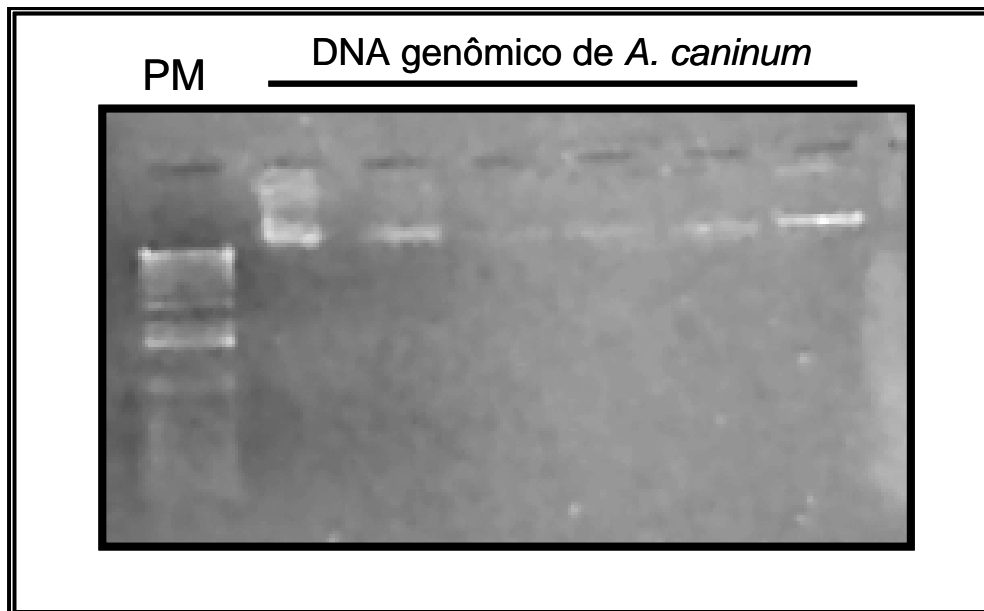
**5 – RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Obtenção dos vermes e extração de DNA

Os vermes adultos de *A. caninum* foram obtidos de cinco cães sem raça definida provenientes de CCZs das regiões estudadas. Foram coletados 37 indivíduos de Belo Horizonte (BH), 47 de Campo Grande (CG), 35 de Curitiba (CT), 11 de Ribeirão Preto (RP) e 49 de São Luiz (SL), totalizando 179 indivíduos.

A extração do DNA genômico foi executada de forma satisfatória com todos dos indivíduos coletados. As concentrações de DNA genômico obtidas variaram, aproximadamente, entre 05-30 ng/ $\mu$ l e não apresentaram sinais de degradação quando analisadas em gel de agarose 0,8% (FIGURA 8).

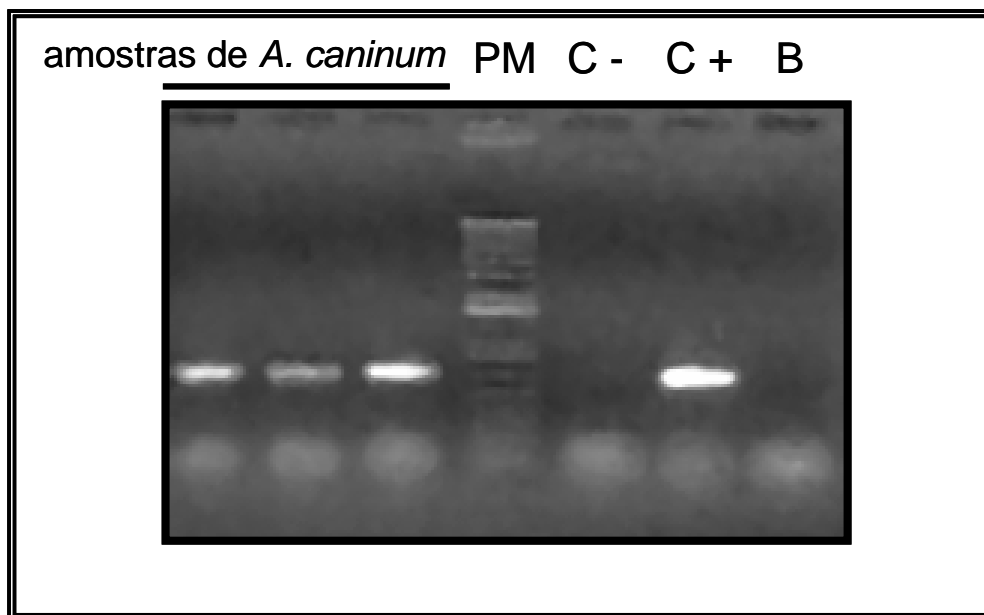


**FIGURA 8:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a qualidade dos DNAs genômicos obtidos. PM = 1 Kb *Plus DNA Ladder* (INVITROGEN).

## 5.2. Citocromo C Oxidase Subunidade 1 (COI)

### 5.2.1. Amplificação e purificação

As amostras de DNA genômico foram amplificadas por PCR conforme parâmetros estabelecidos previamente (item 4.4.1). Esta reação se mostrou eficiente e específica, amplificando uma região de, aproximadamente, 650-700 pb. Em todos os sets de amplificação foram utilizados três controles: controle positivo (amostra de DNA de *A. caninum* previamente amplificada), controle negativo (amostra de DNA de cão) e branco (água). Os produtos amplificados foram resolvidos em gel de agarose 0,8% juntamente com amostras controles (FIGURA 9). O número de indivíduos utilizados nesta etapa do estudo estão apresentados na TABELA 4. Por razões desconhecidas em alguns poucos indivíduos não foi possível a obtenção de seqüências de COI (falha na amplificação por PCR). Todos os amplicons de COI foram purificados satisfatoriamente com PEG (polietileno glicol 8000, 20% NaCl 2,5M). Os resultados foram avaliados em gel de agarose 0,8% (dados não apresentados).



**FIGURA 9:** Amplificação de *COI* utilizando amostras de DNA genômico de *A. caninum*. PM = 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), C- = controle negativo, C+ = controle positivo e B = branco

### 5.2.2. Sequenciamento e produção dos consensos

Tanto o iniciador HCO quanto LCO mostraram-se igualmente eficientes no sequenciamento dos amplicons de COI, permitindo a obtenção de seqüências de até 692 pb. Entretanto, por razões pouco compreendidas, algumas amostras com padrão de amplificação similar não alcançaram a mesma eficiência durante o sequenciamento.

Cada indivíduo incluído neste estudo foi submetido ao sequenciamento de COI em duplicata com os iniciadores LCO1490 e HCO2198, produzindo quatro seqüências/indivíduo. Esse fato contribuiu para a qualidade e a confiabilidade das seqüências consenso obtidas.

Mesmo após inúmeras repetições de sequenciamento, algumas amostras não produziram seqüências consenso superiores a 500 pb. Assim, durante o alinhamento das seqüências consenso de todos os indivíduos foram eliminadas as extremidades não sobrepostas para a uniformidade e sobreposição total das seqüências (467 pb).

### 5.2.3. Diversidade genética

Quatrocentos e sessenta e sete bases foram analisadas, correspondendo às posições 96-562 da seqüência gênica parcial de COI de *Ancylostoma caninum* (nº acesso U57030). Foram observados 30 tipos de haplótipos (EF566762 – EF566791) ocorrendo nas cinco localidades brasileiras avaliadas (FIGURA 10). O haplótipo mais freqüente foi o h1, compartilhado por 42 indivíduos nas cinco localidades, embora com uma freqüência bastante diferente entre as populações. Outros haplótipos frequentemente compartilhados por diversos indivíduos foram os h3, h4 e h12 com 25, 25 e 13 haplótipos, respectivamente. Somente os haplótipos h1 e h3 estão presentes em todas as populações, sendo que o h3, apesar de possuir uma freqüência absoluta geral inferior a de h1, apresenta-se distribuído de uma forma mais homogênea entre as populações. As populações que apresentam mais haplótipos exclusivos são SL e BH, com oito e sete haplótipos, respectivamente (FIGURA 10). Já RP foi a população com o menor número de haplótipos exclusivos (um), entretanto este dado pode ter sido

1 influenciado pelo número de indivíduos que compõem esta população (ver dados  
2 TABELA 4).

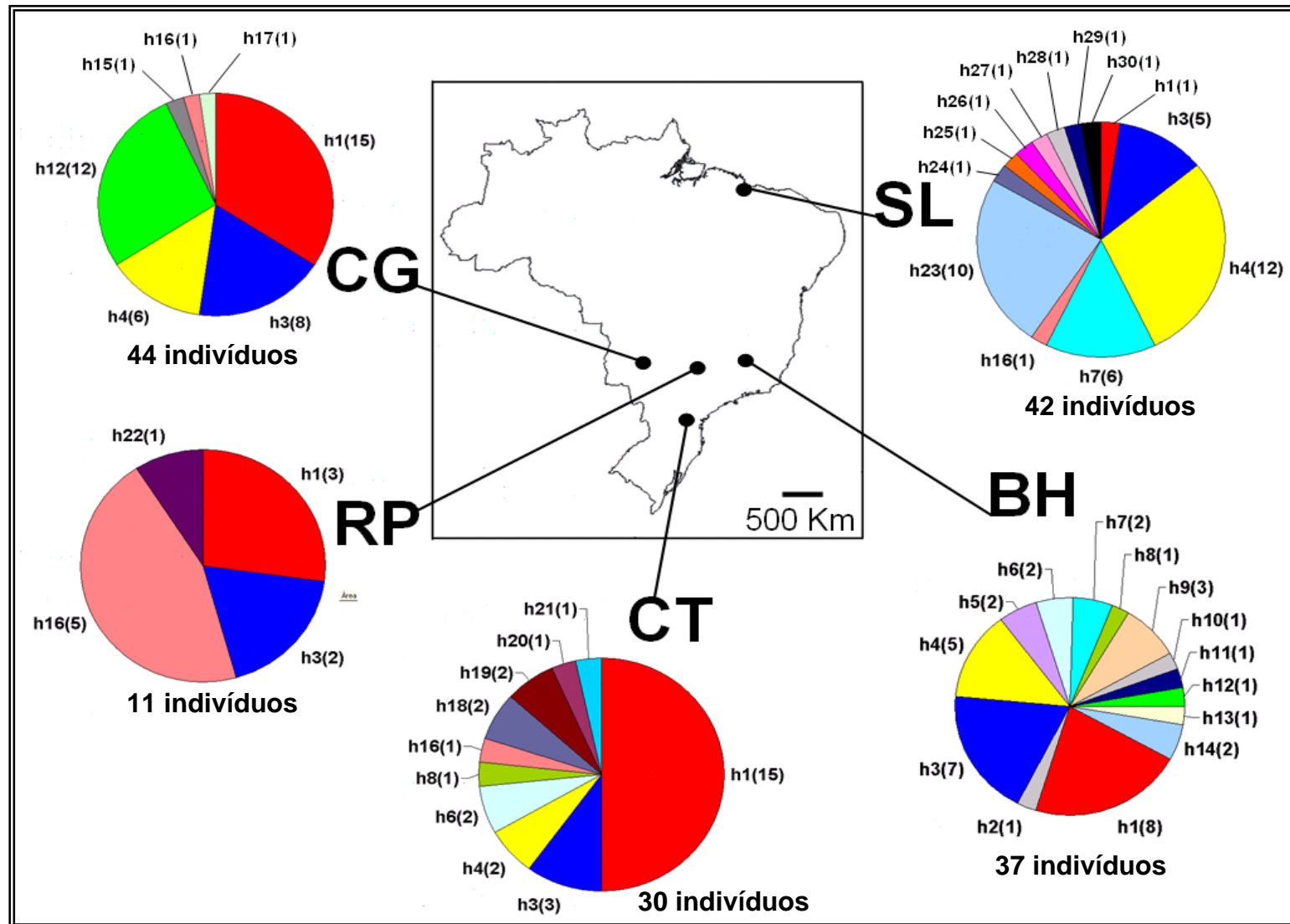
3 A diversidade haplotípica ( $h$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) total foi de 0,88 e 0,016,  
4 respectivamente. A diversidade nucleotídica entre as populações variou entre  
5 0,011 (SL) e 0,019 (CT). O nº. médio de diferenças entre os haplótipos foi de 7,52  
6 nucleotídeos. Estes dados e outros dados de diversidade molecular das  
7 populações avaliadas neste estudo podem ser observados na TABELA 4. Como  
8 esperado, o número de transições nucleotídicas entre os haplótipos foi muito  
9 superior ao de transversões. Entretanto, a razão entre transições/transversões  
10 apresentou-se relativamente baixa em duas populações: CT e SL. Na primeira  
11 esta razão foi influenciada pela presença do haplótipo h18, responsável por  
12 92,3% das transversões em CT (12 em 13). Se este haplótipo for excluído nas  
13 análises de transição e transversão, esta razão (dado não apresentado) se  
14 aproxima dos índices das demais populações (exceto de SL). O haplótipo h18 é  
15 exclusivo de CT e apresenta elevada distância genética (aproximadamente 7%)  
16 em relação aos demais haplótipos brasileiros identificados (FIGURA 11). Já em  
17 SL a razão transição/transversão não foi influenciada particularmente por algum  
18 tipo de haplótipo como em CT. A elevada taxa de transversão em SL apresenta-  
19 se distribuída por vários haplótipos daquela localidade e, de fato, deve estar  
20 influenciada por fatores intrínsecos e ainda desconhecidos daquela localidade.

21 A composição nucleotídica dos haplótipos de COI se manteve  
22 aproximadamente constante entre as diversas populações (TABELA 4). O  
23 conteúdo médio de A + T foi de 70,78%, dentro do esperado para esse marcador  
24 em ancilostomídeos.

25 Os resultados dos testes de neutralidade (TABELA 4 não indicam que as  
26 populações avaliadas encontram-se em expansão populacional. Resultados  
27 positivos nestes testes sugerem que as populações encontram-se sobre um  
28 equilíbrio mutação-deriva genética, sob um processo de seleção balanceadora.  
29 Em contraposição, resultados substancialmente negativos e significantes sugerem  
30 que as mutações ocorridas foram selecionadas por um processo de seleção  
31 natural, ou que ocorreu um processo de expansão populacional. Como observado  
32 na TABELA 4, os resultados negativos apresentados pelos testes de neutralidade  
33 não foram substanciais e significantes. Em CT o resultado negativo apresentado  
34 pelo teste de Tajima's D foi influenciado pelo distinto haplótipo h18 (dado não



- 1 apresentado, ver distância genética em relação aos demais haplótipos na
- 2 FIGURA 11), após a execução de um novo teste excluindo-se este haplótipo. Em
- 3 SL os valores negativos foram muito próximos de zero e não significantes.
- 4



**FIGURA 10:** Distribuição dos 30 haplótipos de COI encontrados nas populações brasileiras de *A. caninum*. Os haplótipos estão numerados de h1-h30 e suas freqüências apresentadas em cada população (números entre parênteses).

**TABELA 4:** Dados de diversidade molecular e testes de neutralidade para avaliar a diversidade molecular das populações brasileiras de *Ancylostoma caninum*.

		mtDNA <i>COI</i> (467nts)					
		BH	CG	CT	RP	SL	total
<b>Diversidade Molecular</b>							
Nº. indivíduos		37	44	30	11	42	164
Nº. haplótipos		14	7	10	4	13	30
Nº. sítios polimórficos		32	17	45	16	28	66
Diversidade haplotípica ( <i>h</i> )		0,90 +/- 0,02	0,77 +/- 0,03	0,74 +/- 0,08	0,74 +/- 0,10	0,84 +/- 0,03	0,88 +/- 0,001
Diversidade nucleotídica ( $\pi$ )		0,018 +/- 0,009	0,014 +/- 0,007	0,019 +/- 0,010	0,016 +/- 0,009	0,011 +/- 0,006	0,016 +/- 0,014
Nº. médio de diferenças nucleotídicas ( <i>K</i> )		8,33 +/- 3,95	6,49 +/- 3,13	8,77 +/- 4,16	7,33 +/- 3,72	5,42 +/- 2,67	7,522
Nº. transições		29	15	32	15	22	-
Nº. transversões		4	2	13	1	7	-
Transições/transversões		7,25	7,5	2,46	15	3,14	-
Nº. <i>indels</i>		0	0	0	0	0	0
Frequência de haplótipos comuns	h1	0,22	0,34	0,50	0,27	0,02	42
	h3	0,19	0,18	0,10	0,18	0,12	25
	h4	0,13	0,14	0,07	0	0,29	25
	H12	0,03	0,27	0	0	0	13
<b>Composição de bases</b>							
Composição nucleotídica	%C	18,96	18,85	19,03	19,14	18,77	18,95
	%T	25,24	25,38	25,30	25,05	25,53	25,30
	%A	45,59	45,53	45,36	45,55	45,37	45,48
	%G	10,21	10,24	10,31	10,26	10,32	10,27
<b>Testes de neutralidade</b>							
Tajima's D (valores <i>P</i> )		0,15 (0,65)	1,93 (0,97)	-1,00 (0,15)	1,30 (0,93)	-0,65 (0,28)	-1,09*
Fs (valores de <i>P</i> )		0,41(0,60)	5,78 (0,96)	2,58 (0,85)	4,63 (0,97)	-0,35 (0,49)	-2,32 *

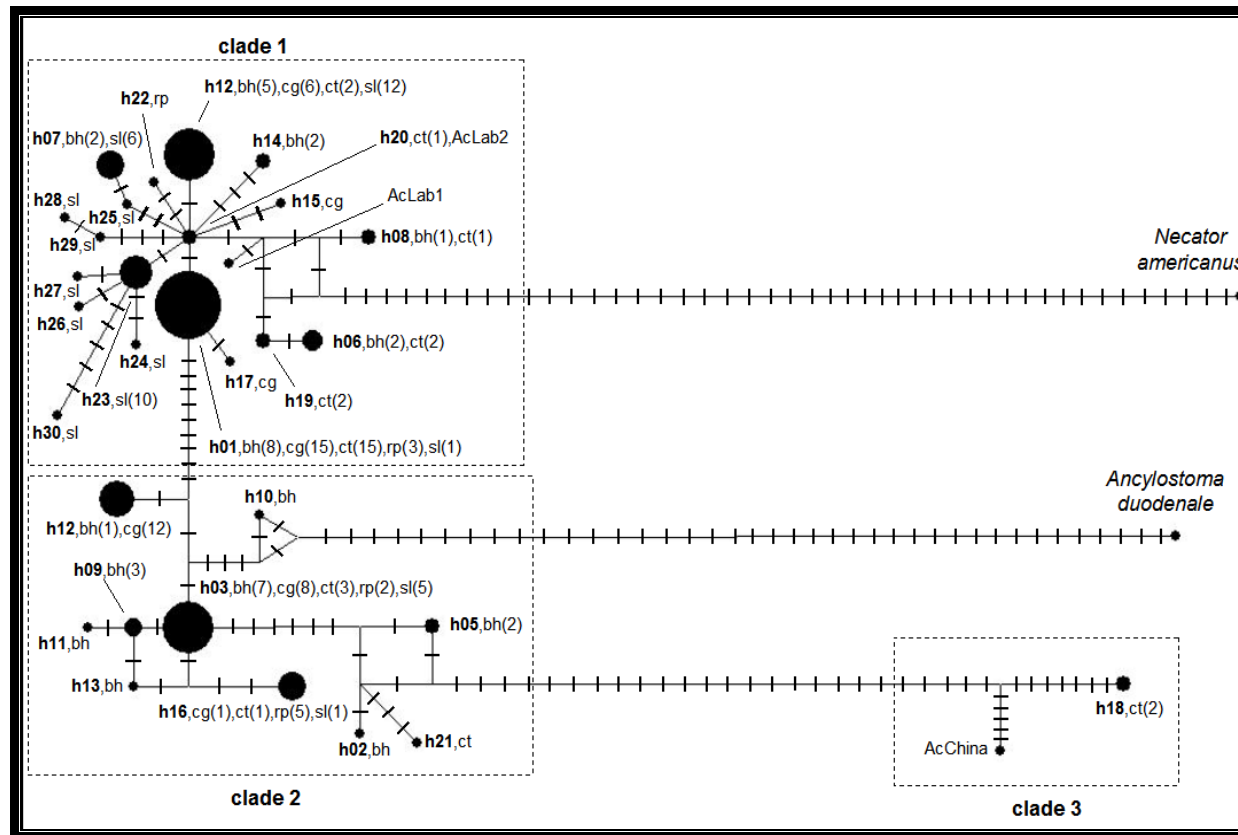
(\* não significante  $P > 0.10$ )

#### 5.2.4. Estrutura genética e geográfica

A estruturação da diversidade genética encontrada nas populações foi verificada pela construção de uma rede de haplótipos e pelas análises estatísticas de variância molecular (AMOVA).

A rede de haplótipos estabelece a relação filogenética entre os alelos encontrados e permite avaliar a existência de correlação entre a estrutura genética e geográfica. Na FIGURA 11 estão representadas as relações filogenéticas entre os diversos haplótipos encontrados nas cinco populações brasileiras de *A. caninum*. Foram incluídos outros haplótipos de *A. caninum* de outras localidades (AcLab1 e AcLab2: EUA e AcChina: China) e haplótipos de *A. duodenale* e *N. americanus* (EU007444 – EU007447 e AJ417719). A relação filogenética entre esses haplótipos evidenciou a presença de três clades genéticas distintas em de *A. caninum*. Duas clades (clade 1 e 2) com a maioria dos haplótipos e com vermes de todas as cinco localidades brasileiras amostradas e uma terceira clade (clade 3) com somente de dois haplótipos: h18 (encontrado em 2 vermes de CT) e um haplótipo chinês (AcChina). A divergência genética entre as clades foi extremamente alta, especialmente entre a clade 3 e as demais (2,48% entre as clades 1 e 2; 6,93% entre clades 1 e 3 e 6,98% entre as clades 2 e 3). Uma característica marcante desta rede filogenética é o grande distanciamento do haplótipo h18 em relação aos demais haplótipos brasileiros identificados, apresentando-se muito mais semelhante à um haplótipo oriundo da China.

As análises de variância molecular (AMOVA) indicaram que aproximadamente 11,75% da variância genética total nos haplótipos foi distribuída entre as localidades brasileiras amostradas ( $P < 0,05$ ), sugerindo uma moderada diferenciação entre as populações ( $\approx \Phi_{ST} = 0,12$ ) (TABELA 5). Esta significativa subestruturação genética nestes nematódeos pode ser ilustrada também pelo fato de que haplótipos de uma mesma localidade estão, frequentemente, agrupados na filogenia (por exemplo, h23-h30 oriundos da localidade SL; FIGURA 11). Além disso, a maioria dos haplótipos identificados foram exclusivos de uma determinada localidade. Os valores de  $\Phi_{ST}$  na comparação par a par entre as populações (TABELA 6) também sugerem, em muitas situações, uma moderada diferenciação populacional.



**FIGURA 11:** Relação filogenética entre os haplótipos brasileiros de COI identificados. Foram incluídos outros haplótipos de *A. caninum* de outras localidades (AcLab1 e AcLab2: EUA e AcChina: China) e haplótipos de *A. duodenale* e *N. americanus*. O número de cópias dos haplótipos estão apresentados entre parênteses (alelos com mais de uma cópia). A área de cada círculo é proporcional à abundância relativa dos haplótipos e os traços representam as substituições nucleotídicas adjacentes entre os alelos.

1 **TABELA 5:** Resultado das análises de variância molecular (AMOVA) realizadas  
 2 com os haplótipos de COI encontrados nas populações brasileiras de *A. caninum*.  
 3 Todos os valores de  $P$  calculados, tanto para os componentes da variância  
 4 quanto para os índices de diferenciação entre as populações ( $\Phi_{ST}$ ) são  
 5 significativos ( $P < 0,05$ )

6

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	% de variação
Entre populações	4	74,177	0,47274	11,75
Dentro das populações	159	564,522	3,55045	88,25
Total	163	638,699	4,02320	

Índice de fixação:  $\Phi_{ST} = 0,11750$

7

8

9 O teste de Mantel utilizado para avaliar a correlação entre distância  
 10 genética (TABELA 6) e geográfica (FIGURA 12) entre as cinco localidades  
 11 brasileiras apresentou uma fraca e não significativa correlação positiva entre  
 12 esses parâmetros ( $r = 0,40$ ; valor de  $p = 0,26$ ).

13

14 **TABELA 6:** Estimativa par a par dos valores de  $\Phi_{ST}$  entre as populações  
 15 brasileiras de *A. caninum*.

16

17

18

19

20

21

22

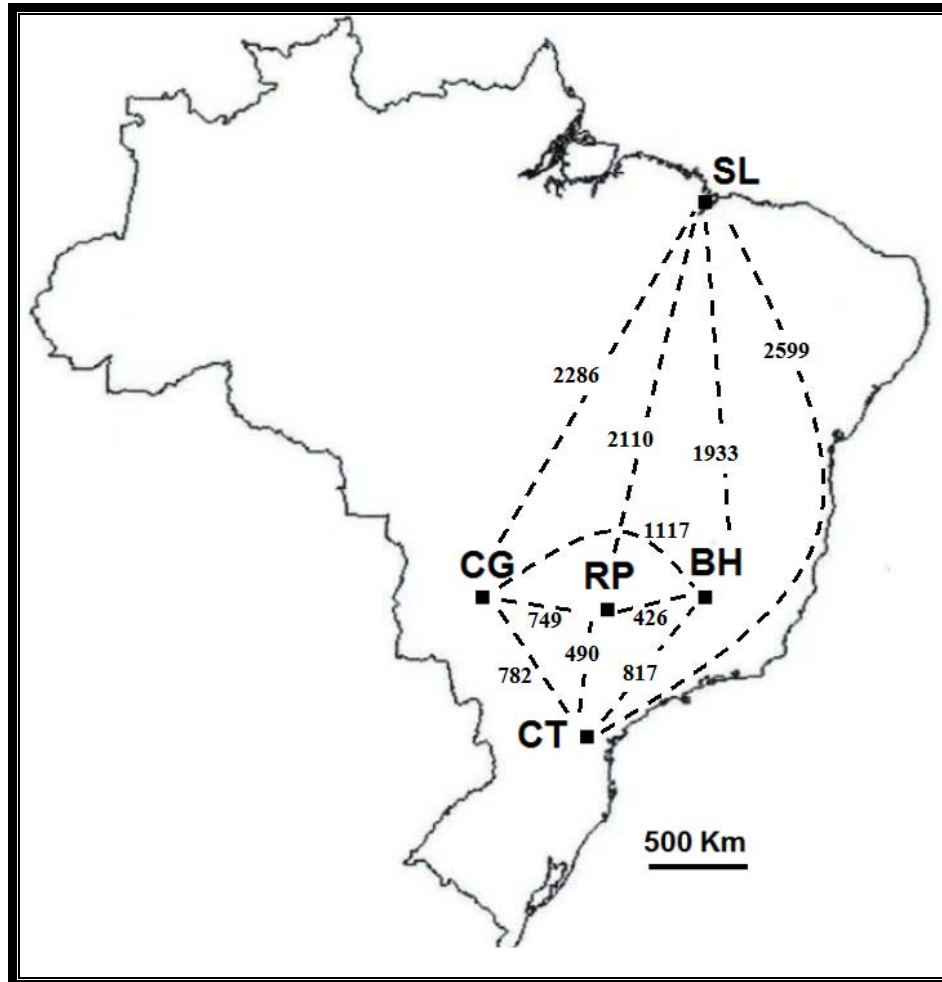
23

24

25

População	BH	CG	CT	RP	SL
BH	0,000				
CG	0,012	0,000			
CT	0,072*	0,096*	0,000		
RP	0,054	0,088*	0,197*	0,000	
SL	0,144*	0,204*	0,080*	0,339*	0,000

\*Significativamente diferente de zero com  $P < 0,05$



1  
2  
3 **FIGURA 12:** Mapa com as distâncias (Km) entre as localidades brasileiras  
4 utilizadas para o teste de Mantel.

5  
6 Estes resultados foram publicados em forma de artigo científico e estão  
7 apresentados no APÊNDICE 2.

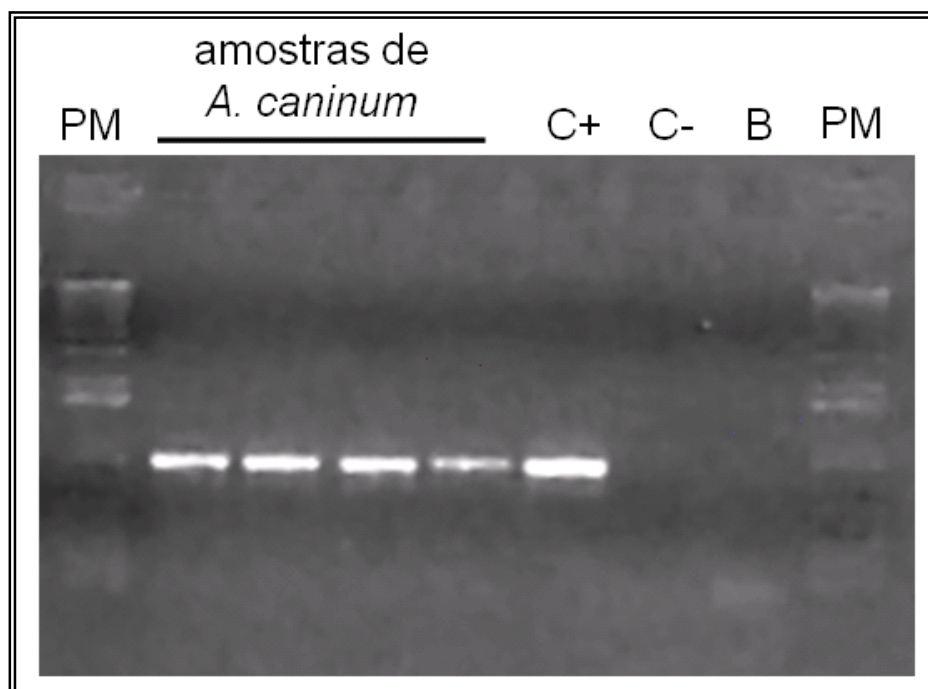
### 8 9 **5.3. Espaços transcritos internos (ITSs)**

#### 10 11 **5.3.1. Amplificação e purificação**

12  
13 Todas as amostras de DNA genômico obtidas foram amplificadas após  
14 reação de PCR utilizando os iniciadores NC2 e NC5 (GASSER et al., 1996),  
15 conforme parâmetros estabelecidos previamente (item 4.4.1). Depois de  
16 padronizada a reação, esta se mostrou eficiente e específica, amplificando uma

1 região de ~800 pb. Em todos os *sets* de amplificação foram utilizados três  
2 controles: controle positivo (amostra de DNA de *A. caninum* previamente  
3 amplificada), controle negativo (amostra de DNA de cão) e branco (água). Os  
4 produtos amplificados foram resolvidos em gel de agarose 0,8% juntamente com  
5 amostras controles (FIGURA 13). De forma geral, a amplificação destes  
6 marcadores foi muito mais eficiente quando comparada à amplificação de COI  
7 devido à presença de inúmeras cópias destes marcadores ao longo do genoma  
8 do *A. caninum*.

9



10

11

12 **FIGURA 13:** Amplificação de ITSs utilizando amostras de DNA genômico de *A.*  
13 *caninum*. PM = 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), C+ = controle positivo,  
14 C- = controle negativo e B = branco.

15

16

17 Assim como para COI, todos os amplicons de ITSs foram purificados  
18 satisfatoriamente com PEG (polietileno glicol 8000, 20% NaCl 2,5M). Os  
19 resultados foram avaliados em gel de agarose 0,8% (dados não apresentados).

20

21

22

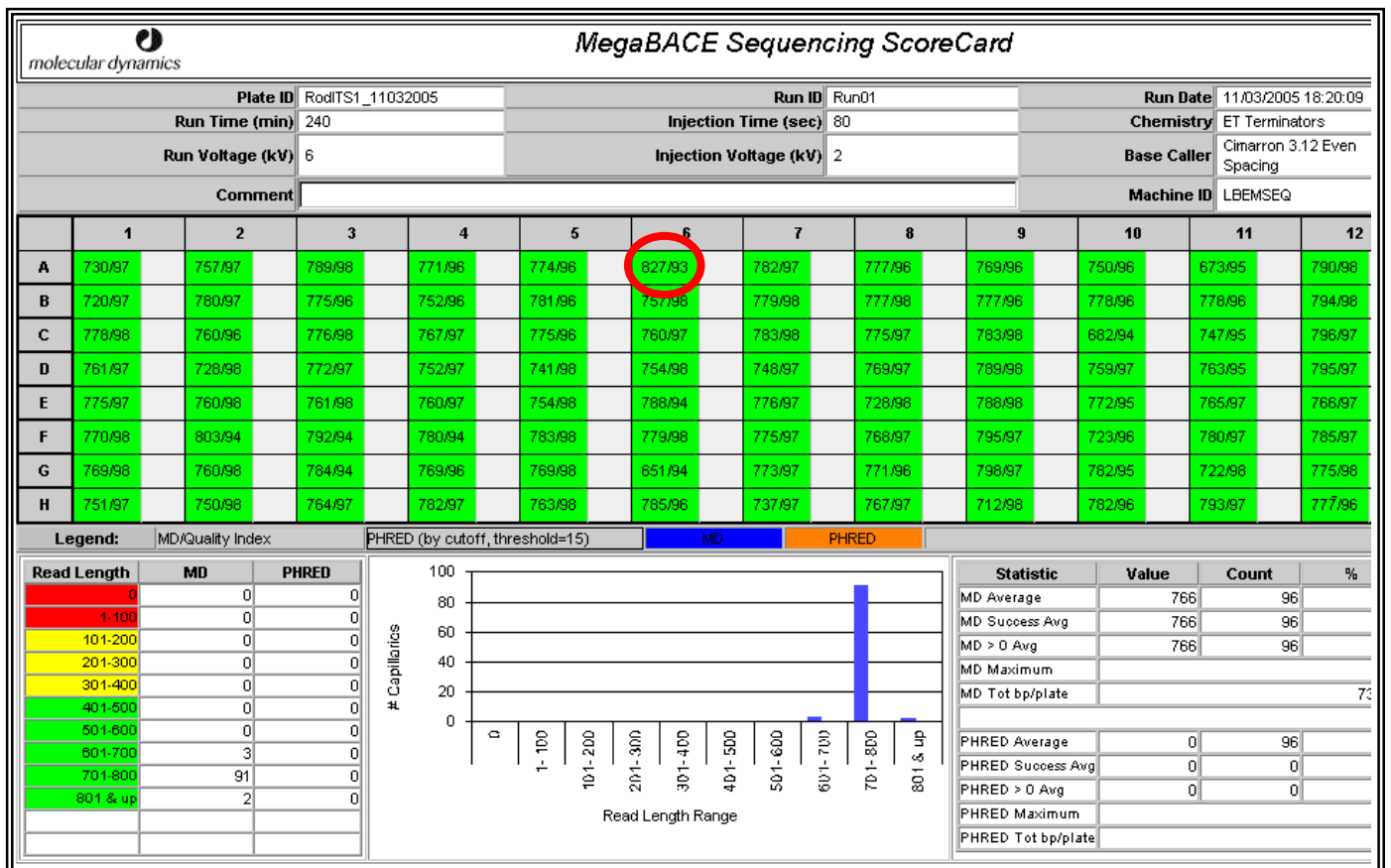


### 1 5.3.2. Sequenciamento e produção dos consensos

2

3 Tanto o iniciador NC2 quanto NC5 mostraram-se igualmente eficientes no  
 4 sequenciamento dos amplicons de ITS, permitindo a obtenção de seqüências de  
 5 até 827 pb, como apresentado na FIGURA 14. Os sequenciamentos destes  
 6 marcadores foram sempre de ótima qualidade, entretanto, como será comentando  
 7 posteriormente, estas seqüências não foram muito informativas como COI.

8



9

10 **FIGURA 14:** ScoreCard exemplificando a qualidade dos sequenciamentos de  
 11 ITSs. Os valores apresentados nos respectivos “poços” representam o tamanho e  
 12 a qualidade da seqüências, respectivamente. Os valores demarcados pelo círculo  
 13 vermelho (827/93), indicam estes parâmetros na maior seqüência de ITS  
 14 produzida.

15

16

17 Inicialmente, foram sequenciados apenas 10 indivíduos (em  
 18 quadruplicatas) de cada localidade (exceto CG = 11 indivíduos), para que fosse

1 possível avaliar a capacidade informacional deste marcador de maneira a evitar  
2 gastos econômicos desnecessários. Como será comentado posteriormente, este  
3 marcador não apresentou características adequadas para o estudo  
4 interpopulacional de *A. caninum*, como uma considerável variabilidade molecular.

### 6 **5.3.3. Diversidade e estrutura genética**

7  
8 Seiscentas e quarenta bases foram analisadas, correspondendo às  
9 posições 56-695 da seqüência DQ438074 (nº. de acesso no GenBank)  
10 compreendendo o ITS-1 (parcialmente), o gene 5.8S e o ITS-2 (parcialmente).  
11 Foram observados apenas seis tipos de haplótipos ocorrendo nas cinco  
12 localidades brasileiras (TABELA 7) após o sequenciamento de 51 indivíduos. Os  
13 haplótipos identificados foram nomeados de a-f e as diferenças entre eles  
14 encontram-se apresentadas na TABELA 7. O haplótipo mais freqüente foi o b,  
15 compartilhado por 37 indivíduos nas cinco localidades brasileiras. Já o menos  
16 freqüente foi o haplótipo f, encontrado em apenas um indivíduo da população de  
17 RP. Os demais haplótipos (a, c, d, e) também apresentaram uma freqüência  
18 reduzida nas populações amostradas.

19 A diversidade haplotípica ( $h$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) total foi extremamente baixa  
20 com valores de 0,465 e 0,0009, respectivamente. O conteúdo global de A + T  
21 destes marcadores nos indivíduos amostrados das cinco localidades brasileiras  
22 foi de 72.56%. A porcentagem de G foi extremamente baixa em todos os  
23 haplótipos, chegando a estar ausente em determinados haplótipos de CT e RP.

24 Em virtude da pequena diversidade molecular apresentada por estes  
25 marcadores ribossomais, apenas a construção da rede filogenética de haplótipos  
26 *Median-Joining* foi realizada, desprezando-se a análise de variância molecular  
27 (AMOVA) neste marcador intraespecífico conservado.

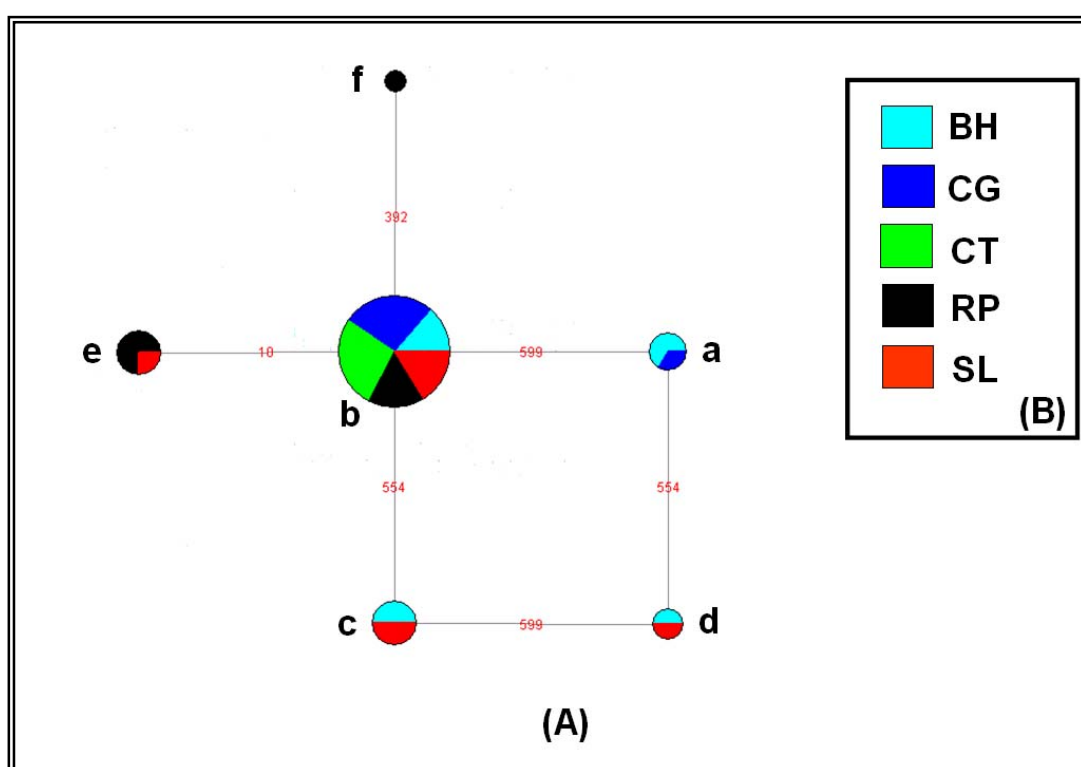
28

**TABELA 7:** Freqüência de ocorrência dos haplótipos de ITSs (640 nucleotídeos) encontrados nas cinco populações brasileiras de *A. caninum*, com os índices de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e haplotípica ( $h$ ) e as composições de nucleotídeos, calculados para cada uma das população e para a espécie toda.

Espaços transcritos internos compreendendo ITS-1, 5.8S e ITS-2 (640 nts)											
Haplótipos	Sítios polimórficos				freqüência	Populações					
	0	2	4	9		BH	CG	CT	RP	SL	Total
	1	9	5	9							
a	T	T	C	G	3	2	1	-	-	-	3
b	.	.	.	A	37	5	10	10	6	6	37
c	.	.	T	A	4	2	-	-	-	2	4
d	.	.	T	.	2	1	-	-	-	1	2
e	.	.	.	A	4	-	-	-	3	1	4
f	.	C	.	A	1	-	-	-	1	-	1
<b>Índices de diversidade</b>											
N	Nº de indivíduos seqüenciados					10	11	10	10	10	51
Nº hap	Nº de haplótipos					4	2	1	3	4	6
$h \pm DP$	Diversidade de haplótipos					0,733+/-0,120	0,182+/-0,144	0	0,600+/-0,130	0,644+/-0,159	0,465+/-0,083
$\pi \pm DP$	Diversidade de nucleotídeos					0,233+/-0,197	0,045+/- 0,071	0	0,166+/-0,157	0,216+/-0,187	0,0009+/-0,0001
<b>Composição nucleotídica</b>											
	%C					17,50	25,00	25,00	35,00	20,00	26,25
	%T					57,50	50,00	50,00	40,00	55,00	48,75
	%A					17,50	22,73	25,00	25,00	22,50	23,81
	%G					7,50	2,27	0,00	0,00	2,50	1,19

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

Na FIGURA 15 estão representadas as relações filogenéticas entre os seis haplótipos encontrados nas cinco populações brasileiras de *A. caninum*. Analisando a relação filogenética entre os alelos, assim como para o marcador *COI*, não foi possível estabelecer uma correlação entre estruturação genética e geográfica.



9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

**FIGURA 15:** (A) Rede *Median-Joining* representando as relações filogenéticas entre os diversos haplótipos de ITSs identificados nas populações brasileiras de *A. caninum*. As áreas dos círculos são proporcionais à frequência de cada haplótipo e as cores representam indivíduos pertencentes às diversas populações, conforme indicado em (B). Em (A), os números sobre as linhas indicam as posições mutantes que diferenciam os haplótipos.

1 A maioria dos haplótipos apresentaram-se dispersos em mais de uma  
2 localidade brasileira (FIGURA 15). Apenas o haplótipo f foi exclusivo de uma  
3 localidade (RP). Estes dados podem ter sido influenciados pelo baixo número de  
4 indivíduos incluídos nesta parte do estudo. De qualquer forma, ao se constatar a  
5 inadequação destes marcadores ribossomais para estudos intraespecíficos em *A.*  
6 *caninum* (pouco polimorficos intraespecificamente), decidiu-se pela interrupção desta  
7 parte do projeto com o intuito de se evitar gastos e tempo desnecessários,  
8 concentrando-se os esforços em marcadores mais informativos e ainda pouco  
9 estudados em ancilostomídeos.

## 10 11 12 **5.4. Microssatélites de DNA**

### 13 14 **5.4.1. Identificação e amplificação de *loci* de microssatélites**

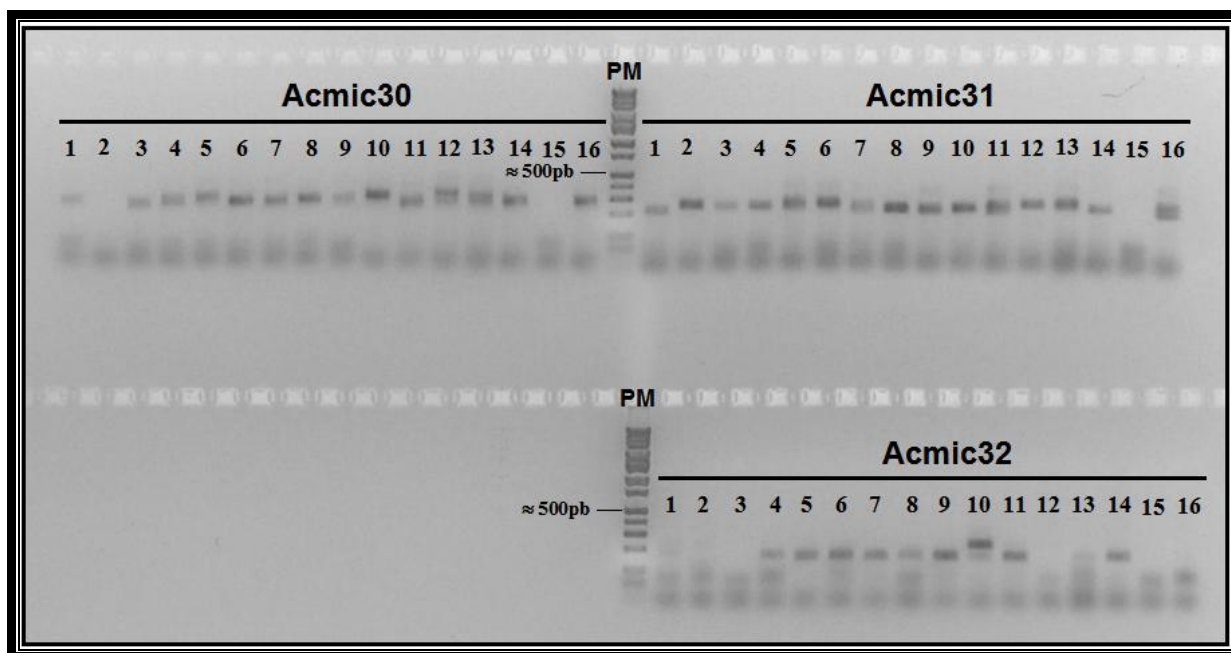
15  
16 Diversos *loci* de microssatélites de DNA foram identificados, conforme  
17 metodologia apresenta no item 4.4.2. O programa *Tandem Repeats Finder* (TRF)  
18 utilizou 104.140 seqüências de DNA de *A. caninum* em busca de *loci* de di, tri e  
19 tetranucleotídeos. Foram selecionados 38 *loci* de microssatélites para serem  
20 submetidos à uma triagem inicial quanto a capacidade de amplificação dos mesmos  
21 por *nested* PCR em tubo único, segundo metodologia descrita por SCHUELKE  
22 (2000).

23 Todos os pares de iniciadores foram submetidos a reações de *nested* PCR  
24 em tubo único em diferentes condições (testando-se diferentes temperaturas de  
25 anelamento, dado não apresentado) para avaliar a capacidade de amplificação dos  
26 fragmentos esperados. A FIGURA 16 ilustra a amplificação dos *loci* Acmic30,  
27 Acmic31 e Acmic32 em indivíduos de *A. caninum*. Nesta figura uma alíquota de 5 $\mu$ l  
28 foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% previamente à genotipagem. Dos  
29 38 *loci* testados apenas sete ( $\approx$  18%) foram satisfatoriamente amplificados e  
30 genotipados. A maioria dos *loci* avaliados por PCR não produziram amplicons  
31 (APÊNDICE 1). Alguns *loci* amplificados apresentaram produtos de PCR espúrios e  
32 não foram incluídos na etapa de genotipagem. Os *loci* amplificados e genotipados  
33 nas cinco populações brasileiras de *A. caninum* foram: Acmic7, Acmic19, Acmic23,

1 Acmic26, Acmic30, Acmic31 e Acmic32. Mesmo para *loci* considerados apropriados  
2 para a genotipagem (FIGURA 16) algumas poucas amostras não foram  
3 satisfatoriamente amplificadas. Este fato pode ser decorrente de polimorfismos nos  
4 sítios de anelamento de iniciadores em determinados indivíduos, impedindo a  
5 amplificação.

6

7



8

9

10 **FIGURA 16:** Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de PCR amplificados  
11 dos *loci* Acmic30, Acmic31 e Acmic32. Os números de 1-16 representam amostras  
12 de DNA de diferentes indivíduos de *A. caninum*. PM representa o padrão de peso  
13 molecular (1Kb DNA Ladder - INVITROGEN).

14

15

#### 16 **5.4.2. Genotipagem e análise dos dados**

17

18 A genotipagem de cada um dos sete *loci* selecionados ocorreu conforme  
19 metodologia descrita anteriormente (SCHUELKE, 2000). Os alelos identificados em  
20 cada *locus* nas populações brasileiras de *A. caninum* e as substâncias fluorescentes  
21 utilizadas na genotipagem estão apresentadas na TABELA 8.

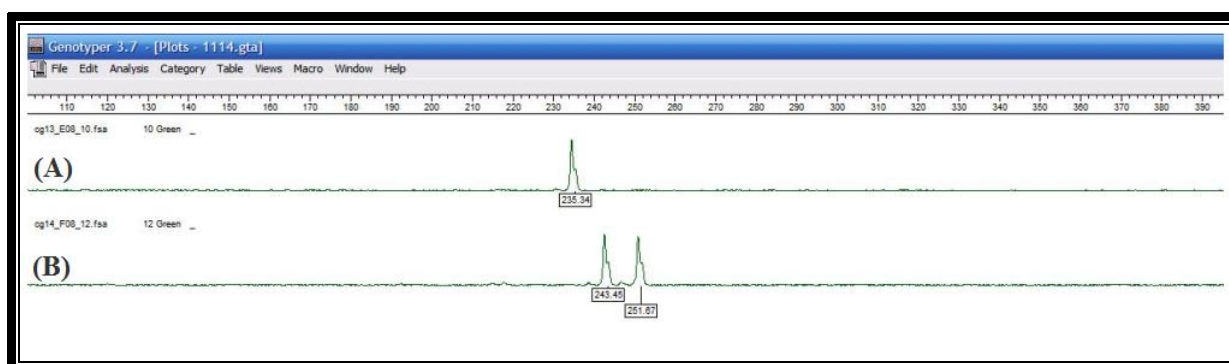
1 **TABELA 8:** *Loci* caracterizados e alelos identificados na genotipagem de populações brasileiras de *A. caninum*.

2

<i>Locus</i>	Repetição	Substância fluorescente	Alelos identificados	Total de alelos	Nº de vermes genotipados				
					BH	CG	CT	RP	SL
Acmic7 (CZ228401)	(TAA)n	6-FAM*	190, 196, 199, 202, 205, 208, 211, 214, 217, 220, 223, 226, 229, 232, 235	15	35	43	34	10	49
Acmic19 (CW971374)	(TGAA)n	6-FAM*	316, 324, 328, 332, 336, 340, 344, 352, 356, 360, 364, 372, 376	13	33	40	34	11	46
Acmic23 (CZ231631)	(TGAA)n	6-FAM*	300, 308, 320, 324, 326, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 352, 356, 360, 364, 368, 376, 378, 380, 384, 420, 440	23	33	37	27	10	46
Acmic26 (CZ221271)	(TACA)n	NED*	204, 208, 212, 214, 218, 222, 226, 230, 234, 238, 242, 246, 250, 254, 262, 286, 294, 308, 312	19	16	26	23	3	28
Acmic30 (CZ220024)	(TTCA)n	PET*	234, 238, 242, 246, 250, 254, 258, 262, 266, 270, 274, 278, 282, 286, 290, 294, 298, 306, 316, 320, 324, 330, 336	23	24	41	29	4	42
Acmic31 (CZ250370)	(TTCA)n	VIC*	204, 208, 212, 215, 219, 223, 227, 231, 235, 239, 243, 247, 251, 255, 259, 263, 275	17	33	45	35	11	46
Acmic32 (CZ249454)	(TGAA)n	6-FAM*	159, 163, 169, 175, 217, 243	6	32	40	36	11	44

3 \* As cores representam a fluorescência emitida na genotipagem

1 A FIGURA 17 ilustra a presença de três tipos alelos do *locus* Acmic31 em dois  
2 indivíduos de *A. caninum* durante o procedimento de identificação dos alelos  
3 (*scoring*) utilizando o programa *Genotyper 3.7 NT*. Em (A) o indivíduo denominado  
4 de CG13 apresentou somente um tipo de alelo, sendo definido como homocigoto  
5 para o *locus* Acmic31 devido a presença de duas cópias de mesmo tamanho (alelo  
6 235). Entretanto em (B), o indivíduo denominado de CG14 apresentou dois tipos de  
7 alelos (alelo 243 e 251) para o mesmo *locus*, sendo caracterizado como um  
8 heterocigoto.



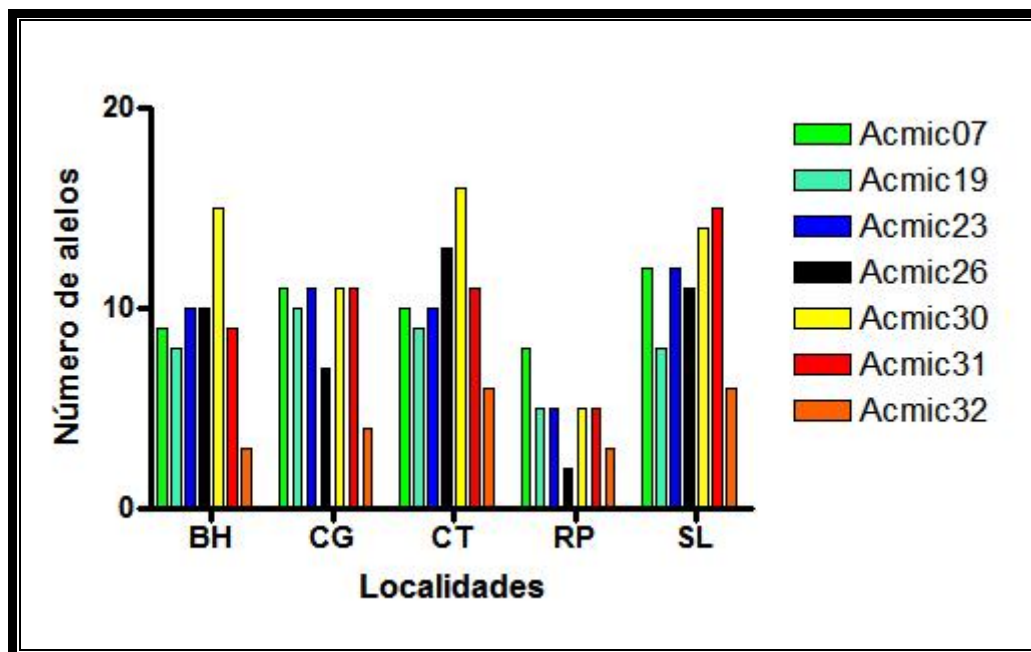
10  
11  
12 **FIGURA 17:** Identificação (*scoring*) de alelos utilizando o programa *Genotyper 3.7*  
13 *NT*. Em (A) e (B) são apresentados dois indivíduos, respectivamente homocigoto e  
14 heterocigoto para o *locus* Acmic31.

15  
16 O número de alelos identificados por população nos sete *loci* genotipados e o  
17 número de alelos exclusivamente encontrados em cada população estão  
18 apresentados, respectivamente, nas FIGURAS 18 e 19.

19 Não foram encontradas evidências de desequilíbrio de ligação entre os *loci*  
20 genotipados (dados não apresentados). Este fato sugere que os alelos encontrados  
21 em todos os *loci* estavam aleatoriamente associados e não geneticamente ligados.  
22 Todas as populações apresentaram um alto grau de diversidade genética, com  
23 polimorfismos em todos os *loci* avaliados. Entretanto, devido ao reduzido número de  
24 indivíduos oriundos da localidade RP (Ribeirão Preto) o número de alelos  
25 encontrados nesta população foi relativamente menor quando comparado com as  
26 demais populações (FIGURA 18). O número de alelos por *locus* variou entre seis  
27 (Acmic 32) e 23 (Acmic23 e Acmic30) (dados apresentados na TABELA 8).



1



2

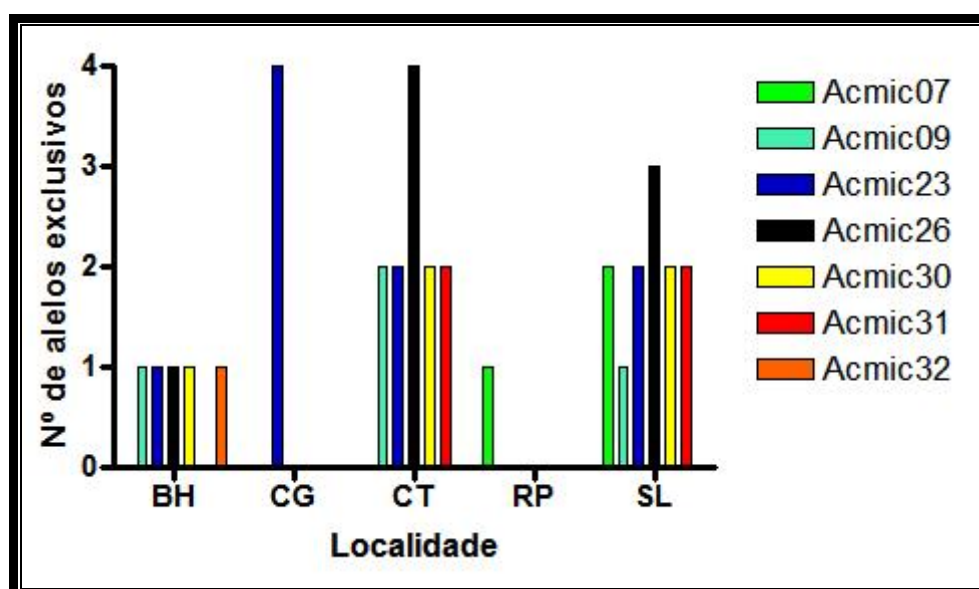
3

4 **FIGURA 18:** Número de alelos identificados nas populações brasileiras de *A.*  
 5 *caninum*.

6

7

8



9

10

11 **FIGURA 19:** Número de alelos exclusivos presentes nas populações brasileiras de  
 12 *A. caninum*.

1 Embora a população RP tenha tido um menor número de alelos identificados  
2 a heterozigidade esperada ( $H_e$ ) para esta população foi similar às demais  
3 (TABELA 9). Conseqüentemente, nenhuma população avaliada apresentou uma  
4 dramática diferença na diversidade genética. Assim, o fato de RP ter apresentado  
5 um número inferior de alelos sugere que este fenômeno se deve ao menor número  
6 de indivíduos amostrados nesta população, como comentado anteriormente.

7 Analisando-se os dados apresentados na TABELA 9, pôde-se constatar um  
8 considerável desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações  
9 avaliadas. Na ampla maioria dos *loci* genotipados nas cinco populações brasileiras a  
10 heterozigidade observada ( $H_o$ ) foi, significativamente, inferior à heterozigidade  
11 esperada ( $H_e$ ). Diversos fatores podem reduzir a heterozigidade, como por  
12 exemplo: acasalamento não aleatório (cruzamento entre parentes – *inbreeding* ou  
13 preferências no acasalamento – *assortative mating*), pequeno tamanho da  
14 população efetiva – *small effective population size* (o efeito da deriva genética é  
15 inversamente proporcional ao tamanho efetivo populacional), seleção, mutação e  
16 migração (efeito Wahlund – *Wahlund effect*).

17 Um outro fator que poderia ocasionar um déficit heterozigótico aparente seria  
18 a presença de alelos nulos devido a polimorfismos nos sítios de anelamento de  
19 iniciadores. Este fato poderia reduzir o número de heterozigotos, uma vez que um ou  
20 mais alelos poderiam não ser amplificados por PCR, devido a polimorfismos  
21 incompatíveis com os iniciadores utilizados. Analisando-se as TABELAS 10, 11, 12 e  
22 13, de fato, pôde-se constatar a presença de alelos nulos em praticamente todos os  
23 *loci* em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Os dados referentes a presença de alelos  
24 únicos na população RP não foi possível de ser calculado pelo programa  
25 MicroChecker devido ao reduzido número de indivíduos desta população.

26 Estes resultados sugerem que o forte desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg  
27 encontrado (TABELA 9) se deve, ao menos em parte, à presença de alelos nulos. O  
28 único *locus* que não apresentou alelos nulos em todas as populações avaliadas foi o  
29 *Acmic19* e os *locus* que apresentaram alelos nulos em todas as populações foram  
30 *Acmic07* e *Acmic30*.

31  
32  
33

1  
2  
3  
4  
5**TABELA 9:** Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ),  $F_{IS}$ , e índice Garza-Williamson (G-W) para cada *loci* utilizado nas cinco populações brasileiras de *A. caninum*.

População		BH (N=36)	CG (N=46)	CT (N=35)	RP (N=11)	SL (N=49)	Média <sup>1</sup> Total <sup>2</sup>
Acmic07	<i>Locus</i>						
	$N_{IG}$	35	43	34	10	49	
	$N_{CG}$	70	86	68	20	98	
	A	9	11	10	8	12	10 <sup>1</sup> , 15 <sup>2</sup>
	$H_E$	0,802	0,835	0,862	0,884	0,903	0,857 <sup>1</sup>
	$H_O$	0,457	0,512	0,353	0,900	0,429	0,530 <sup>1</sup>
	P-val	0,000	0,000	0,000	0,037	0,000	
	$F_{IS}$	0,433	0,390	0,594	-0,019	0,528	0,354 <sup>2</sup>
	P-val	0,000	0,000	0,000	0,724	0,000	0,000 <sup>2</sup>
G-W	0,818	0,846	0,909	0,667	0,923	0,833 <sup>1</sup>	
Acmic19	$N_{IG}$	33	40	34	11	46	
	$N_{CG}$	66	80	68	22	92	
	A	8	10	9	5	8	8 <sup>1</sup> , 13 <sup>2</sup>
	$H_E$	0,606	0,772	0,812	0,758	0,768	0,743 <sup>1</sup>
	$H_O$	0,576	0,775	0,824	0,818	0,717	0,742 <sup>1</sup>
	P-val	0,002	0,043	0,233	0,770	0,216	
	$F_{IS}$	0,050	-0,003	-0,015	-0,084	0,066	0,001 <sup>2</sup>
	P-val	0,392	0,600	0,650	0,806	0,231	0,523 <sup>2</sup>
	G-W	0,800	1,000	0,750	0,833	0,533	0,783 <sup>1</sup>
Acmic23	$N_{IG}$	33	38	27	10	45	
	$N_{CG}$	66	76	54	20	90	
	A	10	11	10	5	12	9,6 <sup>1</sup> , 18 <sup>2</sup>
	$H_E$	0,798	0,795	0,863	0,721	0,879	0,811 <sup>1</sup>
	$H_O$	0,758	0,395	0,630	0,300	0,622	0,541 <sup>1</sup>
	P-val	0,081	0,000	0,050	0,003	0,001	
	$F_{IS}$	0,052	0,507	0,274	0,597	0,295	0,291 <sup>2</sup>
	P-val	0,320	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000 <sup>2</sup>
	G-W	0,476	0,314	0,500	0,357	0,600	0,450 <sup>1</sup>
Acmic26	$N_{IG}$	16	26	23	3	21	
	$N_{CG}$	32	52	46	6	42	
	A	10	7	13	2	11	8,6 <sup>1</sup> , 18 <sup>2</sup>
	$H_E$	0,871	0,591	0,882	0,333	0,863	0,708 <sup>1</sup>
	$H_O$	0,625	0,538	0,522	0,333	0,381	0,480 <sup>1</sup>
	P-val	0,024	0,490	0,000	1,000	0,000	
	$F_{IS}$	0,289	0,091	0,414	0,000	0,565	0,217 <sup>2</sup>
	P-val	0,012	0,274	0,000	1,000	0,000	0,022 <sup>2</sup>
	G-W	0,400	0,259	0,464	0,250	0,407	0,356 <sup>1</sup>
Acmic30	$N_{IG}$	24	41	29	4	44	
	$N_{CG}$	48	82	58	8	88	

	A	15	11	16	5	14	12,2 <sup>1</sup> , 23 <sup>2</sup>
	H <sub>E</sub>	0,913	0,881	0,917	0,858	0,880	0,890 <sup>1</sup>
	H <sub>O</sub>	0,458	0,341	0,655	0,500	0,614	0,514 <sup>1</sup>
	P-val	0,000	0,000	0,034	0,070	0,000	
	F <sub>IS</sub>	0,503	0,615	0,289	0,454	0,306	0,404 <sup>2</sup>
	P-val	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	0,000 <sup>2</sup>
	G-W	0,600	0,550	0,667	0,385	0,583	0,557 <sup>1</sup>
Acmic31	N <sub>IG</sub>	33	45	35	11	46	
	N <sub>CG</sub>	66	90	70	22	92	
	A	9	11	11	5	15	10,2 <sup>1</sup> , 17 <sup>2</sup>
	H <sub>E</sub>	0,767	0,841	0,851	0,714	0,896	0,814 <sup>1</sup>
	H <sub>O</sub>	0,667	0,844	0,457	0,364	0,783	0,623 <sup>1</sup>
	P-val	0,292	0,103	0,000	0,041	0,106	
	F <sub>IS</sub>	0,133	-0,004	0,467	0,503	0,128	0,262 <sup>2</sup>
	P-val	0,102	0,609	0,000	0,009	0,014	0,002 <sup>2</sup>
	G-W	0,642	0,846	0,687	0,500	0,789	0,693 <sup>1</sup>
	Acmic32	N <sub>IG</sub>	32	40	35	11	44
N <sub>CG</sub>		64	80	70	22	88	
A		3	4	6	3	6	4,4 <sup>1</sup> , 6 <sup>2</sup>
H <sub>E</sub>		0,543	0,655	0,612	0,697	0,686	0,639 <sup>1</sup>
H <sub>O</sub>		0,344	0,400	0,600	0,364	0,500	0,442 <sup>1</sup>
P-val		0,013	0,000	0,933	0,039	0,006	
F <sub>IS</sub>		0,371	0,392	0,021	0,490	0,273	0,288 <sup>2</sup>
P-val		0,006	0,000	0,530	0,023	0,006	0,000 <sup>2</sup>
G-W		0,214	0,190	0,273	0,214	0,273	0,233 <sup>1</sup>

1 N<sub>IG</sub> = número de indivíduos genotipados; N<sub>CG</sub> = número de cópias gênicas; A =  
2 número de alelos identificados; H<sub>E</sub> = heterozigosidade esperada; H<sub>O</sub> =  
3 heterozigosidade observada; F<sub>IS</sub> = “índice de estruturação dos indivíduos em uma  
4 subpopulação”; G-W = índice de Garza-Williamson.

5

6

7

1 **TABELA 10:** Análises de alelos nulos na população BH.

População		BH		
<i>Loci</i>	Presença de alelos nulos	$N_f$	$N_e$	$N_o$
Acmic07	sim	<b>0,203</b>	7,3	19
Acmic19	não	<b>0,061</b>	12,4	15
Acmic23	não	0,036	7	9
Acmic26	sim	<b>0,120</b>	2,5	6
Acmic30	sim	<b>0,239</b>	12,5	13
Acmic31	não	0,052	8	11
Acmic32	sim	<b>0,159</b>	14,2	20

2  $N_f$  = frequência de alelos nulos calculada (valores em negrito de  $N_f$  representam os  
3 *loci* que se desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $N_e$  = alelos nulos  
4 esperados;  $N_o$  alelos nulos observados.

5

6

7

8

9 **TABELA 11:** Análises de alelos nulos na população CG.

População		CG		
<i>Loci</i>	Presença de alelos nulos	$N_f$	$N_e$	$N_o$
Acmic07	sim	<b>0,185</b>	7,5	21
Acmic19	não	-0,018	9,5	9
Acmic23	sim	<b>0,245</b>	7,8	23
Acmic26	não	0,053	10,9	12
Acmic30	sim	<b>0,298</b>	5,3	27
Acmic31	não	0,009	7,5	7
Acmic32	sim	<b>0,173</b>	14,1	24

10  $N_f$  = frequência de alelos nulos calculada (valores em negrito de  $N_f$  representam os  
11 *loci* que se desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $N_e$  = alelos nulos  
12 esperados;  $N_o$  alelos nulos observados.

13

1 **TABELA 12:** Análises de alelos nulos na população CT.

População		CT		
<i>Loci</i>	Presença de alelos nulos	$N_f$	$N_e$	$N_o$
Acmic07	sim	<b>0,286</b>	5,1	22
Acmic19	não	-0,018	6,8	6
Acmic23	sim	<b>0,130</b>	3,7	10
Acmic26	sim	<b>0,197</b>	3,1	11
Acmic30	sim	<b>0,134</b>	2,8	10
Acmic31	sim	<b>0,225</b>	5,6	19
Acmic32	não	-0,011	13,8	14

2  $N_f$  = frequência de alelos nulos calculada (valores em negrito de  $N_f$  representam os  
3 *loci* que se desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $N_e$  = alelos nulos  
4 esperados;  $N_o$  alelos nulos observados.

5

6

7

8

9

10 **TABELA 13:** Análises de alelos nulos na população SL.

População		SL		
<i>Loci</i>	Presença de alelos nulos	$N_f$	$N_e$	$N_o$
Acmic07	sim	<b>0,256</b>	5,2	28
Acmic19	não	0,020	11	13
Acmic23	sim	<b>0,148</b>	5,1	17
Acmic26	sim	<b>0,227</b>	2,6	11
Acmic30	sim	<b>0,147</b>	5,7	17
Acmic31	sim	0,058	5,2	10
Acmic32	sim	<b>0,130</b>	14,1	22

11  $N_f$  = frequência de alelos nulos calculada (valores em negrito de  $N_f$  representam os  
12 *loci* que se desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg);  $N_e$  = alelos nulos  
13 esperados;  $N_o$  alelos nulos observados.

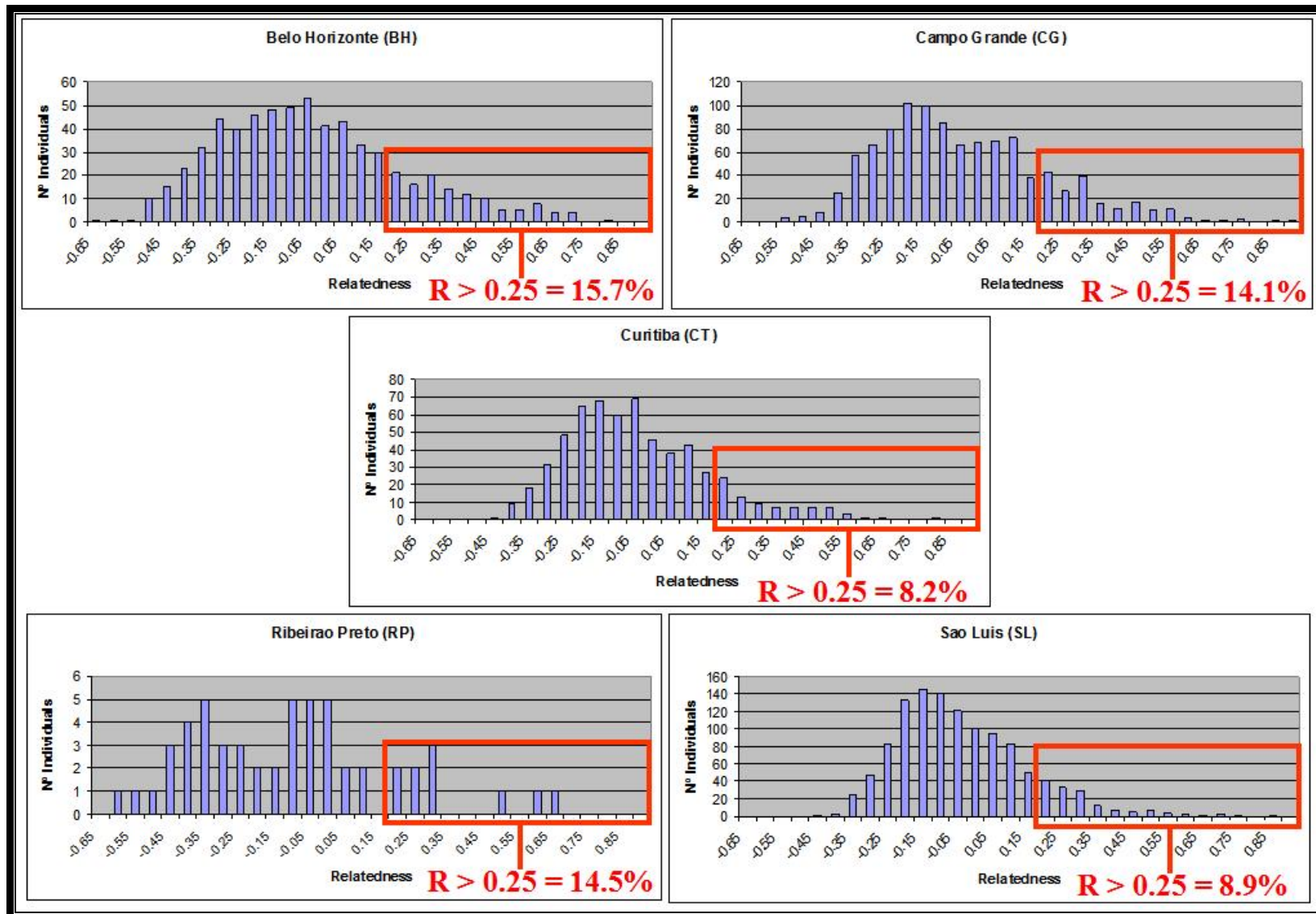
14

1           Analisando-se os dados de  $F_{IS}$  da TABELA 9, estes valores apresentam-se,  
2 no mínimo, moderadamente elevados ( $F_{IS} > 0,35$ ) na maioria dos *loci* com valores  
3 significativos ( $P < 0,05$ ). Estes valores podem sugerir a ocorrência de *inbreeding*  
4 (cruzamento entre parentes próximos) entre os indivíduos amostrados, contribuindo  
5 para um déficit heterozigótico ao longo das gerações. Em virtude dessa possibilidade  
6 estar ocorrendo, como sugerido pelos valores moderados de  $F_{IS}$  apresentados,  
7 utilizou-se um teste de análise de parentesco (*relatedness*) entre os indivíduos  
8 amostrados. Estes resultados estão apresentados na FIGURA 20. Valores com  
9 índices de parentesco ( $r$ ) maiores que 0,25 ( $r > 0,25$ ) indicam algum tipo de relação  
10 parental na comparação par a par entre os indivíduos analisados em cada  
11 população. Os resultados apresentados na FIGURA 20 indicam a presença de  
12 indivíduos aparentados nas populações amostradas. A proporção desses indivíduos  
13 nas populações é relativamente moderada (maior que 8% em todas as populações,  
14 média de 12,28%), sugerindo que a relação de proximidade parental (*relatedness*)  
15 entre os indivíduos das populações amostradas poderia influenciar o equilíbrio de  
16 Hardy-Weinberg e padrão de estrutura genética (efeito Wahlund).

17           Um outro dado apresentado na TABELA 9 refere-se ao índice de Garza-  
18 Williamson (G-W), utilizado para avaliar efeitos gargalo (*bottleneck effect*) nas  
19 populações amostradas. Estes valores variam entre 0 – 1. Valores de G-W próximos  
20 de 0 indicam que uma dada população pode ter sofrido uma dramática redução  
21 populacional. Este fenômeno provocaria uma redução do tamanho efetivo na  
22 população, aumentando as chances da deriva genética promover uma diferenciação  
23 populacional. Entretanto, os valores de G-W encontrados não sugerem, em uma  
24 análise global, a ocorrência de efeito gargalo nas populações amostradas. Os  
25 menores valores entre as populações avaliadas foram encontrados em RP,  
26 provavelmente em função do reduzido número de indivíduos amostrados nesta  
27 população. O marcador com os menores valores de G-W foi o Acmic32, em virtude  
28 de ser o *locus* com o menor polimorfismo. Embora este parâmetro seja sensível para  
29 avaliar gargalos populacionais ele deve ser interpretado com cautela em função de  
30 não estar associado a testes estatísticos (utilizando-se o programa Arlequin 3.11).

31

32



1

2 FIGURA 20: Proporção de indivíduos aparentados nas populações brasileiras de *A. caninum* amostradas.



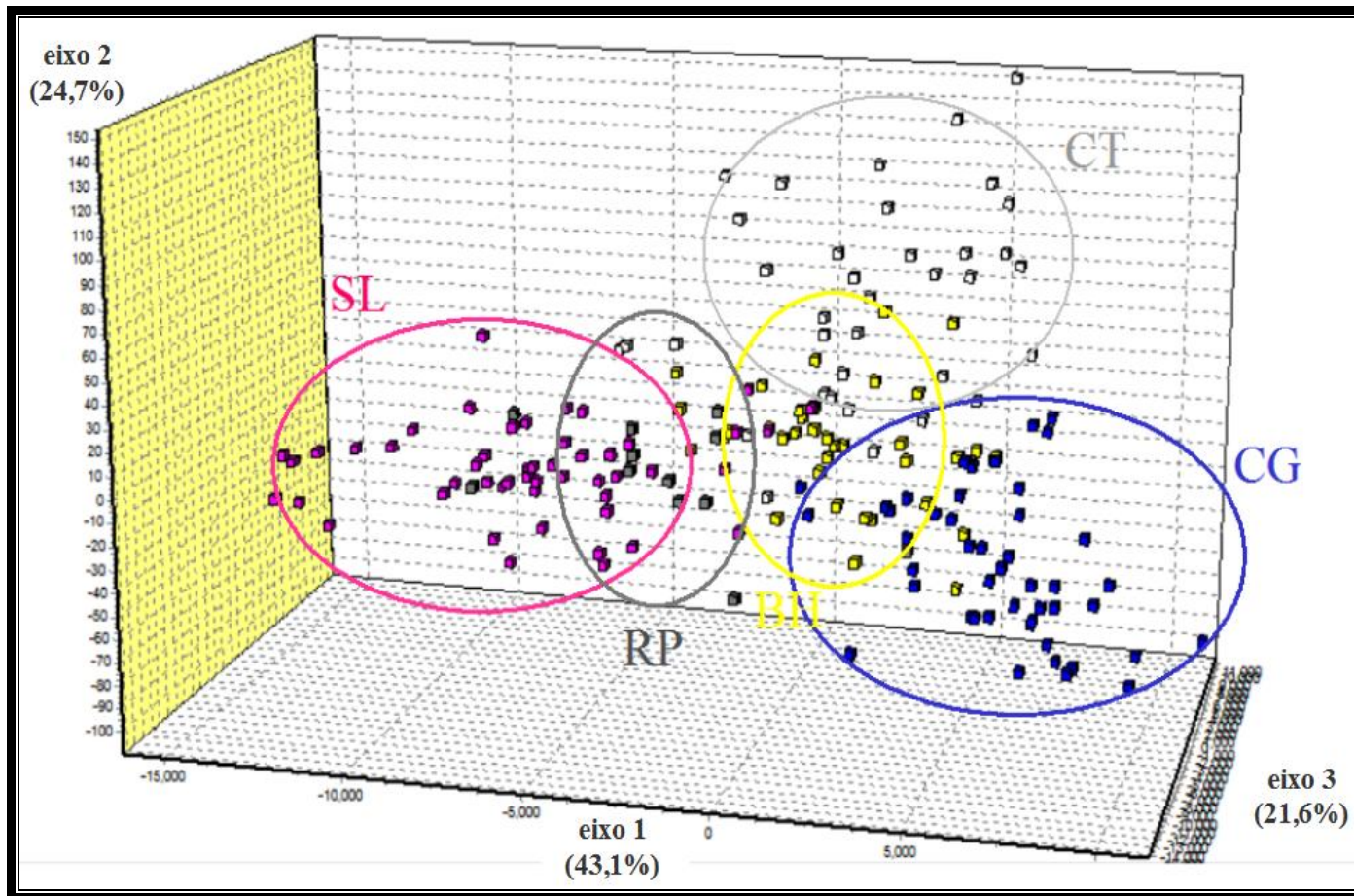
Os valores par a par de  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  foram calculados entre todas as populações genotipadas, baseando-se nos dados dos sete *loci* de microssatélites (TABELA 14). Assim como observado utilizando-se o marcador mitocondrial, os resultados estatisticamente significativos (especialmente os valores de  $R_{ST}$ ) também sugerem uma moderada diferenciação entre algumas populações brasileiras amostradas.

**TABELA 14:** Estimativa par a par dos valores de  $R_{ST}$  (diagonal abaixo) e  $F_{ST}$  (diagonal acima) entre as populações brasileiras de *A. caninum* utilizando os microssatélites de DNA.

População	BH	CG	CT	RP	SL
BH	0,000	0,036*	0,022*	0,022	0,053*
CG	0,109*	0,000	0,013	0,087	0,049
CT	0,037	0,016	0,000	0,064	0,038
RP	0,082*	0,221*	0,107*	0,000	0,036
SL	-0,009	0,143*	0,080*	0,038	0,000

\*  $P < 0.05$  (nível de significância  $< 0,05$ )

Utilizando-se os dados genotípicos, foram realizadas análises tridimensionais de PCA (*principal component analysis*) entre todos os indivíduos das cinco populações (FIGURA 21). Da mesma forma que as análises de  $R_{ST}$  e  $F_{ST}$ , observou-se uma moderada diferenciação entre as populações brasileiras amostradas. A maioria dos indivíduos de uma mesma população estão agrupados próximos uns aos outros. O eixo mais importante nesta análise é o eixo 1, sugerindo que as populações mais divergentes seriam CG e SL. De fato, o valor de  $R_{ST}$  entre estas duas populações sugere uma moderada diferenciação genética (TABELA 14).



1

2

3 **FIGURA 21:** Análises de *PCA* (*principal component analyses*) utilizando-se os dados genotípicos dos vermes das cinco  
 4 populações brasileiras de *A. caninum*. Cada quadrado representa um indivíduo com seus dados genotípicos multi-*locus* e suas  
 5 cores indicam a origem populacional. Os círculos coloridos demonstram o agrupamento da maioria dos vermes de cada  
 6 população.

As análises de AMOVA foram realizadas para examinar a divisão da variação genética dentro e entre as populações (TABELA 15). A proporção da variação dentro das populações ( $R_{ST} = 91.17\%$ ) foi muito maior que entre as populações ( $R_{ST} = 8.85\%$ ). Contudo, estes dados indicam uma baixa/moderada diferenciação entre as populações avaliadas, em concordância com os resultados prévios apresentados.

**TABELA 15:** Resultado das análises de variância molecular (AMOVA) realizadas nas populações brasileiras de *A. caninum* utilizando-se os sete *loci* de microssatélites de DNA.

Fonte de variação		g.l.*	Soma dos quadrados	Componentes da variância	% de variação
Entre populações	$R_{ST}$	4	3840,17	14,83	8,85
	$F_{ST}$	4	54,21	0,18	6,12
Entre indivíduos dentro das populações	$R_{ST}$	172	27576,06	44,41	26,49
	$F_{ST}$	172	523,889	0,83154	27,90
Entre indivíduos	$R_{ST}$	177	15566	108,46	64,68
	$F_{ST}$	177	298	1,96678	65,99
Total	$R_{ST}$		46982,23	167,70	
	$F_{ST}$		876,10	2,98	
Índices de fixação (para os 7 <i>loci</i> )	Divergência alélica ( $R_{ST}$ )			$F_{IS} = 0,290$ $F_{ST} = 0,088$ $F_{IT} = 0,353$	
	Frequência alélica ( $F_{ST}$ )			$F_{IS} = 0,297$ $F_{ST} = 0,061$ $F_{IT} = 0,340$	

Todos os valores de  $P$  calculados para os índices de fixação foram estatisticamente significativos ( $P < 0.05$ )

## 5.5. AcASP-2

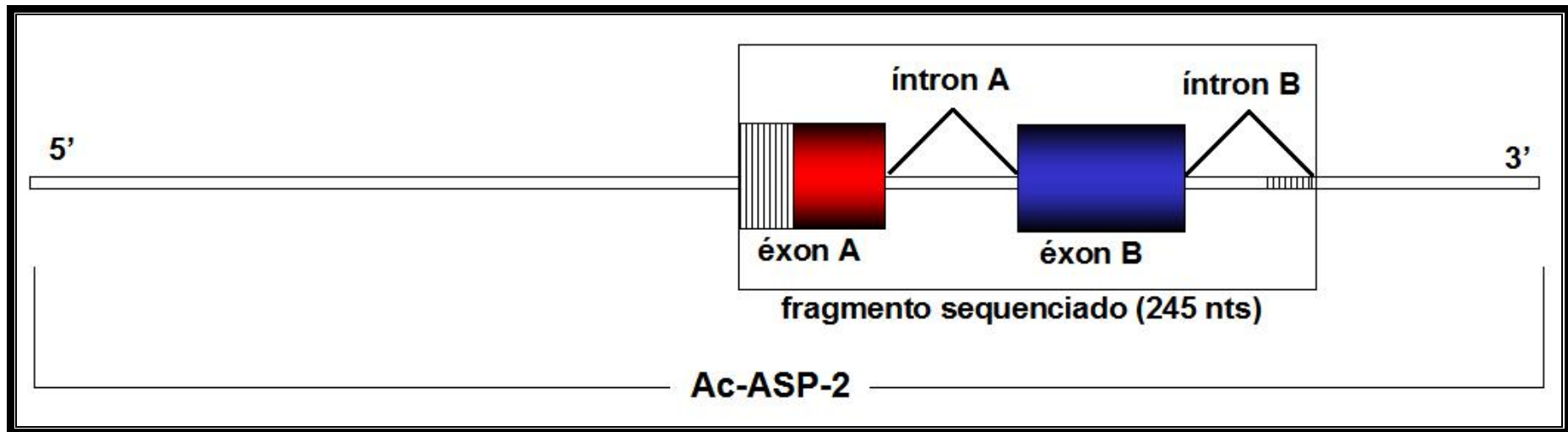
### 5.5.1. Iniciadores, PCR e arquitetura genômica identificada

Em virtude da ausência de informações disponíveis com relação a arquitetura genômica do gene Ac-ASP-2 (número e tamanho dos éxons e íntrons), o primeiro passo para a amplificação de um fragmento deste gene foi a síntese de diferentes conjuntos de iniciadores. Esta etapa foi fundamental para a escolha dos iniciadores que amplificavam corretamente o maior fragmento do gene Ac-ASP-2. Os conjuntos de iniciadores foram sintetizados tendo como base a sequência de mRNA precursor (AF089728) responsável pela codificação da proteína Ac-ASP-2. A combinação dos diferentes conjuntos de iniciadores testados cobriram praticamente toda a extensão dessa sequência (TABELA 16).

Os iniciadores *SET 3 U* (iniciador direto) e *SET 3 L* (iniciador reverso) foram escolhidos para serem utilizados neste estudo por amplificarem adequadamente uma considerável região da proteína secretada. A maioria dos iniciadores sintetizados (TABELA 16) não amplificaram nenhum fragmento ou amplificaram um fragmento inferior ao produzido pelos iniciadores selecionados neste estudo. Foram sequenciados 245 nucleotídeos, sendo 135 oriundos de éxons e 109 de íntrons. Os éxons sequenciados correspondem às posições 419-553 da sequência AF089728 depositada no GenBank.

Foram identificados dois éxons denominados de éxon A (sequenciado parcialmente) e éxon B (sequenciado completamente). O éxon A e o éxon B estão compreendidos entre as posições 419-466 e 467-553 da sequência AF089728, respectivamente. Além disso, foram identificadas duas regiões não codificantes denominadas de íntron A (sequenciado completamente) e íntron B (sequenciado incompletamente). Os tamanhos dos íntrons A e B indentificados foram de 64 e 45 nucleotídeos, respectivamente. A FIGURAS 22 e 23 ilustram a arquitetura genômica sequenciada do gene Ac-ASP-2.

1  
2  
3  
4



5  
6  
7  
8  
9  
10  
11

**FIGURA 22:** Esquema ilustrativo das regiões sequenciadas do gene Ac-ASP-2. As porções hachuradas do éxon A e íntron B representam as regiões não sequenciadas destes segmentos.

1 **TABELA 16:** Iniciadores sintetizados para amplificação genômica de Ac-ASP-2.

<i>Locus</i>	Iniciadores	Seqüências	Posição anelamento*
ASP2 SET1	SET 1 U	5' TGC CAA AGG ACA GGC AAA 3'	152
	SET 1 L	5' TTG TGC ACG GGT TTC CTT 3'	603
ASP2 SET2	SET 2 U	5' TTT GGC TCT CTT GGC TGT 3'	35
	SET 2 L	5' TTT GCC TGT CCT TTG GCA 3'	169
ASP2 SET3	SET 3 U	5' ACA ACG CAG TTG TGG AAC 3'	419
	SET 3 L	5' TTG TGC ACG GGT TTC CTT 3'	602
ASP2 SET4	SET 4 U	5' TTG CCA AAG GAC AGG CAA 3'	151
	SET 4 L	5' ACC ATA CTT CGC AAG CTC AC 3'	398
ASP2 SET5	SET 5 U	5' GAA TGA CCG ACG AAG CCC 3'	91
	SET 5 L	5' CGA GCC ACA GTC AGA GTC 3'	623
ASP2 SET6	SET 6 U	5' CAG GCT AGT GAC GGT TGG 3'	357
	SET 6 L	5' CCT GCC AGA CCA TCT GAG 3'	480
ASP2 SET7	SET 7 U	5' CAG ATG GTC TGG CAG GAG 3'	465
	SET 7 L	5' CGA GCC ACA GTC AGA GTC 3'	623
ASP2 SET8	SET 8 U	5' CGG GAA ATG CTC CGA AGG 3'	181
	SET 8 L	5' GCC AAC TCC CTT CCT GTG 3'	302
ASP2 SET9	SET 9 U	5' CGA CAC AAC CAA CGA TGT 3'	1
	SET 9 L	5' TAA CGC TGT TGT ACG TTG G 3'	700
ASP2 SET10	SET 10 U	5' TGC GGA AAT AAT GGA ATG ACC G 3'	10
	SET 10 L	5' CAC GCA CGA CGC AAA G 3'	597

2

3

\*Posição de anelamento na seqüência AF089728 (mRNA codificante)



### 5.5.2. Diversidade genética e aminoacídica

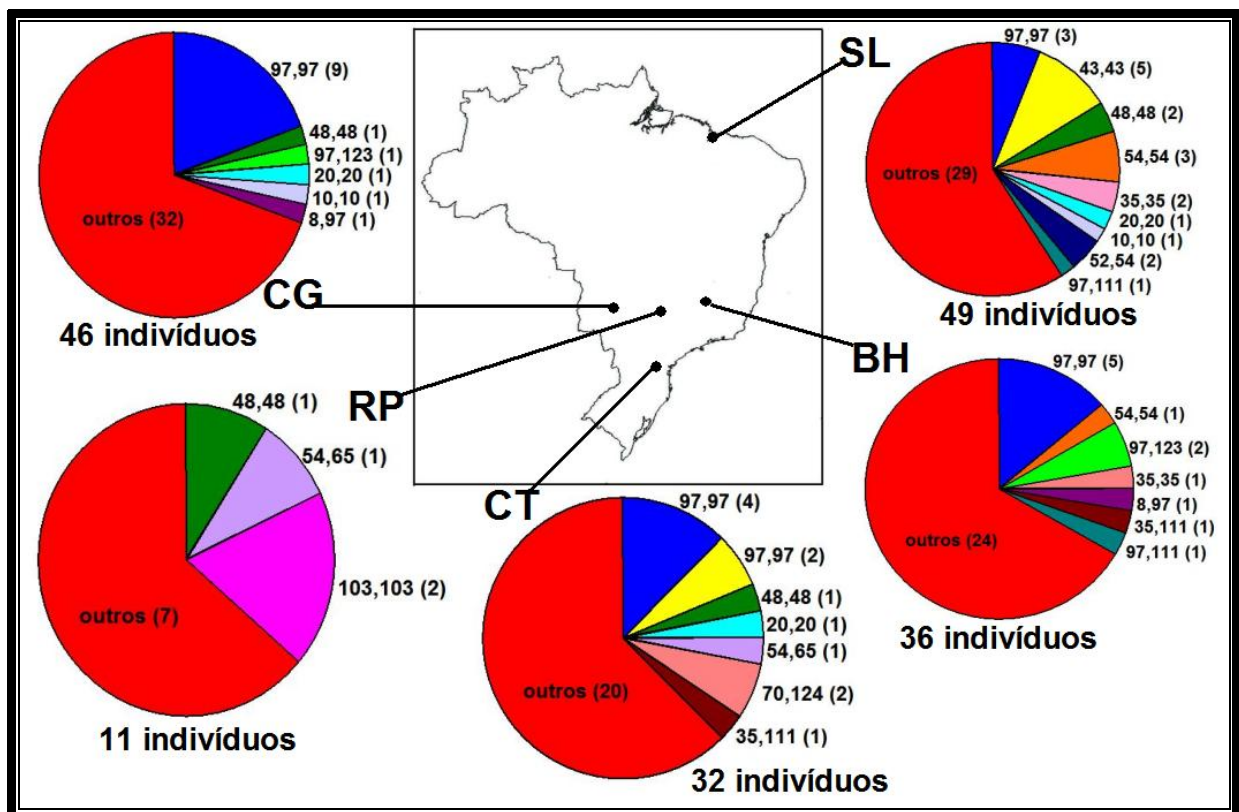
Foram sequenciados 245 nucleotídeos próximos à extremidade 3' do gene Ac-ASP-2 (FIGURA 22). Analisando-se todo o segmento sequenciado (éxons e íntrons) foram identificados, após a reconstrução alélica utilizando-se o algoritmo EM do programa Arlequin, 149 alelos ocorrendo nas cinco localidades brasileiras amostradas (APÊNDICE 3). O excesso de alelos identificados foi consequência do alto grau polimórfico nas regiões não codificantes (íntrons). Os números de sítios polimórficos encontrados em cada região foram oito, 27, oito e 12 para os éxons A, íntron A, éxon B e íntron B, respectivamente (organização apresentada na FIGURA 23). Este resultado não foi inesperado em função destas regiões apresentarem baixa pressão seletiva quando comparadas aos éxons. A distribuição dos genótipos formados pelos 149 alelos identificados nos 245 nucleotídeos sequenciados (considerando-se os éxons e íntrons) estão apresentados na FIGURA 24. O genótipo mais comum foi o 97,97, compartilhado por 21 indivíduos em todas as localidades brasileiras, exceto RP. Provavelmente este genótipo não foi encontrado em RP em função do baixo número amostral desta localidade. Os outros genótipos comuns foram o 43,43 e o 48,48 (FIGURA 24 e TABELA 17), entretanto, compartilhado por um número muito menor de indivíduos, sete e cinco, respectivamente. A grande maioria dos vermes genotipados apresentaram genótipos únicos, fruto do alto grau polimórfico dos íntrons, como mencionado anteriormente.

Além da distribuição genotípica, realizou-se também a análise da distribuição dos 149 alelos identificados pelas populações amostradas. Como esperado, o alelo mais comum foi o 97. A distribuição dos alelos mais comuns nas localidades brasileiras está apresentada na TABELA 17.

Foram estimados diversos parâmetros de diversidade molecular considerando-se os 245 nucleotídeos sequenciados (TABELA 17). Foram identificados 55 sítios polimórficos, com a ampla maioria localizados nas regiões não codificantes (íntrons). Como nestas análises foram incluídos os íntrons a diversidade nucleotídica encontrada foi consideravelmente alta ( $\pi = 0,025 \pm 0,001$ ). Além disso, foi observado um considerável desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em função do déficit heterozigótico em todas as populações avaliadas. Os valores negativos encontrados no teste de neutralidade (TABELA 17), poderiam sugerir uma possível



1 alteração no equilíbrio mutação-deriva genética em função, por exemplo, de um  
 2 processo de seleção natural e expansão populacional, justificando o déficit  
 3 heterozigótico. Entretanto, os valores de P não são significativos para a maioria das  
 4 populações avaliadas.



9  
 10  
 11 **FIGURA 24:** Distribuição dos genótipos formados pelos 149 alelos identificados nos  
 12 245 nucleotídeos sequenciados (considerando-se os éxons e íntrons) de Ac-ASP-2  
 13 nas populações brasileiras de *A. caninum*. As freqüências absolutas dos genótipos  
 14 em cada população estão apresentadas entre os parênteses.

- 1 **TABELA 17:** Dados de diversidade molecular e testes de neutralidade dos éxons e íntrons sequenciados de Ac-ASP-2 nas  
 2 populações brasileiras de *Ancylostoma caninum*.

<b>Ac-ASP-2 (Éxons A e B, Íntrons A e B) – 245nts</b>							
	<b>BH</b>	<b>CG</b>	<b>CT</b>	<b>RP</b>	<b>SL</b>	<b>total</b>	
<b>Diversidade Molecular</b>							
Nº. indivíduos	36	46	32	11	49	174	
Nº. cópias gênicas	72	92	64	22	98		
Nº de alelos	34	52	43	15	43	149	
Nº. sítios polimórficos	28	37	31	22	30	55	
Diversidade gênica	0,92 +/- 0,02	0,92 +/- 0,02	0,98 +/- 0,00	0,95 +/- 0,03	0,96 +/- 0,00		
Nº de heterozigotos	24	26	21	5	23		
Nº. de homozigotos	12	20	11	6	26		
Heterozigozidade observada	0,6667	0,5652	0,6562	0,4545	0,4694		
Heterozigozidade esperada	0,9214	0,9290	0,9812	0,9567	0,9647		
Nº. transições	21	23	23	19	26		
Nº. transversões	11	22	15	7	9		
Alelos mais comuns	97	19	24	6	10	59	
	43	0	1	4	0	15	
	48	3	3	2	2	15	
Genótipos mais comuns	97,97	5	9	4	0	21	
	43,43	0	0	2	0	7	
	48,48	0	1	1	1	5	
<b>Composição de bases</b>							
Composição nucleotídica	%C	23,74	23,58	23,72	23,71	23,83	23,71
	%T	27,69	27,77	27,61	27,87	27,49	27,69
	%A	28,02	28,15	28,08	27,40	27,96	27,92
	%G	20,56	20,50	20,59	21,02	20,72	20,68
<b>Teste de neutralidade</b>							
Tajima's D (valores P)	-1,11 (0,13)	-1,32 (0,06)	-0,70 (0,26)	0,30 (0,68)	-0,59 (0,31)	-0,69 (0,24)	

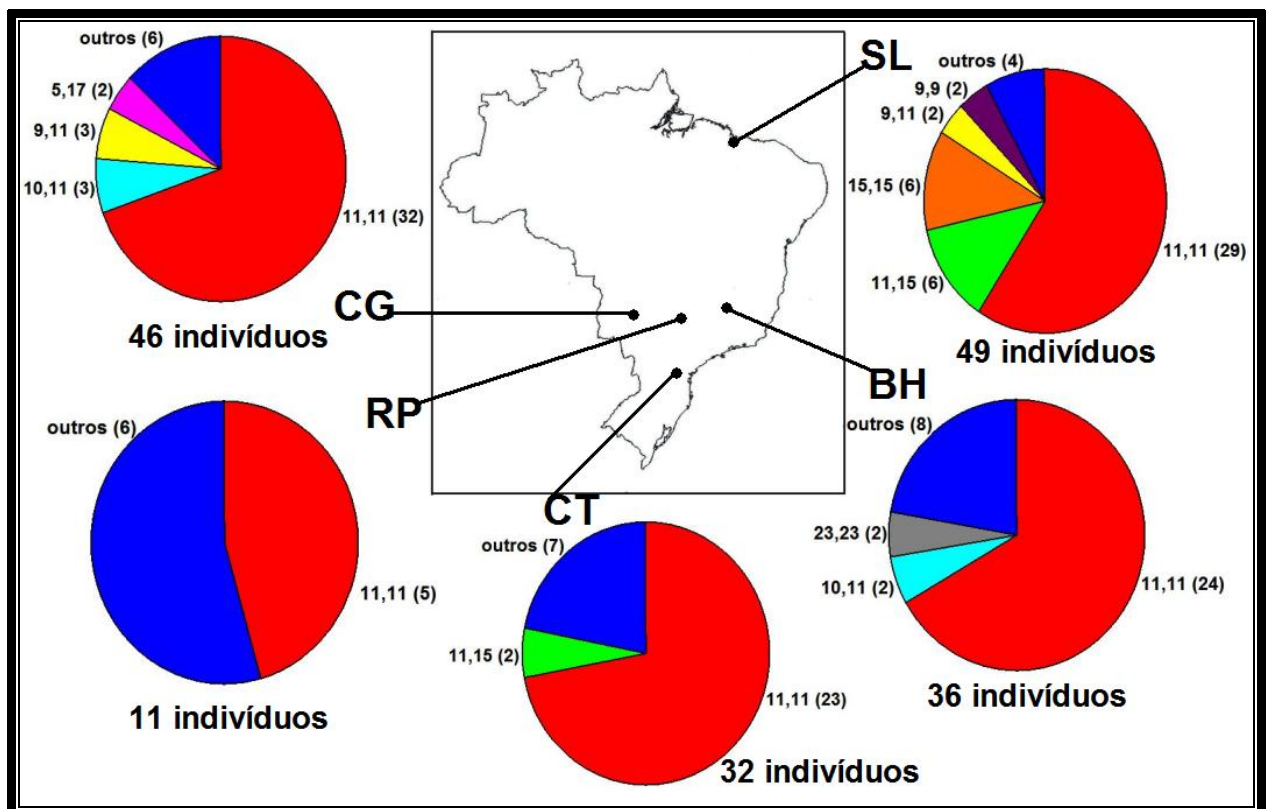
3

1 Além das análises utilizando-se os 245 nucleotídeos sequenciados, ou seja,  
2 incluindo todos os éxons e íntrons identificados, foram também realizadas análises  
3 somente com os éxons (135 nucleotídeos, 48 do éxon A e 87 do éxon B). A  
4 diversidade nucleotídica na parte codificante foi menor ( $\pi = 0,020 \pm 0,002$ )  
5 comparada à seqüência total ( $\pi = 0,025 \pm 0,001$ ), por razões previamente  
6 comentadas. Foi observada, após a reconstrução alélica utilizando-se o algoritmo  
7 EM do programa Arlequin, a ocorrência de 27 alelos nas regiões codificantes  
8 (APÊNDICE 4). A distribuição dos genótipos mais comuns formados pelos 27 alelos  
9 identificados nos 135 nucleotídeos das regiões codificantes está apresentada na  
10 FIGURA 25. O genótipo predominante foi o 11,11, compartilhado por 113 dos 174  
11 indivíduos amostrados nas populações brasileiras. Aproximadamente 60-70% dos  
12 vermes de todas as localidades amostradas apresentaram o genótipo 11,11, exceto  
13 os provenientes de RP, em função, provavelmente, do baixo número amostral desta  
14 localidade (FIGURA 25). Outros genótipos comuns foram o 11,15 e o 15,15,  
15 entretanto, compartilhado por um número muito menor de indivíduos, nove e oito  
16 respectivamente. Além disso, estes genótipos não apresentaram uma distribuição  
17 homogênea entre as populações brasileiras como o 11,11. Diferentemente do  
18 observado nas análises com as seqüências totais (incluindo os íntrons) o número de  
19 vermes com genótipos exclusivos foi muito reduzido.

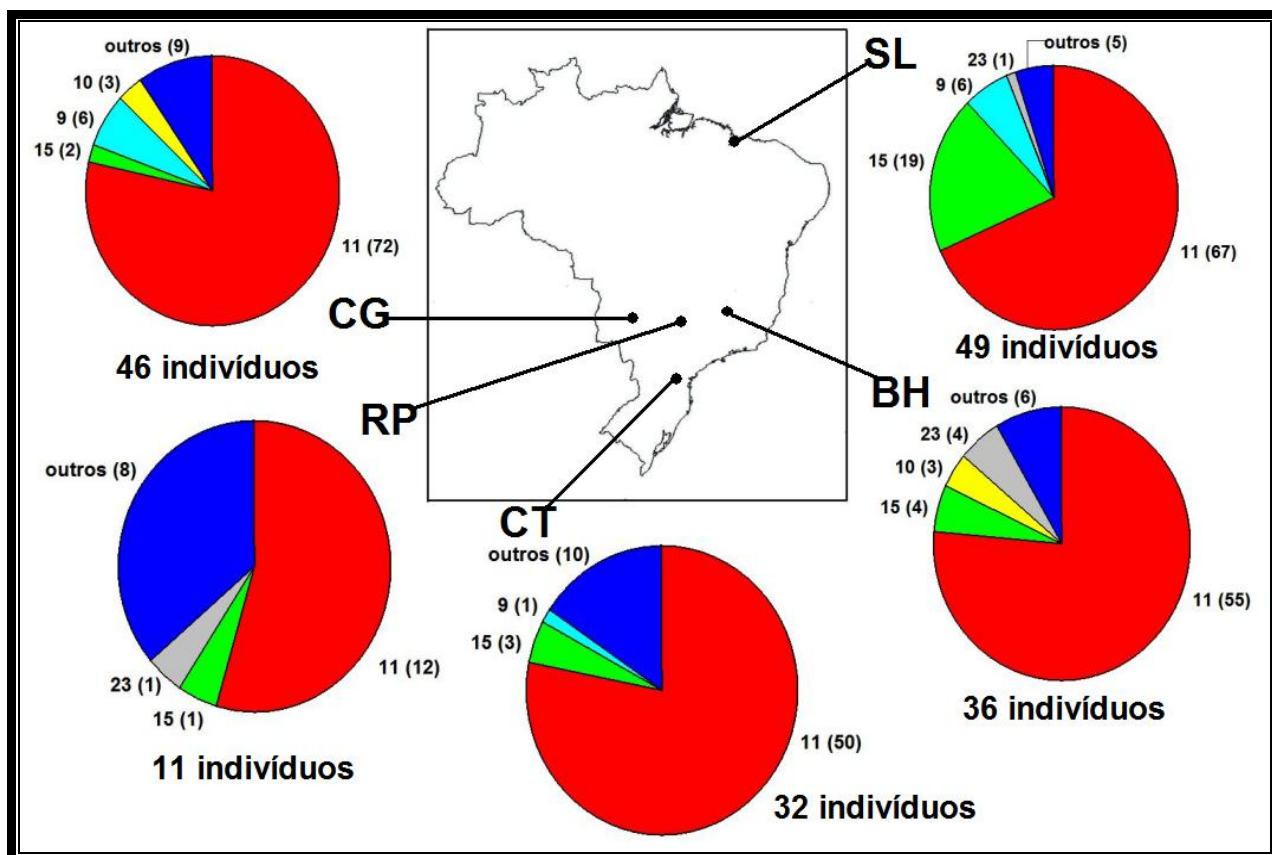
20 Além da distribuição genotípica, realizou-se também a análise da distribuição  
21 dos 27 alelos das regiões codificantes pelas populações amostradas. Como  
22 esperado, o alelo mais comum foi o 11, disseminado amplamente em todas as  
23 populações brasileiras de *A. caninum*. A distribuição dos alelos mais comuns nas  
24 localidades brasileiras está apresentada na FIGURA 26 e TABELA 18.

25 Foram estimados diversos parâmetros de diversidade molecular  
26 considerando-se os 135 nucleotídeos das regiões codificantes (TABELA 18). Foram  
27 identificados 16 sítios polimórficos, com um leve predomínio da taxa de transição  
28 sobre a de transversão nas populações amostradas. À exemplo do observado para a  
29 diversidade nucleotídica a diversidade gênica também foi inferior nos éxons quando  
30 comparada com a seqüência total (incluindo os íntrons), em virtude das razões  
31 comentadas anteriormente, referente a inferior diversidade nucleotídica dos éxons  
32 em relação aos íntrons.

Da forma semelhante ao encontrado com a seqüência total, foi também observado um considerável desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em função do déficit heterozigótico em todas as populações avaliadas (TABELA 18). Além disso, valores estatisticamente significativos dos testes de neutralidade (Tajima's D e outros testes não apresentados como o Fu's Fs) para a maioria das populações amostradas sugerem uma alteração no equilíbrio mutação-deriva genética e uma expansão populacional de um determinado alelo. De fato, como apresentado anteriormente, há uma predominância de um alelo e um genótipo de Ac-ASP-2 (11 e 11,11, respectivamente) nas populações brasileiras de *A. caninum* amostradas.



**FIGURA 25:** Distribuição dos genótipos formados pelos 27 alelos identificados nos 135 nucleotídeos das regiões codificantes (somente os éxons) de Ac-ASP-2 nas populações brasileiras de *A. caninum*. As freqüências absolutas dos genótipos em cada população estão apresentadas entre os parênteses.

1  
2  
3  
4  
5

6

7

8 **FIGURA 26:** Distribuição dos 27 alelos identificados nos 135 nucleotídeos das  
 9 regiões codificantes (somente os éxons) de *Ac-ASP-2* nas populações brasileiras de  
 10 *A. caninum*. As freqüências absolutas dos genótipos em cada população estão  
 11 apresentadas entre os parênteses.

12

13

14

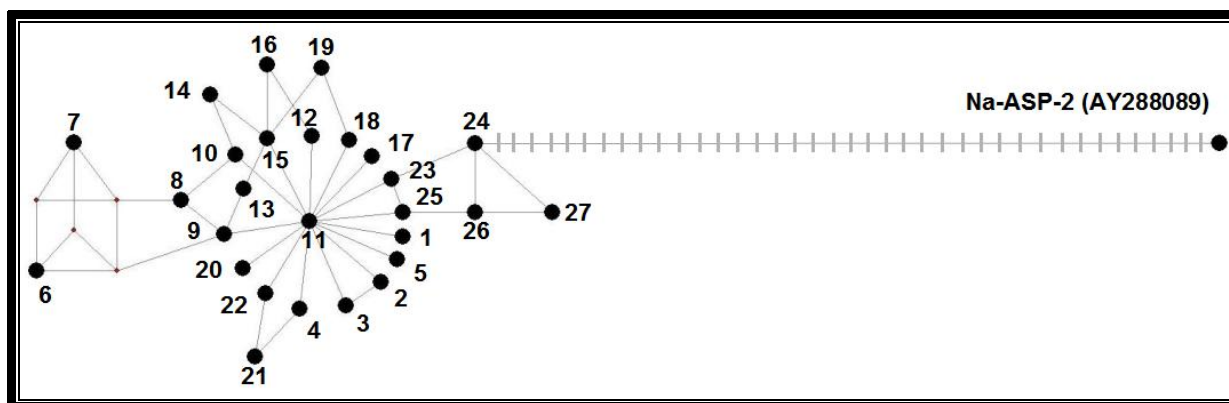


- 1 **TABELA 18:** Dados de diversidade molecular e testes de neutralidade dos éxons sequenciados de Ac-ASP-2 nas populações  
 2 brasileiras de *Ancylostoma caninum*.

<b>Ac-ASP-2 (Éxons A e B) – 135nts</b>							
	<b>BH</b>	<b>CG</b>	<b>CT</b>	<b>RP</b>	<b>SL</b>	<b>total</b>	
<b>Diversidade Molecular</b>							
Nº. indivíduos	36	46	32	11	49	174	
Nº. cópias gênicas	72	92	64	22	98		
Nº de alelos	9	9	11	8	8	27	
Nº. sítios polimórficos	8	8	9	5	6	16	
Diversidade gênica	0,41 +/- 0,07	0,38 +/- 0,06	0,39 +/- 0,07	0,69 +/- 0,10	0,49 +/- 0,05		
Nº de heterozigotos	8	11	8	4	12		
Nº. de homozigotos	28	35	24	7	37		
Heterozigotidade observada	0,2222	0,2391	0,2500	0,3636	0,2449		
Heterozigotidade esperada	0,4128	0,3839	0,3899	0,6970	0,4955		
Nº. transições	5	4	5	5	4		
Nº. transversões	3	4	4	2	3		
Alelos mais comuns	11 15 9	55 4 0	72 2 6	50 3 1	12 1 0	67 19 6	256 29 13
Genótipos mais comuns	11,11 11,15 15,15	24 1 1	32 0 1	23 2 0	5 0 0	29 6 6	113 9 8
<b>Composição de bases</b>							
Composição nucleotídica	%C	28,93	28,83	28,82	28,99	28,86	28,89
	%T	25,88	25,85	25,91	25,99	25,91	25,90
	%A	25,85	26,04	25,90	25,42	25,79	25,80
	%G	19,33	19,28	19,36	19,60	19,44	19,41
<b>Teste de neutralidade</b>							
Tajima's D (valores <i>P</i> )	-1,77 (0,01)	-1,64 (0,02)	-1,83 (0,01)	-0,17 (0,44)	-1,11 (0,12)	-1,31 (0,12)	

3

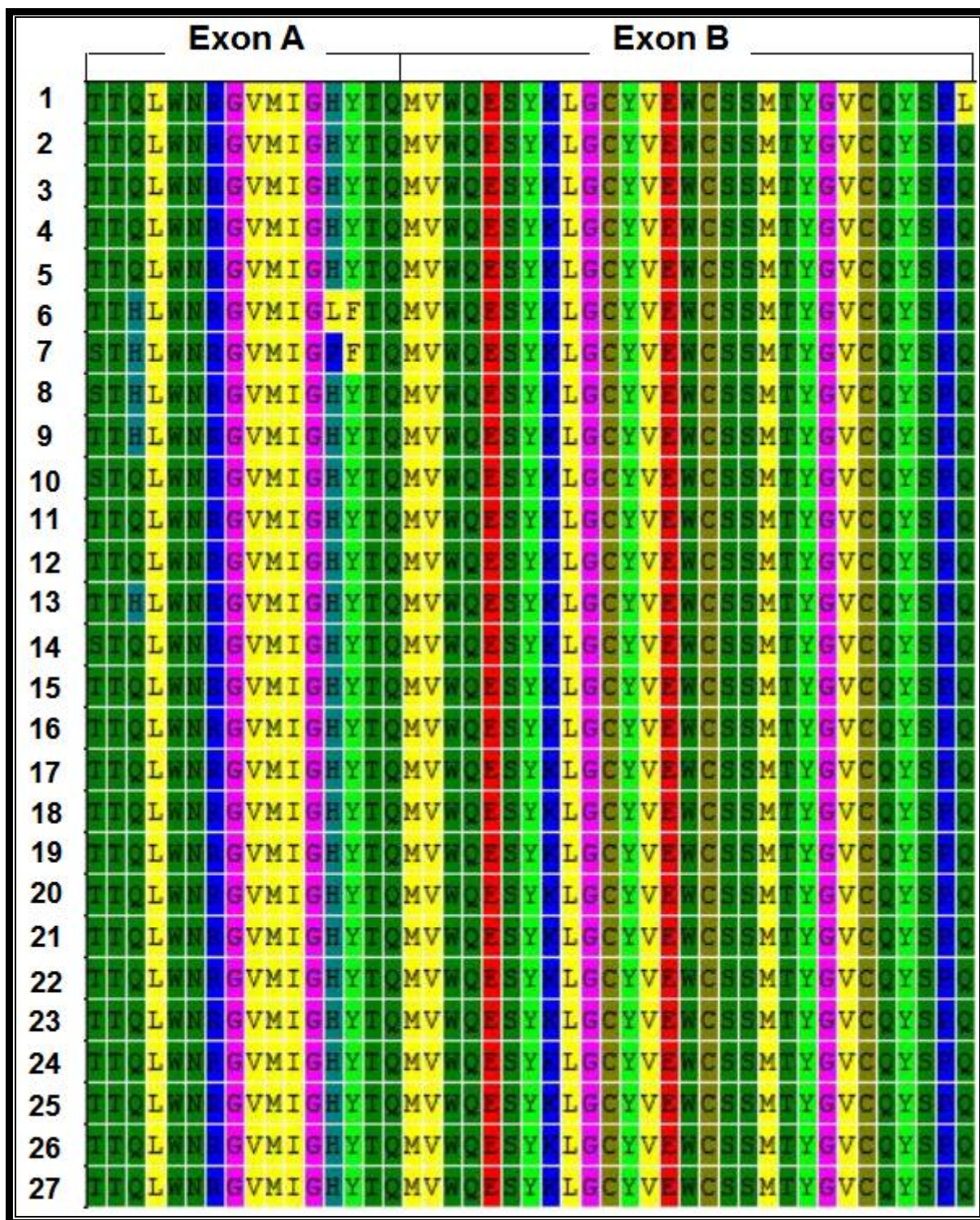
1 A relação filogenética entre 27 alelos das regiões codificantes está  
2 apresentada na FIGURA 27. Nesta rede haplotípica o alelo predominante 11 está  
3 posicionado no centro dando origem a inúmeros alelos menos frequentes, a maioria  
4 com apenas 1 mutação de diferença do 11. O alelo mais divergente é o 7 com  
5 quatro passos mutacionais do alelo 11.



8  
9  
10 **Figura 27:** Relação filogenética entre os 27 alelos identificados nas regiões  
11 codificantes sequenciadas do gene Ac-ASP-2. Estas inferências evolutivas foram  
12 realizadas utilizando-se o algoritmo median-joining do programa Network 4.0. Um  
13 passo mutacional caracteriza a divergência entre alelos adjacentes ou hipotéticos  
14 (pequenos pontos), exceto entre o alelo 24 e o alelo homólogo em *N. americanus*  
15 (*outgroup*), onde os eventos mutacionais estão representados em forma traços.

16  
17  
18 A FIGURA 28 apresenta os 45 aminoácidos codificados pelos 27 alelos  
19 identificados nas regiões exônicas sequenciadas do gene Ac-ASP-2. Nesta figura,  
20 pode-se observar que a variabilidade dos dois éxons identificados neste estudo é  
21 diferente, com um polimorfismo aminoacídico maior do éxon A em relação ao éxon  
22 B. Além disso, o polimorfismo nucleotídico evidenciado na FIGURA 27 não se reflete  
23 na mesma proporção em polimorfismo aminoacídico (FIGURA 28), evidenciando o  
24 alto conteúdo de mutações sinônimas entre os alelos. A maioria dos alelos em volta  
25 do alelo prodominante h11 (FIGURA 27) são, de fato, idênticos em nível protéico.





1  
2  
3  
4  
5  
6

**FIGURA 28:** Aminoácidos codificados pelos 27 alelos identificados nas regiões exônicas sequenciadas do gene *Ac-ASP-2*. A proximidade entre as tonalidades de cores dos aminoácidos reflete a similaridade bioquímica dos mesmos.



### 5.5.3. Estrutura populacional

As análises de variância molecular (AMOVA) foram realizadas utilizando-se todo o fragmento sequenciado (TABELA 19). Foram encontrados níveis inferiores de diferenciação entre as populações avaliadas ( $\approx 5\%$  utilizando-se a divergência alélica) comparando-se estes resultados com aqueles realizados com marcadores previamente avaliados neste estudo. Os dados de AMOVA de Ac-ASP-2 apresentados são significativos e estão em concordância parcial com as análises executadas com os demais marcadores moleculares, sugerindo um alto fluxo gênico interpopulacional e baixa estruturação genética. A maior proporção da variação encontrada foi entre os indivíduos dentro das populações ( $\approx 61\%$  utilizando-se a divergência alélica), concordando com o padrão de distribuição de genótipos e haplótipos entre as populações amostradas (presença de genótipos e haplótipos únicos considerando-se os 245 nts sequenciados).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7

**TABELA 19:** Resultado das análises de variância molecular (AMOVA) realizadas nas populações brasileiras de *A. caninum* utilizando-se os 245 nucleotídeos sequenciados do gene Ac-ASP-2.

Fonte de variação		g.l.*	Soma dos quadrados	Componentes da variância	% de variação
Entre populações	$\Phi_{ST}$	4	46,551	0,11636	4,73
	$F_{ST}$	4	4,3	0,00604	1,25
Entre indivíduos dentro das populações	$\Phi_{ST}$	169	649,156	1,49729	60,86
	$F_{ST}$	169	113,217	0,19272	39,88
Entre indivíduos	$\Phi_{ST}$	174	147,305	0,84658	34,41
	$F_{ST}$	174	49,5	0,28448	58,87
Total	$\Phi_{ST}$	347	843,012	2,46023	
	$F_{ST}$	347	167,017	0,48325	
Índices de fixação	Divergência alélica ( $\Phi_{ST}$ )			$F_{IS} = 0,63881$ $F_{ST} = 0,04730$ $F_{IT} = 0,65589$	
	Frequência alélica ( $F_{ST}$ )			$F_{IS} = 0,40386$ $F_{ST} = 0,01251$ $F_{IT} = 0,41131$	

8  
9  
10  
11

Todos os valores de  $P$  calculados para os índices de fixação foram estatisticamente significativos ( $P < 0.05$ ). \* g.l. = graus de liberdade.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

**6 – DISCUSSÃO**

1 Os avanços tecnológicos estão continuamente contribuindo para o aumento  
2 do conhecimento dos genes e proteínas presentes em ancilostomídeos. Algumas  
3 destas moléculas biológicas apresentam um potencial imunoprotetor e estão sendo  
4 analisadas para serem utilizadas em vacinas (HOTEZ et al., 2002; HOTEZ et al.,  
5 2003). Entretanto, a produção e distribuição de vacinas recombinantes requer a  
6 crucial compreensão das diferenças efetivas entre os antígenos nativos e  
7 recombinantes. Estas diferenças podem indicar que vacinas recombinantes  
8 monovalentes contra ancilostomídeos apresentem baixa proteção quando  
9 comparadas com vacinas polivalentes, por exemplo. Estas seriam compostas por  
10 todas as variantes antigênicas identificadas na espécie e poderiam potencializar os  
11 efeitos imunoprotetores. Uma das chaves para o controle de parasitos nematódeos é  
12 o amplo conhecimento de genética populacional o qual apresenta outras importantes  
13 implicações para a compreensão da ecologia, padrões de transmissão e  
14 desenvolvimento de resistência a drogas (ANDERSON et al., 1998; BLOUIN, 1998;  
15 VINEY, 1998; GASSER & NEWTON, 2000).

16 Presentemente, está sendo realizado um projeto para desenvolver uma  
17 vacina anti-ancilostomídeos financiado pela *Bill and Melinda Gates Foundation*. Este  
18 estudo está sendo realizado pela *Sabin Vaccine Institute (Human Hookworm  
19 Vaccine Initiative*, <http://sabin.org/programs/hhvi/index.html>) em conjunto com a  
20 George Washington University / EUA e a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). A fase  
21 de validação da vacina neste projeto está sendo realizada atualmente no Brasil  
22 (Minas Gerais) em colaboração com a Fiocruz, para avaliar a segurança e a  
23 tolerância de antígenos. Considerando os grandes esforços e investimentos  
24 financeiros que estão sendo empregados na tentativa de se formular uma vacina  
25 contra ancilostomídeos, se faz necessário a implementação de projetos para estudar  
26 a variabilidade antigênica e a estrutura genética populacional destes patógenos ou  
27 mesmo de modelos experimentais como o *A. caninum*. Diante deste quadro e dos  
28 escassos dados de variabilidade molecular e biologia populacional disponíveis  
29 nestes organismos é imprescindível a produção de novos conhecimentos acerca  
30 desses temas. Assim, o presente trabalho contribuiu com esta necessidade, quer  
31 seja identificando e estudando novos marcadores ou mesmo utilizando ferramentas  
32 descritas na literatura para estes objetivos.

1 As localidades onde foram coletados os vermes adultos de *A. caninum* foram  
2 escolhidas meramente devido à disponibilidade operacional. Já quanto a escolha de  
3 coleta dos vermes em centros de controle de zoonoses (CCZs) foi devido a  
4 possibilidade de coletar indivíduos mais representativos de cada localidade, uma vez  
5 que muitos cães capturados nestes centros não possuem moradia fixa (“cães de  
6 rua”) apresentando a possibilidade de se infectarem em diferentes pontos da cidade.  
7 O número de vermes obtidos variou muito de região para região e de cão para cão.  
8 Como a amostragem de animais foi pequena, maiores conclusões não podem ser  
9 inferidas sobre esse achado.

10 No geral, tanto as reações de amplificação por PCR quanto as de  
11 sequenciamento foram eficazes para os marcadores COI, ITSs e Ac-ASP-2.  
12 Entretanto, os amplicons de ITS apresentaram uma banda muito mais definida e  
13 intensa em relação aos demais marcadores. Este fato foi provavelmente  
14 consequência da diferença no número de cópias disponíveis de cada marcador e/ou  
15 da especificidade dos iniciadores utilizados. Como se sabe, o rDNA nuclear de  
16 eucariotos é composto por uma grande família gênica de seqüências repetitivas  
17 (com centenas de repetições concatenadas). Estas moléculas caracterizam-se por  
18 sofrer um processo evolutivo dependente das seqüências repetitivas, resultando em  
19 uma grande similaridade entre as unidades que o compõem, exibindo padrões de  
20 evolução em concerto. Cada unidade repetitiva é composta pelos genes  
21 codificadores ribossomais 18S, 5.8S e 28S, intercalados por dois espaçadores,  
22 conhecidos como ITS-1 e ITS-2 (ELDER & TURNER, 1995). Enquanto muitas  
23 regiões dos genes ribossomais são extremamente conservadas, os espaçadores  
24 transcritos internos 1 e 2 (ITS-1 e ITS-2), apresentam grande variação (HILLIS &  
25 DIXON, 1991). Entretanto, essa extensa variação não foi observada entre os  
26 indivíduos de populações brasileiras de *A. caninum*. Como apresentado nos  
27 resultados, foram identificados somente seis tipos de haplótipos nas cinco  
28 populações brasileiras, com apenas 4 sítios polimórficos em uma seqüência de 640  
29 pb.

30 Analisando-se os dados preliminares (sequenciamento de 50 vermes)  
31 constatou-se que este marcador não seria apropriado para estudos de diversidade e  
32 estrutura populacional em *A. caninum* devido a sua baixa diversidade intraespecífica.  
33 Os ITSs apresentam polimorfismo mais acentuado interespecificamente, adequando-

1 se melhor para serem utilizados em métodos de diagnóstico de diferentes espécies  
2 de ancilostomídeos (CLARA e SILVA et al., 2006; TRAUB et al., 2004), sistemática  
3 (CHILTON et al., 1995; STEVENSON et al. 1995; HUNG et al., 1996) e estudos de  
4 evolução molecular (HUNG et al., 1999).

5 Com relação a amplificação dos marcadores de microssatélites identificados  
6 esta se mostrou bastante heterogênea. Dentre os 38 *loci* identificados apenas os  
7 sete *loci* foram genotipados devido a ausência de amplificação em um grande  
8 número de indivíduos nas populações brasileiras de *A. caninum*. Este fato deve ser  
9 consequência do alto grau polimórfico nas regiões flangeadoras da maioria dos  
10 *loci*. Esta hipótese deve ser considerada uma vez que os marcadores supostamente  
11 neutros (COI e microssatélites) utilizados neste estudo evidenciaram, entre as  
12 populações brasileiras, um moderado grau de diferenciação populacional. Como a  
13 maioria das seqüências utilizadas na identificação e caracterização dos  
14 microssatélites foram provenientes dos Estados Unidos poderíamos esperar  
15 divergências destas seqüências em relação às seqüências homólogas brasileiras,  
16 afetando a amplificação de *loci* de microssatélites. Mesmo assim, realizamos o  
17 primeiro trabalho de genética populacional em ancilostomídeos com amostras de  
18 campo utilizando-se microssatélites de DNA. Sete *loci* apresentaram-se apropriados  
19 para serem genotipados nas populações brasileiras de *A. caninum*. Estes *loci*  
20 apresentaram, no geral, consideráveis níveis de polimorfismos em todas as  
21 populações com a maior parte da diversidade localizada entre os indivíduos ( $\approx 65\%$ ).  
22 Entretanto, observou-se uma baixa/moderada diferenciação populacional ( $R_{ST} \approx$   
23  $9\%$ ), assim como evidenciado pelo mtDNA ( $\Phi_{ST} \approx 12\%$ ).

24 OTSEN et al. (2000) e GRILLO et al. (2007) encontraram altos níveis de  
25 polimorfismos em populações de nematódeos tricostrongilídeos (posição  
26 taxonomica: Eukaryota; Metazoa; Nematoda; Chromadorea; Rhabditida; Strongylida;  
27 Trichostrongyloidea) utilizando-se microssatélites de DNA. A maior parte da  
28 diversidade em tricostrongilídeos se distribui dentro das populações ao invés de se  
29 distribuir entre das populações. Entretanto, como discutido posteriormente, a maior  
30 diversidade dos tricostrongilídeos em relação aos ancilostomídeos se deve ao fato de  
31 que nos estudos citados, esses apresentarem um maior tamanho efetivo  
32 populacional.

1 De forma geral, quatro fatores principais são importantes para explicar o  
2 padrão de estrutura genética populacional em nematódeos parasitos de  
3 animais/humanos. Esses fatores foram considerados e são discutidos a seguir, para  
4 explicar a estrutura genética observada nas populações brasileiras de *A. caninum*: (i)  
5 distância geográfica evitando o evento de panmixia entre as localidades avaliadas;  
6 (ii) fluxos gênicos parciais entre subpopulações amostradas, incluindo a influência de  
7 movimentos recentes de hospedeiros; (iii) a presença de subpopulações distintas  
8 geneticamente melhores adaptadas à diferentes hospedeiros e/ou a presença de  
9 espécies crípticas dentro de uma mesma localização geográfica; e (iv) outros  
10 eventos genéticos (por exemplo deriva genética) ocorrendo independentemente em  
11 cada subpopulação.

12 O primeiro fator a ser considerado seria o efeito da distância geográfica sobre  
13 o padrão genético observado nas populações brasileiras de *A. caninum*. A geografia  
14 não é a principal barreira genética para a maioria das espécies helmínticas, as quais  
15 apresentam, geralmente, baixa estrutura genética mesmo avaliando-se  
16 subpopulações distantes geograficamente (BLOUIN et al.,1999; HAWDON et al.  
17 2001). Por exemplo, tricostrongilídeos de animais ruminantes domésticos  
18 apresentam uma estrutura genética extremamente baixa. Na prática as  
19 subpopulações avaliadas poderiam ser consideradas como uma grande população  
20 panmítica (BLOUIN et al. 1998). Por outro lado, a baixa/moderada diferenciação  
21 genética observada entre as subpopulações brasileiras de *A. caninum* utilizando-se  
22 marcadores supostamente neutros (COI,  $\Phi_{ST} \approx 0.12$  e microssatélites,  $R_{ST} \approx 0.09$ )  
23 sugerem que a distância geográfica deve ser um componente a ser considerado  
24 como barreira ao fluxo genético nesta espécie. Esta subestruturação pôde ser  
25 evidenciada pelo agrupamento filogenético de alguns haplótipos de COI da mesma  
26 localidade (por exemplo, h23-h30 em SL, FIGURA 11), pela presença de haplótipos  
27 COI exclusivos em determinados sítios amostrados (FIGURA 11) e devido ao padrão  
28 *multi/locus* de estruturação dos microssatélites nas análises *PCA* (FIGURA 21). Estes  
29 resultados sugerem que a combinação entre deriva genética e a redução parcial do  
30 fluxo gênico estejam atuando na diferenciação genética entre as localidades  
31 avaliadas. Por outro lado, não há uma correlação significativa entre distanciamento  
32 genético e geográfico. Este padrão de baixa/moderada diferenciação populacional e  
33 ausência de isolamento por distância está em concordância com o trabalho de

1 genética populacional em ancilostomídeos antropofílicos (*N. americanus*)  
2 amostrados na mesma escala geográfica na China (HAWDON et al., 2001). Além  
3 disso, a estrutura genética observada em *Ascaris suum* e *A. lumbricoides* de porcos  
4 e humanos também são similares à encontrada neste estudo (ANDERSON, 1995;  
5 ANDERSON & JAENIKE, 1997).

6 A variação molecular encontrada nos marcadores avaliados neste estudo  
7 concordam com os dados disponíveis em ancilostomídeos. A taxa de variação  
8 molecular encontrada nos haplótipos de COI das populações brasileiras ( $\pi = 0.016$ )  
9 é similar ao observado por HU et al. (2002) em uma amostra de 38 *A. caninum* na  
10 Austrália e ao de *N. americanus* na China (HAWDON et al., 2001;  $\pi = 0.012$ ). Em  
11 conjunto, estes resultados sugerem uma similaridade da biologia populacional entre  
12 ancilostomídeos. Devido a inexistência de dados da biologia populacional em  
13 ancilostomídeos utilizando-se microssatélites de DNA não é possível uma  
14 comparação mais ampla. Por outro lado, tricostrongilídeos nematódeos parasitos de  
15 ruminantes domésticos apresentam maiores diversidades moleculares e estrutura  
16 genética praticamente inexistente (BLOUIN, 1998), com vermes de diferentes  
17 localidades formando uma única população panmítica. A baixa estrutura genética  
18 destes tricostrongilídeos se deve, provavelmente, ao enorme tamanho efetivo  
19 populacional e aos intensos movimentos migratórios dos hospedeiros entre as  
20 fazendas. Em ancilostomídeos e ascarídeos o tamanho efetivo populacional é muito  
21 menor em razão da intensidade parasitária inferior, resultando em uma menor  
22 diversidade genética das populações e das espécies como um todo (FIG. 1 em  
23 CRISCIONE & BLOUIN, 2005). Provavelmente, o movimento migratório dos  
24 hospedeiros é maior em bovinos domésticos, devido à sua importância econômica,  
25 do que em cães. Os hospedeiros do *A. caninum* são animais domésticos com  
26 mobilidade associada ao movimento humano. No Brasil, a migração rural-urbana foi  
27 responsável pela redução da população rural, especialmente nos últimos 50 anos.  
28 Durante os anos de 1950-80, a maioria das migrações rurais-urbanas ocorreu no  
29 sudeste e sul do país. Nas últimas três décadas, as áreas rurais nordestinas e as  
30 fronteiras agrícolas do centro-oeste e do norte do país foram as principais regiões  
31 envolvidas neste processo migratório (CAMARANO & ABROMOVAY, 1999). As  
32 amostras de *A. caninum* utilizadas nesse estudo foram provenientes de centros de  
33 controle de zoonoses (CCZ), responsáveis pela vigilância e controle de doenças



1 zoonóticas em vários centros urbanos brasileiros. A maioria dos cães capturados e  
2 submetidos às necropsias nestes CCZs são provenientes das periferias urbanas.  
3 Curiosamente, estas mesmas regiões urbanas acolheram a maior parte dos  
4 indivíduos migrantes comentados anteriormente. Diante deste aspecto, a estrutura  
5 genética dos nematódeos amostrados deve ser reflexo da recente história  
6 demográfica brasileira, caracterizada por intensos movimentos migratórios nas  
7 últimas décadas. Por exemplo, o haplótipo h18 encontrado exclusivamente na  
8 localidade CT (Curitiba) está filogeneticamente distante dos demais haplótipos  
9 identificados nesta ou em outras localidades brasileiras amostradas, e mais próximo  
10 de um haplótipo chinês (FIGURA 11). O município de Curitiba (CT) está localizado  
11 no sul do Brasil, uma região que recebeu muitos imigrantes, especialmente europeus  
12 e asiáticos no último século. Considerando a vasta migração e imigração humana  
13 que ocorreu no Brasil em sua história recente, a ausência de correlação entre  
14 distância genética e geográfica entre populações de uma espécie comensal humana  
15 não é surpreendente [estes resultados são novamente similares aos do  
16 ancilostomídeo antropofílico; (HAWDON et al., 2001)]. Assim, nossos resultados são  
17 consistentes com a hipótese de que as recentes migrações humanas representaram  
18 um papel primordial na determinação da estrutura genética avaliada neste estudo.

19 Uma outra questão a ser discutida diante dos dados encontrados,  
20 especialmente utilizando o marcador mitocondrial, é a possibilidade de existirem  
21 linhagens genéticas especializadas a determinados hospedeiros, ou mesmo a  
22 existência de especiação críptica responsável pela subestruturação populacional  
23 encontrada. Hu e colaboradores (2002) utilizando a técnica SSCP e o  
24 sequenciamento de um fragmento do gene COI, avaliaram a diversidade molecular e  
25 a estrutura genética de ancilostomídeos. Os autores identificaram duas  
26 subpopulações distintas geneticamente, avaliando *A. caninum* coletados de cães  
27 provenientes de Townsville, Austrália. Como relatado na literatura, o *A. caninum*  
28 pode infectar outros hospedeiros, inclusive o homem, ocasionando um quadro  
29 conhecido como enterite eosinofílica (PROCIV & CROESE, 1996) e larva migrans  
30 cutânea. Os autores especularam sobre a possibilidade de subpopulações  
31 geneticamente distintas em *A. caninum* infectarem, seletivamente, hospedeiros não  
32 caninos. Os mesmos autores sugeriram ainda que um recente contato entre  
33 populações evoluídas alopatriicamente poderia explicar o padrão de variabilidade

1 haplotípica encontrado em *A. caninum* oriundos de Townsville, Austrália. No Brasil,  
2 foram observados altos níveis de diferenciação genética entre as três clades de  
3 mtDNA com um claro sinal de uma antiga diferenciação entre as mesmas. Uma  
4 hipótese para explicar o padrão genético encontrado, seria que as clades  
5 representariam populações alopátricas previamente diferenciadas que recentemente  
6 foram miscigenadas devido ao movimento de hospedeiros como sugerido por HU e  
7 colaboradores (2002). Uma hipótese alternativa seria a presença de espécies  
8 crípticas em *A. caninum*, assim como sugerida em outros helmintos parasitos como:  
9 *N. americanus* (ROMSTAD et al., 1998) e *Teladorsagia circumcicta* (GRILLO et al.,  
10 2007). Em nematódeos parasitos de vertebrados, espécies crípticas apresentam um  
11 nível de divergência superior a 5% para o gene COI (BLOUIN, 2002). Assim, é  
12 possível que a clade 3 (FIGURA 11), identificada com os dados do sequenciamento  
13 de COI ( $\approx$  7% de divergência) represente uma espécie críptica. Entretanto, não  
14 existem evidências diretas de especialização subpopulacional em hospedeiros ou  
15 especializações ecológicas nas amostras coletas que justifiquem esta hipótese.  
16 Além disso, não há correlação entre os haplótipos mitocondriais divergentes com os  
17 dados *multilocus* obtidos com os microssatélites de DNA. Uma explicação para  
18 justificar esta ausência de correlação seria a diferença de ploidia e recombinação  
19 entre os marcadores nucleares e mitocondriais. Novos trabalhos seriam necessários  
20 para confirmar a existência de espécies crípticas em *A. caninum*.

21 A resistência anti-helmíntica é amplamente reconhecida como um grave  
22 problema em tricostrongílídeos de ruminantes domésticos (KAPLAN, 2004;  
23 GILLEARD & BEECH, 2007). Em ancilostomídeos e em outros parasitos de  
24 pequenos animais esta questão ainda não possui a mesma dimensão, mas  
25 recentemente alguns trabalhos vem relatando a ocorrência de resistência em *A.*  
26 *caninum* (KOPP et al., 2007). A evolução de resistência à drogas é promovida pelo  
27 alto tamanho efetivo populacional e dispersão dos alelos resistentes devido ao alto  
28 fluxo gênico interpopulacional. Nossos resultados conjuntamente com os  
29 apresentados por HU et al. (2002) e HAWDON et al. (2001), sugerem que para  
30 ancilostomídeos nem o tamanho efetivo populacional e nem as taxas de fluxo  
31 gênicos são elevadas como aqueles observados em tricostrongílídeos de animais  
32 domésticos ruminantes. Dessa maneira, o aparecimento e a dispersão de um  
33 eventual alelo resistente podem não ocorrer rapidamente em ancilostomídeos sob

1 pressões seletivas similares às encontradas em tricostrongilídeos. Por outro lado,  
2 quanto maior a diferenciação genética entre populações, maiores são as atenções  
3 necessárias quanto as variações nas moléculas antigênicas envolvidas com a  
4 produção de vacinas (diferente da situação dos tricostrongilídeos onde uma  
5 população pode ser representativa das demais). Por exemplo, comparações de  
6 sequências do gene COI revelaram que havia menor variação genética em *N.*  
7 *americanus* nas amostras de laboratório comparado com amostras de campo (LI et  
8 al., 2004). De forma similar, nossos resultados com microsatélites de DNA também  
9 revelaram um reduzido polimorfismo de *A. caninum* mantidos em laboratório em  
10 relação as amostras de campo (dados não apresentados). MOSER et al. (2007)  
11 também observaram uma redução do conteúdo genético mitocondrial em *A. caninum*  
12 provenientes de laboratório ( $\pi = 0.001$ ). Estes resultados sugerem que amostras de  
13 laboratório de ancilostomídeos sofreram um intenso evento de gargalo genético com  
14 redução da diversidade molecular. Assim, potenciais antígenos vacinais podem ter  
15 sofrido a mesma restrição do conteúdo genético durante a manutenção destas  
16 linhagens em laboratório (LI et al., 2004). As vacinas recombinantes anti-  
17 ancilostomídeos (LOUKAS et al., 2006) estão sendo desenvolvidas utilizando-se  
18 linhagens mantidas em laboratório, sem um prévio conhecimento de possíveis  
19 variações populacionais nas moléculas antigênicas. Como apresentado nos  
20 resultados, as amostras brasileiras de campo apresentaram variações nucleotídicas  
21 e aminoacídicas para a principal molécula candidata a vacina contra  
22 ancilostomídeos. Além disso, os polimorfismos aminoacídicos não foram uniformes  
23 entre os éxons analisados (FIGURA 28). MOSER et al. (2007) também observaram  
24 uma variabilidade diferencial entre distintas regiões do gene codificante de uma  
25 outra proteína antigênica em *A. caninum*. Estes autores identificaram variações  
26 nucleotídicas entre  $\pi = 0.004 - 0.033$  ao longo do segundo domínio de Ac-ASP-1. A  
27 existência de diversidade antigênica ao longo das proteínas deve ser considerada,  
28 embora não se saiba se este fato influenciaria no desenvolvimento de possíveis  
29 vacinas utilizando-se a Ac-ASP-2 ou seus respectivos homólogos em  
30 ancilostomídeos antropofílicos. *A priori*, não se sabe se os sítios aminoacídicos mais  
31 conservados, devido ao papel biológico que essas proteínas desempenham, são  
32 também mais importantes para desempenharem a antigenicidade destas proteínas.  
33 Devido à diferença de polimorfismo aminoacídico entre nos éxons avaliados, seria

1 interessante determinar quais regiões são mais antigênicas (conservadas ou  
2 variáveis) ou se ambas desempenham o mesmo papel imunoprotetor.

3 Como sugerido por MOSER et al. (2007) no estudo da variação molecular da  
4 Ac-ASP-1, se o evento de seleção positiva estiver moldando a evolução das  
5 proteínas secretoras de *Ancylostoma* (ASPs – *Ancylostoma secreted protein*), este  
6 fenômeno dever estar restrito à pequenas regiões ao redor de determinados sítios e  
7 deve ser necessariamente fraco. De fato, os testes de neutralidade aqui  
8 apresentados sugerem esta hipótese. MOSER et al. (2007) observaram também a  
9 um baixo desequilíbrio de ligação no genoma do *A. caninum* (evidências de  
10 recombinação entre segmentos com apenas 2kb de distância), assemelhando-se  
11 mais a um padrão de ligação apresentado por *Drosophila melanogaster* do que a  
12 *Caenorhabditis elegans* e humanos (recombinação entre dezenas de Kb) com  
13 elevados níveis de desequilíbrio de ligação (REICH et al., 2001; GABRIEL et al.,  
14 2002; CUTTER, 2006). Uma consequência deste fato é que a associação entre  
15 mapas genotípicos e infectividade ou antigenicidade deve ser realizado por SNPs ao  
16 invés de genotipagem de haplótipos (MOSER et al., 2007).

17 Infecções por ancilostomídeos ainda permanecem como um importante  
18 problema socio-econômico em diversas regiões do mundo, sobretudo em países em  
19 desenvolvimento como o Brasil. O sucesso no controle desses parasitos dependerá  
20 de melhorias sanitárias e educacionais oferecidas pelos poderes públicos locais às  
21 suas respectivas populações, juntamente com constantes avanços em diversas  
22 áreas do conhecimento como a Genética, a Biologia Molecular, a Epidemiologia, a  
23 Imunopatologia e outras áreas correlatas. A produção de conhecimentos científicos  
24 não pode, de forma isolada, implementar todas as providências necessárias ao  
25 controle dessas e de outras parasitoses, necessitando da participação de políticas  
26 públicas (programas de educação e saúde) para maximizar os resultados.

27

28

29

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

**7 – CONCLUSÕES**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

1. As populações brasileiras de *A. caninum* amostradas apresentaram um grau moderado de diversidade e estruturação genética comparado à outros nematódeos.
2. O marcador mitocondrial e os microssatélites de DNA apresentaram informações similares quanto a diversidade e estrutura genética populacional em *A. caninum*.
3. Existe uma considerável divergência entre as seqüências mitocondriais avaliadas sugerindo a possibilidade de existirem espécies crípticas em *A. caninum*.
4. Os marcadores ribossomais ITS não são adequados para o estudos da biologia populacional em *A. caninum*.
5. Em *A. caninum*, existem polimorfismos aminoacídicos em regiões do gene que codificam a principal proteína candidata a vacina em ancilostomídeos (ASP-2).
6. Os taxa de polimorfismo aminoacídico não é homogênea ao longo das regiões codificantes da Ac-ASP-2, sendo o éxon A mais polimorfico que o éxon B.
7. Foram detectadas mutações aminoacídicas não sinônimas nos éxons de Ac-ASP-2 avaliados. Estas informações devem ser melhor compreendidas para o desenvolvimento de vacinas contra ancilostomídeos.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

**8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 ANDERSON, T. J. Ascaris infections in humans from North America: molecular  
2 evidence for cross-infection. *Parasitology* v. 110, p. 215-219, 1995.
- 3
- 4 ANDERSON, T. J.; JAENIKE, J. Host specificity, evolutionary relationships and  
5 macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and  
6 pigs. *Parasitology* v. 115, p. 325-342, 1997.
- 7
- 8 ANDERSON, T. J. C.; BLOUIN, M. S.; BEECH, R. N. Population biology of parasitic  
9 nematodes: applications of genetic markers. *Adv. Parasitol.* v. 41, p. 219-283,  
10 1998.
- 11
- 12 ASOJO, O. A.; GOUD, G.; DHAR, K.; LOUKAS, A.; ZHAN, B.; DEUMIC, V.; LIU, S.;  
13 BORGSTAHL, G. E.; HOTEZ, P. J. X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-  
14 related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine  
15 antigen for human hookworm infection. *J Mol Biol.* v. 346, p. 801-814. 2005.
- 16
- 17 AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINHAM, E.; LAMB, T. et al.  
18 Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population  
19 genetics and systematics. *Annual R. Ecol. Systematics.* v. 18, p. 489-522, 1987.
- 20
- 21 AVISE, J. C. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to  
22 population biology. *Evolution.* v. 43(6), p. 1192-1208, 1989.
- 23
- 24 AVISE, J. C. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative  
25 population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annul Rev. Genetics.* v. 25, p.  
26 45-69, 1991.
- 27
- 28 AVISE, J. C. *Molecular markers, Natural History and Evolution.* Chapman & Hall,  
29 New York, 1994.
- 30
- 31 BANDEL, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring  
32 intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* v. 16, p. 37-48, 1999.
- 33



- 1 BELKHIR, K., V. CASTRIC, & F. BONHOMME. Identix, a computer program to test  
2 for relatedness in a population using permutation methods. *Mol. Ecology Notes* v.  
3 2, p. 611–614, 2002.  
4
- 5 BELL, A. S.; SOMMERVILLE, C.; TELLERVO VALTONEN, E. A molecular  
6 phylogeny of the genus *Ichthyocotylurus* (Digenea, Strigeidae). *Int J Parasitol.* v.  
7 31, 833-842, 2001.  
8
- 9 BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic*  
10 *Acids Res.* v. 27, p. 573-580, 1999.  
11
- 12 BLAXTER, M. L.; DE LEY, P.; GAREY, J., et al. A molecular evolutionary framework  
13 for the phylum Nematoda. *Nature.* v. 392, 71-75, 1998.  
14
- 15 BLAXTER, M. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms.  
16 *Int. J. Parasitol.* v. 30, p. 347-355, 2000.  
17
- 18 BLOUIN, M. S.; YOWELL, C. A.; COURTNEY, C. H.; DAME, J. B. Host movement  
19 and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* v. 141,  
20 p. 1007-1014, 1995.  
21
- 22 BLOUIN, M. S. Mitochondrial DNA diversity in nematodes. *J. Helminthol.* v. 72, p.  
23 285-289, 1998.  
24
- 25 BLOUIN, M. S.; LIU, J.; BERRY, R. E. Life cycle variation and the genetic structure of  
26 nematode populations. *Heredity* v. 83, p. 253-259, 1999.  
27
- 28 BLOUIN, M. S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial  
29 DNA versus internal transcribed spacer. *Int. J. Parasitol.* v. 32, p. 527-531, 2002.  
30
- 31 BURROWS, R. B. Comparative morphology of *Ancylostoma tubaeforme* (ZEDER,  
32 1800) and *Ancylostoma caninum* (ERCOLANI, 1859). *J. Parasitol.* v. 48, n. 5, p.  
33 715-718, 1962.

- 1 BRINKWORTH, R. I.; HARROP, S. A.; PROCIV, P.; BRINDLEY, P. J. Host specificity  
2 in blood feeding parasites: a refining contribution by haemoglobin-degrading  
3 enzymes? *Int. J. Parasitol.* v. 30, p. 785-790, 2000.  
4
- 5 BRINKWORTH, R. I.; PROCIV, P.; LOUKAS, A.; BRINDLEY, P. J. Hemoglobi-  
6 degrading aspartic proteases of blood-feeding parasites: substrate specificity  
7 revealed by homology models. *J. Biol. Chem.* v. 276, p. 38844-38851, 2001.  
8
- 9 CAMARANO, A. A.; ABROMOVAY, R. Texto para discussão nº. 621 Êxodo rural,  
10 envelhecimento e masculinização no Brasil: Panorâma dos últimos 50 anos.  
11 *IPEA*, Brasília, 28 p. 1998.  
12
- 13 CLARA E SILVIA, L. M.; MIRANDA, R. R.; SANTOS, H. A.; RABELO, E. M.  
14 Differential diagnosis of dog hookworms based on PCR-RFLP from the ITS  
15 region of their rDNA. *Vet Parasitol.* v. 140, p. 373-377, 2006.  
16
- 17 CHILTON, N. B.; GASSER, R. B.; BEVERIDGE, I. Differences in a ribosomal DNA  
18 sequence of morphologically indistinguishable species within the *Hypodontus*  
19 *macropi* complex (Nematoda: Strongyloidea). *Int J Parasitol.* v. 25, p. 647-651,  
20 1995.  
21
- 22 COSTA, H. M. A.; GUIMARÃES, M. P.; LEITE, A. C. R.; LIMA, W. S. Distribuição de  
23 helmintos parasitos de animais domésticos no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet.*  
24 *Zootec.* v. 38, n. 4, p. 465-579, 1986.  
25
- 26 CRISCIONE, C. D.; BLOUIN, M. S. Effective sizes of macroparasite populations: a  
27 conceptual model. *Trends Parasitol.* v. 21, p. 212-217, 2005.  
28
- 29 CROESE, J.; LOUKAS, A.; OPDEBEECK, J.; FAIRLEY, S.; PROCIV, P. Human  
30 enteric infection with canine hookworms. *Ann. Intern. Med.* v. 120, p. 369-374,  
31 1994.  
32

- 1 CURY, M. C.; LIMA, W. S. Helmintos de cães e gatos. *Cad. Téc. Vet. Zootec.* n. 39,  
2 p. 12-35, 2002.
- 3
- 4 CUTTER, A. D. Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium in wild  
5 populations of the partial selfer *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* v. 172, p. 171-  
6 184, 2006.
- 7
- 8 DEBRAUWERE, H.; GENDREL, C. G.; LECHAT, S.; DUTREIX, M. Differences and  
9 similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and  
10 microsatellites. *Biochemie.* v. 79, p. 577-586, 1997.
- 11
- 12 de SILVA, N. R.; BROOKER, S.; HOTEZ, P. J.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D.;  
13 SAVIOLI, L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture.  
14 *Trends Parasitol.* v. 19 (12), p. 547-551, 2003.
- 15
- 16 DORRIS, M.; DE LEY, P.; BLAXTER, M. Molecular analysis of nematode diversity.  
17 *Parasitol. Today.* v.15, 188-193, 1999.
- 18
- 19 ELDER, J. F.; TURNER, B. J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in  
20 eukaryotes. *Q. Rev. Biol.* v. 70, p. 297-320, 1995.
- 21
- 22 EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance  
23 inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human  
24 mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v. 131, 479-491, 1992.
- 25
- 26 EXCOFFIER, L.; LAVAL G.; SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: An integrated  
27 software package for population genetics data analysis. *Evolutionary*  
28 *Bioinformatics Online* v. 1, p. 47-50, 2005.
- 29
- 30 FARIAS, N. A.; CRISTOVÃO, M. L.; STOBBE, N. S. Frequência de parasitas  
31 intestinais em cães (*Canis familiares*) e gatos (*Felis domestica*) em Araçatuba/SP.  
32 *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v. 4, n. 1, p. 57-60, 1995.
- 33

- 1 FISHER, M. C.; VINEY, M. E. Microsatellites of the parasitic nematode *Strongyloides*  
2 *ratti*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 80, p. 221-224, 1996.
- 3
- 4 FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEL, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for  
5 amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse  
6 metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* v. 3, p. 294-299, 1994.
- 7
- 8 FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth,  
9 hitchhiking and background selection. *Genetics* v. 147, p. 915–925, 1997.
- 10
- 11 FUJIWARA, R. T.; GEIGER, S. M.; BETHONY, J.; MENDEZ, S. Comparative  
12 immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite*  
13 *immunol.* v. 28 (7), p. 285-293, 2006.
- 14
- 15 GABRIEL, S. B.; SCHAFFNER, S. F.; NGUYEN, H.; MOORE, J. M.; ROY, J.;  
16 BLUMENSTIEL, B.; HIGGINS, J.; DEFELICE, M.; LOCHNER, A.; FAGGART, M.  
17 et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* v. 296, p.  
18 2225–2229, 2002.
- 19
- 20 GASSER, R. B.; STEWART, L. E.; SPEARE, R. Genetic markers in ribosomal DNA  
21 for hookworm identification. *Acta Trop.* v. 62, p. 15-21, 1996.
- 22
- 23 GASSER, R. B.; MONTI, J. R. ; BAO-ZHEN, Q. et al. A mutation scanning approach  
24 for the identification of hookworm species and analysis of population variation.  
25 *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 92, p. 303-312, 1998.
- 26
- 27 GASSER, R. B.; NEWTON, L. A. Genomic and genetic research on bursate  
28 nematodes: significance, implications and prospects. *Int. J. Parasitol.* v. 30, p.  
29 509-534, 2000.
- 30
- 31 GILLEARD J. S.; BEECH, R. N. Population genetics of anthelmintic resistance in  
32 parasitic nematodes. *Parasitology* v. 134, 1133-1147, 2007.
- 33

- 1 GOLDSTEIN, D.; SCHLÖTTERER, C. *Microsatellites: Evolution and Applications*.  
2 Oxford, Oxford University Press, 1999.  
3
- 4 GORDON, R. M.; YOUNG, C. J. Parasites in dogs and cats in Amazonas. *An. Trop.*  
5 *Med. Parasitol.* v. 16, n. 3, p. 297-300, 1922.  
6
- 7 GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence  
8 finishing. *Genome Res.* v. 8, p. 195-202, 1998.  
9
- 10 GRILLO, V.; JACKSON, F.; CABARET, J.; GILLEARD, J. S. Population genetic  
11 analysis of the ovine parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta* and evidence  
12 for a cryptic species. *Int J Parasitol.* v. 7, p. 435-447, 2007.  
13
- 14 GRENIER, E.; BONIFASSI, E.; ABAD, P.; LAUMOND, C. Use of species-specific  
15 satellite DNAs as diagnostic probes in the identification of Steinernematidae and  
16 Heterorhadtidae entomopathogenic nematodes. *Parasitology.* v. 113, p. 483-489,  
17 1996.  
18
- 19 GUBERTI, V.; STANCAMPIANO, L.; FRANCISCI, F. Intestinal helminth parasite  
20 community in wolves (*Canis lupus*) in Italy. *Parassitologia.* v. 35, n. 1-3, p. 59-65,  
21 1993.  
22
- 23 HARROP, S. A.; SAWANGJAROEN, N.; PROCIV, P.; BRINDLEY, P. J.  
24 Characterization and localization of cathepsin B proteinases expressed by adult  
25 *Ancylostoma caninum* hookworms. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 71, p. 163-171,  
26 1995.  
27
- 28 HARROP, S. A.; PROCIV, P.; BRINDLEY, P. J. A<sub>casp</sub>, a gene encoding a cathepsin  
29 D-like aspartic protease from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Biochem.*  
30 *Biophys. Res. Commum.* v. 227, p. 294-302, 1996.  
31

- 1 HAWDON, J. M.; SHAD, G. A. Serum-stimulated feeding in vitro by third-stage  
2 infective larvae of the canine hookworm *Ancylostoma caninum*. *J. Parasitol.* v. 76,  
3 p. 394-398, 1990.  
4
- 5 HAWDON, J. M.; JONES, B. F.; HOFFMAN, D. R.; HOTEZ, P. J. Cloning and  
6 characterization of *Ancylostoma*-secreted protein. A novel protein associated with  
7 the transition to parasitism by infective hookworm larvae. *J. Biol. Chem.* v. 271,  
8 p. 6672-6678, 1996.  
9
- 10 HAWDON, J. M.; NARASIMHAN, S.; HOTEZ, P. J. *Ancylostoma* secreted protein 2:  
11 cloning and characterization of a second member of a family of nematode  
12 secreted proteins from *Ancylostoma caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 99, p.  
13 149-168, 1999.  
14
- 15 HAWDON J. M.; LI, T.; ZHAN, B.; BLOUIN, M. S. Genetic structure of populations of  
16 the human hookworm, *Necator americanus*, in China. *Mol Ecol.* v. 10, p. 1433-  
17 1437, 2001.  
18
- 19 HENRIKSEN, A; KING, T. P.; MIRZA, O.; MONSALVE, R. I.; MENO, K.; IPSEN, G.;  
20 LARSEN, J. N.; GAJHEDE, M.; SPANGFORT, M. D. Major venom allergen of  
21 yellow jackets, Ves V5: structural characterization of a pathogenesis-related  
22 protein superfamily. *Proteins.* v. 45, p. 438-448, 2001.  
23
- 24 HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic  
25 inference. *Q Rev Biol.* v. 66, p. 411-453, 1991.  
26
- 27 HILLIS, D. M.; MABLE, B.K.; LARSON, A.; DAVIS, S. K.; ZIMMER, E. Nucleic Acids  
28 IV: Sequencing and Cloning. Em: Molecular Systematics, 2<sup>nd</sup> Edition. Sinauer  
29 Associates Inc. Sunderland, MA, 1996.  
30
- 31 HOEKSTRA, R.; CRIADO, F. A.; FAKKELDIJ, J.; BERGMAN, J.; ROOS, M. H.  
32 Microsatellites of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*: polymorphism  
33 and linkage with a direct repeat. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 89, p. 97-107, 1997.

- 1 HOTEZ, P. J.; ASHCOM, J.; ZHAN, B.; BETHONY, J. M.; et al. Effect of vaccinations  
2 with recombinant fusion proteins on *Ancylostoma caninum* habitat selection in the  
3 canine intestine. *J Parasitol.* v. 88, p. 684-690, 2002.  
4
- 5 HOTEZ, P. J.; ZHAN, B.; BETHONY, J. M.; LOUKAS, A.; et al. Progress in the  
6 development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: the Human  
7 Hookworm Vaccine Initiative. *Int J Parasitol.* v. 33, p. 1245-1258, 2003.  
8
- 9 HOTEZ, P. j.; BETHONY, J.; BOTTAZZI, M. E.; BROOKER, S.; BUSS, P.  
10 Hookworm: "the great infection of mankind". *PloS. Med.* v. 2 (3), e.67, 2005.  
11
- 12 HU, M.; CHILTON, N. B.; ZHU, X.; GASSER, R. B. Single-strand conformation  
13 polymorphism-based analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1  
14 reveals significant substructuring in hookworm populations. *Electrophoresis* v. 23,  
15 p. 27-34, 2002.  
16
- 17 HU, M.; CHILTON, N. B.; GASSER, R. B. The mitochondrial genomics of parasitic  
18 nematodes of socio-economic importance: recent progress, and implications for  
19 population genetics and sistematics. *Adv. Parasitol.* v. 56, p. 134-211, 2004.  
20
- 21 HUNG, G. C.; JACOBS, D. E.; KRECEK, R. C.; CHILTON, N. B.; GASSER, R. B.  
22 *Strongylus asini* (Nematoda, Strongyloidea): genetic relationships with other  
23 *Strongylus* species determined by ribosomal DNA. *Int. J. Parasitol.* v. 26, p. 1407-  
24 1411, 1996.  
25
- 26 HUNG, G. C.; CHILTON, N. B.; BAVERIDGE, I.; GASSER, R. B. Secondary structure  
27 model for the ITS-2 precursor rRNA of strongyloid nematodes of equids:  
28 implications for phylogenetic inference. *Int. J. Parasitol.* v. 29, p. 1949-1964, 1999.  
29
- 30 JEFFREYS, A. J. et al. Human minisatellites repeat DNA instability and meiotic  
31 recombination. *Electrophoresis.* v. 20, p. 1665-1675, 1999.  
32

- 1 JONES, B. F.; HOTEZ, P. J. Molecular cloning and characterization of Ac-MEP-1 a  
2 developmentally regulated gut luminal metalloendopeptidase from adult  
3 *Ancylostoma caninum* hookworm. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 119, p. 107-116,  
4 2001.  
5
- 6 KALKOFEN, U. P. Hookworm in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am.* v. 17, p.1341-  
7 1354, 1987.  
8
- 9 KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status  
10 report. *Trends Parasitol.* v. 20 (10), p. 493-497, 2004.  
11
- 12 KNOX, D. P. Development of vaccines against gastrointestinal nematodes.  
13 *Parasitology.* v. 120, p. S43-S61, 2000.  
14
- 15 KNOX, D. P.; SMITH, W. D. Vaccination against gastrointestinal nematode parasite  
16 of ruminants using gut-expressed antigens. *Vet. Parasitol.* v. 100, p. 21-32, 2001.  
17
- 18 KOPP, S. R.; KOTZE, A. C.; MCCARTHY J. S.; COLEMAN G. T. High-level pyrantel  
19 resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Vet. Parasitol.* v. 143 (3-4),  
20 299-304, 2007.  
21
- 22 KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. *Mega3: Molecular Evolutionary*  
23 *Genetics Analysis Software.* Arizona State University, Arizona USA, 2001.  
24
- 25 LEIGNEL, V.; HUMBERT, J. F. Mitochondrial DNA variation in benzimidazole-  
26 resistant and -susceptible populations of the small ruminant parasite *Teladorsagia*  
27 *circumcincta*. *J. Hered.* v. 92, p. 503-506, 2001.  
28
- 29 LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for  
30 DNA sequences evolution. *Mol. Biol. Evol.* v. 4, p. 203-221, 1987.  
31  
32  
33



- 1 LI, T. H.; GUO, X. R.; XUE, J.; HU, L.; QIANG, H. Q.; XUE, H. C.; BIN, Z.; HAWDON,  
2 J. M.; XIAO, S. H. Comparison of mitochondrial cytochrome oxidase 1 DNA  
3 sequences from *Necator americanus* hookworms maintained for 100 generations  
4 in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) and hookworms from natural human  
5 infections. *Acta Trop.* v. 92 (1), p. 71-75, 2004  
6
- 7 LIMA, W. S.; CAMARGO, M. C. V.; GUIMARÃES, M. P. Surto de larva migrans  
8 cutânea em uma creche de Belo Horizonte, Minas Gerais (Brasil). *Rev. Inst. Med.*  
9 *Trop. São Paulo.* v. 26, n. 2, p. 122-124, 1984.  
10
- 11 LOUKAS, A; DOWD, A. J.; PROCIV, P.; BRINDLEY, P. J. Purification of a diagnostic,  
12 secreted cysteine protease-like protein from the hookworm *Ancylostoma caninum*.  
13 *Parasitol. Int.* v. 49, p. 237-233, 2000.  
14
- 15 LOUKAS, A.; PROCIV, P. Immune responses in hookworm infections. *Clin. Microbiol.*  
16 *Rev.* v. 14, n. 4, p. 689-703, 2001.  
17
- 18 LOUKAS, A.; BETHONY, J.; BROOKER, S.; HOTEZ, P. Hookworm vaccines: past,  
19 present, and future. *Lancet Infect Dis.* v. 6, p. 733-741, 2006.  
20
- 21 MABASO, M. L.; APPLETON, C. C.; HUGHES, J. C.; GOUWS, E. The effect of soil  
22 type and climate on hookworm (*Necator americanus*) distribution in KwaZulu-  
23 Natal, South Africa. *Trop. Med. Int. Health.* v. 8, p. 722-727, 2003.  
24
- 25 MALGOR, R.; OKU, Y.; GALLARDO, R.; YARZABAL, I. High prevalence of  
26 *Ancylostoma spp.* infection in dogs, associated with endemic focus of human  
27 cutaneous larva migrans, in Tacuarembó, Uruguay. *Parasite.* v. 3, n. 2, p. 131-  
28 134, 1996.  
29
- 30 MARK, D.L. Survival of *Ancylostoma caninum* on bluegrass pasture. *J. Parasitol.*, v.  
31 63, n. 3, p. 484-488, 1975.  
32

- 1 MINNAAR, W. N.; KRECEK, R. C. Helmenths in dogs belonging to people in a  
2 resource-limited urban community in Gauteng, South Africa. *Onderstepoort. J.*  
3 *Vet. Res.* v. 68, n. 2, p. 111-117, 2001.  
4
- 5 MOSER, J. M.; CARBONE, I.; ARASU, P.; GIBSON, G. Impact of population  
6 structure on genetic diversity of a potential vaccine target in the canine hookworm  
7 (*Ancylostoma caninum*). *J. Parasitol.* v. 93, p. 796-805, 2007.  
8
- 9 NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small  
10 number of individuals. *Genetics* v. 89, p. 583-590, 1987.  
11
- 12 NUNES, C. M.; PENA, F. C.; NEGRELLI, G. B.; ANJO, C. G. S.; NAKANO, M. M.;  
13 STOBBE, N. Ocorrência de larva migrans na areia de áreas de lazer das escolas  
14 municipais de ensino infantil, Araçatuba, SP. Brazil. *Rev. Saúde Pública.* v. 34,  
15 p. 656-658, 2000.  
16
- 17 OKIMOTO, R.; MACFARLANE, J. L.; CLARY, D. O; WOLSTENHOLME, D. R. The  
18 mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhanditis elegans* and *Ascaris*  
19 *suum*. *Genetics.* v. 130, p. 471-498, 1992.  
20
- 21 OOSTERHOUT, V.; WEETMAN, C. D.; HUTCHINSON, W. F. Estimation and  
22 adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Mol. Ecol.*  
23 *Notes.* v. 6, 255-256, 2006.  
24
- 25 OLIVEIRA, R. P.; BROUDE, N. E.; MACEDO, A. M.; CANTOR, C. R.; SMITH, C. L.;  
26 PENA, S. D. J. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with  
27 polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 95, p. 3376-3780,  
28 1998.  
29
- 30 OLIVEIRA-SIQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T.; FERRARI, T. B.; NUNES, L.  
31 C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo Satate, Brazil. *Vet.*  
32 *Parasitol.* v. 103, p. 19-27, 2002.  
33

- 1 OTSEN, M.; PLAS, M. E.; LENSTRA, J. A.; ROOS, M. H.; HOEKSTRA, R.  
2 Microsatellite diversity of isolates of the parasitic nematode *Haemonchus*  
3 *contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 110, p. 69-77, 2000.  
4
- 5 PROCIV, P.; CROESE, J. Human eosinophilic enteritis causes by dog hookworm  
6 *Ancylostoma caninum*. *Lancet.* v. 335, p. 1299-1302, 1990.  
7
- 8 PROCIV, P.; CROESE, J. Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*:  
9 hookworms reappraised in the light of a new zoonosis. *Acta Trop.* v. 62, p. 23-44,  
10 1996.  
11
- 12 QIANG, S.; ZHAN, B.; SHU-HUA, X.; ZHENG, F.; HOTEZ, P.; HAWDON, J. M.  
13 Variation between ASP-1 molecules from *Ancylostoma caninum* in China and the  
14 United States. *J. Parasitol.* v. 86, p. 181-185, 2000.  
15
- 16 RADOMSKI, A. A.; PENCE, D. B. Persistence of a recurrent group of intestinal  
17 helminth species in a coyote population from southern Texas. *J. Parasitol.* v. 79, n.  
18 3, p. 371-378, 1993.  
19
- 20 RASSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence *loci*  
21 for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprint. *Electrophoresis.* v.  
22 12, p. 113-118, 1991.  
23
- 24 REICH, D. E.; CARGILL, M.; BOLK, S.; IRELAND, J.; SABETI, P. C.; RICHTER, D.  
25 J.; LAVERY, T.; KOUYOUJIAN, R.; FARHADIAN, S. F.; WARD, R. et al.  
26 Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* v. 411, p. 199-204. 2001.  
27
- 28 ROMSTAD, A.; GASSER, R. B.; NANSEN, P.; POLDERMAN, A. M.; CHILTON, N. B.  
29 *Necator americanus* (Nematoda: Ancylostomatidae) from Africa and Malaysia  
30 have different ITS-2 rDNA sequences. *Int. J. Parasitol.* v. 28, p. 611-615, 1998.  
31

- 1 ROZAS, J.; SÁNCHEZ DEL-BARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP,  
2 DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*  
3 v. 19, p. 2496-2497, 2003.  
4
- 5 SANTOS, F.R.; PENA, S.D.J.; EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a y-  
6 linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic  
7 technique. *Hum. Genet.*, v. 90, p. 655-656, 1993.  
8
- 9 SAMBROOK, J., FRITISCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory  
10 manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 7.87 p.  
11
- 12 SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion?  
13 *Genetics*. v. 5, p. 63-69, 2004.  
14
- 15 SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. *Arlequin version 2000: a software*  
16 *for population genetic data analysis*. Genetics and Biometry laboratory, University  
17 of Geneva, Switzerland, 2000.  
18
- 19 SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments.  
20 *Nat. Biotechnol.* v. 18, p. 233-234, 2000.  
21
- 22 SCHWENKENBECHER, J. M.; KAPLAN, R. M. Development and characterization of  
23 microsatellite markers for the canine hookworm, *Ancylostoma caninum*. *Parasitol.*  
24 *Res.* v. 100, p. 1015-1021, 2007.  
25
- 26 SEGOVIA, J. M.; TORRES, J.; MIQUEL, J.; LLANEZA, L.; FELIU, C. Helminths in the  
27 wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. *J. Helminthol.* v.75, n.2, p.183-192,  
28 2001.  
29
- 30 SINUON, M.; ANANTAPHRUTI, M. T.; SOCHEAT D. Intestinal helminthic infections  
31 in schoolchildren in Cambodia. *Southeast Asian J. Trop. Med Public Health.* v. 34,  
32 p. 254-258, 2003.  
33

- 1 STANSSENS, P.; BERGUM, P. W.; GANSEMANS, Y; JESPERS, L.; LAROCHE, Y.;  
2 HUANG, S.; MAKI, S.; MESSENS, J.; LAUWEREYS, M.; CAPPELLO, M.;  
3 HOTEZ, P. J.; LASTERS, I.; VLASUK, G. P. Anticoagulant repertoire of the  
4 hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 93, p. 2149-5154,  
5 1996.  
6
- 7 STEVENSON, L. A.; CHILTON, N. B.; GASSER, R. B. Differentiation of *Haemonchus*  
8 *placei* from *H. contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) by the ribosomal DNA  
9 second internal transcribed spacer. *Int. J. Parasitol.* v. 25, p. 483-488, 1995.  
10
- 11 TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA  
12 polymorphism. *Genetics* 123, p. 585–595, 1989.  
13
- 14 TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of  
15 eukaryotic genomes. *Nucl. Acids Res.* v. 12, p. 4127-4138, 1984.  
16
- 17 TONOMO N.; ANANTAPHRUTI, M. T.; JONGSUKSUNTIGUL, P. et al. Risk factors  
18 of helminthiasis among schoolchildren in southern Thailand. *Southeast Asian J.*  
19 *Trop. Med. Public Health.* v. 34, p. 264-268, 2003.  
20
- 21 TRAUB, R. J.; ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P. et al. The prevalence, intensities and  
22 risk factors associate with geohelminth infection in tea-growing communities of  
23 Assam, India. *Trop. Me Int. Health.* v. 9, p.688-701, 2004.  
24
- 25 UTZINGER, J.; MULLER, I.; VOUNATSOU, P.; et al. Ranom spatial distribution of  
26 *Schistosoma mansoni* and hookworm infections among schoolchildren within a  
27 single village. *J. Parasitol.* v. 89, p. 686-692, 2003.  
28
- 29 VAN DEN BUSSCHE, R. A.; KENNEDY, M. L.; WILHELM, W. E. Helminth parasites  
30 of the coyote (*Canis latrans*) in Tennessee. *J. Parasitol.* v. 73, n. 2, p. 327-332,  
31 1987.  
32

- 1 VAN DER HOEK, W.; DE, N. V.; KONRADSEN, F. et al. Current status of soil-  
2 transmitted helminths in Vietnam. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. v.  
3 34, s. 1, p. 1-11, 2003.  
4
- 5 VINEY, M. E. Nematode population genetics. *J. Helminthol.* v. 72, p. 281-283, 1998.  
6
- 7 WACHIRA, T. M.; SATTRAN, M.; ZEYHLE, E.; NJENGA, M. K. Intestinal helminths  
8 of public health importance in dogs in Nairobi. *East. Afr. Med. J.* v. 70, n. 1, p.  
9 617-619, 1993.  
10
- 11 WILDER, J.; HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in  
12 dipterans. *Mol. Biol. Evol.* v. 18, p. 384-392, 2001.  
13
- 14 WILLIAMSON, A. L.; BRINDLEY, P. J.; ABBENANTE, G.; PROCIV, P.; BERRY, C.;  
15 GIRDWOOD, K.; PRITCHARD, D. I.; FAIRLIE, D. P.; HOTEZ, P. J.; DALTON, J.  
16 P.; LOUKAS, A. Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic  
17 proteases and its potential contribution to host-specificity. *FASEB J.* v. 16, 1458-  
18 1460, 2002.  
19
- 20 WILLIAMSON, A. A.; BRINDLEY, P. J.; HOTEZ, P. J.; LOUKAS, A. Hookworm  
21 aspartic proteases cleave serum albumin and fibrinogen in a host specific manner.  
22 *Parasitology*. v. 126, p. 179-185, 2003.  
23
- 24 ZAGO FILHO, H.; BARRETO, M. P. Estudo sobre a prevalência e intensidade de  
25 infestação por helmintos intestinais em cães e gatos de Ribeirão preto, SP. *Rev.*  
26 *Bras. Malariol. Doenças Trop.* v. 9, n. 2, p. 295-304, 1957.  
27
- 28 ZHAN, B.; HOTEZ, P. J.; WANG, Y.; HAWDON, J. M. A developmentally regulated  
29 metalloprotease secreted by host-stimulated *Ancylostoma caninum* third-stage  
30 infective larvae is a member of the astacin family of proteases. *Mol. Biochem.*  
31 *Parasitol.* v. 120, p. 291-296, 2002  
32  
33  
34

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

***APÊNDICE 1***

1 **Loci de Microssatélites de DNA de *Ancylostoma caninum* identificados com o**  
 2 **programa *Tandem Repeat Finder* e selecionados para a síntese de iniciadores**  
 3 **e triagem inicial quanto a capacidade de amplificação por PCR**

4  
 5 Obs: Algumas sequências selecionadas para esse propósito são idênticas (Acmic4 e  
 6 Acmic21; Acmic11 e Acmic24; Acmic13 e Acmic29; Acmic 14, Acmic20 e Acmic 31;  
 7 Acmic19 e Acmic36). A inobservância inicial deste aspecto não invalida ou deprecia  
 8 o projeto em função dos iniciadores terem sido sintetizados em regiões diferentes  
 9 de uma mesma sequência, aumentando-se as chances de uma amplificação  
 10 satisfatória.

11  
 12  
 13 **Legenda:**

- 14 • Sítios de anelamento dos iniciadores
- 15 • Repetições nos *loci* de microssatélites de DNA
- 16 • → : direção 5' para 3' da amplificação pela Taq DNA polimerase

17  
 18  
 19 **1) Loci: Acmic1 (amplicon ≈ 220pb)**

20  
 21 >gi|59238410|gb|CZ219296.1|CZ219296 AIAA-aad19c06.g1 *Ancylostoma caninum* whole  
 22 genome shotgun library (AIAAGSS 001) *Ancylostoma caninum* genomic, DNA sequence

23  
 24 GAATTCCATCGAGATTCTGCGGAGAAACAAAGATCGTGTA AACAGTTTGGGGATTAAACAGA  
 25 AGTTGTTTCGAGATATTACGAAAACCTCTTCTCATATGTATTTTCAGGGTAAGAAATTTCCCAT  
 26 TGAATATGATCTCAGAGATTCTCTTCTTCCCCGCAATTGGGAACGCGATGAGAATTTTATCA  
 27 AATTTACATTTCCCATCGACCTGCCAAAGGATGTTGAGGCTTAGAGGATTGGA ACTCTGAA



1 ACTAAATAGAGTTCTTCATCTTTTGTAGATTTCTATTCTTGTAGTACGGCAATTGCAGTGCT  
 2 GCTTCAAACACCCTGCTTCTGAATACTCCGATAAGCCCTGACACTGTCCGTTCCAATGGGCA  
 3 ACCATTTCGATTACGTTTTTTTTTCTTCACATAATTTTGAATTAATCATATCCATTTTTTACAT  
 4 TATACTCAATTTGACGTCGGTCTAGCCTTTCGCTGATATTTCTTGGCGATGCTGAGATTGCACC  
 5 TTGGAGTCGGCTAGATGTTGGCTGACTGGT CACACACACACACACACACACACACACACACACA  
 6 CA  
 7 GCACATACACACCCGCACACACACACAGCACATACACCCCGCACATA CAAACGCAACATACAG  
 8 TCTGGTACGACAGAAGGTGGCCACCTCGGTGCACTTTGTCCGCAATTACAATCATTGTCCCA  
 9 AAGTCAGTCAAGTAAAGCAAGATGTGGCAACTTTTTTTGAAAGCTTATGCAGCTGAGAATTAC  
 10 TTTCCATCTCAGAAAGTCTTCCCCAAAATGCCATATTTTTTGTAA

11

12

## 13 2) *Loci: Acmic2* (amplicon ≈ 194 pb)

14

15 >gi|59244765|gb|CZ222451.1|CZ222451 AIAA-aag43a06.g1 Ancylostoma caninum whole  
 16 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

17

18 GAATTCGTCCGGTATAGATCTGATCCAAAGTCATATCGAACATGGAGTGTTCGAGGTCTGC  
 19 AATGATGGTTTAAAAGCAATTCTGAAATTCACGTAGTTCTTCTACAAATCTTCACGTACAG  
 20 CTACGTAAATCCCATCGATAGTGGTCTTCACTTCTCCTCCCTGAACTCCACCTCTACCCTC  
 21 GCCAATGTCCCGTGTGAAGCTCTGGAGCATCAACGAGAAGTGGAGTGGCCGAGCCACAC  
 22 GCGGAGAAGCCCATCATCGACCTGAAAAGTTG ACCACTTGCGACCGTTCCATGGGTCTCCA  
 23 GA  
 24 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTCACTGTACCTCTACTCTGTAGAACGTATTCCTTTGCTC  
 25 GAACTCAACGACAGTGACCTGGGTGTCGGTACGGGAGGTGCGCAATTCGAAAGAAAGTGTGA  
 26 ACGGCACCGAGATGTCCTGAGAGCGATAGATCACGAACGACTCGTTCGTCCGTGAGTGTGAGA  
 27 GGTCCGCTGTGAGATGAGGTCAGTTCTGATACATAAAAGAATTGTTCTAGGCATATATCTGG  
 28 AAATTACATCTCGTAGCGAGTCAAGAATGATTAGCAGCACATCTCACTGCAGATACGCCGGC  
 29 TTTGTCTTGGGACTTTACGCATGAGTTTTTTTTATGAATGTAGTTTGCACACCCAGAACCAGT  
 30 ATTGTAAGCCCAGTTAATCAGTCCATGAAGCTACTAATTACGTTTAGGAAGCATGTTTCGAA  
 31 AAAACCCGAAAACCTTCCAAT

32

33

**3) Acmic3 (amplicon ≈ 195 pb)**

>gi|56778943|gb|CW974881.1|CW974881 AIAA-aaa83d05.b1 Ancylostoma caninum whole genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

CTGTGGTGGATTCTTTGTGGCGAGAAGAGGTCACAGATCAGCTGTTCCCTTCGAAAACAGGGT  
 CAGGCATGAGAGCTGAGAAAAGTATGTACCCAAGTGTGGATGAGACTTTCTTTAAACTTCGG  
 CGCGGGTCGCGACATCCCTAGTGC<sup>→</sup>CGCGTCAA<sup>→</sup>ACTAACGACTCAAAATGGTTAGCATTGAAAT  
 GAAACTCATTTCGAGTGAGGTTACAATTGAGTCTTTGGTGACCTTGAGGTGTGTGTGTGTG  
 TG  
 TGTATTTAACCCATTAGATAAAG<sup>←</sup>CGCCAGTGGATTAATGCGAAGAGTGCTTTTCGTCTGACA  
 T

**4) Acmic4 (amplicon ≈ 264 pb)**

>gi|56769660|gb|CW968933.1|CW968933 AIAA-aaa14f09.g1 Ancylostoma caninum whole genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

GAATTCAACCGTAAGGGTCACCATTTATTACCATGATTTGGGAATCACCGATATCAGGATGA  
 TTGTGATCACCCATGTCAGGATCATTCAACGAGCTCACGAAGGAGAAAGGAGACATGAGGAG  
 AAATGTGAGAAAAGAATATACAAAATGCTGCAAAAATATCGTCATTTCCACATCAAACGTCTT  
 TTTGAACCCTTTCAGCGAGCGCGAAGTTCAA<sup>→</sup>ACTTAACAGCAGTTGCTTTTTCTAACGGCTC  
 AATTACACGCAAAATACCTATTAGTAGTTATAGCTCGTTATGTCTCAATGTTGTTAAAG<sup>→</sup>TTC  
 AGGAAGAACGGGACTTTTAAACAAAATGCACTTTCTAGAAGAAATTCATGTGTTGAGTGACAT  
 GTTTTTTGTGTCACCAAGTTGTGATAGGAACGACTCCTAGAATGAATGAATGAATGAATGA  
 ATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGGATGGATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT  
 GAATAAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAGCAAGTCC  
 GAATCTGATCTGG<sup>←</sup>AGCGCCGGTATCATAATTTGGCAAGCCAGTAATTC<sup>←</sup>CGGGGACACTTTG  
 AAACCCAGCACGCTTACGAGTGGGAAAGGTGAAGAAATGCTCCATAGATCCTTGACGAAAAC  
 GTTGAGATGCCACGCATGGCTGTGATAATTTCCCTCTCTGTCCGTCTGCCTGAAATCGTCTC  
 AGCAGACATTCTCAGGAGCAACTCTGCGCTGAAGCTAACACCCAGGAAATTAACAAAACCC  
 TTGTTTGGCTTCCTTAA

1

2

3 **5) Acmic5 (amplicon ≈ 266 pb)**

4

5 >gi|56770807|gb|CW970080.1|CW970080 AIAA-aaa23d10.g1 Ancylostoma caninum whole  
6 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

7

8 GAATTCTTCCATAGCGGACAAGAGTGTACACTCGCGGAGCATAGCCTGTGCCACGCCCATTT

9 GTTATAATACGTGTTGTCGGGCTGCTTAGCTGATGTTCTCTGCCGTCCCTGTTGTCCTCAT

10 TAACATTCATCTTTGCGTGTGCTCCCGAAATCAACTCCCTGCAAATTTTTTCGATTAGATAA

11 TTCAGGAAAGGGTGACATATTGCAGTGGAAAATGTAGTCCCTTAGTGATATTTTCTAGACTTC

12 CATCAAATCTCTCCTCCCTAACAAAGCTGCAGCAGCTATTGGAGCCCTTTCACAGTCGCTTT

13 CACCCTATTCCACTTTGACTTGCTTAGTCACTGCTGCCGTGTTGCAACCGCGGAGCGGTGTA

14 GTCGCGACGCGGTTCCGTTTGCGAACACACACACACACACACACACACACACACACACAC

15 AC

16 TTTGAACCCTAATTGGTTATTGGTTATACCCCATCCGATCTCTGTGATGCGTGTCAGACTAT

17 GTCAGGACAACCGAATCGGCATGTCGAAACTGCGTCGCGGCCGTTATATTTGCGAGGCTTCG

18 AGGCATTGCTAATTGGAGTCATCATCCACGGAAAATTCCACTCCTAGGATCTTGAGCGTTTC

19 GTGCTTCAATCGATTGAGTACTAGTGAGAAAGTTCTCTATCCGAGTGATAACAGTTCATACC

20 GGGTTTCAGCCGAGCCCTGCAAGTCATATATTGTCTGAGCCCCCTACTGTCTTCGTGAAGGG

21 CGAAAAATAACAATACTAAGTCT

22

23

24 **6) Acmic6 (amplicon ≈ 241 pb)**

25

26 >gi|56780553|gb|CW976240.1|CW976240 AIAA-aab22b04.b1 Ancylostoma caninum whole  
27 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

28

29 TCTCGCCCTGTGGTGGATTCCAGCCCGCCAGCGCATTTCAGGTAAATAGTACTAATAGGTAGG

30 TATCCCACTCTATATCACCAAACACCTCCATTCCCTAAGATATTTCTTTATAGACGCTTAGC

31 GTGCGTGTAGCGTGATACTTGACACAACAATAGACACAGCTTTTGGATAACACCCCTTAGGA

32 GGTTTGAAGAGACGCCTAGCCTACGACGTGGAGGATTCTAAGAGAATAATCCGTGAGCCAT

33 AGATCAGATTTATATATAATTATATAGAGTAAGATAATAAAATGGAAGTGTGGAATGTGGAA

1 ATCATATGGGTTGATTCTTGTAGTGAATACGAGATACTCGAACTATGCTGAGGCTAATTTCC  
 2 ATGAAGGACTCTAGAATTA AAAAATTCGAACTTATATTCTCAATTCAGAACGTTTTCTGTC  
 3 CCTAATACCCGTA CT CACGACCTTAAGGCTCAGAGGCTTGGTGAGTGCAGGTAATTTTTGGA  
 4 CGAATTTTCACGATATGATGTGAGTATGATACGATATGACGATAGGAAGCGAACGGACAAGC  
 5 CAATCAACGCTACACATTTGTCTACATTTTGACAAATCCAGGACAGAATAGTGCGGATAAT  
 6 AATA  
 7 TAATA  
 8 TGAAAAATTTCTGCTGCAGCTCAACATTCAGGAATGCGGTAGATACAGTACGATTCAGAATC  
 9 TTCCAACACTCTACAAGGTGCTATCTGATGATCTCCTGATCTTTTTTCAGACTTAGGCCTAGG  
 10 ATTATCCCCAGAATATTGGTTACCAAACAA

11

12

### 13 7) Acmic7 (amplicon ≈ 204 pb)

14

15 >gi|59256716|gb|CZ228401.1|CZ228401 AIAA-aae21h18.g1 Ancylostoma caninum whole  
 16 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

17

18 GAATTCGCTTAGACAAAATTA AAAATTCCTACTGAATTTTCTTCTTCTAACTTTTTTGAAAA  
 19 GATCAGTTTTTCAAATAGGCAAAGACAAGGGATTAGGCGAGTACTCGCAAGTGCACCTCATCGA  
 20 GCCACTGTTCTCGCGGAGATGTTAAGTGATAGTTTTAAATTCGCCTTCATCTTTACTGAACA  
 21 TGTAACAAATTTGCATGTAAAAAATGAGATTTATGAAAGAGTTGAGAAAGTAAGCAAGCAAG  
 22 CAAGCATAATCTTACACTGCTGCTTTTTTCTTGAGCCGCTCCGTCCGCGAAGTGTGAAATTTT  
 23 TTGTTGACCTAAACAAGACAACATTTTGATGAAAACAGCGCTAAAGAGGTTAGTATATACAA  
 24 CGATGATTAAATGTTTGGGAATCCATCCATTCAGTGCAGATGATTTTAAAAATGTACGATTT  
 25 GTATCATAGGTTTGAAATGAATCATCAGAATTAATGAGGCTTCACTGCATTGCAAGTAATTT  
 26 TGCTCCCTTCTACACATTGCATAGCGTAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA  
 27 ATA  
 28 AGGAATAAATGAGTGCTCACGAAATCAGCGGGCAGCAATGCTCCGCTGCCGCCACAACCTCGA  
 29 TCAAACGACTCCACGCTGATCCTTCTTATCCAGGATCTTGACATCCAATAGATGTATGTTA  
 30 GAAACAGTTACGTTTTCCGTA CT ATGTCTCTCACACTGTGGACGATTGCCAAAGTTCCAAGG  
 31 CCATCAAATCTCAGAACGAAAAA

32

33

**8) Acmic8 (amplicon ≈ 393 pb)**

>gi|59247910|gb|CZ224025.1|CZ224025 AIAA-aaf80d09.g1 Ancylostoma caninum whole genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

GAATTCCTTCTCCCACAAACGGCGGTGGCGCCCCTCTGACTTAGTTAGCGACGATTCTTATT  
 GTCCTCTCCTAAATCATGCTATCATTCATGTCGCATCGCAACCCACATCCTTGTCATCCTTC  
 ATCCGCTCGGCTCGTCCTCCTCCTAACGGCATCGTTCCCACCTCTCCCCTTTTATACGA  
 TCTTGCAATCACAGGCCATTCCAAATGTAGATGTAAACAATTTTCGGTCATAATAAGAAATT  
 AACACGTCTGTACATGACAAAAGTGCCACGAAACACCTGTAAATTAAACTAAAACCTAAAAT  
 TTACCATATAATTCAAAGCACCACCTGAACACGATGGTGTAGGTATCTTCCGTTTTTAATGGC  
 TCGT **TGGCTGGTTCTCGTG** CACAGATGACACACACACACACACACACACACACACACACA  
 CACACACACACACACACACACACACACACACACACACACTCACACACACACATGAA  
 CTGCCAGTTAATAGATAGTATGATATTTGCCGGCGGTCAGTGGCCTGAAAAACGGGCTGAT  
 GCCTGACACCCTTCACATAGCGGGCCAAACCCCGACGGTCATGCATCAACCCAATTGATTCT  
 CTGTT CAGCCTGCGATT CGCCGATAGGGCGTCTAGCCCGCTAAATGAGTGTTCGCCCGCT  
 GTTAGCC CAGCTACGTGTCTTCGTCTCCTGTCCTGAGTTGTT CGAATGACGTGGGAATATCGGA  
 TCGCT **GAGCTTATACTGCCCTT** GAATAGTGTGCTGGCATGGTAGCAATTGTACAAAAAT  
 TGTAGAGGGGTTGAAACGGTTTGCCGGACG

**9) Acmic9 (amplicon ≈ 220 pb)**

>gi|56766959|gb|CW966232.1|CW966232 AIAA-aaa50g04.b1 Ancylostoma caninum whole genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

GATTCACAAACGGAATGGGAAGAGAACACGGATACGAAAGGAAACAATGTACATCTAGGTGA  
 CTTAGGTGGGAGGGTCCGCCAAAACAGGACGCGCACCCACACCGTTGGATCCGACTCCAAG  
 CGTTTTCTCACATTTGAACGCCGGCGCACCGTTATCACACCGTTGGACCCGACTCCAGGGGT  
 TTCCCCACTTTTGGACGCCGGCGCACTCCTACAGCGACAGTGGACCCGTTGCAGAGCA **TTTT**  
**CTTCGGTCTAGGC** CACGCCCTCGGATTTGTTTT CACACACACACACACACACACACACACAC  
 AC  
 ACAGAGACAC

1 AGGCGTGACAGACTACGCCCTTTATTATAA ← GTCATGATATATGATTACTTTACAGTGTGAGA  
 2 GCTCTTCTAGCGGTAAGCATTCT

3

4

### 5 **10) Acmic10 (amplicon ≈ 172 pb)**

6

7 >gi|59247856|gb|CZ223998.1|CZ223998 AIAA-aae73n04.g1 Ancylostoma caninum whole  
 8 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

9

10 GAATTCGTAGTATAC → GTC AATTGTGTTTTTATTTTCGGCCACATGGTTTCCCCATGTAATAA  
 11 ATAA  
 12 AATAATAATAATAA ← TTGTGAAGAATGAAGCATTCTGAAGAATGAGGGATACAACGATGTGATT  
 13 TGCTATCCTATCACTGTTATTGTAAACAAGTGTACATTTAAGGCATTGTAAGAGTAGGGTAG  
 14 CATTCAATTCGCTTGTGCTACTGTGGTTGAGGGTTCTCAATAAAGATCCTTAACCACACTTC  
 15 TTCTGCACACAAAAGAAGCGGTGCAATCACTTGGGGGCCGAACGCCTCTACCGCCTGGAAGT  
 16 ACTGCACTCAGTTGCAGTACTAAGGCGTGGACCCTGCCAAGCCGGCAGAGAGTGAAGGAACC  
 17 TGCGGAGTCAAAAACGTAAGGTTTCTGTTTCAATCCGCATCCTGCGTGGAGGTGACCTCGCC  
 18 TAATTCGCCTTTCAACAGGATGACGAATAACGACAGTATGGACGACCTCGACCTCGAGCGCC  
 19 TACTGTTAGATGACCCACGGCGGCGGAGCAGATTGCTACGATGAAAGCTTCGACGGACCGC  
 20 CTAATCGGGACAGTACAAAAGCTGGCAGAAAACAACGCAGCACAGGTAAATTCAGTTTGCGA  
 21 GGTCATGAGCAGCAAAATCAAGACTATCCAAACCATACTGACTCGTTCTTAGAAAACCTCAG  
 22 CCAAGAAGCGCAAAAAGAAGACAGTAGAGCAGCCCTTTTCGGCTCTCGATGCTGAATGCAAGG  
 23 TCAATGTTACGCGCAAGCTTGCCTAA

24

25

### 26 **11) Acmic11 (amplicon ≈ 261 pb)**

27

28 >gi|59247553|gb|CZ223847.1|CZ223847 AIAA-aah00p05.b1 Ancylostoma caninum whole  
 29 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

30

31 GATTCATTGTGCAAACTGGCCGAGTGCAGAGGGATCAATATAAAGGTCTGTCATCCGTCAT  
 32 CAATATGAAGGCAACTGTCACAGTCTATCAATGAATGGTTTGAAAAGGAAATGGTTTCAGTC  
 33 AAAATTTGAAGAGGAAGCGGAGGGAGAGGAATCCATGC → GCTGAGTACGAGACCGAAATAG

1 AGACGATTTTATAGATAGAGAACATTCAGACGTTGAGTTGGGCTCAATCCATGATTTATTT  
2 GATTCAATTGTTGAAGTTTAGAATTAGAAATTTTGACATAAGGTCATTTAATTAGTTGGCAC  
3 GTGAGTAAGTGAATGAGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT  
4 GAATGAATGAGTTTATTATTTACTCAGTACACCACATAGGTGCGCCATCAGAAATCATATAG  
5 GACCATATAAAGAGGAAGCAGGTAAACTTAAAGACAAAAATCTAAATAGAACCTAATAGCTC  
6 AACCTTAAACAATAACATCTAGTACTGATTAACAAAAACATGATGAAGGGACAGTTACCAAG  
7 CCTTTAGTTAGATAACCACGCCGAAGAAGACTAGTCAAACATAATTTGAAAGGTTGTAAAGT  
8 ACGTGCTAAATCCATGACAGAAAGTGTGAGGTCAATTTAGTAAGGGTAAAGATGAGGGATCG  
9 TGGAGGAAAACAC

10

11

## 12 **12) Acmic12 (amplicon ≈ 219 pb)**

13

14 >gi|59246896|gb|CZ223520.1|CZ223520 AIAA-aag85n02.b1 Ancylostoma caninum whole  
15 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

16

17 AAAACAACCTGCAGGCCATTAACATGTCTGAACATGACAAAAGTGGCCCGAAACACCCTTAAA  
18 TCAAGGTAAAAATCAAATTTACCACGTTTTTCGTACATAACTCGATGCGCTGAACACAATGG  
19 TGTAGGTATTTTCCGTTTTTCGATGGCTGGTTCTCGTGACACACACACACACACACACAC  
20 AC  
21 ACACACACACATACACACACATACACACACACACACATACACACACACACATACACACACAC  
22 ACACACACACATGAACTGCCAATTAAGAAGAAGTATGATATATCGGTTACAAGATATAACCAG  
23 CACTGTACAAGTTATAAGAGAACAACACCGACAAAACTGGAGTGTGAAATCGGAGACATAT  
24 ATCAAGAGAGTGATCCTCGAAGAGTGAAAGTTAGTGAAAAATAATTGAATAGTCAATTTGGG  
25 GGGGGGGGGGGGGGAGGAGGGAGTGTGTATCTCATCGGCGAGGAAGAGCGGTGGCCGCCAAC  
26 ACCGTAAGTCTGACAGATGAGAATATCGGGGCTCCAGATACAATCTTAATATTTCCCGTCAA  
27 ACCTCGCAGAGATCCACTTATTGTCTGGTGGTGTGGATAGAGGTGATCTAATTAATA

28

## 29 **13) Acmic13 (amplicon ≈ 283 pb)**

30

31 >gi|56762127|gb|CW961400.1|CW961400 AIAA-aac21a06.b1 Ancylostoma caninum whole  
32 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

33

1 CCTGTGGTGGATTCTCTCTTGAGCAATTCCCCGGTCTTCTTGAACAAAAATGTCCTCAAC  
 2 ATCCTCGTAGAGGAAGAGTAGCGCTTTTGAATTGTTGCAGAATGATAACAGATTGGTGGAGG  
 3 AAAGCGAACAGTAGTAACACAGATAGATTGGCTGCAATTTTCAAACGAATGAATGAATGAAT  
 4 GAATGAATGAACGAACGAACGAATGAATGAATGAATGAATGAGTGAATGAATGAATGAATGA  
 5 ATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGCAATCCAATAAAGGGAATATATTAG  
 6 TGCATCTTCAACATTTTTCAAAAACATAGACAGCCCTTTTTTGAGCACATACTGGGCTCCGT  
 7 TTCTGTTTCACTTCTTATATGGCACGCAATAATTAGTTTCCTGATGTATTGCTATCACTCTA  
 8 AATGATTTATTAGATATCGTTCCTTAGAGAAACAGCTTATGTTCCGAGAGTATGGGAAAGCA  
 9 AAAGAGACTTTATTCTTAGCACTACTAGTTAATAAACTCATAGCAATTATGGTAGTTCGAGA  
 10 ACAAGTTGAGGGAATTGGTAATTAAGTCCTGCTCAAGAATTCAGAACACGGGACAATGAACT  
 11 CATAACTTATTAATGAATATCAATGAGTAGAAGGAATACACGTGTGCGACCATGACTATCAA  
 12 CGTGCGACATAGATAGATAATCAGTAGATGTGATCAGTTAGAGAGTCGTACGCATATCGCAT  
 13 GTACATATGCAGTAATGACTCTGTGTC

14  
15

#### 16 **14) Acmic14 (amplicon ≈ 306 pb)**

17

18 >gi|59636208|gb|CZ250370.1|CZ250370 AIAA-aag09p04.g1 Ancylostoma caninum whole  
19 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

20 GAACTTTTGGGAAGCGAACACGTCTTTGCGGCGGCGATCATGTCCATGATTTCTGAATAC  
 21 GAATATCCCCATTTACATCTTGCAAACCAGTCTTCTTAGAATAATTTTCAGGTAAGGCATGA  
 22 GCAAGACGTTGAGGACCAGTAAAAACAGATTCCTGCAGCAAAATTTGAATGAATTGATCAAA  
 23 AGAGTTCGAAAAACTCATTAAGTGCACCACTCTTATTGCCTACATAGGGCAACTTATATAGA  
 24 TGCGTGGGTCCAACGCGCGTACGTACATACCATGAACGAGCCAGTCAGAGCCATAGTTCTGA  
 25 CGCATCTCAGACGCGCGTACGACGCACGCATTTGCTGCCTCGCGGCGGCCATGTTGCATTTCT  
 26 CATTTCAGGGTACACGTTCCACTTTGGCTGCTTTTTCACAGAAAATTCCTTGCAAATAGATGCG  
 27 TGCGTATGATGCGCGACTGACGCAGATATCTGGTAAGAAATGTCCTTATGCATACGTACATT  
 28 CCGTTGAAATCAGCATTCTCATTCTCGATCTCTCCTTAGCGAGGTCCGGATCAGTGCAGTCT  
 29 TCCTTTCTGGCAAGATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTC  
 30 ATCCATTCATTCATTGCTAGCTAAGCGAGACGTTAGCAACAATGATATTATACATATGCTTT  
 31 TATTTCTGCTTCAAACTATGAAAGCAAAACATAAGGTTATTAACGGGTCGGGGGTGAAAAT  
 32 TCTACGTTTGTACATTACTTAGATGCGTGCCTTTGATGGCGCCTGCGTTCATAGGATGAA  
 33 GGATTAAACTTACATTTGA



1

2 **15) Acmic15 (seqüências com espaços flaqueadores curtos e/ou incompatíveis para**  
 3 **desenhar iniciadores)**

4

5 >gi|59209001|gb|CZ207769.1|CZ207769 AIAA-aae36h23.g1 Ancylostoma caninum whole  
 6 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

7

8 GAATTCCAGTGGGAAAATATGTATATGACCCATATGCATGCACATCTGCAAGAGAGAGAGAG  
 9 AGAAGGAAGAGTTGGGCAACA  
 10 GAGAACGGAATTTTTATTATATTCTGGTACTTTTTAATTACACTGAGTCGAGTATTCAGAAG  
 11 AAAAAGTTGAACAATCGTGCAAAGAAAAGTCGAGCGGAGAGGGATCAGATGTTTCATATACTA  
 12 CGTACTCAAATCCCTCCGGACGGAAGATAACATGGTTCTGTTGCAAATAACCACGTTTCTAT  
 13 TCAACCATCCTGGTGAATTTTGTGTCAGCCATCATGAAAACATTGGCAGAACAACGGTGTAAAC  
 14 AAACAATCCAACCTCGGTAGTACACATCCGTACAATTGGGAAACTATGGCCGTTGGTGAAAG  
 15 CACACAACAAAACAACAACCTCTCGCGTTGTGCTATCTAGAGTGGCGATCTGGTGATGCTTA  
 16 CTCACAATAACAGTACTTGTAAATGTCGTTCACTTTCATGGTCATTCAGCGTCATCCATTCAA  
 17 ACTGTCCTTGTACTCGTGCAAGAGTAGTCAGGAGCAGGACAAAAACGACACTCCACTCTCT  
 18 CTCTCCATTTCTTGGCATACTACTCAGGGGTGAAAATAGATAACCACTCTGTAACGAGCAAAA  
 19 ATCGAAATGAATTGGGTTACCCAATTCGATAATTTTAG

20

21

22 **16) Acmic16 (amplicon ≈ 353 pb)**

23

24 >gi|56779997|gb|CW975684.1|CW975684 AIAA-aaa95c09.b1 Ancylostoma caninum whole  
 25 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

26

27 CCTCAATGCGCTGAACGCGAATATGACAACCATTTTGC GCCTGTCTATCGATTTATTGATTT  
 28 TATTGATTTTTTGTCTTTCTTGACCAGGGACTAGCGAGAACATGCCTACTGGGGTACCTCAA  
 29 TGCGCTGAACGCGAATATGACAAACATTTTGCATGAAATATCGATTTTTTCGATTTTATTGAT  
 30 TTTTAGCTCTTCCGCCCATTTGGAGCGGTGAAGGCATCTCTCCTGGGGTTCCTCGATATGCTG  
 31 AGTATGAATATGACAACCACTTTGTACGAATACGTCGATTCAATGTCACCGGAATAGCTTTG  
 32 CTAACTTTTCTCCACAAGACGATGGGAAACGTCACCTGGGCTTCGCTAACATGCTGATCAC  
 33 CAAAATTATGAAGATTTTAATGAATTTGTCGATGATAGTAATTAGCCTCAGCAG **TATGATGT**





1 ATGGAAAATTTTACCACTCACCCGAGCCGCTGCGATTGGAAAAAAGAAGCAGATCATTGT  
2 GATTTCTTTACCAAACCATTACGTGCCTCC

3



4

5 **20) Acmic20 (amplicon ≈ 289 pb)**

6

7 >gi|59636208|gb|CZ250370.1|CZ250370 AIAA-aag09p04.g1 Ancylostoma caninum whole  
8 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

9

10 GAACTTTTGGGAAGCGAACACGTCTTTGCGGCGGCGATCATGTCCATGATTTCTGAATAC  
11 GAATATCCCCATTTACATCTTGCAAACCAGTCTTCTTAGAATAATTTTCAGGTAAGGCATGA  
12 GCAAGACGTTGAGGACCAGTAAAAACAGATTCCTGCAGCAAAATTTGAATGAATTGATCAAA  
13 AGAGTTCGAAAACTCATTAAGTGCACCACTCTTATTGCCTACATAGGGCAACTTATATAGA  
14 TGCGTGGGTCCAACGCGCGTACGTACATACCATGAACGAGCCAGTCAGAGCCATAGTTCTGA  
15 CGCATCTCAGACGCGCGTGAGACGCACGCATTTGCTGCCTCGCGGCGGCCATGTTGCATTTT  
16 CATTTCAGGGTACACGTTCCACTTTGGCTGCTTTTTCACAGAAAATTCCTTGCAAATAGATGCG  
17 TGCGTAT  GATGCGGACTGACGCAGATATCTGGTAAGAAATGTCCTTATGCATACGTACATT  
18 CCGTTGAAATCAGCATTCTCATTCTCGATCTCTCCTTAGCGAGGTCCGGATCAGTGCAGTCT  
19 TCCTTTCTGGCAAGATTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTC  
20 ATCCATTTCATTTCATTGCTAGCTAAGCGAGACGTTAGCAACAATGATATTATACATATGCTTT  
21 TATTTCTGCTTCAAACCTATGAAAGCAAA  ACATAAGGTTATTAACGGGTCGGGGTGAAAAT  
22 TCTACGTTTGTACATTACTTAGATGCGTGCGTTTGATGGCGCCTGCGTTCCATAGGATGAA  
23 GGATTAAACTTACATTTGA

24

25

26 **21) Acmic21 (amplicon ≈ 325 pb)**

27

28 >gi|56769660|gb|CW968933.1|CW968933 AIAA-aaa14f09.g1 Ancylostoma caninum whole  
29 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

30

31 GAATTCAACCGTAAGGGTCACCATTTATTACCATGATTTGGGAATCACCGATATCAGGATGA  
32 TTGTGATCACCCATGTCAGGATCATTCAACGAGCTCACGAAGGAGAAAGGAGACATGAGGAG  
33 AAATGTGAGAAAAGAATATACAAAATGCTGCAAAATATCGTCATTTCCACATCAAACGTCTT



1 **23) Acmic23 (amplicon ≈ 348 pb)**

2

3 >gi|59263173|gb|CZ231631.1|CZ231631 AIAA-aaf62o01.b1 Ancylostoma caninum whole  
4 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

5

6 GATTCGGGAGGAAGCAAGGCTTCATTTGATTTGAGGACATCGAACCAGGAAGTCCCAGGAAG

7 CCAGGCATTGAAGGGGAGAGGATAGAATCTTTGATTGGT  TGCTGGAAAGCTTCTGGA AAAA

8 ATTCGGATTTTCATTGATGTAAGTGGCAAAAGTAGCAAAGATCGTTGTGCAATTTATTTGTAA

9 TTCCCCTCGTAGTCGATTCTCTTGTGCGGAGTGAACAAGTGAACGAATGAATGAATGAATG

10 AATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGATTGGATGAATGAATGAATAAA

11 TAAATAAATGAATGGGTCAATGAATGAATAGATGAATTAATTAATCAATGAGCGAATGCATG

12 AGTGGGCAAATGAATGAATGATGGAATGAATGGATGAATTCTGAACGTTTCGTTTCACAATC

13  ACATCCGAGCTCACAA AACAGCCATTTTCAAACATCGTTTTGTGACAGCCCCATTTTGGAA

14 AAAAAGTGCAAAACGTATGTGCATAAGATATAACAAAAGAAAATTTTGAAGGAAATAGAACA

15 CAAAAGTAATTCTCTTTTTAATGGGAATTTTCCCAAATGCTTGAATCCATTTGGAAAAATTT

16 TCAGAAGACCAAAAAGTTCCACGACGAATCCGCCGCAGAGCGTGGATTTCGTGCACAATCTT

17 TGCAGTGGATGCACTACGAAATCTTGCAACAAATCGCTGAGCCAGAAACAATAATAATGTTA

18 GGGACATTAGGAAAGCAATGAAGATAAGCAAAAGGGAAAATGGTTACCAAAAAAATCTAGCG

19 AAAGTCCTCATCGAGTATTCCAGAGCCAGATGAATGCCGCGCCGGTGATGGGCCTTCTGTGA

20 AACCTAA

21

22

23 **24) Acmic24 (amplicon ≈ 209 pb)**

24

25 >gi|59247553|gb|CZ223847.1|CZ223847 AIAA-aah00p05.b1 Ancylostoma caninum whole  
26 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

27

28 GATTCATTGTGCAAACTGGCCGAGTGCAGAGGGATCAATATAAAGGTCTGTCATCCGTCAT

29 CAATATGAAGGCAACTGTCACAGTCTATCAATGAATGGTTTGAAAAGGAAATGGTTTCAGTC

30 AAAATTTGAAGAGGAAGCGGAGGGAGAGGAATCCATGCGCTGAGTACGAGACCGAAATAG

31 AGACGATTTTTATAGATAGAGAACATTCAGACGTT  GAGTTGGGCTCAATCCATGATTTATTT

32 GATTCAATTGTTGAAGTTTAGAATTAGAAATTTTACATAAGGTCATTTAATTAGTTGGCAC

33 GTGAGTAAGTGAATGAGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT

1 GAATGAA TGAGTTTATTATTTACTCAGTACACCACATAGGTGCGCCATCAGAAAGTCATATAG ←  
 2 GACCATATAAAGAGGAAGCAGGTAAACTAAAGACAAAATCTAAATAGAACCTAATAGCTC  
 3 AACCCTTAAACAATAACATCTAGTACTGATTAATAAACAATGATGAAGGGACAGTTACCAAG  
 4 CCTTTAGTTAGATAACCACGCCGAAGAAGACTAGTCAAACATAATTTGAAAGGTTGTAAAGT  
 5 ACGTGCTAAATCCATGACAGAAAGTGTGAGGTCAATTTAGTAAGGGTAAAGATGAGGGATCG  
 6 TGGAGGAAAACAC

7

8

9 **25) Acmic25 (amplicon ≈ 354 pb)**

10

11 >gi|56762986|gb|CW962259.1|CW962259 AIAA-aaa04f12.b1 Ancylostoma caninum whole  
 12 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

13

14 ATCTCGCCCTGTGGTGGATTCTCTGAGGGGACCTCGATGATTCGTTTCCAAGCACATAAGA  
 15 CATCTATTTAGAGCTTAGTAAAGAATTCCCTAGAGATGTGCGCAACGCTCTCGAACGCTGGC  
 16 ACTCTTCTCTGAGCAGTTGCTGCCCCGAGTAGTGCCCCCTTCTCCTGTTTTTGTTCCTTCCAAG  
 17 AGCACTTCACTAACTTGGGCGAAAGGAAGCGCTTCTCTGCTATACATAGAAAACGATTAGG →  
 18 AGAATGTTGATAATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCAT  
 19 TCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCAT  
 20 GTTCACTCATTCTACCACATCCATGATTTATTCAGCCATCTTGAATGCTTAAATGGTGACCA  
 21 TATATATATTAGCTGAGTTTAGTCTTACTGCATTGAGAATAAGGTTGATGAAAATTCAAGGA  
 22 GAAAAAAGAAGAAAGAATAAGCAGCATAAAAAACA CCTTCCATAACAAGCACGCAATGTTTA ←  
 23 TGATGACTTTCATAGGAGGCACGCAATGCTTATGATGCTCACGCAACGATAAATCTTTTCA  
 24 GACAACCTGTGCATTTACTCATTTACCGGTCCATTCATTCGCTCAATCATTTTTTTCATTCAA  
 25 TTTCTGCCAGCGTTTGAATTTCTAAACTCGTAAGGGCTATTATCCTCACCTGCAGTGTTTC  
 26 CATTATTATTTTAAGCTTAGCGCTTAGCGTTTTTTTTCTTGCATTTTTTTCTGTAAAACCTGTT  
 27 GCCAAAGCTCACACAGAAGTAGGAAAATCTTTCGAAAAACAATTGAGAAAATTCGCTGACC  
 28 TTACCCACTGCTTTCCTTTTTT

29

30

31 **26) Acmic26 (amplicon ≈ 299 pb)**

32

1 >gi|59242387|gb|CZ221271.1|CZ221271 AIAA-aad14a13.b1 Ancylostoma caninum whole  
2 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

3  
4 GATTCTCCATGAAGTTATTATCCAAATAACTCCATTATTTTCATTTTCCGCCAATATGTCGGT  
5 TAAATAATGGTCATTCAGGTCCGTCAGCATACTGATTACCAAATGATGAGCATTTTTTCATG  
6 GATTTGCCGGTAGTAGCAGATTTTCTCGTCATTGTGAAATAGCCGGGGTAGTGGAACACCCG  
7 AGCGAAGCCGGGTACACCGTCTAGTACATACATACATACATACATACATACATACATA  
8 TACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACACA  
9 GATACACATACATACACACACAAAGCTTCTACCTTACATATACAGACATATGTACATACAA  
10 ACATTCACTTTTATATTGCCACTTCCGACTTTTCATTGGACCTCGGCATATTGTAAACTATTT  
11 TCGGTAGTTTTGTTGAGCCGACACGGGGTTGTTATAGATGACTTTATTAGGCTGACGCGTTT  
12 TGGCGCAATCGCCATTTTCAGAGCCTTTAATATGCATATATACAGGTGAACGAACACCTAGA  
13 ATGATGACTTACCTGCGATGAAACTCGATTTCGCAGTGGCCAACCCAACCTATCTCGTACTTGC  
14 TAGCGCTGTGACGATGCGTCAGCTCTCGCACGTTTCAGTCACATGCCAGCATTATACTCGCG  
15 TGGAGGAGCCTTAAGACCCAAAGAGGCGTTCATCCAAACATTGGAAAATAGCGCTGTGATTT  
16 CGTGGGTGTTTTCTAGCATGTTTCAGCTATTCCATTAATCTGAAATGGGTTCTTGCCTCAT  
17 TAAAATCGTCTAATCCTGTAAAA

18

19

## 20 **27) Acmic27 (amplicon ≈ 385 pb)**

21

22 >gi|59206458|gb|CZ206942.1|CZ206942 AIAA-aad60f15.b1 Ancylostoma caninum whole  
23 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

24

25 ATCGCCCTGTGGTGGATTCCAAGTGTCCCTTCAAGCCAGGGTTTCTAAAGCTGTCAAGATG  
26 TTCGCAATAGAATTTTCGTGGATTACTGCCTTCAAGTGAGCCGAATAACTGTGTCTGATCCC  
27 TGATCGTATGACATGCCCTCCCTCCCCTGCATCGATGGAACCTATCAATTATTCAGTTCGAAT  
28 GAATGAGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGA  
29 ATGAATGAATGAATGAATGAATGAA GTAGATAAATGAGATCAGTAAATGAATTATGGCTGGA  
30 TAAGTAGTTGAATGAATGGGGAAGCGATTAAGTAGATGAATGAGTGAATGGTTGAATGAGTA  
31 GATGAATACTTGCCCAATGAGCAACTGGTGGCTGAATAGCTAATTGAATGAATGAATGACT  
32 GACTGACCGAATGAGTGAATGATTTTATTTTATTGACTCCACCGGATGGATGAGTGAATGAA



1 TGAATGAATGAGTGAGTGGATGGATGAGTGAAATGACTGACTGACTGAATTATGAATGAATGA  
 2 ATGACTGAATGAAACGAATGAGTCACGACAAACGCAACTTCTATGTTCTATGTG

3  
 4

5 **28) Acmic28 (amplicon ≈ 327 pb)**

6

7 >gi|56761603|gb|CW960876.1|CW960876 AIAA-aac17a02.g1 Ancylostoma caninum whole  
 8 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

9

10 GAATTCGCTTTCAGAGGAAAAAAGAAAAGAGACATCAGAACGCTCTAAAAGCACGGAAAA  
 11 AATGGAAATGCATGTGCAGTCAAGCATAGGGTCTGGTCTATACAAACATGTGTGCTGAAGGA  
 12 CACATTC AAGAAACGGAAACGAATCAGAACCAAAGGACATTTGGACTACAACGGAATTTGCC  
 13 AGCTCCGAATAGAAATAAACTGGCAATTATGGAATCTTTGAGTTATACAAGTTCAGAGGAAC  
 14 TTTAGTATGCAATTTATGCAATCTCCTCACTGGACGTGGGATTTTGTGAGTTTGATGTGACC  
 15 AGCCTTGAAGCATTAAAAGTTATGTATTTTCACATTAAGTTATGTATTTTCTTCATTTTC  
 16 ATTATTTATTTATTTTGTGCTGTGTAAT **CAGCAGAAAGGCAATGAG**AATTAAACTCAAG  
 17 ACATTATGTACATTTGAATGACTTACACTTACAATAATGATGCCTAATGTACGTAAGAGGCT  
 18 CTATTGTCATAGATTCTCTTTTGAGAGGCTTAGTTTCGAGTGAAC TAA**TGAATGAATGAATG**  
 19 **AATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAA**  
 20 **TGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAGTGAATGAATGACTGAATGAATGAATGAATG**  
 21 **AATGAA**TGATGAGTGGTCTGCTGTGACAGAT**TTCACTGTTTGGTGCAGC**TCTCATT CAGAGGC  
 22 TGGGATATGAAAAAAGATGGATAAATGAATCAAAAAAACAATATCAGGGCGGGAGAGT  
 23 GAGGGT

24  
 25

26 **29) Acmic29 (amplicon ≈ 267 pb)**

27

28 >gi|56762127|gb|CW961400.1|CW961400 AIAA-aac21a06.b1 Ancylostoma caninum whole  
 29 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

30

31 CCTGTGGTGGATTCTCTCTTGAGCAATTC CCGGTCTTCTTGGAACAAAAATGTCCTCAAC  
 32 ATCCTCGTAGAGGAAGAGTAGCGCTTTTGAATTGTTGCAGAATGATAACAG**ATTGGTGGAGG**  
 33 **AAAGCGA**ACAGTAGTAACACAGATAGATTGGCTGCAATTTCAAACGAAT**TGAATGAATGAAT**



1

2 **31) Acmic31 (amplicon ≈ 233 pb)**

3

4 >gi|59636208|gb|CZ250370.1|CZ250370 AIAA-aag09p04.g1 Ancylostoma caninum whole  
5 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

6

7 GAACTTTTGGGAAGCGAACACGTCC'TTTGCGGCGGCGATCATGTCCATGATTTCTGAATAC  
8 GAATATCCCCATTTACATCTTGCAAACCAGTCTTCTTAGAATAATTTTCAGGTAAGGCATGA  
9 GCAAGACGTTGAGGACCAGTAAAAACAGATTCCTGCAGCAAAATTTGAATGAATTGATCAAA  
10 AGAGTTCGAAAAACTCATTA'ACTGCACCACTCTTATTGCCTACATAGGGCAACTTATATAGA  
11 TCGGTGGGTCCAACGCGCGTACGTACATA'CCATGAACGAGCCAGTCAGAGCCATAGTTCTGA  
12 CGCATCTCAGACGCGCGTGAGACGCACGCATTTGCTGCCTCGCGGCGGCCATGTTGCATTTT  
13 CATT'CAAGGTACACGTTCCACTTTGGCTGCTTTT'CACAGAAAATTCCTTGCAAATAGATGCG  
14 TCGGTATGATGCGCGACTGACGCAGATATCTGGTAAGAAATGTCCTTATGCATACGTACATT  
15 CCGTTGAAATCAGCATTCTCATTCTCGATCTCTCCTTAGCGAGGTCCGGATCAGTGCAGTCT  
16 TCCTTTCTGGCAAGATTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTC  
17 ATCCATTTCATTCAATTGCTAGCTAAGCGAGACGTTAGCAACAATGATATTATACATATGCTTT  
18 TATTTCTGCTTCAAAACTATGAAAGCAAACATAAGGTTATTAACGGGTCCGGGTGAAAAT  
19 TCTACGTTTGTACATTACTTAGATGCGTGC'GTTGATGGCGCCTGCGTTCCATAGGATGAA  
20 GGATTAAACTTACATTTGA

21

22

23 **32) Acmic32 (amplicon ≈ 213 pb)**

24

25 >gi|59635148|gb|CZ249454.1|CZ249454 AIAA-aah06g15.b1 Ancylostoma caninum whole  
26 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

27

28 GATTCATTTATTTATTTATTTATTCAAATACACTCCGGGTGTAGCAA'ACTGTAAAACAAAC  
29 CAATTGGGACATCAATCACACAAATTC'CCATTTCCGTATTAATTATGAAGCATTAAAGCAAA  
30 CAGTACCACCCACCTTCTCTCATGTGATCAGAAAGACCCACTGACGAAACCTCAAATCGCTC  
31 TCCCCCTATGGAATGAATAAATGAATGAATGGATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT  
32 GAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAGCTGAA'GATCAGCCACCGAAAGCC  
33 CGCAAATTTCTGCGAAGTCATCATCTGCGACAAA'TCGTTGTACAATTGGAGCCGTTCTTGTGA

1 TTATCATTTTGAACACTCATTGGATAATAACTATTTAATTAAAACATCATGTAGTTTATCTAT  
 2 TTAAATGCTTAATAGATTTGGGTACTAATCTCTATGTATCACTTGTGATATTACCCTATTTT  
 3 TACAAAATCTATATTCCAATATGTCTAAACTATTTGTAACACTCGCAATAACTGAATATGTT  
 4 CAAACATCAAATTTTTTTTATCCAAGTAATGCTACTAAATACCTTTTATTGAATTTTCGCGCA  
 5 ACAATATATACATTTTCATATTTTGTTC AATAGATAATCATTGAATATAATAAATCTACGAAA  
 6 TGTCCTTATTTTATGGAAAAGATTTATATCTGATATGTTAATTTTCATTTTCAGATCAGGAATT  
 7 ATTTCTAACTTTCTCTATAAC

8  
 9  
 10

### 11 **33) Acmic33 (amplicon ≈ 257 pb)**

12

13 >gi|56765573|gb|CW964846.1|CW964846 AIAA-aaa08a07.g1 Ancylostoma caninum whole  
 14 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

15

16 GAATTCTTGTAATTGCCTAAGGACATTGTAGCGCACGTGGTTTTCTTCCGAACAGAGAACAG  
 17 TACCTTGAAGTAGTGAATAAATGAAGGAGAAAGTGAGAAAATGAGAGTGGGTGGGGATAAAA  
 18 GATGATTGGCTGGC **CGGGTTGATTGGACAATTCCG**AGGAAATGGTGAGAATGAGTAAACGTGA  
 19 GGCTTT**TGA**AGAGAACAAG**TGAA**AGGCTGTGTT**GATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGA**  
 20 **ATGAATGAATGAATGGATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT**  
 21 **GAATGACTGACTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATAAA**CGGGTTCACTGGATGAATT  
 22 GACGG**ATCGGCTGAATGCACGA**AGGAAAGAAGCCACGAACGACTGAAACAAAATGGATAAT  
 23 AAATAAATTAAC

24

25

### 26 **34) Acmic34 (amplicon ≈ 385 pb)**

27

28 >gi|59246725|gb|CZ223446.1|CZ223446 AIAA-aac71g15.b1 Ancylostoma caninum whole  
 29 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

30

31 GATTTCTGCTCTAGGCCATATGTTAGTTGTCGTCCGAATTATGAATGAATCCTCGTTCGAAGA  
 32 TGACAACACACATACTCTGTTTACCCCATTCCTCCTAGAACCAATCGTAACGAAATTAGTGA  
 33 ATATTTGTCTGGACTTGCAGCAAATTAGGTTGCACTTTCTATGAGAATCTGAATTAATGTGG



1 **36) Acmic36 (amplicon ≈ 315 pb)**

2

3 >gi|56772101|gb|CW971374.1|CW971374 AIAA-aaa40e04.g1 Ancylostoma caninum whole  
4 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

5

6 GAATTCCGGGGTGGACCATTTCCAGCTGCAGTCAACCCCCACGATTGCTGGAGTAAACACAC

7 CTTACAGAAAGCAAGAATCGTTCCGACATTGCAGAAACAAGGAGTCCACCCCATGATCCCA

8 CCCGCTCTCAGGGCAGGCACAAGTTCGCGTTTAGTCCGCGATCAGCCCCTTATCCGACACC

9 TGTTAACGATCCACGCAGTTCTGCAATTAACCAGCTTCCTTGCCCTGTTTCCAACGTTACG

10 TGTTTGCTAGGGAACGGCATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGA

11 ATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGA

12 GGGAGTCAAAGTTAGAAATTCCTTGTTCGTCAAAGAAGTTTTGCATGGAAAATCAGAAAGTATT

13 TTCTTCCCTGCCACATTCTCATATTATCCCGAAAATGTTCCACCAAAGCCTGAAACATAGCAG

14 AAAGCGACGGAAAATGACAGAGGATAGAGGAAACATGAATCGAACATAAATCAATGTTATTT

15 TTTCCCGTCTCAAACATATTGAACGCAATTAAGGAGGATTAGCGACGACGGACCCAGATTAA

16 CGAAACATTGTGAAATATAGATAATATTTCTGTAATTAGTATCCATTGACAGTAAATTTCCA

17 ACTGTTGTGATATATTTCCACCAACTTGTGCTGATTGATTCCAAACTTGTGTTGATTCAAGA

18 ATGGAAAATTTTACCACTCACCCGAGCCGCTGCGATTGGAAAAAAGAAGCAGATCATTGT

19 GATTTCTTTCACCAAACCATTACGTGCCTCC

20

21

22 **37) Acmic37 (amplicon ≈ 378 pb)**

23

24 >gi|59630672|gb|CZ245231.1|CZ245231 AIAA-aah46c13.b1 Ancylostoma caninum whole  
25 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

26

27 GATTCGGTGGACGCGAACAGCTGGATGAGCGACTGGCATTGTCAACGAGCAGAACATCGAC

28 ATGATCAAGCGTAACGATGTCGTGAAAAGTGGGTCAAACCTTCAACAATCGATGACTGAGCCG

29 GATATTGATTGAAATTTGATTTTCAGATCAGTGGTCAAAGTTCGACGATCACCATGATCGT

30 ACCATCGGTCTACAGTCTGTTGCTCGTGATGCCGACAAACGTGCTGAGATGGCTAGGAAAGC

31 TACGGATGCGCTTGTCAGGAGGTTGGTCAATTTTGGGCGGAGCTTACCCACAGTCCAAGAC

32 TTGTCCTTTCATTCATTCACCTCACTAATTTCACTCATTCAATTCGTTCACTCATTTCATT

33 CATTTCATTTCATTTCATCCATCCATTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTC

1 CCCATTCACCCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATT  
2 CATTTCATTCATTCATTCATTTCGCCCATTCAATTGATTCATTCATTCATTGGATTTTCGTAGTTTTTG  
3 GTACCTGTGATAACTAACACCTTGTGGGCAGGGTCTTCTGTCCCTCTAGTTCATAGAAGCG  
4 AACATGTGTCGCTTCTGTCCCAGAAATTCACAAGCAGCTGGACAAC<sup>←</sup>TGACACAAATTCAGG  
5 TGAAAGAGGTTGCTGACAAGGCAAACAACTTGTGAACAGCACTGGTTCATGAATACGAGAAG  
6 AATTGAGAGGAAGGAAGACGGTATCGTCTACTCACCCAGTAATAACGACTACTCGAAAGGGA  
7 AAA

### 10 38) Acmic38 (amplicon ≈ 295 pb)

11  
12 >gi|56769465|gb|CW968738.1|CW968738 AIAA-aaa1h11.b1 Ancylostoma caninum whole  
13 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

14  
15 GATTTGTAAAACAACCTTGCATACGGTAGGGAGGCGGCAGAGGTGCACCTACACATTGTACC  
16 TTCTCTTTATGAATACAAAATTATGCAGAGAAATATCTCAGTGCCGCTATACTTTTGAATTG  
17 TGGCGAGATTGCTAGAGAACAAAATATCCAAGAGATGTATAAATGGTTAGAAATAGAAATCA  
18 CCTGAAGAATGGATGAAACATCTCCCTCAATCGGTGCTGGATCTGTAGGGCGCGTGAGGTGA  
19 GCAAAATGGAGATCAAATGCAGTACAACCGGGTAGAGGTACGAGGCGACTGATAGCGTCGAG  
20 CTGCACGTGCTGTCAGTCATTTCTGCAAGGACAGATTGTAAAAGTAATGTGAAGATGGGAA  
21 GTAGGGAGGAGGGGACGCGAGGACGAAGAGAAATGTTTCTGGAGAGTAAACGAACAAGTGGG  
22 TAGAATATCTGTTTCGATTGATTTCGATGGAATTGAATCGAGTTCCAAATGATTTCGATATTCAA  
23 GTCAT<sup>→</sup>TCATGACACCGGTTAGGTAAAAAGCTATCATAGAAGTAGCTTAACTGTTCAAAAAAA  
24 CAGATCTACTTGTGGACAAAGTGAAATTATGGATGAGTTATTGAATAAATGAATGAGTGA  
25 ATGGATAAGTGGATGACTCACAGAA<sup>←</sup>TGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT  
26 GAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAGCCAGATTTCTGAGCAATTACAACGTGCAATG  
27 CAGAAATACAGCTGTTTCGCAAATAGGTGCCACTGTCGTTTCGTCGCTCTGATA<sup>←</sup>AGGATTTCTGT  
28 GCAAGTACCCCTTTGTAAATAATTTGAACGGAACTTCAATTCGGCAAAGGGCAAATTCA  
29 ATCCC

30

31

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

**APÊNDICE 2**



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

***APÊNDICE 3***

1 Haplótipos identificadas nas populações brasileiras de *A. caninum* após a  
2 reconstrução alélica utilizando-se os 245 nucleotídeos genômicos sequenciados  
3 (íntrons e éxons) do gene Ac-ASP-2:

4

5 >h001

6 ATTCTCGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACACCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACCCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAATTAGGTACTGTTGTTAAACGGCTATGGACG  
9 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT

10 >h002

11 ATTCTCGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAATTAGGTACTGTTGTTAAACGGCTATGGACG  
14 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT

15 >h003

16 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT

20 >h004

21 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
24 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT

25 >h005

26 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT

30 >h006

31 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCACAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG

1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
2 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
3 >h007  
4 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACAGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
7 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
8 >h008  
9 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
12 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
13 >h009  
14 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTGCAACTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
17 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGA  
18 >h010  
19 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTGCAACTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
22 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
23 >h011  
24 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTTCAACTTAGATACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
28 >h012  
29 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACATCGTTTCAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
32 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
33 >h013

1 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
4 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
5 >h014  
6 ATTCTTGGATTCTCAGCTATGCGAAGTACGCCACAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
9 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
10 >h015  
11 ATTCTTGGATTCTCAGCTATGCGAAGTACGCCACAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGAAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTACGGACG  
14 CATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
15 >h016  
16 ATTCTTGGATTCTCAGCTATGCGAAGTACGCCACAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGAAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTACGGACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
20 >h017  
21 ATTCTTGGATTCTCAGCTATGCGAAGTACGCCACAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGAAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTACGGACG  
24 TATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
25 >h018  
26 ATTCTTGGATTCTCAGCTATGCGAAGTACGCCACAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTTTTAAAGGGCTATGGACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
30 >h019  
31 ATTCTTGGATTCTCAGCTATGCGAAGTACGCCACAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG

1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGCACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
2 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
3 >h020  
4 ATTCTTGGATTCTCAGCTATGCGAAGTACGCCACAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGCACTGTTTTTAAAGGGCTATGGACG  
7 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
8 >h021  
9 ATTCTTGGATTCTCAGCTATGCGAAGTACGCCACAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGACTGTTTTTAAAGGGCTATGGACG  
12 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
13 >h022  
14 ATTCTTGGATTCTCAGCTATGCGAAGTACGTCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGCAATGTTGTTAAAGGGCAATGGACG  
17 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
18 >h023  
19 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCACAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGAAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGACTGTTGTTAAAGGGCTACGGACG  
22 CATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAAATGCGTTGT  
23 >h024  
24 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCACAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCATAGGTCATTGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
28 >h025  
29 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCACAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
32 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
33 >h026

1 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCACAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTACGGACG  
4 TATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
5 >h027  
6 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACACCATAGGTCATCGAAGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
9 AATTTTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
10 >h028  
11 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
14 AATATTCTGACCTGAGTATAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
15 >h029  
16 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAATGCGTTGT  
20 >h030  
21 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
24 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
25 >h031  
26 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
30 >h032  
31 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG

1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
2 AATATTCTGACCTGAGTATAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
3 >h033  
4 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
7 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAATGCGTTGT  
8 >h034  
9 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
12 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGA  
13 >h035  
14 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
17 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
18 >h036  
19 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
22 AATTTTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
23 >h037  
24 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGTTATGGACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAATGCGTTGT  
28 >h038  
29 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
32 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
33 >h039

1 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGAACG  
4 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
5 >h040  
6 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTTCAACTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
9 AATTTTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
10 >h041  
11 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGAAGATGTACAACGTTACAAGTTAGTTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
14 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
15 >h042  
16 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAATGCGTTGT  
20 >h043  
21 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
24 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
25 >h044  
26 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
30 >h045  
31 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG



1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
2 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAAATGCGTTGA  
3 >h046  
4 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
7 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
8 >h047  
9 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACA  
12 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGA  
13 >h048  
14 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
17 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
18 >h049  
19 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
22 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGA  
23 >h050  
24 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
28 >h051  
29 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
32 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGA  
33 >h052

1 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
4 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
5 >h053  
6 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
9 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
10 >h054  
11 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGAACG  
14 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
15 >h055  
16 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGAACG  
19 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCTCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
20 >h056  
21 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAACGGCTATGGACG  
24 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
25 >h057  
26 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGAAAGGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAATGCGTTGA  
30 >h058  
31 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG

1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
2 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
3 >h059  
4 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
7 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAATGCGTTGT  
8 >h060  
9 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
12 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
13 >h061  
14 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGAACG  
17 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
18 >h062  
19 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGTTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
22 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
23 >h063  
24 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
28 >h064  
29 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACGTAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTAAGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGAACG  
32 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
33 >h065

1 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACGTAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGAACG  
4 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
5 >h066  
6 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACCCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
9 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
10 >h067  
11 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTGCATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTGTGGACG  
14 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
15 >h068  
16 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGAAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
20 >h069  
21 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGAAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTACGGACG  
24 TATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
25 >h070  
26 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
30 >h071  
31 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG

1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGAACG  
2 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
3 >h072  
4 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
7 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
8 >h073  
9 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
12 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCTCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
13 >h074  
14 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
17 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
18 >h075  
19 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGTACTGTTTTTAAAGGGCTATGGACG  
22 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
23 >h076  
24 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCGTAGGTCATCGATGAACACCACTCCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGAAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAACGGCTATGGACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
28 >h077  
29 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACCCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
32 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
33 >h078

1 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACGCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
4 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
5 >h079  
6 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTGCATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTGTGGACG  
9 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
10 >h080  
11 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCACAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGAAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTACGGACG  
14 GATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
15 >h081  
16 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCACAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGTACTGTTTTTAAAGGGCTATGGACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
20 >h082  
21 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACACCATAGGTCATCGACGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGATAATGTTGTTAAAGGGCGATGGACA  
24 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
25 >h083  
26 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGACGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACATCGTTACAAGTTAGATACTGTTGTTAAAGGGCGATGGACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
30 >h084  
31 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCACTCCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG

1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTAATGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
2 AATATTCTGACCTGAGTGTAAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
3 >h085  
4 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGAAGATGTACAACGTTACAACCTTAGATACTGTTGTTAAAGGGCCATGGACG  
7 AATATTCTGACCTGAGTGTAAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
8 >h086  
9 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGAAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTAATGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
12 AATATTCTGACCTGAGTGTAAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
13 >h087  
14 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACGTTCAAGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
17 AATATTCTGACCTGAGTGTAAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
18 >h088  
19 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAAGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGGACG  
22 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
23 >h089  
24 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGATACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
28 >h090  
29 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTAATGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
32 AATATTCTGACCTGAGTGTAAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
33 >h091

1 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
4 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAAATGCGTTGA  
5 >h092  
6 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
9 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
10 >h093  
11 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACA  
14 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGA  
15 >h094  
16 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGAAAAGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAAATGCGTTGT  
20 >h095  
21 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
24 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAAATGCGTTGT  
25 >h096  
26 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGA  
30 >h097  
31 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG



1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
2 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
3 >h098  
4 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGTTATGGACG  
7 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
8 >h099  
9 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGGACG  
12 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
13 >h100  
14 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGATACTGTTGTTAAAGGGCGATGGACG  
17 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
18 >h101  
19 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGATACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
22 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
23 >h102  
24 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTATAACTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGTTATGGACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAATGCGTTGT  
28 >h103  
29 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTATAACTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGTTATGGACG  
32 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
33 >h104

1 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACATCGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
4 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
5 >h105  
6 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACATCGTTACAAGTTAGATACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
9 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
10 >h106  
11 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGGAGATGTACATCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
14 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
15 >h107  
16 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACATCGTTACAATTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
20 >h108  
21 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACCCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
24 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATGACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
25 >h109  
26 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTATGTACATCGTTCAAGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
30 >h110  
31 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG

1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
2 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
3 >h111  
4 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
7 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
8 >h112  
9 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGAACG  
12 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
13 >h113  
14 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGGACG  
17 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
18 >h114  
19 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAAGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGGACG  
22 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
23 >h115  
24 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
28 >h116  
29 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
32 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
33 >h117

1 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGGACG  
4 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
5 >h118  
6 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
9 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
10 >h119  
11 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
14 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
15 >h120  
16 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACATCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
20 >h121  
21 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACGTAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAGAGGGCTATGGACG  
24 AATATTCTGACCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
25 >h122  
26 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGAAGATGTACAGCGTTATAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGTTATGGACG  
29 GATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
30 >h123  
31 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG

1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
2 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
3 >h124  
4 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
7 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
8 >h125  
9 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATTGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
12 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
13 >h126  
14 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTCCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
17 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAATGCGTTGT  
18 >h127  
19 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
22 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
23 >h128  
24 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
28 >h129  
29 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
32 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
33 >h130

1 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGTTATGGACG  
4 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
5 >h131  
6 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
9 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAATGCGTTGA  
10 >h132  
11 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
14 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAATGCGTTGT  
15 >h133  
16 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
20 >h134  
21 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACCCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
24 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
25 >h135  
26 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
30 >h136  
31 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTTCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG

1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
2 AATTTTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAAATGCGTTGT  
3 >h137  
4 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
5 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
6 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGTTATGGACG  
7 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAAATGCGTTGT  
8 >h138  
9 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
10 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
11 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
12 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACTGCGTTGT  
13 >h139  
14 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACTTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
15 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
16 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTATAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGTTATGGACG  
17 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACTGCGTTGT  
18 >h140  
19 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTGCGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
20 CAGACACCGTAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
21 CCAGACCATCTGAAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
22 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACTGCGTTGT  
23 >h141  
24 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGCGAAGTGCGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG  
25 CAGACACCGTAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
26 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
27 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACTGCGTTGT  
28 >h142  
29 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGTGAAGTACACCGCAAAAATTGCATACTGAGGACTGTACTGG  
30 CAGACTCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
31 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTGTGGACG  
32 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATGACTCCCCTGTTCCACAACTGCGTTGT  
33 >h143

1 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGTGAAGTACGCCGCAAAAATTGCATACTGAGGACTGTACTGG  
2 CAGACGCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
3 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTGTGGACG  
4 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATGACTCCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
5 >h144  
6 ATTCTTGGATTCTCATCTGTGTGAAGTACGCCGCAAAAATTGCATACTGAGGACTGTACTGG  
7 CAGACTCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAGCGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTGTGGACG  
9 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATGACTCCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
10 >h145  
11 ATTCTTGGATTCTTATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
13 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
14 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
15 >h146  
16 ATTCTTGGATTCTTATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
20 >h147  
21 ATTCTTGGATTCTTATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAATACATACTGAGGACTGTACTGG  
22 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACATCGTTACAAGTTAGATACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
24 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
25 >h148  
26 ATTCTTGGATTCTTATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG  
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG  
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG  
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
30 >h149  
31 ATTCTTGGATTCTTATCTGTGCGAAGTACGTCGCAAAAAGTTCATACTGAGGACTGTACTGG  
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAGCATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG



1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGTACTGTTTTTAAAGGGCTATGGACG  
2 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT  
3  
4

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

***APÊNDICE 4***

1 Haplótipos identificadas nas populações brasileiras de *A. caninum* após a  
2 reconstrução alélica utilizando-se os 135 nucleotídeos codificantes (somente os  
3 éxons) da proteína Ac-ASP-2:

4

5 >h01

6 CAGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
7 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
8 AACTGCGTTGT

9 >h02

10 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGAAGAACCATTCCACATAACATCCGA  
11 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
12 AACTGCGTTGT

13 >h03

14 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGACGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
15 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
16 AACTGCGTTGT

17 >h04

18 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCACTCCACATAACATCCGA  
19 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
20 AACTGCGTTGT

21 >h05

22 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
23 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTATAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
24 AACTGCGTTGT

25 >h06

26 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
27 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGAAAAGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
28 AAATGCGTTGT

29 >h07

30 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
31 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGAAAGGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
32 AAATGCGTTGA

33 >h08

1 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
2 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
3 AAATGCGTTGA  
4 >h09  
5 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
6 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
7 AAATGCGTTGT  
8 >h10  
9 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
10 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
11 AACTGCGTTGA  
12 >h11  
13 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
14 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
15 AACTGCGTTGT  
16 >h12  
17 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
18 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCTCTGTTCCAC  
19 AACTGCGTTGT  
20 >h13  
21 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
22 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
23 AAATGCGTTGT  
24 >h14  
25 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
26 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
27 AACTGCGTTGA  
28 >h15  
29 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
30 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
31 AACTGCGTTGT  
32 >h16

1 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
2 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCTCTGTTCCAC  
3 AACTGCGTTGT  
4 >h17  
5 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAGCATCCGA  
6 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
7 AACTGCGTTGT  
8 >h18  
9 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACGTAACATCCGA  
10 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
11 AACTGCGTTGT  
12 >h19  
13 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACGTAACATCCGA  
14 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGGGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
15 AACTGCGTTGT  
16 >h20  
17 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATTGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
18 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
19 AACTGCGTTGT  
20 >h21  
21 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCGTAGGTCATCGATGAACACCACTCCACATAACATCCGA  
22 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
23 AACTGCGTTGT  
24 >h22  
25 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCGTAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
26 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
27 AACTGCGTTGT  
28 >h23  
29 CTGAGGACTGTACTGGCAGACCCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
30 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
31 AACTGCGTTGT  
32 >h24

1 CTGAGGACTGTACTGGCAGACCCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
2 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATGACTCCCCTGTTCCAC  
3 AACTGCGTTGT  
4 >h25  
5 CTGAGGACTGTACTGGCAGACGCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
6 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC  
7 AACTGCGTTGT  
8 >h26  
9 CTGAGGACTGTACTGGCAGACGCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
10 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATGACTCCCCTGTTCCAC  
11 AACTGCGTTGT  
12 >h27  
13 CTGAGGACTGTACTGGCAGACTCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA  
14 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATGACTCCCCTGTTCCAC  
15 AACTGCGTTGT  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22