

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

LUIS FERNANDO VIANA FURTADO

POLIMORFISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE RESISTÊNCIA AOS
BENZIMIDAZÓIS EM ANCILOSTOMÍDEOS

Belo Horizonte

2018

LUIS FERNANDO VIANA FURTADO

POLIMORFISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE RESISTÊNCIA AOS
BENZIMIDAZÓIS EM ANCILOSTOMÍDEOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Orientação: Dra. Élide Mara Leite Rabelo

Coorientação: Dra. Luciana Werneck
Zuccherato

Belo Horizonte

2018

043 Furtado, Luis Fernando Viana.
Polimorfismos envolvidos no processo de resistência aos benzimidazóis em
ancilostomídeos [manuscrito] / Luis Fernando Viana Furtado. – 2018.

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

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

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas.

1. Parasitologia - Teses. 2. Ancilostomídeos - Teses. 3. Benzimidazóis - Teses.
4. Tubulina. 5. Polimorfismo (Genética) - Teses. I. Rabelo, Élide Mara Leite. II.
Zuccherato, Luciana Werneck. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 470968/2014-1) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – APQ-02417-16).

AGRADECIMENTOS

À Élide Rabelo, pela orientação, dedicação, ensinamento e amizade durante todos esses anos;

À Luciana Zuccherato, pela coorientação, parceria e essencial engajamento na realização desse trabalho;

Aos companheiros do Laboratório de Parasitologia Molecular e agregados, pela amizade e boa convivência: Alaíde de Matos, Ana Cristina, Ana Flávia, Bruna Silvestre, Celi Medeiros, Ceres Luciana, Eduardo Pulido, Danimar Danilia, Érica Munhoz, João Scarpelli, Júlia Silveira, Letícia Estevam, Luciana Serafim, Maria Luiza, Nayara Mendes, Thayse Batista, Vívian Jordania e William Alves.

Ao Pedro Aguiar e à Talita Guimarães, pela prestativa colaboração na construção da minibiblioteca;

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

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia: Hudson Santos, Sibebe Abreu, Sumara Ferreira, Thaís Maia e, em especial, ao Manoel Carlos, pela ajuda e disposição;

Aos funcionários dos Centros de Controle de Zoonoses, pela coleta de material e auxílio no procedimento;

Ao Rodrigo Miranda, pelo fornecimento de parte das amostras de DNA analisadas nesse trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto; e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), também pelo financiamento do projeto;

À turma Parasito Lado B, por participarem dessa trajetória;

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, em especial, à Ana Carolina Melo.

Ao Wesley Carneiro, pelo incentivo, comprometimento e ajuda;

Ao André, Marcinha, Marcus, Rafaela e Thaís, por todo o encorajamento e torcida; ao William, pelo companheirismo; à Paula, pela cumplicidade;

À minha família, em especial, aos meus pais, Carlito e Rita; aos meus irmãos, Michele e Júnior; e aos meus sobrinhos, Isabele, Luiz Neto e Maria Fernanda, por me ensinarem que o maior e mais edificante título de um homem vai muito além do mundo acadêmico.

“Olhem o céu. Perguntem: Terá ou não terá o carneiro comido a flor? E verão como tudo fica diferente... E nenhuma pessoa grande jamais compreenderá que isso tenha tanta importância.”

O Pequeno Príncipe, Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A administração em massa de benzimidazóis corresponde ao principal método de controle dos ancilostomídeos, entretanto, isso pode selecionar cepas de parasitos resistentes ao tratamento. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 estão associados com resistência aos benzimidazóis em nematódeos. Para ancilostomídeos, a mutação no códon 167 nunca foi descrita, enquanto que as mutações nos códons 198 e 200 já foram descritas para esses helmintos, em baixa frequência na natureza. O objetivo desse trabalho foi investigar a participação de polimorfismos no gene da β -tubulina isotipo 1 no processo de resistência aos benzimidazóis em ancilostomídeos. Foi realizada uma varredura em busca dos SNPs canônicos relacionados à resistência em diferentes espécies de ancilostomídeos. Foram coletados vermes adultos de *Ancylostoma braziliense* e *Ancylostoma caninum* de cães naturalmente infectados de dois e de seis estados do Brasil, respectivamente, e ovos de *Necator americanus* provenientes de amostras fecais de humanos de seis estados do Brasil. Os códons 167 e 198 de *A. caninum* foram avaliados por ARMS-PCR e Tetraprimer ARMS-PCR, respectivamente (o códon 200 dessa espécie foi analisado em um trabalho anterior). Os códons de *A. braziliense* e *N. americanus* foram analisados por RFLP-PCR. Somente foram observadas as mutações no códon 198 de *A. braziliense* e *N. americanus*, com frequência de 1,2% e 1,4%, respectivamente, e no códon 200 de *N. americanus*, com frequência de 1,1%. No segundo momento, tendo em vista a baixa frequência desses SNPs na natureza e a possibilidade de existência de outros mecanismos relacionado com resistência, foi realizada a seleção de uma cepa resistente de *Ancylostoma ceylanicum* em hamsters, por meio de pressão seletiva de tratamento. Visto que não foram observados os SNPs canônicos no gene da β -tubulina dessa cepa, foi realizada a construção de uma minibiblioteca de cDNA do gene em questão de vermes resistentes. As análises mostraram três SNPs que não se repetiram entre as amostras. Tendo em vista que poderiam ocorrer mudanças na biologia do parasito, foi realizada uma comparação entre a cepa sensível e resistente, baseada em parâmetros parasitológicos e patogênicos. Foi observada uma menor recuperação de vermes na cepa resistente, com menor quantidade de ovos liberados nas fezes, indicando uma menor adaptação dessa cepa à infecção. Sugere-se que outros mecanismos, independentes do alvo de ligação da droga, estejam relacionados com resistência aos benzimidazóis em ancilostomídeos.

Palavras-chave: Ancilostomídeos; resistência; benzimidazóis; β -tubulina.

ABSTRACT

Mass administration of benzimidazoles corresponds to the main method of control of hookworms, however, this strategy may select strains of parasites resistant to the drug. Single nucleotide polymorphism (SNP) at codons 167, 198 and 200 of the β -tubulin isotype 1 gene are associated with resistance to benzimidazoles in some nematodes. The mutation at codon 167 has never been described for hookworms, whereas mutations at codons 198 and 200 have already been described for these helminths, at low frequency in nature. The objective of this work was to investigate the participation of polymorphisms in the β -tubulin isotype 1 gene in the resistance process to benzimidazoles in hookworms. A screening of the canonical SNPs related to resistance in different species of hookworms was carried out. Adult worms of *Ancylostoma braziliense* (81) and *Ancylostoma caninum* (327) were collected from naturally infected dogs from two and six states of Brazil, respectively, and *Necator americanus* eggs (552) from faecal samples from six states of Brazil. Codons 167 and 198 of *A. caninum* were evaluated by ARMS-PCR and Tetraprimer ARMS-PCR, respectively (codon 200 of this species was analyzed in a previous work). All codons of *A. braziliense* and *N. americanus* were analyzed by RFLP-PCR. Mutations were observed only to the codon 198 of *A. braziliense* and *N. americanus*, with a frequency of 1.2% and 1.4%, respectively, and in the codon 200 of *N. americanus*, with a frequency of 1.1%. Considering the low frequency of these SNPs in nature and the possibility of other mechanisms being involved in the benzimidazole resistance, the selection of a resistant strain of *Ancylostoma ceylanicum* in hamsters was performed by selective drug pressure. Since the canonical SNPs in the β -tubulin gene of this strain were not observed, a β -tubulin isotype 1 cDNA mini library was constructed to the resistant worms. Sequence analyzes of the clones showed three independent SNPs not reproducible among the samples. Considering that changes in the parasite biology could occur, a comparison between the sensitive and resistant strain was made, based on parasitological and pathogenic parameters. A lower recovery of worms was observed in the resistant strain, with a lower amount of eggs released in the faeces, indicating a lower adaptation of this strain to the infection. It is suggested that other mechanisms, independent of the drug binding target, are related to resistance to benzimidazoles in hookworms.

Keywords: Hookworms; drug resistance; benzimidazoles; β -tubulin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema representativo do ciclo biológico dos ancilostomídeos, adaptado de Loukas et al. (2016). L1, L2, e L3 = Larva de primeiro, segundo e terceiro estágio, respectivamente. ID = intestino delgado..... 25
- Figura 2** – Predição de possíveis aminoácidos da proteína β -tubulina isotipo 1 de *T. spiralis* envolvidos na ligação com os benzimidazóis. Interação da β -tubulina isotipo 1 com carbendazim (A), luxabendazol (B), albendazol (azul) e febendazol (verde) (C). Adaptado de Aguayo-Ortiz et al. (2013a)..... 31
- Figura 3** – Predição da estrutura tridimensional da proteína β -tubulina isotipo 1 de *H. contortus* (A) e possíveis aminoácidos da proteína β -tubulina isotipo 1 de *H. contortus* envolvidos na interação com os benzimidazóis (B). Adaptado de Aguayo-Ortiz et al. (2013b)..... 32
- Figura 4** – Representação esquemática da técnica de Tetraprimer ARMS-PCR para análise de SNP. O hipotético amplicon 3 é produzido pelos iniciadores externos (*F2* e *R1*). Esse amplicon serve como um controle intratubo. O alelo 1 é detectado pela amplificação de *F1* e *R1* (Amplicon 1). O alelo 2 é detectado pela amplificação dos iniciadores *F2* e *R2* (Amplicon 2)..... 42
- Figura 5** – Esquema da síntese dos controles sem mutação para análise de polimorfismos no gene da β -tubulina de *A. caninum* (B), *A. braziliense* (B) e *N. americanus* (C). A ponta triangular de cada seta representa a extremidade 3' do iniciador..... 56
- Figura 6** – Esquema da síntese dos controles com mutação para análise de polimorfismos nos códons 167 (A) e 198 (B) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. A ponta triangular de cada seta representa a extremidade 3' do iniciador..... 59
- Figura 7** – Esquema da síntese dos controles com mutação para análise de polimorfismos nos códons 167 (A), 198 (B) e 200 (C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*. A ponta triangular de cada seta representa a extremidade 3' do iniciador..... 60
- Figura 8** – Esquema da síntese dos controles com mutação para análise de polimorfismos nos códons 167 (A), 198 (B) e 200 (C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*. A ponta triangular de cada seta representa a extremidade 3' do iniciador..... 61
- Figura 9** – Esquema adotado para adição da segunda incompatibilidade de iniciadores na análise do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. O iniciador *Fs167Ac* foi desenhado para se anelar somente na ausência da mutação, enquanto que o iniciador *Rr167Ac* foi desenhado para se anelar na presença da mesma. Os locais de anelamento dos iniciadores *Fs167Ac*, *Rb167Ay*, *Fa167Ac* e *Rr167Ac* estão marcados, respectivamente, com as cores azul claro, amarelo, preto e azul escuro; o códon 167 encontra-se sublinhado, com a base de interesse em vermelho. Nos iniciadores, as bases marcadas em verde correspondem ao local da segunda incompatibilidade e as caixas em vermelho representam as incompatibilidades encontradas em cada situação..... 63

Figura 10 – Esquema adotado para adição da segunda incompatibilidade de iniciadores na análise do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. O iniciador *Fr198Ac* foi desenhado para se anelar somente na presença da mutação, enquanto que o iniciador *Rs198Ac* foi desenhado para se anelar na ausência da mesma. Os locais de anelamento dos iniciadores *Fb198Ac*, *Rs198Ac*, *Fr198Ac* e *Rb198Ac* estão marcados, respectivamente, com as cores amarelo claro, verde, preto e amarelo escuro; o códon 198 encontra-se sublinhado, com a base de interesse em vermelho. Nos iniciadores, as bases marcadas em azul claro correspondem ao local da segunda incompatibilidade e as caixas em vermelho representam as incompatibilidades encontradas em cada situação..... 65

Figura 11 – Esquema da digestão empregada para análise do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*. A mutação cria um sítio para a enzima *RsaI*. Os fragmentos para ambos os alelos apresentam outros dois sítios para essa mesma enzima (não representados no esquema), mas que independem da mutação pesquisada. O códon 167 encontra-se sublinhado, com a base de interesse destacada em vermelho. A caixa vermelha representa o sítio da enzima. A caixa verde representa o local no qual poderia ser criado um sítio caso a sequência apresentasse mutação..... 66

Figura 12 – Esquema representativo da análise do códon 198 de *A. braziliense*. O iniciador *Fsite198Aby* foi desenhado com uma alteração (marcado em azul claro e em caixa preta) para adicionar uma mutação no DNA amplificado, independente de haver mutação no códon 198. A ausência da mutação no códon 198 somada com a alteração adicionada cria um sítio para *DdeI* (marcado em caixa vermelha). Caso o alelo seja mutado, mesmo com a alteração do iniciador, o sítio para a *DdeI* não é criado. A caixa em azul marca o local que seria o sítio para a enzima caso não haja mutação. O códon 198 encontra-se sublinhado, com a base de interesse em vermelho. A base em amarelo escuro no DNA amplificado representa a alteração adicionada pelo iniciador. Os locais de anelamento dos iniciadores *Fsite198Aby* e *Rb198/200Aby* estão marcados, respectivamente, com as cores verde e amarelo claro..... 69

Figura 13 – Esquema representativo da análise do códon 200 de *A. braziliense*. O iniciador *Fsite200Aby* foi desenhado com uma alteração (marcado em azul claro e caixa preta) para adicionar uma mutação no DNA amplificado, independente de haver mutação no códon 200. A presença da mutação no códon 200 somada com a alteração adicionada cria um sítio para *RsaI* (marcado em caixa vermelha). Caso o alelo não tenha mutação, mesmo com a alteração do iniciador, o sítio para a *RsaI* não é criado. A caixa em azul marca o local do sítio para a enzima caso exista mutação. O códon 200 encontra-se sublinhado, com a base de interesse em vermelho. A base em amarelo escuro no DNA amplificado representa a alteração adicionada pelo iniciador. Os locais de anelamento dos iniciadores *Fsite200Aby* e *Rb198/200Aby* estão marcados, respectivamente, com as cores verde e amarelo claro..... 70

Figura 14 – Esquema da digestão empregada para análise do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*. A mutação cria um sítio para a enzima *Hpy8I*. O códon 167 encontra-se sublinhado, com a base de interesse destacada em vermelho. A caixa vermelha representa o sítio da enzima. A caixa verde representa o local que também teria um sítio para a enzima caso a sequência apresentasse mutação..... 72

Figura 15 – Esquema da digestão empregada para análise do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*. A mutação desfaz um sítio para a enzima *Alw26I*. O códon 198 encontra-se sublinhado, com a base de interesse destacada em vermelho. A caixa vermelha representa o sítio da enzima. A caixa verde representa o local que também teria um sítio para a enzima caso a sequência não apresentasse mutação..... 73

Figura 16 – Esquema da digestão empregada para análise do códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*. A mutação desfaz um sítio para a enzima *HpyAV*. O códon 200 encontra-se sublinhado, com a base de interesse destacada em vermelho. A caixa vermelha representa o sítio da enzima. A caixa verde representa o local que também teria um sítio para a enzima caso a sequência não apresentasse mutação..... 74

Figura 17 – Fluxograma para seleção da cepa resistente de *A. ceylanicum* através de passagens seriadas de infecção seguidas de tratamento. A nomenclatura de cada grupo se baseou no nome do grupo de origem. CTRL = controle..... 76

Figura 18 – Esquema representativo dos iniciadores utilizados para sequenciamento do cDNA da cepa resistente de *A. ceylanicum*, com os diferentes tamanhos dos fragmentos sequenciados. As sequências em azul correspondem ao plasmídeo enquanto que a sequência em cinza corresponde ao inserto clonado (1373 pb)..... 84

Figura 19 – Esquema representativo utilizado para análise da região exônica da cepa sensível de *A. ceylanicum*. O gene da β -tubulina isotipo 1 foi dividido em duas partes, com PCRs individuais. De cada PCR, foram feitas mais duas PCRs abrangendo as regiões de interesse..... 85

Figura 20 – Resultados demonstrativos da ARMS-PCR para varredura do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. Amostras individuais de DNA genômico do nematódeo foram submetidas a duas reações com dois pares de iniciadores (ARMS-PCR), após uma primeira reação. As canaletas identificadas com número ímpar correspondem ao produto de PCR com combinação para detectar o fragmento sem mutação (*Fs167Ac* + *Rb167Ac* = 141 pb). As canaletas identificadas com número par correspondem ao produto da PCR com a combinação para detectar a mutação (*Fa167Ac* + *Rr167Ac* = 212 pb). Nas canaletas de 1 a 4 foram utilizados controles (1 e 2: plasmídeos sem mutação; 3 e 4: plasmídeo com mutação). Das canaletas 5 a 40, os produtos das duas reações para a mesma amostra de DNA genômico se encontram uma ao lado da outra. As canaletas 41 e 42 correspondem aos “brancos” das reações. A imagem mostra um gel de agarose 1%, corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos). PM: peso molecular de 100 pb.....91

Figura 21 – Resultados demonstrativos da Tetraprimer ARMS-PCR para varredura do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. Amostras individuais de DNA genômico do nematódeo, após uma primeira PCR, foram submetidas à Tetraprimer ARMS-PCR. Nas canaletas de 1 a 3 foram utilizados controles (1: plasmídeo sem mutação; 2: plasmídeo com mutação; 3: mix de plasmídeos com e sem mutação). Fragmentos esperados (pb) – homocigoto sem mutação: 331 + 161, homocigoto com mutação: 331 + 217, e heterocigoto: 331 + 161 + 217. As canaletas de 4 a 42 apresentam produto de PCR de vermes sem mutação. A canaleta 43 corresponde ao “branco” da reação. A imagem mostra um gel de agarose 2%, corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos). PM: peso molecular de 100 pb..... 92

Figura 22 – Resultados demonstrativos da RFLP-PCR para varredura de SNPs nos códons 167(A), 198(B) e 200(C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*. Amostras individuais de DNA genômico do nematódeo, após duas PCRs, foram submetidas à digestão com enzima de restrição (*RsaI* para os códons 167 e 200; e *DdeI* para o códon 198). Nas canaletas de 1 a 6 foram utilizados controles (1 e 4: plasmídeo sem mutação; 2 e 5: plasmídeo com mutação; 3 e 6: plasmídeos com e sem mutação). Com exceção do produto de PCR com plasmídeos das canaletas de 1 a 3, todas as outras canaletas apresentam produtos após digestão. As canaletas de 7 a 18 apresentam produto de digestão de PCR utilizando DNA genômico de verme. Fragmentos esperados (pb) – códon 167: homocigoto sem mutação: 162 + 95 + 49, homocigoto com mutação: 138 + 95 + 49 + 24, heterocigoto: 162 + 138 + 95 + 49 + 24; códon 198: homocigoto sem mutação: 186 + 28, homocigoto com mutação: 214, heterocigoto: 214 + 186 + 28; códon 200: homocigoto sem mutação: 137 + 71, homocigoto com mutação: 137 + 41 + 30, heterocigoto: 137 + 71 + 41 + 30. As canaletas destacadas apresentam perfil de genótipo representativo de mutação. A imagem mostra géis de acrilamida 12%, corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos). PM: peso molecular de 50 pb..... 94

Figura 23 – Cromatograma correspondente ao sequenciamento da única amostra de *A. braziliense* que apresentou mutação no códon 198. A presença de dois picos na segunda base do códon destacado revela um helminto heterocigoto..... 95

Figura 24 – Resultados demonstrativos da RFLP-PCR para varredura de SNPs nos códons 167(A), 198(B) e 200(C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*. Amostras individuais de DNA genômico do nematódeo, após duas PCRs, foram submetidas à digestão com enzima de restrição (*Hpy8I*, *Alw26I* e *HpyAV* para os códons 167, 198 e 200, respectivamente). Nas canaletas de 1 a 6 foram utilizados controles (1 e 4: plasmídeo sem mutação; 2 e 5: plasmídeo com mutação; 3 e 6: mix de plasmídeos com e sem mutação). Com exceção do produto de PCR com plasmídeos das canaletas de 1 a 3, todas as outras canaletas apresentam produtos após digestão. As canaletas de 7 a 18 apresentam produto de digestão de PCR utilizando DNA genômico de ovo. Fragmentos esperados (pb) – códon 167: homocigoto sem mutação: 291, homocigoto com mutação: 210 + 81, heterocigoto: 291 + 210 + 81; códon 198: homocigoto sem mutação: 262 + 53, homocigoto com mutação: 315, heterocigoto: 315 + 262 + 53; códon 200: homocigoto sem mutação: 242 + 73, homocigoto com mutação: 315, heterocigoto: 315 + 242 + 73. As canaletas destacadas apresentam perfil de genótipo representativo de mutação. A imagem mostra géis de acrilamida 6%, corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos). PM: peso molecular de 50 pb..... 96

Figura 25 – Cromatograma representativo do sequenciamento das amostras de *N. americanus* que apresentaram mutação no códon 198 e 200 com perfil homocigoto (A e B, respectivamente). O cromatograma C representa o helminto que com dupla heterocigose para esses dois códons..... 97

Figura 26 – Resultados demonstrativos da RFLP-PCR para varredura de SNPs nos códons 167(A), 198(B) e 200(C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*. Amostras individuais de DNA genômico do nematódeo, após duas PCRs, foram submetidas à digestão com enzima de restrição (*RsaI* para os códons 167 e 200; e *DdeI* para o códon 198). Nas canaletas de 1 a 6 foram utilizados controles (1 e 4: plasmídeo sem mutação; 2 e 5: plasmídeo com mutação; 3 e 6: mix de plasmídeos com e sem mutação). Com exceção do produto de PCR com plasmídeos das canaletas de 1 a 3, todas

as outras canaletas apresentam produtos de PCR após digestão. As canaletas de 7 a 17 apresentam produto de PCR de vermes. Fragmentos esperados (pb) – códon 167: homozigoto sem mutação: 162 + 95 + 49, homozigoto com mutação: 138 + 95 + 49 + 24, heterozigoto: 162 + 138 + 95 + 49 + 24; códon 198: homozigoto sem mutação: 186 + 28, homozigoto com mutação: 214, heterozigoto: 214 + 186 + 28; códon 200: homozigoto sem mutação: 137 + 71, homozigoto com mutação: 137 + 41 + 30, heterozigoto: 137 + 71 + 41 + 30. A imagem mostra géis de acrilamida 12%, corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos). PM: peso molecular de 50 pb..... 107

Figura 27 – Cromatogramas correspondentes às regiões dos códons 167 (A) e dos códons 198 e 200 do gene da β -tubulina da cepa de *A. ceylanicum* resistente..... 108

Figura 28 – Cromatogramas correspondentes ao sequenciamento das regiões dos códons 110 (A), 177 (B) e 390 (C) do gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa resistente de *A. ceylanicum*. Os códons que sofreram alteração encontram-se destacados..... 109

Figura 29 – Alinhamento das duas sequências de aminoácidos referentes às sequências de cDNA da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum* sem mutação e com mutação, a partir da ferramenta Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Os aminoácidos marcados correspondem aos locais nos quais as sequências divergiram..... 109

Figura 30 – Cromatogramas correspondentes ao sequenciamento das regiões dos códons 92 (A), 298 (B) e 371 (C) do gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa sensível de *A. ceylanicum*. Os códons que sofreram alteração encontram-se destacados..... 110

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Comparação em grupo (A) e individual (B) do número de ovos de *A. ceylanicum* por grama de fezes (OPG) de hamsters infectados com a cepa sensível e resistente. A quantificação individual somente foi realizada no dia da eutanásia dos animais. DPI = dia pós-infecção. n = 6. *p<0,05..... 99
- Gráfico 2** – Quantificação de vermes adultos recuperados das cepas de *A. ceylanicum* sensível e resistente. Número de vermes machos e fêmeas por grupo (A) e número total de vermes por grupo (B). Cada barra representa a média ± desvio padrão do grupo (n = 6). *p<0,05; ***p<0,001..... 100
- Gráfico 3** – Comparação da taxa de fertilidade em 24 h das fêmeas recuperadas dos grupos infectados com a cepa sensível e resistente de *A. ceylanicum*. Cada barra representa a média ± desvio padrão do grupo (n = 6)..... 101
- Gráfico 4** – Eritrograma realizado no 25º dia pós-infecção nos grupos controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*, com a contagem global de eritrócitos (A), níveis de hemoglobina (B), hematócrito (C), volume corpuscular médio (VCM) (D), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (E), distribuição da largura das células vermelhas (RDW) (F) e contagem de plaquetas (G). Cada barra representa a média ± desvio padrão do grupo (n = 6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. CTRL = controle..... 102
- Gráfico 5** – Dosagem de ferro sérico realizado no 25º dia pós-infecção nos grupos controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*. Cada barra representa a média ± desvio padrão do grupo (n = 6). **p<0,01. CTRL = controle..... 103
- Gráfico 6** – Níveis de expressão de hepcidina no fígado dos grupos de hamsters controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*, no 25º dia pós-infecção. Cada barra representa a média ± desvio padrão do grupo (n = 6). **p<0,01; ***p<0,001. CTRL = controle..... 104
- Gráfico 7** – Massa dos grupos de hamsters controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*, no dia da infecção (dia 0) e a cada seis dias pós-infecção. n = 6. **p<0,01; ***p<0,001. CTRL = controle..... 105
- Gráfico 8** – Teste de eclodibilidade de larva da cepa resistente e sensível de *A. ceylanicum* ao albendazol. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. n = 50..... 105

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Estrutura comum e a variação nos radicais (R1 e R2) de alguns componentes do grupo dos benzimidazóis (adaptado de Brunton et al., 2012)..... 28
- Quadro 2** – SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 relacionados à resistência aos benzimidazóis em helmintos..... 38
- Quadro 3** – Técnicas moleculares utilizadas para análise dos SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*..... 51
- Quadro 4** – Iniciadores utilizados para análise de mutações no gene da β -tubulina de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus* e suas respectivas temperaturas de anelamento. As posições em que foram feitas alterações encontram-se em negrito..... 53
- Quadro 5** – Combinações de iniciadores e respectivos tamanhos dos amplicons utilizados para síntese dos controles sem mutação de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*..... 55
- Quadro 6** – Combinações de iniciadores e respectivos tamanhos dos amplicons utilizados para síntese dos controles com mutação de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*. Os iniciadores sublinhados apresentam uma alteração proposital para mimetizar o gene mutado no produto amplificado..... 58
- Quadro 7** – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*..... 66
- Quadro 8** – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*..... 69
- Quadro 9** – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*..... 70
- Quadro 10** – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*..... 72
- Quadro 11** – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*..... 73
- Quadro 12** – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*..... 74
- Quadro 13** – Iniciadores utilizados para análise da expressão do gene da hepcidina em *Mesocricetus auratus*, com seu respectivos tamanhos de amplicon..... 80
- Quadro 14** – Iniciadores utilizados para construção da minibiblioteca de cDNA do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*, suas respectivas temperaturas de anelamento e tamanho de amplicon..... 83

Quadro 15 – Iniciadores utilizados para análise da região exônica do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum* e suas respectivas temperaturas de anelamento..... 84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Estados de origem de *A. caninum* e *A. braziliense* e quantidade de exemplares recuperados para genotipagem de SNPs ligados à resistência..... 48
- Tabela 2** – Locais de coleta, número de pacientes e de ovos de *N. americanus* utilizados para genotipagem de SNPs ligados à resistência..... 51
- Tabela 3** – Resultados da quantificação de ovos por grama de fezes por grupo, em câmara de McMaster (Gordon e Whitlock, 1939), durante o processo de seleção da cepa resistente de *A. ceylanicum*..... 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ARMS-PCR	Sistema de reação de amplificação refratária – reação em cadeia da polimerase, do inglês “ <i>amplification refractory mutation system – polymerase chain reaction</i> ”
BSA	Albumina do soro bovino, do inglês “ <i>bovine serum albumin</i> ”
C	Citosina
CCZ	Centro de Controle de Zoonose
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês “ <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> ”
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CO ₂	Dióxido de carbono
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTRL	Controle
DALY	Ano de vida perdido ajustado por incapacidade, do inglês “ <i>disability-adjusted life year</i> ”
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “ <i>deoxyribonucleic acid</i> ”
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado, do inglês “ <i>nucleoside triphosphate</i> ”
DPI	Dias pós-infecção
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês “ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ”
EHT	Teste de eclodibilidade de larva, do inglês “ <i>egg hatch test</i> ”
FECRT	Teste de redução de contagem de ovos nas fezes, do inglês “ <i>faecal egg count reduction test</i> ”
G	Guanina
HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferase, do inglês “ <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i> ”
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio

L1	Larva de primeiro estágio
L2	Larva de segundo estágio
L3	Larva de terceiro estágio
L4	Larva de quarto estágio
L5	Larva de quinto estágio ou adulto jovem
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
miRNA	Micro-RNA
miR-1	Micro-RNA do tipo 1
NaCl	Cloreto de sódio
nAChR	Receptor nicotínico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Ovos por grama de fezes
PBS	Tampão fosfato salina, do inglês “ <i>phosphate buffered saline</i> ”
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês “ <i>polymerase chain reaction</i> ”
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial de hidrogênio
Phe	Fenilalanina, do inglês “ <i>phenylalanine</i> ”
PM	Peso molecular
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês “ <i>real time – polymerase chain reaction</i> ”
R1	Radical 1
R2	Radical 2
RDW	Distribuição da largura das células vermelhas, do inglês “ <i>red blood cell distribution width</i> ”
RFLP-PCR	Polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição – reação em cadeia da polimerase, do inglês “ <i>restriction fragment length polymorphism – polymerase chain reaction</i> ”
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês “ <i>deoxyribonucleic acid</i> ”
RPMI	“ <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> ”
RT-	Controle negativo para transcriptase reversa
SDS	Duodecil sulfato de sódio, do inglês “ <i>sodium dodecyl sulfate</i> ”

SmartAmp2	Processo de amplificação inteligente, do inglês “ <i>smart amplification process</i> ”
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês “ <i>single nucleotide polymorphism</i> ”
TAE	Tris/acetato/EDTA
TBE	Tris/ácido bórico/EDTA
Tris-HCL	Tris hidrocloreto
T	Timina
Tyr	Tirosina, do inglês “ <i>tyrosine</i> ”
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCM	Volume corpuscular médio
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Ancilostomídeos.....	22
1.1.1. Considerações gerais.....	22
1.1.2. Ciclo biológico.....	23
1.1.3. Epidemiologia, sinais clínicos, sintomas e controle.....	25
1.2. Aspectos sobre resistência anti-helmíntica com foco nos benzimidazóis.....	27
1.2.1. Abordagem geral e mecanismo de ação dos benzimidazóis.....	27
1.2.2. Resistência anti-helmíntica e fatores predisponentes.....	32
1.2.3. Diferenças entre cepas resistente e sensível a anti-helmínticos.....	35
1.2.4. Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos benzimidazóis.....	36
1.2.5. Métodos para detecção de resistência aos benzimidazóis.....	40
1.3. Falha no tratamento da ancilostomose.....	44
2. JUSTIFICATIVA.....	46
3. OBJETIVOS.....	47
3.1. Objetivo geral.....	47
3.1. Objetivos específicos.....	47
4. METODOLOGIA.....	48
4.1. Considerações éticas.....	48
4.2. Amostragem e extração de DNA de <i>A. caninum</i> e <i>A. braziliense</i>	48
4.3. Amostragem e extração de DNA de <i>N. americanus</i>	50
4.4. Análise de SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>A. caninum</i> , <i>A. braziliense</i> e <i>N. americanus</i>	51
4.4.1. Desenho dos iniciadores.....	51
4.4.2. Síntese de controles.....	54
4.4.2.1. Síntese dos controles sem mutação.....	54
4.4.2.2. Síntese dos controles com mutação.....	57
4.4.3. <i>A. caninum</i>	62
4.4.3.1. Códon 167.....	62
4.4.3.2. Códon 198.....	63
4.4.4. <i>A. braziliense</i>	65
4.4.4.1. Códon 167.....	65

4.4.4.2. Códons 198 e 200.....	67
4.4.5. <i>N. americanus</i>	71
4.4.5.1. Códons 167, 198 e 200.....	71
4.5. Seleção da cepa de <i>A. ceylanicum</i> resistente ao albendazol.....	74
4.5.1. Infecção de hamsters com <i>A. ceylanicum</i>	76
4.5.2. Estimativa de carga parasitária por quantidade de ovos liberados nas fezes.....	77
4.5.3. Eutanásia, necrópsia e recuperação de vermes adultos.....	77
4.6. Caracterização das cepas resistente e sensível.....	77
4.6.1. Comparação quanto à espoliação sanguínea e de ferro sérico.....	77
4.6.2. Comparação quanto à massa dos animais.....	78
4.6.3. Comparação do número de ovos por grama de fezes, patência e taxa de fertilidade das fêmeas.....	78
4.6.4. Comparação quanto aos níveis de expressão de hepcidina no hospedeiro.....	78
4.6.4.1. Extração de RNA total.....	78
4.6.4.2. Tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	79
4.6.4.3. PCR em tempo real (qPCR).....	80
4.7. Teste de eclodibilidade de larva (EHT).....	81
4.8. Varredura de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>A. ceylanicum</i>	81
4.9. Construção da minibiblioteca de cDNA do gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>A. ceylanicum</i>	82
4.10. Purificação do DNA.....	86
4.11. Clonagem.....	87
4.12. Recuperação do DNA plasmidial.....	88
4.13. Sequenciamento.....	88
4.14. Análise estatística.....	89
5. RESULTADOS.....	90
5.1. <i>A. caninum</i>	90
5.2. <i>A. braziliense</i>	93
5.3. <i>N. americanus</i>	95
5.4. Seleção da cepa de <i>A. ceylanicum</i> resistente ao albendazol.....	97
5.5. Caracterização das cepas resistente e sensível.....	98

5.5.1. Quantificação de ovos por grama de fezes e patência.....	98
5.5.2. Recuperação de vermes.....	99
5.5.3. Taxa de fertilidade.....	100
5.5.4. Eritrograma.....	101
5.5.5. Dosagem de ferro sérico.....	103
5.5.6. Níveis de expressão de hepcidina no hospedeiro.....	103
5.5.7. Aferição de massa.....	104
5.6. Teste de eclodibilidade de larva (EHT).....	105
5.7. Varredura de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>A. ceylanicum</i>	106
5.8. Construção da minibiblioteca de cDNA do gene da β -tubulina isotipo 1 de <i>A. ceylanicum</i>	108
6. DISCUSSÃO.....	111
7. CONCLUSÃO.....	124
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
PRODUÇÕES RESULTANTES DA EXECUÇÃO DA TESE.....	151
PRODUÇÕES RESULTANTES DAS COLABORAÇÕES.....	169

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ancilostomídeos

1.1.1. Considerações gerais

Estima-se que um quarto da população mundial esteja infectada com algum geohelminto e que desse total 439 milhões de pessoas apresentam ancilostomídeos (Pullan et al., 2014). Os ancilostomídeos são responsáveis por ocasionar uma doença parasitária muito debilitante em humanos, a ancilostomose. Estima-se que essa parasitose resulte em uma carga global de 4,1 milhões de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (índice DALY), com mais de US\$ 100 bilhões em perdas econômicas globais (Bartsch et al., 2016; Shepherd et al., 2018).

Os parasitos conhecidos como ancilostomídeos são geohelminhos e são classificados como do Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Superfamília Strongyloidea, Família Ancylostomatidae (Zhang, 2011). Já foram descritas centenas de espécies de ancilostomídeos, que além do homem, podem parasitar outras classes de mamíferos, como canídeos e felídeos. Dentre essas espécies, destacam-se membros da subfamília Ancylostomatinae, que apresentam dentes na cápsula bucal, como *Ancylostoma braziliense* (de Faria, 1909), *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859), *Ancylostoma ceylanicum* (Looss, 1911) e *Ancylostoma duodenale* (Dubini, 1943). Destaca-se ainda o nematódeo *Necator americanus*, um membro da subfamília Bunostomatinae, que possui lâminas cortantes circundando a margem da cápsula bucal (Stiles, 1902).

A. duodenale e *N. americanus* parasitam o intestino delgado de humanos, enquanto que *A. braziliense*, *A. caninum* e *A. ceylanicum* usualmente parasitam o intestino delgado de canídeos e felídeos (Koide, 1961; Hasslinger, 1986). Essas três últimas espécies apresentam caráter zoonótico, sendo que *A. braziliense* e *A. caninum* podem causar uma inflamação eritematosa e pruriginosa na derme, conhecida como síndrome da larva migrans cutânea, popularmente chamada de bicho geográfico (Hasslinger, 1986). *A. caninum* pode ainda causar enterite eosinofílica no homem, uma infiltração intensa e segmentar principalmente no intestino delgado (Prociv e Croese, 1996), enquanto que *A. ceylanicum* também pode parasitar o intestino delgado de humanos e de alguns roedores, com caráter endêmico na Ásia (Inpankaew et al., 2014), sendo considerado um parasito zoonótico emergente em algumas partes do mundo, como na Austrália (Papaiakovou et al., 2017).

1.1.2. Ciclo biológico

O ciclo biológico dos ancilostomídeos é classificado como direto, sem participação de hospedeiros intermediários. Os vermes adultos se alojam no intestino delgado dos hospedeiros, onde se fixam na mucosa e se alimentam de tecido e de sangue. Com a fixação do helminto no intestino, arteríolas e capilares são rompidos por ação mecânica, por dilaceração da mucosa com os “dentes” ou placas e devido à pressão negativa causada pela musculatura esofagiana do verme. Esses vermes mudam de posição em um intervalo de 4 a 6 h, possivelmente em função de uma inflamação local, acarretando em pequenas e numerosas dilacerações no intestino delgado do hospedeiro, o que faz com que haja perda de sangue constantemente, que também é ocasionada pela ação química de enzimas que são produzidas e excretadas pelo parasito para interromper a hemostasia (Loukas e Prociv, 2001).

No intestino, os vermes adultos copulam e as fêmeas depositam os ovos, os quais são carregados pelas fezes do hospedeiro para o meio exterior. Em condições adequadas de umidade, temperatura e oxigenação, em aproximadamente 48 h, uma larva rabditoide (primeiro estágio - L1) eclode do ovo, a qual se alimenta de microrganismos e detritos orgânicos. Ainda no solo, dentro de sete a oito dias, essa larva passa por duas mudas e origina uma larva filarioide (terceiro estágio - L3), considerada a forma infectante do parasito. Devido à presença de uma bainha que oblitera a cavidade bucal, resultante da forma evolutiva anterior, a L3 não é capaz de se alimentar, contudo, apresenta uma resistência maior que os outros estádios larvais, sendo capaz de sobreviver no ambiente com grande motilidade, dependendo da espécie, por aproximadamente 49 dias (Mark, 1975).

Uma vez desenvolvida, as L3 podem apresentar duas rotas de infecção no hospedeiro original. No gênero *Ancylostoma*, a infecção ocorre pela penetração das L3 através da pele ou pela ingestão das mesmas. No caso de *N. americanus*, a infecção ocorre predominantemente pela penetração das L3 na pele (Soulsby, 1965).

No que diz respeito à infecção pela pele, a penetração das L3 ocorre via folículos pilosos, podendo acontecer de forma despercebida ou causar uma erupção cutânea local pruriginosa e eritematosa. As L3 alcançam, em seguida, os capilares sanguíneos e/ou linfáticos, perdendo a bainha resultante das formas evolutivas anteriores e se alimentando de componentes do plasma do hospedeiro (Hawdon e Shad, 1990), com produção de

variadas enzimas hidrolíticas cruciais para invasão no hospedeiro e desenvolvimento do nematódeo (Brown et al., 1999).

Após a penetração na pele, as L3 ganham o sistema circulatório, sendo carreadas para o lado direito do coração e, em seguida, para a vasculatura pulmonar. Essas larvas migram dos capilares para o parênquima pulmonar, são carreadas pelos alvéolos, bronquíolos e brônquios até a laringe. Esse processo de migração larval no sistema respiratório é chamado de ciclo de Loss. Na laringe, as L3 são deglutidas e ganham o trato gastrointestinal. No intestino delgado, sofrem duas mudas e se tornam vermes adultos, os quais passam a copular, com consequente liberação de ovos nas fezes do hospedeiro (Soulsby, 1965).

No caso da espécie *A. caninum*, após as L3 penetrarem na pele de cães, pode ocorrer também o fenômeno de migração somática, com dispersão das larvas no organismo, se instalando em tecidos musculares esqueléticos, onde permanecem em hipobiose ainda na forma de L3 (Kalkofen, 1987). Isso corresponde à capacidade do helminto de adotar um estado de latência, como uma estratégia para fugir das condições ambientais desfavoráveis (Schad, 1979). Em cadelas prenhas, essas larvas latentes nos tecidos somáticos podem se instalar nas glândulas mamárias, infectando os filhotes por via lactogênica (Kalkofen, 1987).

No tocante à infecção oral, devido à ação do suco gástrico, as L3 ingeridas perdem a cutícula externa ao passar pelo estômago do hospedeiro. Por volta de três dias de infecção, as L3 migram para o intestino delgado e penetram nas células de Lieberkühn, onde ocorre a muda para a larva de quarto estágio (L4) e, em seguida, para o quinto estágio (L5), também chamado de adulto jovem. Depois de um a dois dias, o parasito volta à luz do intestino, se fixando na mucosa intestinal por meio das suas cápsulas bucais para realizar hematofagia e cópula. Quando a infecção ocorre por via oral, o parasito não realiza o ciclo de Loss (Soulsby, 1965). Na Figura 1 é representado um esquema do ciclo biológico dos ancilostomídeos.

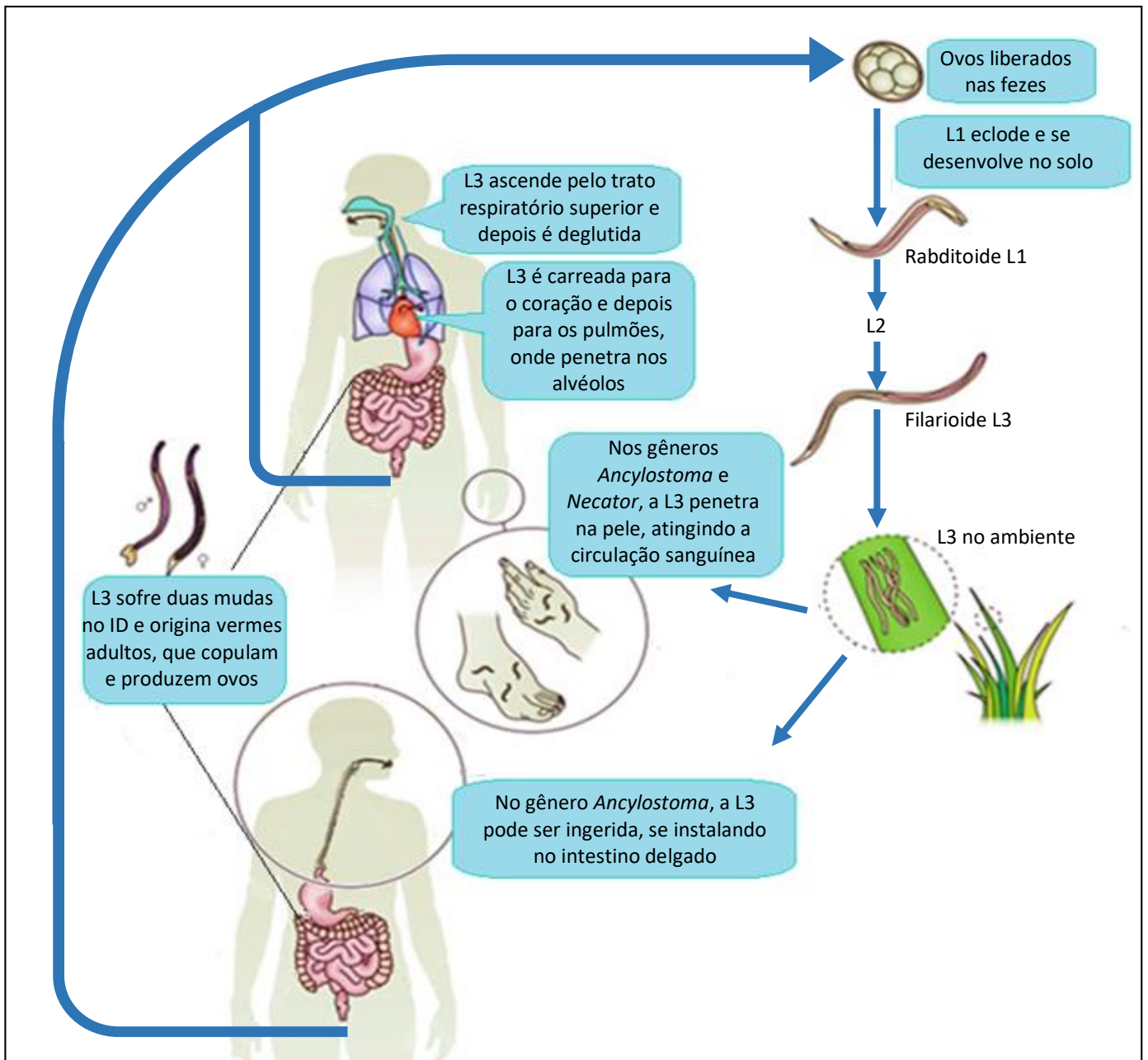


Figura 1 – Esquema representativo do ciclo biológico dos ancilostomídeos, adaptado de Loukas et al. (2016). L1, L2, e L3 = Larva de primeiro, segundo e terceiro estágio, respectivamente. ID = intestino delgado.

1.1.3. Epidemiologia, sinais clínicos, sintomas e controle

Vários levantamentos epidemiológicos demonstraram altas prevalências de ancilostomose humana em diferentes partes no mundo (Ajanga et al., 2006; Eijk et al., 2009; Ndibazza et al., 2010; Sarkar et al., 2017; Shiferaw et al., 2017). Na década de 90, por exemplo, o índice de positividade em uma região do Nepal chegou a 78,8% (Navitsky et al., 1998). Na Tanzânia, já foi relatada uma prevalência de 72,5%, principalmente em

área urbana (Albonico et al., 2002). Em Minas Gerais, Brasil, há relato de prevalência de 69,8% em área rural (Jardim-Botelho et al., 2009). Para Mudenda et al. (2012), a prevalência de ancilostomídeos no Brasil pode estar fortemente relacionada às condições climáticas mais quentes e úmidas.

Devido às noções básicas de higiene ainda em formação, a ancilostomose humana apresenta altas prevalências em crianças, contudo, como a infecção não confere proteção à reinfeção, há relatos de altos índices em adultos, principalmente em áreas precárias (Bethony et al., 2002; Brooker et al., 2004). Para Hotez et al. (2004), no que diz respeito à infecção por gênero em adultos, a prevalência e intensidade são maiores em homens do que em mulheres, em parte porque os homens têm maior exposição ao agente, sobretudo, pelas atividades laborais.

No caso da ancilostomose animal, pesquisas também evidenciam elevadas prevalências em diferentes regiões do mundo (Eguía-Aguilar et al., 2005; Pumidonming et al., 2017). No sul da China, Liu et al. (2013) detectaram prevalência dessa espécie em 95,1% dos gatos analisados, sugerindo que felídeos podem ser o principal hospedeiro desse helminto na região estudada. No sudeste do Brasil, Coelho et al. (2011) relataram índice de positividade de 63,6% e 30,3% para *A. caninum* e *A. braziliense*, respectivamente. No norte do Brasil, na década de 20, Gordon e Young (1922) encontraram 100% dos cães parasitados com *A. caninum*. Segundo Seguel e Gottdenker (2017), os ancilostomídeos são nematódeos de extrema importância em animais selvagens, como raposas, coiotes e ursos, apresentando elevada morbidade, entretanto, as pesquisas com esses animais são escassas.

Aliado a essas elevadas prevalências, inclusive em animais domésticos, a frequente ocorrência de ancilostomídeos em amostras de fezes coletadas no solo de locais públicos apontam os riscos de aquisição da larva migrans cutânea (Marques et al., 2012; Bojar e Kłapeć, 2012). George et al. (2016) observaram que 92,3% das amostras de solo analisadas por técnicas moleculares foram positivas para alguma espécie de ancilostomídeo. Nesses locais, a exposição de hospedeiros não usuais representam um potencial meio de infecção cutânea, de modo que crianças constituem um dos principais grupos de risco, pelos próprios hábitos de lazer.

Vários sinais e sintomas podem ser desencadeados pelo parasitismo por geo-helmintos em geral, como desnutrição, anorexia, irritabilidade e deficiência no desenvolvimento físico e mental. O grau de patogenia acarretado é diretamente proporcional à quantidade de parasitos albergados e às condições nutricionais do

hospedeiro (Hotez et al., 2005). Em infecções por ancilostomídeos, dentre as principais consequências do parasitismo, destaca-se a anemia, que é considerada do tipo ferropriva, uma vez que o hábito hematofágico do parasito, com ruptura das hemácias e degradação da hemoglobina, com consequente espoliação de ferro (Napier et al., 1941).

Em relação à anemia, vale ressaltar o papel adaptativo por parte do hospedeiro na produção do hormônio hepcidina, que ocorre principalmente nos hepatócitos, agindo como um regulador central do metabolismo de ferro no organismo (Meynard et al., 2014). Em condição de anemia e consequente hipóxia, esse hormônio é infrarregulado, controlando a homeostasia ao inibir a absorção de ferro no intestino, a reciclagem de ferro pelos macrófagos e a mobilização de ferro de estoques hepáticos. Esses eventos levam a uma maior disponibilidade dos níveis de ferro para garantir a síntese de células da série eritrocítica (Camaschella et al., 2016). Em suma, quanto maior o grau de anemia causada pelos ancilostomídeos, maior é a depleção de ferro e nível de hipóxia e, consequentemente, menor produção de hepcidina.

Apesar da tentativa de descoberta de alvos vacinais contra ancilostomídeos, com achados promissores no que diz respeito à diminuição na taxa de oviposição e carga parasitária, nenhum ensaio induziu imunidade esterilizante (Fujiwara et al., 2007; Wiśniewski et al., 2013; Wiśniewski et al., 2016). Dessa forma, dentre as possíveis adoções de medidas de controle, podem ser citadas as melhorias na qualidade de vida populacional, com educação em saúde e saneamento básico adequado (Albonico et al., 1999; Hotez, 2008). Essas medidas se tornaram fatores primordiais para a redução da prevalência de ancilostomídeos na China e nos Estados Unidos (Hotez, 2008). Todavia, baseando-se nas reduções globais de prevalência e intensidade de infecção, o principal método de controle das ancilostomoses é a administração do fármaco em massa, usando principalmente os benzimidazóis (Paveley e Bickle, 2013; Albonico e Savioli, 2017).

1.2. Aspectos sobre resistência anti-helmíntica com foco nos benzimidazóis

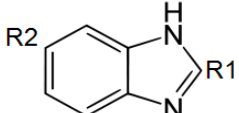

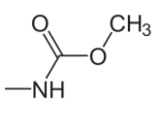
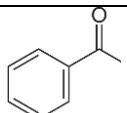
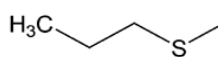
1.2.1. Abordagem geral e mecanismo de ação dos benzimidazóis

Com uso muito difundido na medicina humana e na veterinária, os compostos benzimidazólicos são considerados medicamentos de amplo espectro, com baixo custo financeiro, simples esquema posológico, fácil administração (via oral) e ação contra as diferentes formas evolutivas de nematódeos (Brunton et al., 2012). Embora a utilização desses medicamentos ocorra principalmente em infecções por nematódeos, os

benzimidazóis também são usados contra algumas espécies de trematódeos, cestódeos, fungos e, em menor escala, protozoários intestinais (Spinosa et al., 2017). Por apresentarem ação fungicida, esses fármacos também são amplamente utilizadas na agricultura (Liu et al., 2010; Zhang et al., 2016a).

Dentre os medicamentos do grupo dos benzimidazóis, o primeiro a ser desenvolvido foi o tiabendazol, ainda na década de 60 (Brown et al., 1961). A partir de então, outros medicamentos com o mesmo mecanismo de ação foram desenvolvidos, os quais passaram a ser divididos nos seguintes subgrupos, de acordo com suas estruturas químicas: os tiazólicos (cambendazol e tiabendazol); os metilcarbamatos (albendazol, fembendazol, flubendazol, luxabendazol, mebendazol, oxibendazol, oxfendazol, parbendazol) e os halogenados (triclambendazol) (Spinosa et al., 2017). Também existe uma classe chamada de pró-benzimidazóis, como febantel e tiofanato, que são anti-helmínticos que sofrem transformação para benzimidazóis, através da conversão enzimática em benzimidazol-etil ou metilcarbamatos, pelo rúmen e pelo metabolismo hepático de ruminantes (Bogan et al., 1987). Todos esses fármacos apresentam uma estrutura química em comum, com variação em seus radicais, que estão diretamente relacionados à toxicidade do fármaco. O tiabendazol, por exemplo, possui um anel do tipo tiazol na posição 2 e apresenta significativa toxicidade (Tada et al., 1996). No Quadro 1 é mostrada a estrutura comum e a variação nos radicais de alguns componentes do grupo dos benzimidazóis.

Quadro 1 – Estrutura comum e a variação nos radicais (R1 e R2) de alguns componentes do grupo dos benzimidazóis (adaptado de Brunton et al., 2012).

Estrutura química em comum		
		
R1	R2	Fármaco
	-H	Tiabendazol
		Mebendazol
		Albendazol

A diferença de eficácia entre os membros do grupo dos benzimidazóis está relacionada com a biodisponibilidade, a qual está associada à solubilidade do fármaco. Alguns benzimidazóis são menos hidrossolúveis e permanecem mais tempo no trato gastrointestinal, enquanto outros são mais hidrossolúveis, atingindo concentrações plasmáticas máximas de forma mais rápida. A fração absorvida é terapêuticamente ineficiente, apresentando metabolismo hepático e excreção renal. A parcela insolúvel, que fica em contato direto com o parasito por mais tempo, é eliminada nas fezes do hospedeiro (Bansal e Silakari, 2012; Keri et al., 2015).

Os eucariotos apresentam diferentes sensibilidades aos compostos benzimidazólicos (Davidse e Flach, 1977). Todavia, no que concerne ao mecanismo de ação, os benzimidazóis agem por contato direto com os vermes, impedindo a polimerização dos microtúbulos, que são estruturas ocas formadas principalmente por heterodímeros de duas proteínas: α -tubulina e β -tubulina (Friedman, 1979). Existem duas famílias de genes que codificam essas duas subunidades, de modo que cada família, dependendo da espécie, é formada por diferentes genes que codificam isotipos de proteínas, as quais apresentam domínios muito conservados, sofrendo principalmente modificações pós-tradução (Ludueña, 1998). Os diferentes isotipos, quando existentes, podem ser expressos, preferencialmente, em determinadas células e tecidos (Fuchs et al., 2013). É possível que as diferentes combinações entre os isotipos α e β possam explicar a diversidade de funções biológicas dos microtúbulos, como mitose, motilidade celular, transporte intracelular e secreção (Huzil et al., 2006).

Os microtúbulos são estruturas que se encontram em polimerização constantemente, de modo que um heterodímero de α - β -tubulina é adicionado em um lado da cadeia enquanto outro heterodímero é liberado no extremo oposto (Alberts et al., 2002). A ligação dos benzimidazóis com a proteína β -tubulina ocorre ao mesmo tempo em que o microtúbulo está perdendo o heterodímero no outro extremo, ocasionando o encurtamento e o desaparecimento do microtúbulo (Lacey, 1988). Como essa estrutura desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase celular, isso acaba inibindo uma série de mecanismos, levando à morte de formas maduras e, em menor escala, imaturas do helminto (Silva et al. 1997; Nogales, 2000). Secundariamente, os benzimidazóis apresentam outros mecanismos de ação, como redução do transporte de glicose e desacoplamento da fosforilação oxidativa (Lacey, 1988; Lacey, 1990). Os compostos benzimidazólicos podem ainda inibir a ação da enzima fumarato redutase

mitocondrial, resultando na diminuição da captação de glicose pelas células intestinais do verme, levando-o à morte por inanição (Prichard, 1973).

O sítio exato de ligação do fármaco na proteína β -tubulina não é conhecido, mas existem predições através de estudos de modelagem molecular, que sugerem que o sítio de ligação na β -tubulina pode variar de acordo com o fármaco, como observado para *Trichinella spiralis* por Aguayo-Ortiz et al. (2013a) (Figura 2). Na Figura 3A é apresentada a predição da estrutura tridimensional da β -tubulina de *Haemonchus contortus*, enquanto que na Figura 3B são apresentados alguns possíveis aminoácidos envolvidos na ligação com os benzimidazóis em *H. contortus*. Segundo a predição de Aguayo-Ortiz et al. (2013b), os aminoácidos da β -tubulina de *H. contortus* nas posições 50, 134, 165, 167, 198 e 200 seriam possíveis locais de interação dos benzimidazóis com a proteína.

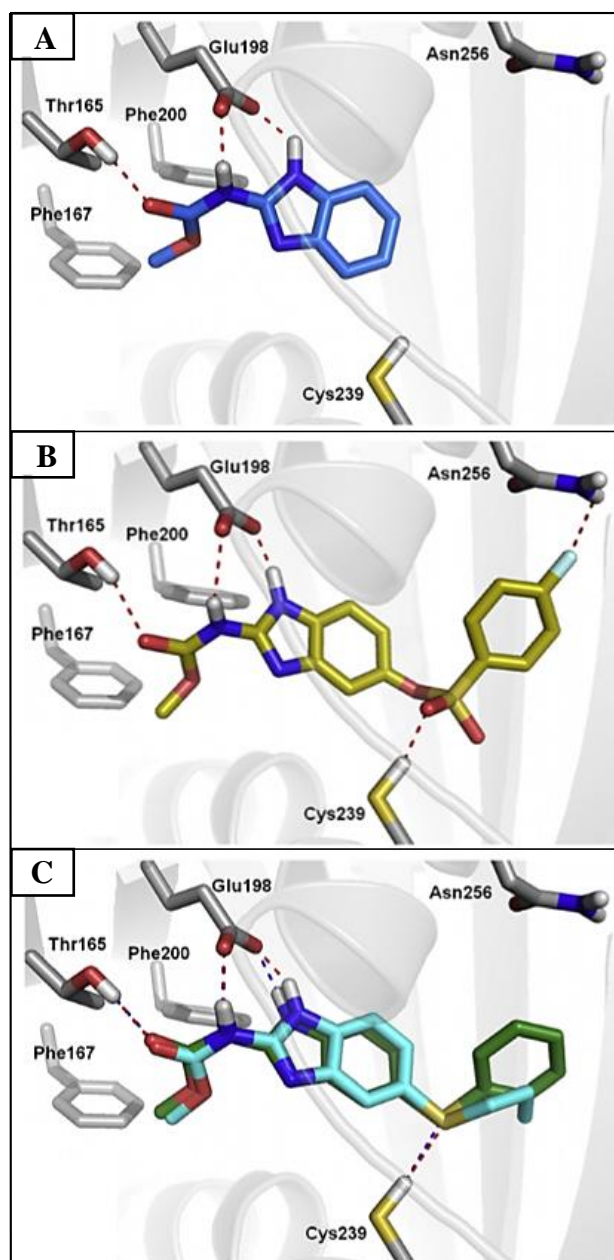


Figura 2 – Predição de possíveis aminoácidos da proteína β -tubulina isotipo 1 de *T. spiralis* envolvidos na ligação com os benzimidazóis. Interação da β -tubulina isotipo 1 com carbendazim (A), luxabendazol (B), albenbazol (azul) e febendazol (verde) (C). Adaptado de Aguayo-Ortiz et al. (2013a).

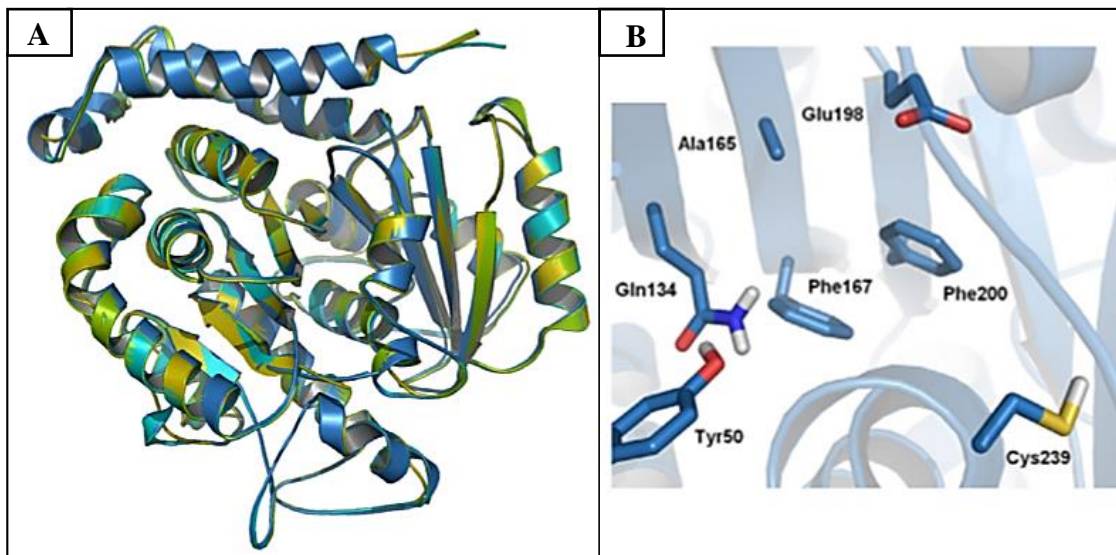


Figura 3 – Predição da estrutura tridimensional da proteína β -tubulina isotipo 1 de *H. contortus* (A) e possíveis aminoácidos da proteína β -tubulina isotipo 1 de *H. contortus* envolvidos na interação com os benzimidazóis (B). Adaptado de Aguayo-Ortiz et al. (2013b).

1.2.2. Resistência anti-helmíntica e fatores predisponentes

Embora vários trabalhos evidenciem elevada eficácia dos benzimidazóis contra helmintos no tratamento tanto de humanos (Bennett e Guyatt, 2000; Keiser e Utzinger, 2008) como de outros animais (Nalubamba e Mudenda, 2012), há muitos relatos de falha no tratamento com esses fármacos (Adams et al., 2004; Humphries et al., 2013). Isso evidencia a possibilidade do estabelecimento de resistência anti-helmíntica. De acordo com Kelly e Hall (1979), a resistência aos anti-helmínticos pode ser conceituada como um aumento da habilidade das cepas de parasitos em sobreviver às doses de uma fármaco que eliminaria a maioria dos indivíduos da mesma espécie. Coles et al. (1992) sugeriram que a resistência está presente quando a eficácia da dose terapêutica normal está abaixo de 95%.

As primeiras descrições de resistência ao tratamento anti-helmíntico foram para fármacos fenotiazínicos ainda nos anos 50, em *H. contortus* (Drudge et al., 1957). Em relação aos benzimidazóis, os primeiros relatos de resistência datam da década de 60, descritos por Conway (1964) e Drudge et al. (1964), também em *H. contortus*. A partir de então, muitos trabalhos relataram o estabelecimento de parasitos resistentes em diferentes espécies (Drogemuller et al., 2004; Palcy et al., 2010; Diawara et al., 2013a), inclusive caracterizando mecanismos moleculares envolvidos nesse processo (Kwa et al., 1994; Prichard, 2001; Ghisi et al., 2007).

Existem relatos de resistência aos três principais grupos de anti-helmínticos existentes: benzimidazóis/pró-benzimidazóis, imidazotiazóis/tetra-hidropirimidinas e lactonas macrocíclicas (Barrère et al., 2012; Bentounsi et al., 2012; Veríssimo et al., 2012; Falzon et al., 2013; Chaudhry et al., 2014; Muñoz-Lagunes et al., 2015). No caso dos benzimidazóis, há relatos de resistência na América (Chaudhry et al., 2014), na África (Bentounsi et al., 2012), na Ásia (Garg e Yadav, 2009), na Europa (Geurden et al., 2014) e na Oceania (Rendell, 2010), evidenciando a extensão geográfica do problema em todos os continentes do mundo, para diferentes helmintos.

Levando em consideração os custos relacionados ao desenvolvimento de um novo fármaco, cerca de US\$ 5 bilhões segundo Herper (2013), e as exigências governamentais rígidas para o registro da mesma, não existe um grande comprometimento no desenvolvimento de novos fármacos. Além do mais, há um desinteresse por parte da indústria farmacêutica por um produto voltado para tratamento de doenças negligenciadas humanas, já que afetam principalmente a população de baixa renda (Santos et al., 2017). Esses fatores acabam agravando o quadro atual de resistência anti-helmíntica. Até mesmo para o monepantel, primeiro representante do grupo dos derivados de amino acetônitrila, um medicamento relativamente novo no mercado, já existe relato de falha em seu uso (Scott et al., 2013).

De acordo com Vera (2014), a resistência anti-helmíntica pode ser classificada como lateral, cruzada ou múltipla. A resistência lateral ocorre quando uma cepa selecionada por um fármaco se mostra resistente a outros fármacos com mecanismo de ação semelhante, enquanto que a resistência cruzada envolve compostos químicos com diferentes mecanismos de ação. Em relação à resistência múltipla, esta ocorre quando há indivíduos em uma população que são resistentes a dois ou mais grupos de anti-helmínticos diferentes, como resultado da seleção de cada grupo, ou como resultado da resistência cruzada.

Segundo Jabbar et al. (2006), o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica é influenciado por fatores que podem ser classificados como genéticos, biológicos e operacionais. Os fatores genéticos dizem respeito à questão da frequência e perpetuação dos genótipos relacionados à resistência, enquanto os fatores biológicos estão ligados às alterações patogênicas, morfológicas e parasitológicas, que podem variar conforme o verme seja resistente ou sensível (ver item 1.2.3). Todavia, dentre esses fatores, são os operacionais os mais importantes, uma vez que formam as bases dos programas de controle.

Na veterinária, alguns esquemas de controle são propostos, como o tratamento estratégico (Kaplan e Vidyashankar, 2012). Nesse tipo de esquema, os animais são tratados quando as condições ambientais são desfavoráveis para o desenvolvimento do parasito, ou seja, praticamente toda a fauna helmintológica daquele habitat é exposta ao fármaco. Isso pode acarretar em uma grande pressão de seleção, uma vez que não existe uma subpopulação em estágio de vida livre, denominada refugia, contaminando o ambiente, impossibilitando a diluição do genótipo relacionado à resistência. Nesse ponto, as próprias condições climáticas podem estar diretamente ligadas à resistência, como sugerem Rinaldi et al. (2014), que associaram o clima mediterrâneo, com verão quente e seco, como um fator predisponente para o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica, uma vez que a população em refugia pode ser mais facilmente eliminada nessas condições desfavoráveis para o helminto. Segundo Shalaby (2013), à medida que a quantidade relativa da população em refugia aumenta, a taxa de desenvolvimento de resistência diminui.

Além do curto intervalo entre tratamentos, outros fatores operacionais predisõem ao estabelecimento da resistência, como a administração de doses incorretas (Silvestre et al., 2002), o uso frequente de um único fármaco, sem rotação e sem associação entre os fármacos de diferentes mecanismos de ação (Shalaby, 2013) bem como a introdução de um animal parasitado com helmintos resistentes em um novo grupo (Requejo-Fernández et al., 1997). Conseqüentemente, a ausência de resposta ao tratamento ameaça a sustentabilidade da indústria pecuária, comprometendo a sanidade animal e, conseqüentemente, o mercado financeiro (Prichard, 2001; Roeber et al., 2013).

Nas últimas décadas, alguns trabalhos ressaltaram a importância da resistência em helmintos de humanos, evidenciando mecanismos moleculares similares aos observados em helmintos de importância veterinária (Diawara et al., 2009; Diawara et al., 2013a). Conforme preconizado pela OMS (2012), a estratégia de controle atual contra os geohelmintos é a administração regular de uma dose única de albendazol (400 mg) ou mebendazol (500 mg) como quimioterapia preventiva, objetivando a eliminação desses parasitos como um problema de saúde pública até 2020. Isso é recomendado uma vez que o diagnóstico de infecção por geo-helmintos requer treinamento laboratorial, o tratamento com dose única é barato, bem tolerado pela população, além de poder ser distribuído por profissionais não médicos em escolas ou comunidades (Ásbjörnsdóttir et al., 2017).

Se por um lado a administração de fármaco em massa garante que os níveis de infecção sejam mantidos abaixo dos associados com morbidade, com melhorias na saúde

e no desenvolvimento infantil (Tchuenté, 2011), por outro, essa medida se torna arriscada, já que induz forte pressão de seleção de cepas resistentes (Prichard et al., 2012). Esse revés se acentua pela ausência de perspectiva de desenvolvimento de novas moléculas com propriedades anti-parasitárias (Weatherhead et al., 2017), evidenciando a necessidade de análise das estratégias para tratamento e controle das helmintoses (Kenyon et al., 2017).

1.2.3. Diferenças entre cepas resistente e sensível a anti-helmínticos

Especula-se que genótipos relacionados à resistência ao tratamento anti-helmíntico possam influenciar outras particularidades em diferentes formas evolutivas de helmintos, tais como sobrevivência de ovos e de larvas no ambiente, patogenicidade e infectividade (Hennon, 1993). Melo e Bevilaqua (2005) levantam a hipótese de que cepas resistentes podem apresentar aspectos mais patogênicos, o que levaria à morte do hospedeiro e, conseqüentemente, diminuiria a frequência dos genótipos relacionados à resistência; contudo, os parasitos resistentes, através de mecanismos como a alta capacidade de sobrevivência dos estágios de vida livre e maior liberação de ovos, compensariam a morte prematura do hospedeiro e, assim, disseminariam seus alelos na população.

Os mecanismos envolvidos nessas mudanças fisiológicas não são claros e os trabalhos comparando esses dados entre cepas são escassos. Todavia, essas mudanças são observadas inclusive para diferentes isolados de fungos (Koenraadt et al., 1992; Ma et al., 2003). No nematódeo de vida livre *Caenorhabditis elegans*, muito utilizado como modelo de estudo de drogas, Prichard (2001) observou características deletérias para a cepa resistente, como disfunções na motilidade, oviposição e musculatura da faringe. Maingi et al. (1990) relataram que uma cepa sensível de *H. contortus* apresentou maior número de ovos liberados nas fezes, maior patogenicidade e maior recuperação de vermes comparado com cepas resistentes, enquanto que Kelly et al. (1978) observaram o oposto desses dados para outra cepa sensível de *H. contortus*.

Skorping e Read (1998) sugerem que quando um verme é exposto a um medicamento que aumenta a sua mortalidade na forma adulta, ocorre prolongamento do estágio larval e conseqüente adiamento da maturidade do helminto. Dessa forma, o desenvolvimento larvário prolongado permite atingir uma maior taxa de fertilidade, uma vez que o crescimento prolongado pré-reprodutivo resulta em maior tamanho na vida

adulta. Leignel e Cabaret (2001) observaram que adultos resistentes de *Teladorsagia circumcincta* apresentaram maior comprimento do que adultos sensíveis, esperando um aumento da fertilidade nas fêmeas, pelo maior tamanho do útero. Por apresentarem maior comprimento longitudinal, esses vermes também poderiam apresentar maior patogenicidade (Stear et al., 1999). Todavia, Elard et al. (1998) observaram em *T. circumcincta* que não houve diferença significativa na oviposição, taxa de desenvolvimento de ovos à L3, capacidade de estabelecimento das larvas no hospedeiro e sobrevivência dos vermes adultos entre cepas sensível e resistente.

1.2.4. Mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos benzimidazóis

Os mecanismos moleculares relacionados à resistência aos benzimidazóis estão elucidados para vários helmintos (Elard et al., 1998; Silvestre et al., 2009; Blackhall et al., 2011). Conforme mostrado no item 1.2.1, os benzimidazóis agem na proteína β -tubulina do parasito. O gene codificador dessa proteína apresenta, dependendo da espécie, expressão de diferentes isotipos, com diferentes afinidades aos benzimidazóis (Saunders et al., 2013). Alterações que caracterizam polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) nos códons 167, 198 e 200 desse gene já foram descritos para alguns helmintos e fungos que não responderam ao tratamento com esses fármacos (Lubega e Prichard, 1991; McKay e Cooke, 1997), de maneira que as mutações no isotipo 1 da β -tubulina são frequentemente relacionadas à resistência em tricostrongilídeos e estrongilídeos (Saunders et al., 2013).

Embora nenhuma estrutura cristalográfica com as alterações provenientes desses SNPs tenha sido produzida até o momento, acredita-se que a presença dos mesmos cause uma mudança conformacional na proteína, resultando em alterações moleculares e bioquímicas que impedem a associação do fármaco com o seu local de ligação. De acordo com Lubega e Prichard (1990), uma cepa de *H. contortus* resistente aos benzimidazóis exibe uma diminuição significativa na expressão de receptores de alta afinidade à droga em comparação com a cepa sensível. No entanto, os valores da constante de associação para o receptor de alta afinidade são semelhantes entre as duas cepas.

De acordo com a modelagem proposta por Robinson et al. (2004), a estrutura atômica do heterodímero mostra que o aminoácido 200 da β -tubulina e outros aminoácidos que podem estar relacionados com resistência estão escondidos no interior da proteína, numa posição inacessível à droga. No entanto, esses autores sugerem alguns meios através dos quais esses aminoácidos podem se tornar acessíveis. Um desses

mecanismos seria pelo movimento das cadeias laterais de alguns aminoácidos na superfície, expondo os aminoácidos envolvidos na ligação. Outra possibilidade seria pelo alargamento da fenda entre os domínios N-terminais e intermediários na dissociação de tubulina dimérica em monômeros durante a polimerização dos microtúbulos.

Helmintos sensíveis aos benzimidazóis apresentam o códon TTC na posição 200 do gene da β -tubulina, codificando uma fenilalanina. A substituição da segunda timina por uma adenina causa alteração no códon, com substituição da fenilalanina por uma tirosina, podendo caracterizar o polimorfismo de resistência (Kwa et al., 1994). Mamíferos apresentam naturalmente uma tirosina no códon 200 nessa região do ácido desoxirribonucleico (DNA), um dos motivos pelos quais o fármaco não apresenta alta toxicidade para os mesmos (Lewis et al., 1985).

A alteração no códon 167 é semelhante a que ocorre no códon 200, também acarretando na substituição de uma fenilalanina por uma tirosina (Prichard, 2001). No caso da mutação no códon 198, que também é caracterizada pela substituição de apenas uma base, a trinca GAG, que codifica um ácido glutâmico, sofre mutação e passa a ser GCG, codificando uma alanina (Ghisi et al., 2007). É importante ressaltar que esse três códons podem variar na sua composição de nucleotídeos, tendo em vista que o código genético é degenerado. Para *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiuria*, por exemplo, o códon 198 dos parasitos sensíveis é composto pela trinca GAA, que codifica um ácido glutâmico. A partir da mutação da primeira adenina por uma citosina, a nova trinca GCA codifica uma alanina, o que pode garantir fenótipo de resistência para o helminto (Rashwan et al., 2017). No Quadro 2 são apresentados os SNPs associados à resistência em alguns nematódeos.

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

Número do códon	Troca de aminoácido	Helminto	Referência
167	Phe → Tyr	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Diawara et al. (2013a)
		<i>Cylicocyclus nassatus</i> , <i>Cyathostomum pateratum</i> , <i>Cyathostomum coronatum</i> , <i>Cyathostomum catinatum</i> , <i>Cylicostephanus longibursatus</i> e <i>Cylicostephanus goldi</i>	Drogemuller et al. (2004)
		<i>Haemonchus contortus</i>	Prichard (2001)
		<i>Haemonchus placei</i>	Brasil et al. (2012)
		<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Silvestre e Cabaret (2002)
		<i>Trichuris trichiuria</i>	Diawara et al. (2013a)
		198	Glu → Ala
<i>Necator americanus</i>	Rashwan et al. (2016)		
<i>Trichuris trichiuria</i>	Diawara et al. (2013a)		
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Redman et al. (2015)		
200	Phe → Tyr	<i>Ancylostoma caninum</i>	Furtado et al. (2014)
		<i>Cooperia oncophora</i>	Njue e Prichard (2003)
		<i>Cyathostomum coronatum</i>	von Samson-Himmelstjerna et al. (2002)
		<i>Cylicocyclus nassatus</i>	Pape et al. (1999)
		<i>Haemonchus contortus</i>	Kwa et al. (1994)
		<i>Haemonchus placei</i>	Chaudhry et al. (2014)
		<i>Necator americanus</i>	Diawara et al. (2013a)
		<i>Nematodirus battus</i>	Morrison et al. (2014)
		<i>Ostertagia ostertagi</i>	Knapp-Lawitzke et al. (2015)
		<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Elard e Humbert (1999)
		<i>Trichostrongylus axei</i>	Palcy et al. (2010)
		<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Silvestre e Humbert (2000)
		<i>Trichuris trichiura</i>	Diawara et al. (2009)
		<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Esteban-Ballesteros et al. (2017)
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Schwab et al. (2005)		

Conforme Melo e Bevilaqua (2005), uma população sensível de helmintos apresenta uma subpopulação com habilidade hereditária para resistir ao tratamento anti-helmíntico. Assim, três hipóteses são discutidas por Silvestre et al. (2009) para estabelecimento desses genótipos em tricostrongilídeos: (1) o alelo resistente pode ter existido como um alelo ancestral, o qual foi introduzido em fazendas, no início da

formação do rebanho, (2) mutação espontânea pode ter gerado novos alelos após a constituição do rebanho e (3) a recombinação sexual entre alelos sensíveis e resistentes pode ter gerado novas variantes de um alelo resistente existente.

É importante ressaltar que a droga não é um agente mutagênico. O polimorfismo pode estar presente numa subpopulação de parasitos e o uso periódico da droga seleciona os indivíduos com o genótipo relacionado à resistência, enquanto os indivíduos que não apresentam o polimorfismo não sobrevivem ao tratamento (Prichard, 2007). Com a eliminação da população sensível, a próxima geração consistirá da progênie dos parasitos que sobreviveram ao tratamento, herdando a capacidade de sobrevivência à exposição anti-helmíntica.

Mutações que conferem resistência aos benzimidazóis podem se apresentar de forma isolada ou em combinações, resultando em diferentes níveis de resistência e variando entre populações de uma mesma espécie (Blackhall et al., 2011). De acordo com Silvestre e Cabaret (2002), três situações podem ser descritas dentre as relações que podem existir entre os códons 167 e 200: a homozigose para uma das duas mutações é suficiente para conferir resistência; a dupla homozigose permite tolerância a doses mais elevadas do que a homozigose para uma única mutação e, por fim, a dupla heterozigose confere maior grau de resistência do que heterozigose para uma única mutação. Todavia, nunca foi observada uma dupla mutação homozigótica para o mesmo helminto, o que sugere que a β -tubulina pode tolerar uma mutação, mas duas mutações homozigóticas a tornam disfuncional e incompatível com a vida (Hodgkinson et al., 2008).

Barrère et al. (2012) mostraram que a homozigose para a mutação no códon 167 conferiu resistência aos benzimidazóis em *H. contortus*, porém a heterozigose tanto para o códon 167 como para o códon 200 não conferiu perfil de resistência, a menos que essa heterozigose fosse presente simultaneamente nesses dois códons. Silvestre e Cabaret (2002) observaram que a mutação no códon 167, tanto em homozigose como em heterozigose, garantem sobrevivência ao tratamento contra a espécie *T. circumcincta*, sem mutação no códon 200. Contrariamente, Elard e Humbert (1999) concluíram que, após tratamento com albendazol de pequenos ruminantes infectados com *T. circumcincta*, apenas homozigotos para mutação no códon 200 resistiram ao tratamento, sendo que os três genótipos possíveis para esse códon estavam inicialmente presentes.

Em relação ao SNP na posição 198, esse foi descrito pela primeira vez por Ghisi et al. (2007) em *H. contortus*, detectando também mutação no códon 200, mas não no 167. Apesar de alguns trabalhos tentarem relacionar a mutação no códon 198 com outros

nematódeos, como em *A. caninum* (Schwenkenbecher e Kaplan, 2009), *A. lumbricoides* (Diawara et al., 2013a) e ciatostomíneos de equinos (Blackhall et al., 2011), somente em *H. contortus* (Ghisi et al., 2007), *N. americanus* (Rashwan et al., 2016), *T. circumcincta* (Redman et al., 2015) e *T. trichiuria* (Diawara et al., 2013a) essa mutação foi relatada.

Em *T. trichiura* foram detectados SNPs nos códons 167, 198 e 200 em amostras coletadas a campo do Haiti, Panamá e Quênia, enquanto que em *A. lumbricoides* a mutação foi observada apenas no códon 167 de parasitos desses mesmos locais (Diawara et al., 2013a). Em trabalho semelhante, realizado no Panamá e Quênia, também foi observado SNP no códon 200 em *T. trichiura*, mas não para *A. lumbricoides*, levantando a hipótese de que a baixa sensibilidade observada no tratamento da tricurose com benzimidazóis pode ser devido à alta frequência desse SNP (Diawara et al., 2009). Todavia, Hansen et al. (2013) não detectaram nenhum desses SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 de *Trichuris* spp. recuperados de humanos da China e Uganda, e de babuínos da Dinamarca e Estados Unidos.

1.2.5. Métodos para detecção de resistência aos benzimidazóis

Tendo em vista o impacto que o problema de resistência anti-helmíntica representa, se faz necessária a detecção precoce desse processo, a fim de adotar estratégias para tentar retardar o estabelecimento de cepas resistentes (Humphries et al., 2013; Lyndal-Murphy et al., 2014). Sendo assim, algumas metodologias foram estabelecidas para realização de testes *in vivo* ou de bioensaios *in vitro* para diagnóstico de resistência anti-helmíntica. Segundo Fortes e Molento (2013), a disponibilidade de testes de bioensaios validados para resistência é muito limitada devido à sua complexibilidade e ao nível de treinamento técnico para análise dos achados, com poucos laboratórios oferecendo esse tipo de serviço. Ainda de acordo com esses autores, testes *in vivo* podem ser inviáveis devido ao custo elevado, já que envolvem manutenção e, às vezes, sacrifício de animais.

De acordo com Coles et al. (1992), testes *in vivo*, como o Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (FERCT, do inglês *fecal egg count reduction test*), constituem uma importante ferramenta para diagnóstico fenotípico de resistência. Segundo esse teste, uma determinada população é considerada resistente quando a eficiência do fármaco no tratamento elimina menos que 95% do número de ovos contados nas fezes em relação à contagem dos ovos do pré-tratamento. Esse teste é amplamente

empregado para ruminantes (Dixit et al., 2017), mas também utilizado, em menor escala, para outros hospedeiros, como aves (Tarbiat et al., 2017) e humanos (Humphries et al., 2013; Krücken et al., 2017).

O teste de eclodibilidade de larva (EHT, do inglês *egg hatch test*) é outra metodologia fenotípica descrita para diagnóstico de resistência, principalmente para os benzimidazóis. Esse teste se baseia na atividade ovicida do fármaco, com incubação dos ovos em diferentes concentrações do fármaco. Ao final de 48 h, é realizada a contagem do número de larvas eclodidas na presença do fármaco. Quando a dose efetiva para inibir 50% da eclosão das larvas for superior ou igual a 0,1µg/mL, a população de parasitos é considerada resistente (Coles et al., 1992). Esses testes podem ser padronizados inclusive para helmintos de importância humana (Humphries et al., 2013).

Apesar de serem indicados pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, existe a hipótese de que os métodos para diagnóstico fenotípico somente detectam resistência quando, no mínimo, 25% da população de nematódeos apresentar genótipo de resistência, ou seja, quando já houve o estabelecimento da população resistente (Papadopoulos, 2008). Os resultados de Dixit et al. (2017) também suportam essa correlação. Desse modo, é necessária a realização de análises moleculares, que podem ser capazes de compensar as limitações encontradas em triagens fenotípicas.

Segundo Roeber et al. (2013), embora novas metodologias moleculares tenham sido descritas, não existe um teste prático para a detecção de resistência a mais de uma classe de anti-helmíntico. Além disso, segundo os mesmo autores, a maioria dos ensaios moleculares utilizados requer o uso de L3 ou de verme adulto, o que dificulta a realização dos trabalhos. Para Várady e Čorba (1999), algumas desvantagens são citadas em termos de custo, aplicabilidade, interpretação e reprodutibilidade desses testes. Entretanto, desde essa constatação, já se passaram mais de 15 anos e tanto as metodologias moleculares ficaram mais sensíveis quanto os custos mais acessíveis, inclusive com vários trabalhos na literatura que utilizam ovos para estes testes (Diawara et al., 2013a; Rashwan et al., 2016).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) baseada no Sistema de Reação de Amplificação Refratária (ARMS-PCR) é uma das ferramentas moleculares muito utilizada na genotipagem de SNPs relacionados à resistência aos benzimidazóis tanto em helmintos (Niciura et al., 2012) como em fungos (Zhang et al., 2017). Essa técnica tem como princípio o fato de que a *Taq* DNA polimerase convencional não apresenta atividade 3'-5' exonuclease, ou seja, a enzima não possui função de revisão durante a

polimerização. Dessa forma, o pareamento incorreto na extremidade 3' do iniciador e o DNA molde resulta na impossibilidade de amplificação (Ye et al., 2001).

A ARMS-PCR utiliza apenas um par de iniciador por reação, enquanto que sua variante, a Tetraprimer ARMS-PCR, utiliza quatro iniciadores na mesma reação (dois iniciadores externos e dois internos): um iniciador para se anelar na sequência correspondente ao alelo sem mutação e outro iniciador para o alelo com mutação. Nessa reação podem ser produzidos dois ou três fragmentos de tamanhos diferentes: um fragmento que é o controle da amplificação, e mais um fragmento, caso o indivíduo seja homocigoto para um dos alelos, ou mais dois fragmentos, caso o indivíduo seja heterocigoto. Na Figura 4 é apresentado um esquema para dessa técnica.

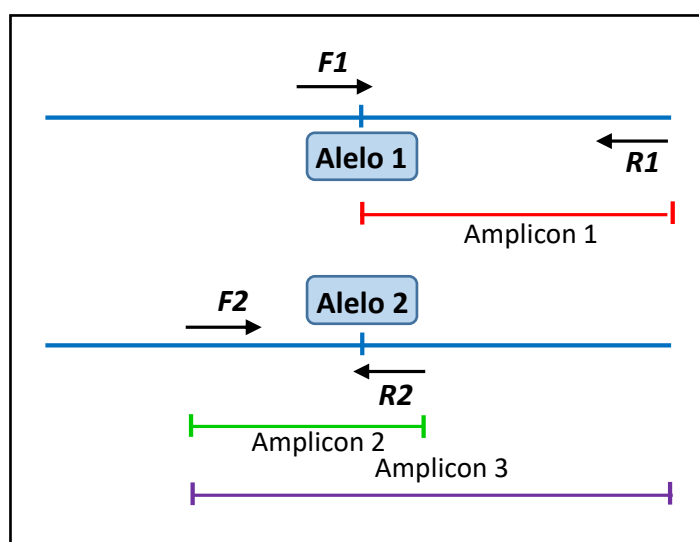


Figura 4 – Representação esquemática da técnica de Tetraprimer ARMS-PCR para análise de SNP. O hipotético amplicon 3 é produzido pelos iniciadores externos (*F2* e *R1*). Esse amplicon serve como um controle intratubo. O alelo 1 é detectado pela amplificação de *F1* e *R1* (Amplicon 1). O alelo 2 é detectado pela amplificação dos iniciadores *F2* e *R2* (Amplicon 2).

Furtado e Rabelo (2015) padronizaram uma técnica molecular baseada em ARMS-PCR para detecção de SNP no códon 200 em *A. caninum*, todavia, relataram uma dificuldade de extrapolação de protocolos espécie-específicos. Segundo esses autores, em alguns casos a padronização da Tetraprimer ARMS-PCR pode não funcionar pela dificuldade em compatibilizar quatro iniciadores em uma mesma reação, os quais podem produzir mais fragmentos do que o esperado, demonstrando que o problema pode estar intrínseco à região onde os iniciadores necessitam se anelar. Segundo esses mesmos autores, outro fator importante e que encontra divergência na literatura é o local de adição

de uma segunda incompatibilidade de pareamento de nucleotídeo, uma vez que somente a incompatibilidade de pareamento na posição 3' do iniciador com o DNA molde pode não ser suficiente para prevenir uma amplificação inespecífica. Segundo Shayan et al. (2007), a ARMS-PCR, embora excelente, é muito difícil de ser padronizada e precisa de um alto nível de experiência em técnicas de biologia molecular para obter resultados reprodutíveis.

Outro método muito utilizado para a detecção de SNPs relacionados à resistência é a PCR que se baseia em Polimorfismos no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP-PCR) (Nabavi et al., 2011; Chandra et al., 2015). Como esses polimorfismos correspondem a uma mutação de ponto, essa troca de nucleotídeo pode criar ou desfazer um sítio para enzima de restrição. Desse modo, a enzima cliva somente um dos alelos (o mutado ou o sem mutação), sendo possível fazer a diferenciação dos genótipos em um gel. Segundo Ota et al. (2007), essa técnica é simples, sensível, confiável e requer investimento mínimo em instrumentação, entretanto, apresenta algumas limitações, como nos casos em que as sequências não são adequadas para enzimas de restrição comerciais ou quando possuem muitos sítios de reconhecimento para uma única enzima.

No caso da mutação não criar ou desfazer um sítio para nenhuma enzima de restrição, é possível criar esse sítio para realizar a diferenciação dos genótipos. Nesse caso, é possível fazer uma alteração em um dos iniciadores que flanqueiam a região do SNP, de modo que esse iniciador apresente uma alteração proposital, a qual resultará em uma base alterada em todas as amostras amplificadas. Essa alteração, somada com a presença ou com a ausência da mutação de interesse, irá criar um sítio para alguma enzima de restrição, permitindo a caracterização das amostras. Shokrani et al. (2012) padronizaram essa técnica para análise do códon 167 de *H. contortus*, para clivagem dos alelos mutados, enquanto que Shayan et al. (2007) realizaram essa técnica para o códon 200 de *T. circumcincta*, para clivagem dos alelos sem mutação.

Conforme Lambert et al. (2017), o uso de PCR em tempo real (qPCR) é uma das opções para monitorar mudanças na frequência de alelos ligados à resistência. Esses autores realizaram a genotipagem de SNPs nos códons 167 e 200 de *H. contortus* por qPCR usando sonda, cujo os resultados apresentaram 100% de concordância com o sequenciamento, mostrando, portanto, alta eficiência e sensibilidade. Schwenkenbecher e Kaplan (2009) desenvolveram um ensaio com qPCR para o códon 198 de *A. caninum* sem necessidade de utilização de sonda, já que para essa sequência, os produtos para os dois alelos podem ser distinguidos pela sua curva de dissociação. Nesse sentido, segundo

esses autores, essa técnica nem sempre é exequível, uma vez que dependendo da alteração, a mudança não acarreta numa diferença de temperatura de dissociação detectável, como acontece nos códons 167 e 200 (onde a alteração é de uma timina para uma adenina).

O sequenciamento de DNA também tem sido realizado para detecção de SNPs ligados à resistência aos benzimidazóis. Drogemuller et al. (2004), por exemplo, sequenciaram o DNA codificante (cDNA) completo do gene da β -tubulina isotipo 1 de ciatostomíneos, enquanto Ishii et al. (2017) sequenciaram a região do códon 167 a partir de DNA genômico de ciatostomíneos. A vantagem dessa técnica é permitir a análise de múltiplos SNPs numa mesma reação (Milhes et al., 2017). O pirosequenciamento, variante do sequenciamento convencional, também tem sido descrito como um método eficaz na detecção dessas mutações. Redman et al. (2015) avaliaram os códons 167, 198 e 200 de *H. contortus* e *T. circumcincta* através de pirosequenciamento. Para Diawara et al. (2009), essa técnica é confiável, rápida e fácil, permitindo a análise de SNPs de grandes números de amostras de ovo ou outras fases do parasito, num curto período. Segundo Rashwan et al. (2016), as técnicas de sequenciamento são demoradas, complexas e muito caras para programas de triagem em larga escala.

1.3. Falha no tratamento da ancilostomose

A efetividade do tratamento quimioterápico contra a infecção por ancilostomídeos tem sido investigada em vários trabalhos (Humphries et al., 2013; Marocco et al., 2017). Pion et al. (2017) observaram que a administração de albendazol de 2012 a 2015, a cada seis meses, foi suficiente para interromper a transmissão de ancilostomídeos nos anos de 2014 e 2015 em uma comunidade no Congo. Entretanto, alguns trabalhos denotam falha no tratamento utilizando diferentes fármacos (Keiser e Utzinger, 2008; Humphries et al., 2013). Humphries et al. (2011) relataram uma taxa de falha do tratamento de 39% da ancilostomose em crianças após a administração de uma dose única de albendazol, evidenciando a possibilidade de presença de parasitos resistentes, especialmente porque, entre aqueles que não foram curados, não houve diferença significativa no número de ovos nas fezes entre o pré e o pós-tratamento.

Keiser e Utzinger (2008) realizaram uma busca sistemática em diferentes bancos de dados, incluindo a OMS, concluindo que a eficácia de uma dose única de albendazol, mebendazol e pamoato de pirantel contra as infecções por ancilostomídeos foi de 72%,

15% e 31%, respectivamente. Humphries et al. (2013) observaram uma taxa de cura de 43% de crianças infectadas por ancilostomídeos tratadas com dose oral única de albendazol. Segundo Albonico et al. (2003), do ponto de vista de saúde pública, o programa de controle de helmintos com tratamento em massa pode ser eficaz na redução da intensidade, embora a baixa eficácia do tratamento das infecções por ancilostomídeos possa ser preocupante. Os resultados de Kēpha et al. (2017) reforçam essa hipótese, demonstrando que tratamentos repetidos contra ancilostomídeos com albendazol reduziram drasticamente a intensidade, mas não eliminaram 100% das infecções em crianças do Quênia, sugerindo a necessidade de integrar o tratamento com intervenções baseadas em higiene e saneamento básico.

No tocante aos aspectos moleculares envolvidos no processo de resistência aos benzimidazóis em ancilostomídeos, ainda existe uma lacuna de estudo muito extensa. A maioria dos trabalhos realizados que objetivaram elucidar os mecanismos nesses vermes não descreveu o processo completo. Os únicos resultados que até então descreveram mutações no gene da β -tubulina isotipo 1 de ancilostomídeos foram os de Diawara et al. (2013a) e Furtado et al. (2014), para o códon 200 de *N. americanus* e *A. caninum*, respectivamente, bem como Rashwan et al. (2016), para o códon 198 de *N. americanus*. Schwenkenbecher et al. (2007) não relataram mutação no códon 167 e 200 em *N. americanus* de crianças que receberam tratamento de forma periódica com falha no tratamento. Schwenkenbecher e Kaplan (2009) analisando o códon 198 de *A. caninum* não detectaram qualquer alteração.

2. JUSTIFICATIVA

O principal meio de controle das geo-helminthoses é administração do fármaco em massa, principalmente usando os benzimidazóis. Essa estratégia pode acarretar na seleção de cepas de parasitos resistentes ao tratamento, caracterizando um problema muito estudado em parasitos de importância na pecuária, como *H. contortus*. SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 têm sido relacionados com o perfil de resistência ao tratamento em muitos helmintos, contudo, embora existam vários relatos de falha no tratamento contra os ancilostomídeos, as bases genéticas envolvidas no processo de resistência ainda necessitam ser elucidadas. Assim, analisar esses SNPs em populações de *A. braziliense* e *A. caninum* e *N. americanus* coletadas a campo de diferentes regiões do Brasil permite determinar a frequência desses polimorfismos nessas populações.

As mutações associadas com resistência em outros nematódeos muitas vezes não são encontradas em populações de ancilostomídeos que não responderam ao tratamento, o que sugere a participação de outros mecanismos moleculares envolvidos no processo. Nesse contexto, a obtenção de uma cepa de *A. ceylanicum* resistente, através de pressão seletiva de tratamento, constitui um modelo útil para a determinação desses mecanismos. Como outros processos podem estar associados aos mecanismos de resistência que não os polimorfismos já descritos, a construção de uma minibiblioteca do gene da β -tubulina isotipo 1 pode ser uma ferramenta importante para ajudar a responder essa questão, estabelecendo novos possíveis polimorfismos.

Para alguns nematódeos, a mutação que acarreta em genótipo de resistência pode ser acompanhada de outras alterações, ocasionando mudanças na biologia do parasito. Essas alterações podem ter efeitos deletérios sobre a sua sobrevivência ou ainda potencializar sua patogenicidade. Selecionar uma cepa de ancilostomídeo resistente aos benzimidazóis e caracterizar o perfil da mesma, baseado em parâmetros patogênicos e parasitológicos, permite realizar um delineamento da relação parasito-hospedeiro e da biologia da cepa como um todo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Investigar a participação de polimorfismos no gene da β -tubulina isotipo 1 no processo de resistência aos benzimidazóis em ancilostomídeos.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar a frequência de SNPs relacionados à resistência aos benzimidazóis nos códons 167 e 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* e nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense* e de *N. americanus* coletados a campo.
- Obter uma cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol por pressão seletiva de tratamento;
- Realizar uma varredura para a detecção de mutações nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa resistente de *A. ceylanicum*;
- Construir uma minibiblioteca de cDNA do gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa resistente de *A. ceylanicum*;
- Comparar experimentalmente as cepas de *A. ceylanicum* resistente e sensível ao albendazol baseado em parâmetros parasitológicos e patogênicos;
- Realizar tese de eclodibilidade de larva para comparação de nível de resistência de droga entre as cepas de *A. ceylanicum* resistente e sensível ao albendazol.

4. METODOLOGIA

4.1. Considerações éticas

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA (número de protocolo 328/12) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa – COEP (CAAE 61047216.7.0000.5149) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.2. Amostragem e extração de DNA de *A. caninum* e *A. braziliense*

Os exemplares de *A. caninum* e *A. braziliense* foram provenientes de cães eutanasiados nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) dos respectivos locais (5 a 11 animais por estado). Na Tabela 1 é mostrado o número total e o número de vermes coletados por estado.

Tabela 1 – Estados de origem de amostras de *A. caninum* e *A. braziliense* e quantidade de exemplares recuperados para genotipagem de SNPs ligados à resistência.

Estado	Quantidade de exemplares	
	<i>A. caninum</i>	<i>A. braziliense</i>
Maranhão	46	-
Mato Grosso do Sul	44	-
Minas Gerais	112	42
Paraná	34	-
Piauí	80	39
São Paulo	11	-
Total	327	81

Como a eutanásia dos cães já é um procedimento de rotina dos CCZs, coube aos médicos veterinários a realização dessa etapa, obedecendo à legislação vigente. Após eutanásia, esses cães foram postos em decúbito dorsal e tiveram suas cavidades abdominais abertas. O intestino delgado foi retirado, acondicionado em caixas de isopor com gelo e transportado ao Laboratório de Helminologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

Os intestinos foram abertos longitudinalmente, seguido de uma raspagem da mucosa. O material proveniente dessa raspagem foi transferido para um tamis de 25 µm, lavado com água corrente e transferido para um recipiente com fundo escuro. Os vermes

foram coletados, identificados em microscópio estereoscópico e lavados com solução salina 0,85%. As características morfológicas utilizadas para identificação dos vermes foram analisadas segundo Biocca (1951) para *A. braziliense*, e Burrows (1962) para *A. caninum*. Como muitas amostras de *A. caninum* utilizadas nesse trabalho foram provenientes de um estudo anterior (Miranda et al., 2008), no qual não foi necessária a realização de sexagem dos exemplares, somente as amostras do Piauí (32 machos e 48 fêmeas) e parte das amostras de Minas Gerais (37 machos e 38 fêmeas) foram identificadas segundo o sexo do helminto. Todas as amostras de *A. braziliense* foram sexadas, sendo 18 machos e 21 fêmeas do Piauí e 15 machos e 27 fêmeas de Minas Gerais. Os vermes foram armazenados, individualmente, em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e conservados a -20 °C.

A extração de DNA dos vermes adultos ocorreu segundo protocolo padronizado no Laboratório de Parasitologia Molecular do ICB/UFMG. Inicialmente, os tubos contendo os vermes foram submersos em nitrogênio líquido, seguido de maceração mecânica individual com auxílio de pistilo de vidro. Ao macerado, foram adicionados 400 µL de tampão de lise (50 mM de EDTA, 100 mM de Tris-HCl pH 7,4, 100 mM de NaCl e SDS 10%), seguido de digestão com 100 µg/mL de proteinase K (Promega, Estados Unidos), a 65 °C por 30 min. Posteriormente, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, com centrifugação a 12.000 xg, a 25 °C por 5 min. A fase superior foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e submetida à digestão de ácido ribonucleico (RNA) com 100 µg/mL de RNase A (Ludwig Biotec, Brasil), a 37 °C por 30 min. Foram adicionados mais 400 µL da solução de clorofórmio e álcool isoamílico seguido de centrifugação, conforme parâmetros mencionados anteriormente. A fase superior foi novamente transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, com adição de 400 µL de isopropanol para precipitação do DNA, a -20 °C. Após 16 h, o tubo foi centrifugado a 14.000 xg, a 4 °C por 30 min. O precipitado foi lavado com 400 µL de etanol 70% e centrifugado a 12.000 xg, a 4 °C por 10 min. Essa etapa de lavagem foi repetida e o DNA foi ressuspensão em 20 µL de água ultrapura. Antes do armazenamento a 4°C, a concentração do DNA foi determinada, em duplicata, por espectrofotometria através do aparelho Epoch (Biotek, Estados Unidos) A qualidade do DNA foi determinada com base na relação 260/280.

4.3. Amostragem e extração de DNA de *N. americanus*

Colaboradores de diferentes estados brasileiros realizaram coleta e análise coproparasitológica de humanos. As amostras positivas para *N. americanus* foram armazenadas em formaldeído 10% e encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia Molecular do ICB-UFMG. Os ovos passaram por um isolamento inicial através de processamento com éter segundo Ritchie (1948). A suspensão de fezes foi homogeneizada, filtrada em gaze dobrada e o volume de 2 mL foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL. Foram adicionados 5 mL de éter sulfúrico e a suspensão foi agitada vigorosamente. O material foi centrifugado por 1 min a 14.000 xg, com posterior descarte do sobrenadante. Foi realizada uma nova etapa de lavagem dos ovos, com adição de 500 µL de hipoclorito 1%. O material foi centrifugado a 14.000 xg por 1 min, o sobrenadante foi descartado novamente e o sedimento foi ressuspensão em 100 µL de água ultrapura.

Os ovos foram observados em microscópio óptico, pipetados individualmente em volume de 1 µL e transferidos para um tubo de microcentrífuga de 0,2 mL, contendo 10 µL de tampão descrito por Lake et al. (2009) e modificado por Diawara et al. (2013a). Esse tampão de lise foi preparado em alíquotas de 1 mL (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 2,5 mM MgCl₂, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween 20, 0,01% de gelatina, 100 µg de proteinase K, 10% β-mercaptoetanol) e armazenado a -20 °C até o momento do uso. Após adição do ovo ao tampão, o material foi incubado a 57 °C por 2 h, seguido de inativação da proteinase K, a 80 °C por 20 min. O DNA foi estocado a -20 °C até o uso. No total, foram analisados 552 ovos provenientes de 48 pacientes de seis estados brasileiros. Na Tabela 2 são mostrados os locais de coleta, bem como o número de pacientes e de ovos de *N. americanus* por estado utilizados nesse trabalho.

Tabela 2 – Locais de coleta, número de pacientes e de ovos de *N. americanus* utilizados para genotipagem de SNPs ligados à resistência.

Estado	Número de pacientes	Número mínimo e máximo de ovos analisados por paciente	Número de ovos
Bahia	6	11-21	101
Ceará	9	7-14	100
Maranhão	10	9-16	111
Minas Gerais	7	7-18	80
Piauí	10	5-12	100
Tocantins	6	7-12	60
Total	48	-	552

4.4. Análise de SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*

As técnicas moleculares utilizadas para análises dos SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus* utilizados nesse trabalho estão listadas no Quadro 3.

Quadro 3 – Técnicas moleculares utilizadas para análise dos SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*.

Códon Espécie	167	198	200
<i>A. caninum</i>	ARMS-PCR	Tetraprimer ARMS-PCR	*
<i>A. braziliense</i>	RFLP-PCR	Mutagênese sítio-dirigida seguida de RFLP-PCR	Mutagênese sítio-dirigida seguida de RFLP-PCR
<i>N. americanus</i>	RFLP-PCR	RFLP-PCR	RFLP-PCR

* O códon 200 de *A. caninum* foi analisado em um trabalho anterior (Furtado et al., 2014).

4.4.1. Desenho dos iniciadores

Os iniciadores utilizados nesse trabalho foram desenhados através do programa Oligo Explorer 1.4 (Gene link, Estados Unidos) com base na sequência de nucleotídeos do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), sob número de acesso DQ459314.1 para o gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*, e EF392851.1 para *N. americanus*. Para *A. braziliense*, como não existia a sequência do gene da β -tubulina isotipo 1 nos bancos de dados, os iniciadores utilizados foram os mesmos para *A.*

ceylanicum (ver item 4.8.). As sequências geradas de *A. braziliense* foram depositadas no Genbank sob número de acesso BankIt2083594.

Conforme a técnica utilizada, foram realizadas algumas substituições de bases nos iniciadores. No Quadro 4 são mostrados todos os iniciadores utilizados para *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*, suas respectivas temperaturas de anelamento e, quando se aplica, a alteração das bases.

Quadro 4 – Iniciadores utilizados para análise de mutações no gene da β -tubulina de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus* e suas respectivas temperaturas de anelamento. As posições em que foram feitas alterações encontram-se em negrito.

Espécie	Códon	Iniciador (5' – 3')	Alteração	Temperatura de anelamento (°C)
<i>A. caninum</i>	167	<i>Fa167Ac</i> : AAG AGG CGG AAG GAT GCG		58
		<i>Fs167Ac</i> : GAT AGG ATC ATG TCC TGG TT	C → G	58
		<i>Ra167Ac</i> : ATT CAT CAT GAG AAA TCG CCA		58
		<i>Rb167Ac</i> : CCT TCG CCT TTT CTT ACG G		58
		<i>Rr167Ac</i> : GGT GAG GGG ACA ACA CAG T	G → C	60
		<i>Rm167Ac</i> : GGA CAA CAG AGT ACG AGG A	A → T	58
	198	<i>Fa198Ac</i> : GAC GGG TTG GTT CTA GCC AT		60
		<i>Fb198Ac</i> : TGT AGT GAA AAA GCA GTC TCG		59
		<i>Fr198Ac</i> : CCA GTT GGT TGA GAA TAC AGT TGC	A → T	59
		<i>Fm198Ac</i> : GTT GAG AAT ACA GAT GCG ACC TTC	A → C	59
		<i>Ra198Ac</i> : AGC CGA AAG TGG AGC AAA TC		60
		<i>Rb198Ac</i> : AGG TAG TGA CAC CGG ACA TT		59
	<i>Rs198Ac</i> : CCT CGT TAT CAA TAC AGA AGC TCT	G → C	59	
	<i>A. braziliense</i>	167	<i>Fa167Aby</i> : TGA GCT CGT CGA TAA CGT CC	
<i>Fb167Aby</i> : CAG GTA TTT CGC AAC CGT GC				57
<i>Ra167Aby</i> : TGA GGT CAT CCC CAG TTT GAC				57
<i>Rb167Aby</i> : AGG AAC ACG ACC AGC GTT T				57
<i>Rm167Aby</i> : AAC AGA GTA CGA GGA CAT AAT C			A → T	57
198/ 200		<i>Fa198/200Aby</i> : TGT TCC TAA AAA GGG GTC GGG		57
		<i>Fb198/200Aby</i> : GCA GTC CAC GTT CCT GCT TA		57
		<i>Fsite198Aby</i> : CTG TGC ACC AAT TGG TCG AGA ACA CAG CTG	A → C	60
		<i>Fsite200Aby</i> : ACC AAT TGG TCG AGA ACA CAG ATG AGA CGT	G → C	60
		<i>Ra198/200Aby</i> : AAG CGA AGG CAG GTA GTG AC		57
		<i>Rb198/200Aby</i> : ACC GGA CAT TGT TAC AGA CAC T		56
		<i>Rm198Aby</i> : GAA GGT CGC ATC TGT GTT CTC	T → G	56
<i>Rm200Aby</i> : GAT ACA GTA GGT CTC ATC TGT	A → T	57		
<i>N. americanus</i>	167	<i>Fab167Na</i> : GTT CGC AAA GAA GCT GAA GG		60
		<i>Fm167Na</i> : CTC GTT TAC CGT TGT ACC CT	T → A	60
		<i>Ra167Na</i> : GAT ACG CGG GAT GCA TCT AT		60
		<i>Rb167Na</i> : CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATC AAT TTT GCT CTT ATT TCC TAG GA*		60
		<i>Rm167Na</i> : GAT ACG CGG GAT GCA TCT AT		60
	198/ 200	<i>Fa198/200Na</i> : TTT CCG ACA CTG TGG TTG AG		60
		<i>Fb198/200Na</i> : GTA AAA CGA CGG CCA GAA TGC TAC ACT CTC TGT TCA CCA GTT*		60
		<i>Fm198Na</i> : ACA GAT GCG ACC TTC TGT ATT	A → C	60
		<i>Fm200Na</i> : ACA GAT GAG ACC TAC TGT ATT	T → A	58
<i>Rab198/200Na</i> : GGG AAT GGA ACC ATG TTG AC		60		

* Iniciadores com cauda M13 utilizados para melhores resultados no sequenciamento.

4.4.2. Síntese de controles

Antes da padronização das técnicas para análise dos SNPs, foram construídos plasmídeos com mutação e sem mutação, para servir como controles das reações para genotipagem de cada códon. As PCRs para esse fim foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo 12,5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Estados Unidos), 0,5 µl de cada iniciador (com concentração final de 0,2 µM/iniciador), 9,5 µl de água ultrapura e 2 µl de DNA (~20 ng). As amplificações ocorreram em termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Alemanha) obedecendo ao seguinte programa: 95 °C por 5 min para desnaturação inicial da dupla fita de DNA, 30 ciclos a 95 °C por 30 s, temperatura de anelamento por 45 s a 57 °C para todos os códons de *A. braziliense*; 58 °C e 59 °C para os códons 167 e 198 de *A. caninum*, respectivamente; e 60 °C para todos os códons de *N. americanus*; seguido de 72 °C por 45 s e um passo final de extensão a 72 °C por 8 min. Nas reações, foram incluídos os controles da PCR e o “branco”, com a substituição do DNA por água, para avaliar a presença de possíveis contaminantes. Os controles foram usados nas segundas reações de genotipagem de todos os códons avaliados nesse trabalho, tanto separadamente, para mimetizar os vermes homozigotos, quanto em conjunto, para mimetizar os vermes heterozigotos.

Cada plasmídeo sem mutação foi identificado de acordo com a seguinte nomenclatura: NXE, onde “N” corresponde a não mutado, “X” é o número do códon e “E” é a sigla adotada para o nome da espécie (Ac para *A. caninum*, Aby para *A. braziliense* e Na para *N. americanus*). A sigla para *A. braziliense* (Aby) apresenta uma letra “y” porque esse mesmo plasmídeo foi usado para *A. ceylanicum* (ver item 4.8.). Por estarem em posições próximas no genoma, foi possível construir apenas um único plasmídeo sem mutação para os códons 198 e 200 de cada espécie. Para nomeação dos plasmídeos com mutação, foi usada a mesma lógica, com substituição do “N” (de não mutado) por “M” (de mutado).

4.4.2.1. Síntese dos controles sem mutação

Para síntese dos controle dos alelos sem mutação de todos os códons avaliados nesse trabalho, para cada espécie, foi realizada uma primeira PCR, utilizando DNA genômico do respectivo nematódeo. O volume de 2 µl do produto da primeira reação foi utilizado como molde de uma segunda reação, com os iniciadores e amplicons citados no

Quadro 5, seguido de sequenciamento para confirmação da ausência da mutação. Esses fragmentos foram clonados com kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Estados Unidos), os produtos da ligação foram transformados em células da linhagem XL1-blue (Phonutria, Brasil) e recuperados por minipreparação com Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Estados Unidos), conforme item 4.2.7. Os nomes adotados para cada plasmídeo também se encontram no Quadro 5. Na Figura 5 são apresentados esquemas para síntese dos controles sem mutação para as espécies *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*.

Quadro 5 – Combinações de iniciadores e respectivos tamanhos dos amplicons utilizados para síntese dos controles sem mutação de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*.

Espécie	Códon	Iniciadores da Reação I	Amplicon (pb) da Reação I	Iniciadores da Reação II	Amplicon (pb) da Reação II	Nome do plasmídeo
<i>A. caninum</i>	167	<i>Fa167Ac + Ra167Ac</i>	477	<i>Fa167Ac + Rb167Ac</i>	315	N167Ac
	198	<i>Fa198Ac + Ra198Ac</i>	588	<i>Fb198Ac + Rb198Ac</i>	331	N198Ac
<i>A. braziliense</i>	167	<i>Fa167Aby + Ra167Aby</i>	415	<i>Fb167Aby + Rb167Aby</i>	306	N167Aby
	198/200	<i>Fa198/200Aby + Ra198/200Aby</i>	424	<i>Fb198/200Aby + Rb198/200Aby</i>	308	N198/200Aby
<i>N. americanus</i>	167	<i>Fab167Na + Ra167Na</i>	360	<i>Fab167Na + Rb167Na</i>	291	N167Na
	198/200	<i>Fa198/200Na + Rab198/200Na</i>	325	<i>Fb198/200Na + Rab198/200Na</i>	315	N198/200Na

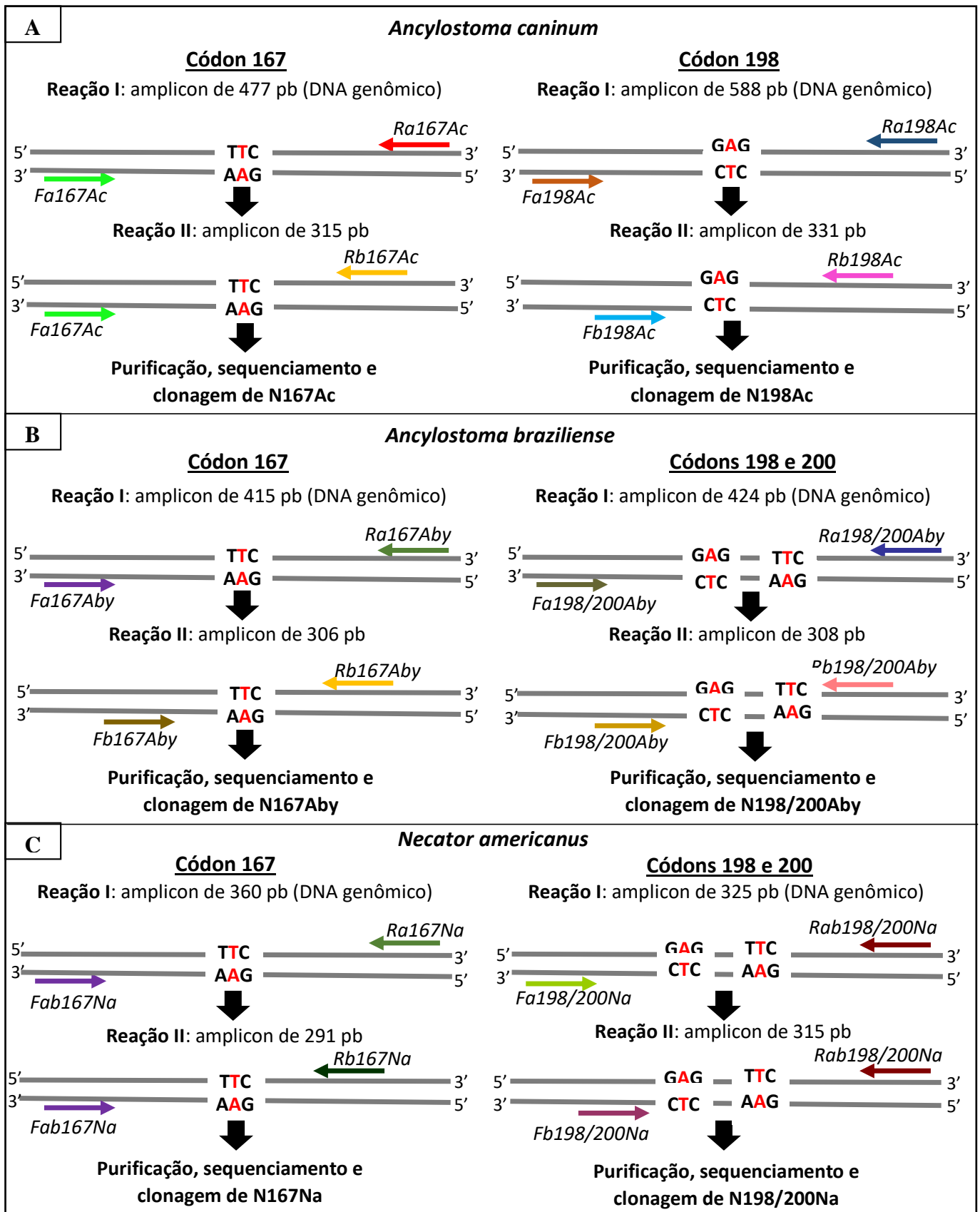


Figura 5 – Esquema da síntese dos controles sem mutação para análise de polimorfismos no gene da β -tubulina de *A. caninum* (B), *A. braziliense* (B) e *N. americanus* (C). A ponta triangular de cada seta representa a extremidade 3' do iniciador.

4.4.2.2. Síntese dos controles com mutação

No caso das sínteses dos controles positivos para mutação, para os códons de todas as espécies foi realizada uma mutagênese sítio-dirigida através da técnica de Megaprimer-PCR. As combinações de iniciadores utilizados em cada etapa estão citadas no Quadro 6, bem como seus respectivos amplicons. Para a construção de cada controle mutado, foi realizada uma primeira PCR utilizando o plasmídeo correspondente sem mutação como molde, de maneira que um dos iniciadores dessa reação (sublinhados no Quadro 6) apresentava uma alteração proposital para mimetizar o alelo mutado. O produto dessa reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) (Midsci, Estados Unidos), com tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos). O fragmento foi excisado do gel com uma lâmina de bisturi, purificado com o kit GFX® PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Reino Unido) e dosado através de espectrofotômetro Epoch (Biotek, Estados Unidos).

Cerca de 20 ng do produto da primeira reação foi usado como um megaprimer de uma segunda PCR, juntamente com um novo iniciador (citados no Quadro 6). O produto dessa reação foi purificado, sequenciado, submetido à clonagem e recuperado, nas mesmas condições dos controles sem mutação. No Quadro 6 também é mostrada a nomenclatura adotada para os plasmídeos mutados. Nas Figuras 6, 7 e 8 estão apresentadas, de forma esquemática, as sínteses dos controles mutados para as espécies *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*, respectivamente.

Quadro 6 – Combinações de iniciadores e respectivos tamanhos dos amplicons utilizados para síntese dos controles com mutação de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*. Os iniciadores sublinhados apresentam uma alteração proposital para mimetizar o gene mutado no produto amplificado.

Espécie	Códon	Iniciadores da Reação I	Amplicon (pb) da Reação I	Iniciador da Reação II	Amplicon (pb) da Reação II	Nome do plasmídeo
<i>A. caninum</i>	167	<i>Fa167Ac</i> + <u><i>Rm167Ac</i></u>	205	<i>Rb167Ac</i>	315	M167Ac
	198	<u><i>Fm198Ac</i></u> + <i>Rb198Ac</i>	210	<i>Fb198Ac</i>	331	M198Ac
<i>A. braziliense</i>	167	<i>Fb167Aby</i> + <u><i>Rm167Aby</i></u>	176	<i>Rb167Aby</i>	306	M167Aby
	198	<i>Fb198/200Aby</i> + <u><i>Rm198Aby</i></u>	132	<i>Rb198/200Aby</i>	308	M198Aby
	200	<i>Fb198/200Aby</i> + <u><i>Rm200Aby</i></u>	138	<i>Rb198/200Aby</i>	308	M200Aby
<i>N. americanus</i>	167	<u><i>Fm167Na</i></u> + <i>Ra167Na</i>	156	<i>Fab167Na</i>	360	M167Na
	198	<u><i>Fm198Na</i></u> + <i>Rab198/200Na</i>	263	<i>Fa198/200Na</i>	325	M198Na
	200	<u><i>Fm200Na</i></u> + <i>Rab198/200Na</i>	263	<i>Fa198/200Na</i>	325	M200Na

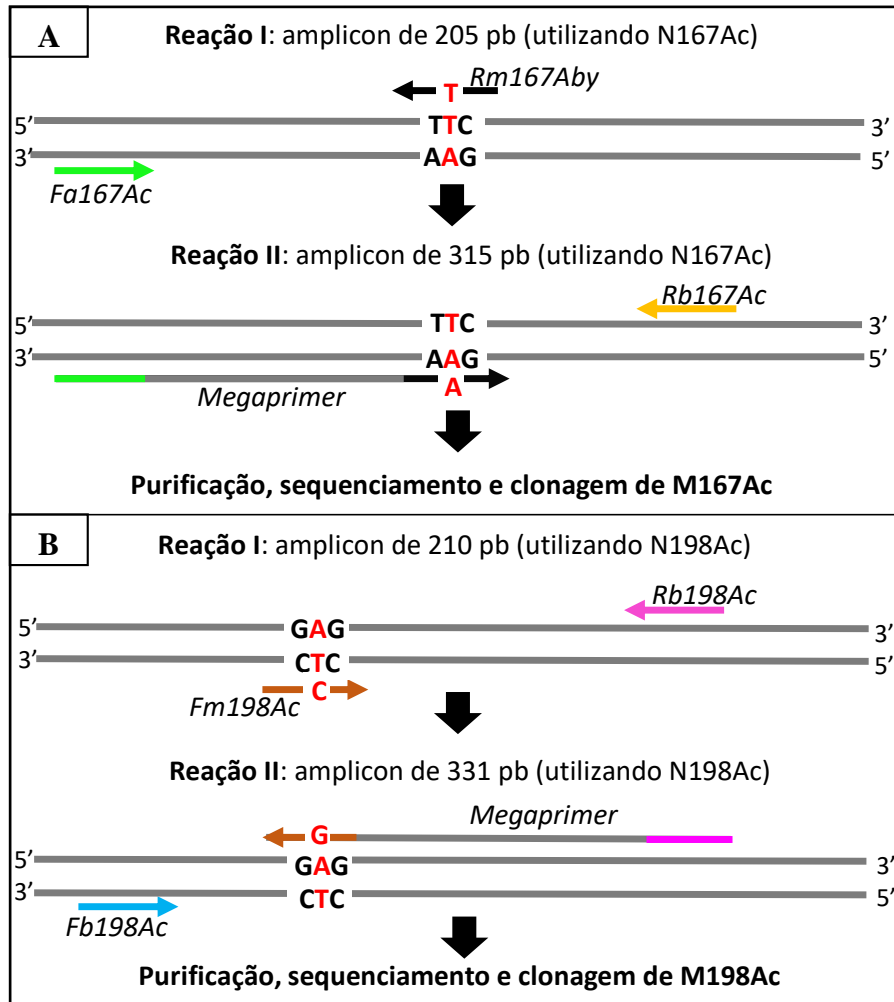


Figura 6 – Esquema da síntese dos controles com mutação para análise de polimorfismos nos códons 167 (A) e 198 (B) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. A ponta triangular de cada seta representa a extremidade 3' do iniciador.

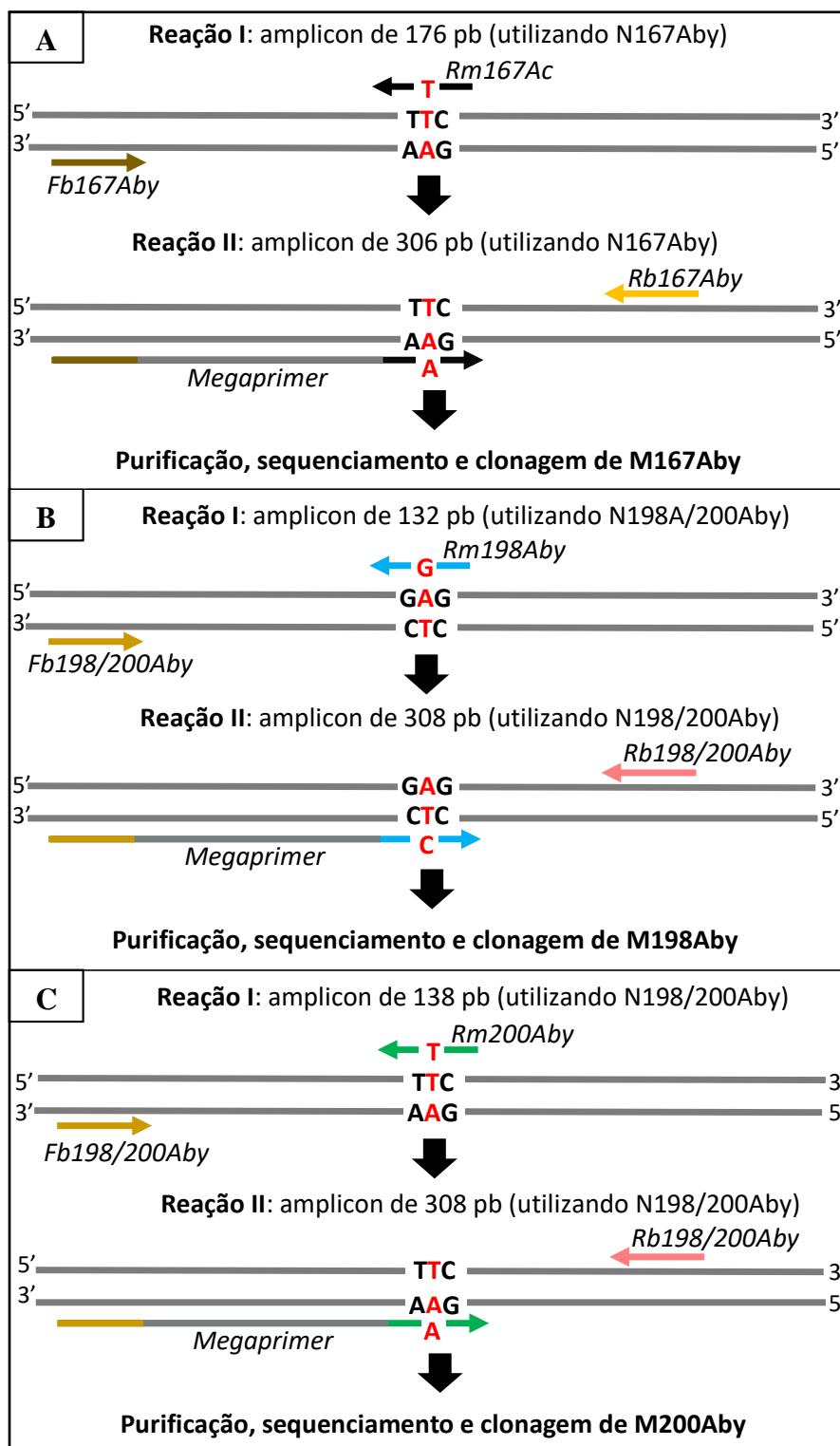


Figura 7 – Esquema da síntese dos controles com mutação para análise de polimorfismos nos códons 167 (A), 198 (B) e 200 (C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*. A ponta triangular de cada seta representa a extremidade 3' do iniciador.

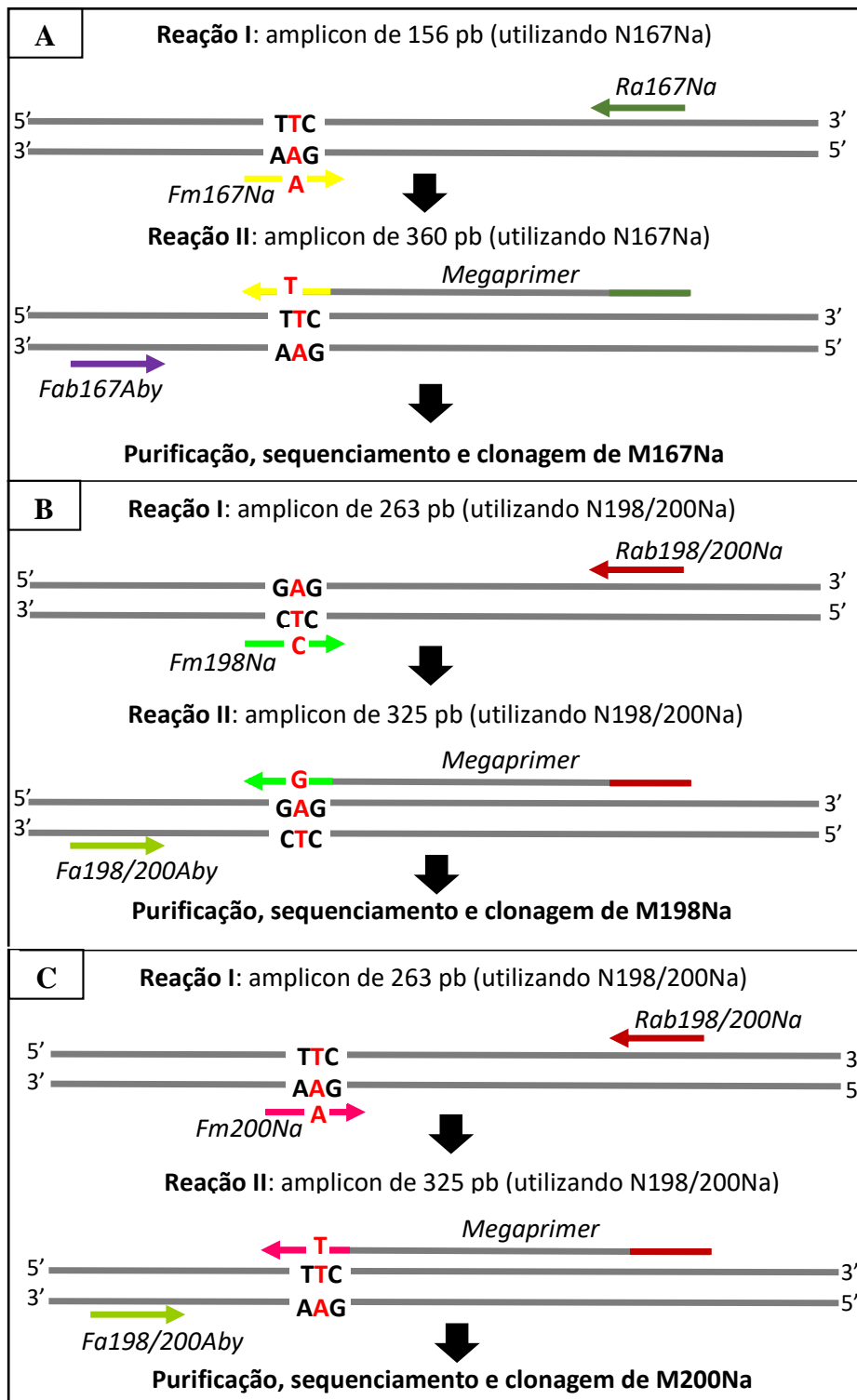


Figura 8 – Esquema da síntese dos controles com mutação para análise de polimorfismos nos códons 167 (A), 198 (B) e 200 (C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*. A ponta triangular de cada seta representa a extremidade 3' do iniciador.

4.4.3. *A. caninum*

4.4.3.1. Códon 167

Para análise do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*, foi realizada a técnica de ARMS-PCR. As PCRs foram realizadas em volume final de 10 μ l, contendo 5 μ l de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Estados Unidos), 0,2 μ l de cada iniciador (com concentração final de 0,2 μ M/iniciador), 3,6 μ l de água ultrapura e 1 μ l de DNA (~20 ng), seguindo a mesma ciclagem descrita para a síntese de controles.

Foi realizada uma primeira PCR com os iniciadores *Fa167Ac* + *Ra167Ac* (477 pb), seguida de duas PCRs individuais: uma nested-PCR utilizando o par de iniciador *Fs167Ac* + *Rb167Ac* (141 pb) para detectar o fragmento sem mutação, e uma semi nested-PCR com o par *Fa167Ac* + *Rr167Ac* (212 pb) pra detectar o fragmento com mutação. Os produtos dessas reações foram submetidos à eletroforese em agarose 1% (m/v) com tampão TAE 0,5x e corados com GelRed® (Biotium, Estados Unidos). Dessa forma, caso a amostra fosse homozigota sem mutação, ocorreria amplificação apenas da reação com a combinação *Fs167Ac* + *Rb167Ac* (141 pb), caso fosse homozigota com mutação, ocorreria amplificação apenas da reação com a combinação *Fa167Ac* + *Rr167Ac* (212 pb) e caso fosse heterozigota, ocorreria amplificação nas duas reações.

O iniciador *Fs167Ac* foi desenhado para se anelar somente no DNA sem mutação, enquanto o iniciador *Rr167Ac* foi desenhado para se anelar somente no DNA com mutação. Conforme descrito por Furtado e Rabelo (2015), foi adicionada uma segunda incompatibilidade na posição 4 da extremidade 3' nos iniciadores *Fs167Ac* e *Rr167Ac*, para garantir um anelamento específico dos mesmos. Assim, caso o helminto analisado apresentasse mutação no códon 167, somente a incompatibilidade de pareamento na última base do iniciador *Fs167Ac* (desenhado para se anelar na ausência da mutação) poderia não ser suficiente para impedir o seu anelamento na presença da mutação, mas duas incompatibilidades garantiam sua boa especificidade. Não obstante, caso o helminto não apresentasse a mutação, a incompatibilidade na posição 4 desse mesmo iniciador não impediria que o mesmo se anelasse na ausência da mutação. O contrário também vale para o iniciador *Rr167Ac*. Na Figura 9 é mostrado um esquema evidenciando a segunda incompatibilidade adicionada aos iniciadores do códon 167 de *A. caninum* e suas consequentes amplificações.



Figura 9 – Esquema adotado para adição da segunda incompatibilidade de iniciadores na análise do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. O iniciador *Fs167Ac* foi desenhado para se anelar somente na ausência da mutação, enquanto que o iniciador *Rr167Ac* foi desenhado para se anelar na presença da mesma. Os locais de anelamento dos iniciadores *Fs167Ac*, *Rb167Ay*, *Fa167Ac* e *Rr167Ac* estão marcados, respectivamente, com as cores azul claro, amarelo, preto e azul escuro; o códon 167 encontra-se sublinhado, com a base de interesse em vermelho. Nos iniciadores, as bases marcadas em verde correspondem ao local da segunda incompatibilidade e as caixas em vermelho representam as incompatibilidades encontradas em cada situação.

4.4.3.2. Códon 198

Para análise do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*, foi adotada a técnica de Tetraprimer ARMS-PCR. Após uma primeira PCR com os iniciadores *Fa198Ac* + *Ra198Ac* (588 pb), foi realizada a Tetraprimer ARMS-PCR, com os iniciadores *Fb198Ac* + *Rb198Ac* + *Rs198Ac* + *Fr198Ac*. Os volumes e concentrações utilizados na segunda reação foram os mesmos citados para o códon 167, entretanto, uma vez que os iniciadores *Rs198Ac* e *Fr198Ac* apresentavam uma segunda incompatibilidade (explicada a seguir), foi utilizado 0,9 μ l de cada iniciador (com concentração final de 0,9 μ M/iniciador). Como houve a adição de dois novos iniciadores na mesma reação, esse volume foi descontado da água, totalizando 1,8 μ l de água ultrapura. O programa utilizado foi o mesmo descrito para a síntese dos controles. O produto da Tetraprimer ARMS-PCR

foi submetido à eletroforese em agarose 2% (m/v) com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos).

Ao utilizar os quatro iniciadores numa mesma reação, a combinação *Fb198Ac* + *Rb198Ac* resultaria na formação de um amplicon, independente de haver mutação ou não, denominado de fragmento controle (331 pb) (ver esquema hipotético da Figura 4). O iniciador *Rs198Ac* foi desenhado para se anelar somente no DNA sem mutação, combinando com *Fb198Ac* (161 pb), enquanto o iniciador *Fr198Ac* foi desenhado para se anelar somente no DNA com mutação, combinando com *Fb198Ac* (217 pb). Assim como explicado para análise do códon 167, foi adicionada uma segunda incompatibilidade na posição 4 da extremidade 3' nos iniciadores *Rs198Ac* e *Fr198Ac*, para garantir um anelamento específico. Portanto, para cada amostra analisada existia a possibilidade de três perfis de resultados: homocigoto sem mutação ($Fb198Ac + Rb198Ac = 331\text{pb}$; $Fb198Ac + Rs198Ac = 161\text{pb}$), homocigoto com mutação ($Fb198Ac + Rb198Ac = 331\text{pb}$; $Fr198Ac + Rb198Ac = 217\text{pb}$) e heterocigoto ($Fb198Ac + Rb198Ac = 331\text{pb}$; $Fb198Ac + Rs198Ac = 161\text{pb}$; $Fr198Ac + Rb198Ac = 217\text{pb}$). Na Figura 10 é apresentado um esquema para mostrar a segunda incompatibilidade adicionada aos iniciadores do códon 198.



Figura 10 – Esquema adotado para adição da segunda incompatibilidade de iniciadores na análise do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. O iniciador *Fr198Ac* foi desenhado para se anelar somente na presença da mutação, enquanto que o iniciador *Rs198Ac* foi desenhado para se anelar na ausência da mesma. Os locais de anelamento dos iniciadores *Fb198Ac*, *Rs198Ac*, *Fr198Ac* e *Rb198Ac* estão marcados, respectivamente, com as cores amarelo claro, verde, preto e amarelo escuro; o códon 198 encontra-se sublinhado, com a base de interesse em vermelho. Nos iniciadores, as bases marcadas em azul claro correspondem ao local da segunda incompatibilidade e as caixas em vermelho representam as incompatibilidades encontradas em cada situação.

4.4.4. *A. braziliense*

4.4.4.1. Códon 167

Através da ferramenta online NEBcutter V2.0 (New England Biolabs, Estados Unidos) (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) foi observado que a mutação no códon 167 de *A. braziliense* cria um sítio para a enzima de restrição *RsaI* (5' GT[^]AC 3' / 3' CA[^]TG 5'), a qual também reconhece outros dois sítios na sequência amplificada, independentes do códon em questão. Assim, para análise desse códon, foi adotada a técnica de RFLP-PCR. Após uma primeira PCR com o par *Fa167Aby* + *Ra167Aby* (415 pb), foi realizada uma nested-PCR com *Fb167Aby* + *Rb167Aby* (306 pb). As concentrações e volumes utilizados nessas PCRs foram os mesmos descritos para o códon 167 de *A. caninum* e o programa foi o mesmo descrito para a síntese de controles. O volume de 2 μ l do produto da segunda reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) (Midsci,

Estados Unidos), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos).

Após confirmação do tamanho do amplicon no gel, o volume de 5 µl do produto da segunda reação foi digerido com 5 unidades (0,5 µl) de enzima *RsaI* (Promega, Estados Unidos), com 1 µl de albumina do soro bovino (BSA) 10x, 1 µl de tampão 10x e 2,5 µl de água ultrapura, totalizando volume final de 10 µl. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 3 h, os produtos de digestão foram submetidos à corrida eletroforética em acrilamida 15% (m/v) com tampão TBE (Tris/ácido bórico/EDTA) 1x e corados com GelRed® (Biotium, Estados Unidos). No Quadro 7 são mostrados os tamanhos de fragmentos após digestão dos três possíveis genótipos. Na Figura 11 é representada, em forma de esquema, a digestão empregada nesse códon.

Quadro 7 – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 167 do gene da β-tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*.

Genótipo	Tamanho dos fragmentos (pb)
Homozigoto mutado (TAC/TAC)	138 + 95 + 49 + 24
Homozigoto sem mutação (TTC/TTC)	162 + 95 + 49
Heterozigoto (TTC/TAC)	162 + 138 + 95 + 49 + 24

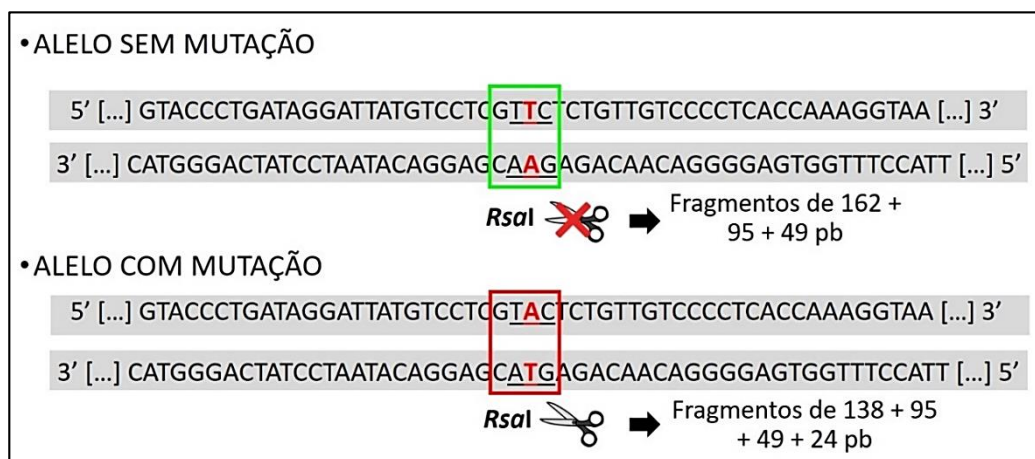


Figura 11 – Esquema da digestão empregada para análise do códon 167 do gene da β-tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*. A mutação cria um sítio para a enzima *RsaI*. Os fragmentos para ambos os alelos apresentam outros dois sítios para essa mesma enzima (não representados no esquema), mas que independem da mutação pesquisada. O códon 167 encontra-se sublinhado, com a base de interesse destacada em vermelho. A caixa vermelha representa o sítio da enzima. A caixa verde representa o local no qual poderia ser criado um sítio caso a sequência apresentasse mutação.

4.4.4.2. Códon 198 e 200

Usando a ferramenta Nebcutter V2.0 (New England Biolabs, Estados Unidos), foi visto que os SNPs nos códon 198 e 200 de *A. braziliense* não criam ou desfazem sítio para nenhuma enzima de restrição. Portanto, para esses ensaios foram realizadas uma etapa de mutagênese sítio-dirigida seguida de RFLP-PCR. Os experimentos constaram de uma primeira PCR com *Fa198/200Aby* + *Ra198/200Aby* (424 pb) para ambos os códon, com posterior nested-PCR usando *Fsite198Aby* + *Rb198/200Aby* (214 pb) para o códon 198, e outra nested-PCR com o par *Fsite200Aby* + *Rb198/200Aby* (208 bp) para o códon 200. Os volumes e as concentrações utilizadas nessas PCRs foram os mesmos descritos para o códon 167 de *A. caninum* e o programa foi o mesmo descrito para a síntese de controles. O volume de 2 µl do produto da segunda reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) (Midsci, Estados Unidos), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos), para confirmação do tamanho do amplicon.

Para o códon 198, o iniciador da segunda reação *Fsite198Aby* foi desenhado com uma alteração proposital na posição 3 da extremidade 3'. Essa alteração introduz uma mutação no códon 197 (na segunda base da trinca). Assim, a ausência da mutação no códon 198, somada com a alteração inserida pelo iniciador, cria um sítio para corte com a enzima *DdeI* (5' C[^]TNAG 3' / 3' GANT[^]C 5'). As amostras mutadas no códon 198, embora apresentem a alteração inserida propositalmente, não possuem sítio para a enzima em questão. Assim, o volume de 5 µl do produto da segunda reação foi digerido com 2 unidades (0,2 µl) de enzima *DdeI* (Promega, Estados Unidos), com 1 µl de albumina do soro bovino (BSA) 10x, 1 µl de tampão 10x e 2,8 µl de água ultrapura, totalizando volume final de 10 µl.

Para o códon 200, o iniciador *Fsite200Aby* foi desenhado com alteração proposital na posição 2 da extremidade 3', introduzindo uma mutação no códon 199 (na terceira base da trinca), obedecendo o mesmo princípio explicado para o *Fsite198Aby* do códon 198. O DNA mutado naturalmente no códon 200 aliado com a mudança adicionada pelo iniciador *Fsite200Aby* cria um sítio para a enzima *RsaI* (5' GT[^]AC 3' / 3' CA[^]TG 5'), enquanto que mesmo com a alteração adicionada pelo iniciador, o DNA sem mutação não apresenta sítio para corte com essa enzima. Aditivamente, o produto da segunda PCR já apresenta um sítio para *RsaI*, que independe da alteração no códon 200. A digestão para esse códon seguiu as mesmas concentrações e volumes utilizados para o códon 167 de *A.*

braziliense. Para os códon 198 e 200, o tempo de incubação e a corrida eletroforética também ocorreram conforme explicado para o códon 167 de *A. braziliense*.

No Quadro 8 e na Figura 12 são mostrados os tamanhos de fragmentos após digestão dos três possíveis genótipos para os códon 198 e um esquema da digestão desse códon para *A. braziliense*, respectivamente. No Quadro 9 e na Figura 13 são mostradas essas informações para o códon 200.

Quadro 8 – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*.

Genótipo	Tamanho dos fragmentos (pb)
Homozigoto mutado (GCG/GCG)	214
Homozigoto sem mutação (GAG/GAG)	186 + 28
Heterozigoto (GAG/GCG)	214 + 186 + 28

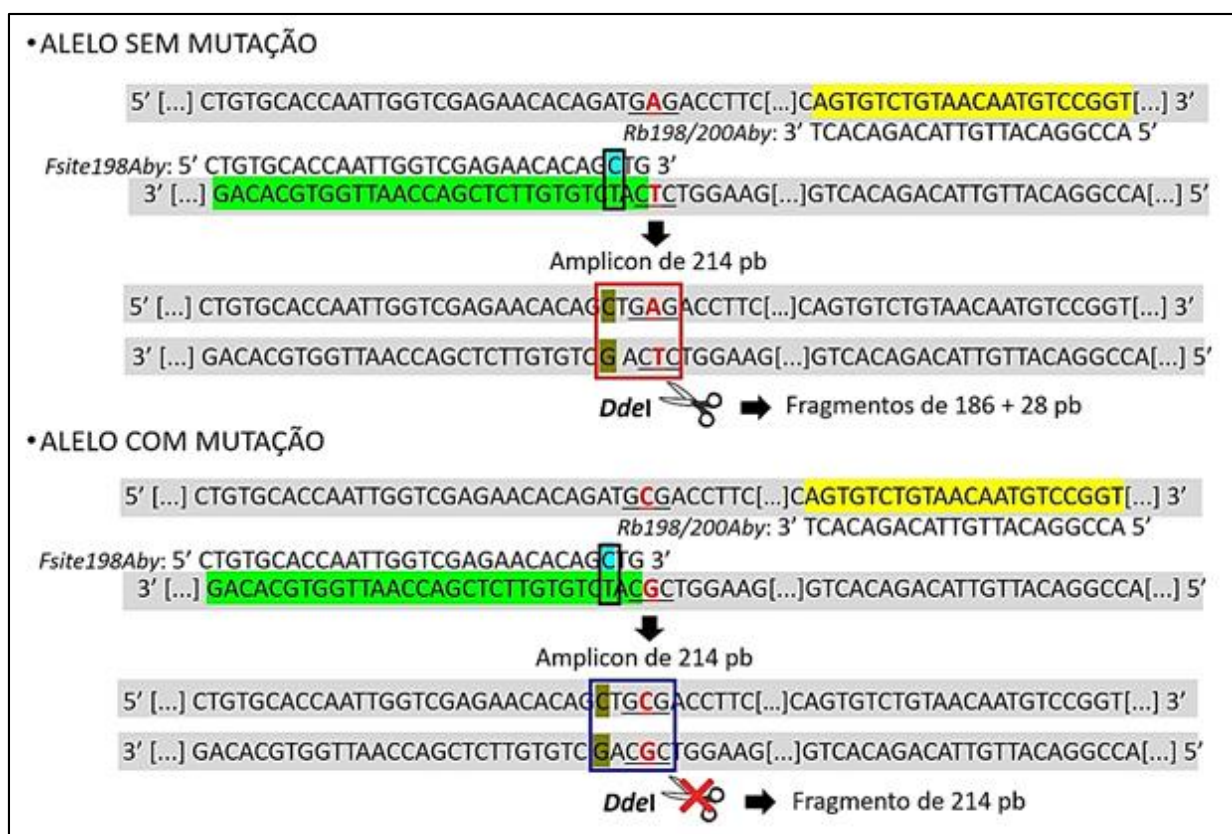


Figura 12 – Esquema representativo da análise do códon 198 de *A. braziliense*. O iniciador *Fsite198Aby* foi desenhado com uma alteração (marcado em azul claro e em caixa preta) para adicionar uma mutação no DNA amplificado, independente de haver mutação no códon 198. A ausência da mutação no códon 198 somada com a alteração adicionada cria um sítio para *DdeI* (marcado em caixa vermelha). Caso o alelo seja mutado, mesmo com a alteração do iniciador, o sítio para a *DdeI* não é criado. A caixa em azul marca o local que seria o sítio para a enzima caso não haja mutação. O códon 198 encontra-se sublinhado, com a base de interesse em vermelho. A base em amarelo escuro no DNA amplificado representa a alteração adicionada pelo iniciador. Os locais de anelamento dos iniciadores *Fsite198Aby* e *Rb198/200Aby* estão marcados, respectivamente, com as cores verde e amarelo claro.

Quadro 9 – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*.

Genótipo	Tamanho dos fragmentos (pb)
Homozigoto mutado (TAC/TAC)	137 + 41 + 30
Homozigoto sem mutação (TTC/TTC)	137 + 71
Heterozigoto (TTC/TAC)	137 + 71 + 41 + 30

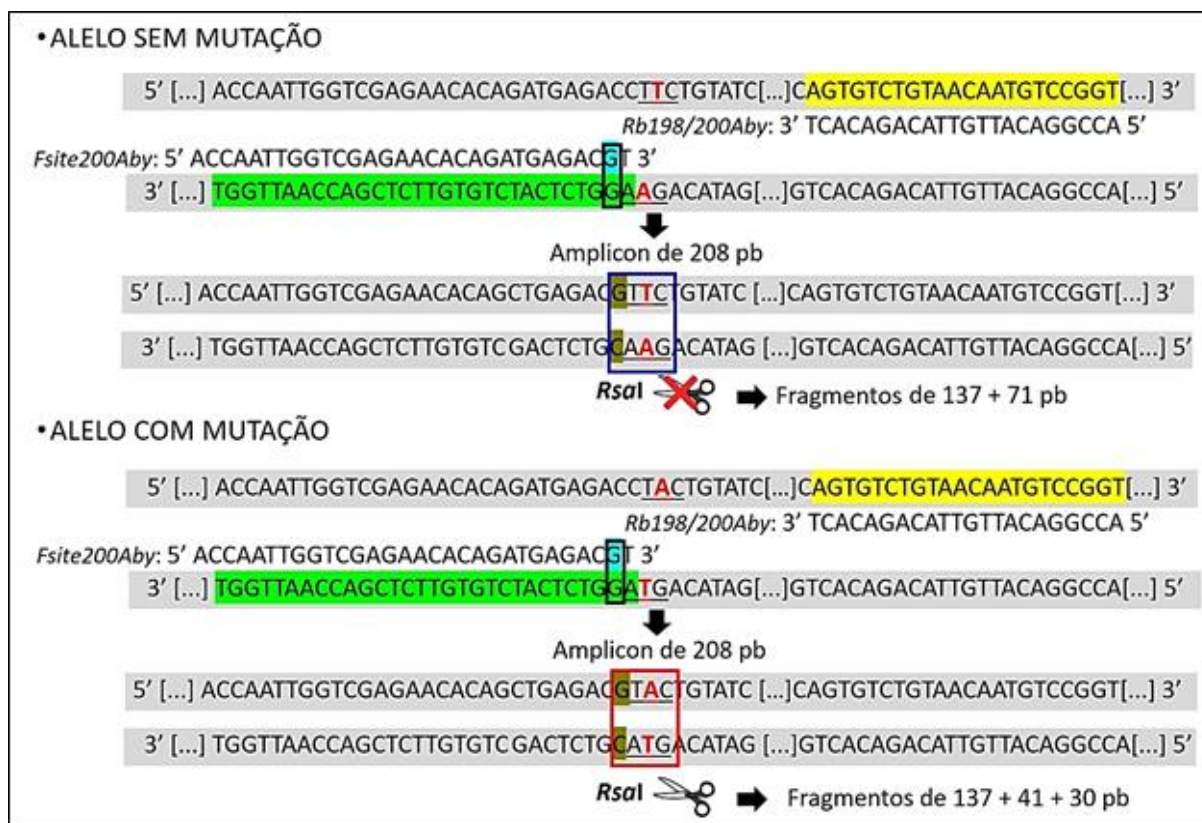


Figura 13 – Esquema representativo da análise do códon 200 de *A. braziliense*. O iniciador *Fsite200Aby* foi desenhado com uma alteração (marcado em azul claro e caixa preta) para adicionar uma mutação no DNA amplificado, independente de haver mutação no códon 200. A presença da mutação no códon 200 somada com a alteração adicionada cria um sítio para *RsaI* (marcado em caixa vermelha). Caso o alelo não tenha mutação, mesmo com a alteração do iniciador, o sítio para a *RsaI* não é criado. A caixa em azul marca o local do sítio para a enzima caso exista mutação. O códon 200 encontra-se sublinhado, com a base de interesse em vermelho. A base em amarelo escuro no DNA amplificado representa a alteração adicionada pelo iniciador. Os locais de anelamento dos iniciadores *Fsite200Aby* e *Rb198/200Aby* estão marcados, respectivamente, com as cores verde e amarelo claro.

4.4.5. *N. americanus*

4.4.5.1. Códon 167, 198 e 200

Para análise dos SNPs de *N. americanus*, foi observado através do NEBcutter V2.0 (New England Biolabs, Estados Unidos) que todas essas mutações criam ou desfazem sítio para alguma enzima de restrição, portanto, não houve necessidade de uma etapa anterior de mutagênese sítio-dirigida. A mutação no códon 167 cria o sítio de reconhecimento para a enzima *Hpy8I* (5' GTN[^]NAC 3' / 3' CAN[^]NTG 5'). Assim, somente DNA com mutação apresenta o local de clivagem da enzima. Para os códon 198 e 200, a mutação desfaz um sítio para as enzimas *Alw26I* (5' GTCTCN[^] 3' / 3' CAGAGNNNN[^] 5') e *HpyAV* (5' CCTTCNNNN[^] 3' / 3' GGAAGNNNN[^] 3'), respectivamente, ou seja, somente o DNA sem mutação é clivado por essas enzimas.

Inicialmente, foi realizada uma PCR multiplex, utilizando dois pares de iniciadores: um com *Fab167Na* + *Rb167Na* (360 pb) para o códon 167, e outro com *Fa198/200Na* + *Rab198/200Na* (325pb) para os códon 198 e 200. Essa PCR multiplex foi realizada em volume final de 10 µl, contendo 5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Estados Unidos), 0,2 µl de cada iniciador (com concentração final de 0,2 µM/iniciador) e 4,2 µl de DNA de ovo único. O programa da PCR foi o mesmo descrito para a síntese de controles.

Para o códon 167, 1 µl do produto da PCR multiplex foi transferido para uma semi nested-PCR com os iniciadores *Fab167Na* + *Ra167Na* (291 pb). Para os códon 198 e 200, a semi nested-PCR foi realizada com os iniciadores *Fb198/200Na* + *Rab198/200Na* (315 pb). As concentrações e volumes utilizados nessas PCRs foram os mesmos descritos para o códon 167 de *A. caninum* e o programa foi o mesmo descrito para a síntese dos controles. O volume de 2 µl do produto da segunda reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) (Midsci, Estados Unidos), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos).

Confirmada a amplificação, 1 µl do produto da segunda reação foi digerido com 1 unidade de enzima (0,1 µl de *Hpy8I* para o códon 167, 0,05 µl de *Alw26I* para o códon 198 e 0,5 µl de *HpyAV* para o códon 200, ambas da marca Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). As reações também constaram de 1 µl de tampão 10x e água ultrapura com quantidade suficiente para volume final de 10 µl. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 1h, os produtos de digestão foram submetidos à corrida eletroforética em

acrilamida 6% (m/v) com tampão TBE 1x e corados com GelRed® (Biotium, Estados Unidos).

Nos Quadros 10, 11 e 12 são mostrados os tamanhos de fragmentos após digestão dos possíveis genótipos para os códons 167, 198 e 200, respectivamente. Nas Figuras 14, 15 e 16 são apresentados esquemas da digestão dos códons 167, 198 e 200 de *N. americanus*, respectivamente.

Quadro 10 – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*.

Genótipo	Tamanho dos fragmentos (pb)
Homozigoto mutado (TAC/TAC)	210 + 81
Homozigoto sem mutação (TTC/TTC)	291
Heterozigoto (TTC/TAC)	291 + 210 + 81

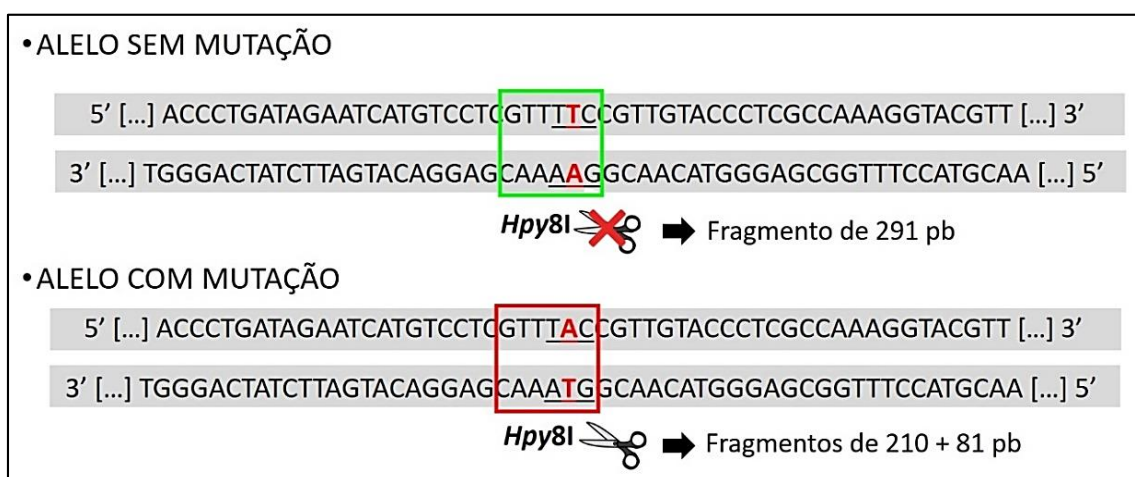


Figura 14 – Esquema da digestão empregada para análise do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*. A mutação cria um sítio para a enzima *Hpy8I*. O códon 167 encontra-se sublinhado, com a base de interesse destacada em vermelho. A caixa vermelha representa o sítio da enzima. A caixa verde representa o local que também teria um sítio para a enzima caso a sequência apresentasse mutação.

Quadro 11 – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*.

Genótipo	Tamanho dos fragmentos (pb)
Homozigoto mutado (GCG/GCG)	315
Homozigoto sem mutação (GAG/GAG)	262 + 53
Heterozigoto (GAG/GCG)	315 + 262 + 53

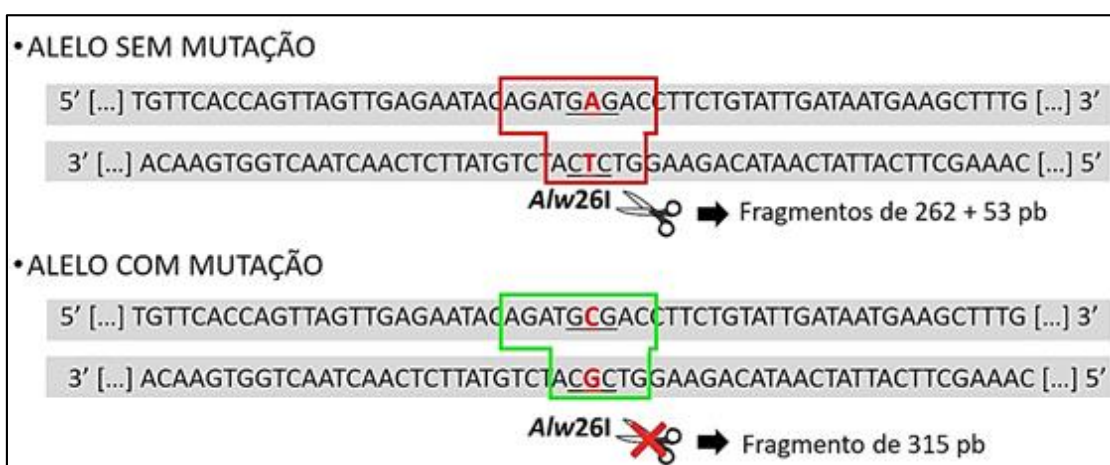


Figura 15 – Esquema da digestão empregada para análise do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*. A mutação desfaz um sítio para a enzima *Alw26I*. O códon 198 encontra-se sublinhado, com a base de interesse destacada em vermelho. A caixa vermelha representa o sítio da enzima. A caixa verde representa o local que também teria um sítio para a enzima caso a sequência não apresentasse mutação.

Quadro 12 – Tamanhos dos fragmentos de DNA esperados para os três possíveis genótipos do códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*.

Genótipo	Tamanho dos fragmentos (pb)
Homozigoto mutado (TAC/TAC)	315
Homozigoto sem mutação (TTC/TTC)	242 + 73
Heterozigoto (TTC/TAC)	315 + 242 + 73

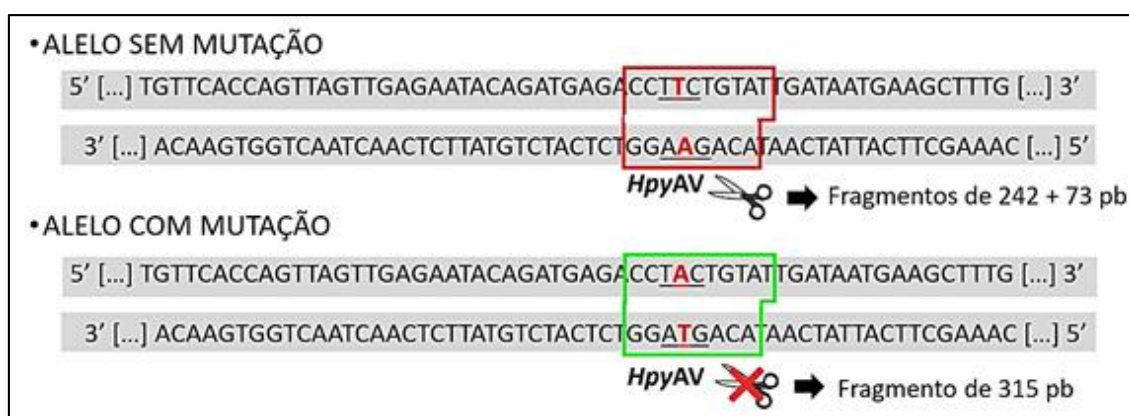


Figura 16 – Esquema da digestão empregada para análise do códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*. A mutação desfaz um sítio para a enzima *HpyAV*. O códon 200 encontra-se sublinhado, com a base de interesse destacada em vermelho. A caixa vermelha representa o sítio da enzima. A caixa verde representa o local que também teria um sítio para a enzima caso a sequência não apresentasse mutação.

4.5. Seleção da cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol

Para a seleção da cepa de *A. ceylanicum* resistente ao benzimidazol, foi utilizado o modelo experimental no qual o nematódeo é mantido em hamsters (*Mesocricetus auratus*) fêmeas, com idade entre quatro e seis semanas, criados em biotério com ambiente controlado. A cepa resistente foi isolada através de passagens seriadas de infecção seguidas de tratamento, como descrito a seguir.

Os hamsters foram divididos em três grupos experimentais contendo sete animais em cada grupo. Cada passagem do experimento teve um grupo controle infectado e não tratado, e mais dois grupos infectados e tratados com o fármaco. Todos os animais foram infectados com 100 L3 de *A. ceylanicum* no dia zero do experimento. O grupo controle recebeu, a cada tratamento, apenas água destilada e os outros grupos foram tratados, no 21º DPI (dia pós-infecção), com diferentes dosagens de suspensão oral de albendazol

(Aché, Brasil). No 30º DPI de cada passagem do experimento, os animais foram eutanasiados para recuperação de vermes adultos.

Em estudo piloto, foi verificado que a dose de 0,2 mg de albendazol por animal eliminou 100% da infecção. Assim, as dosagens de albendazol utilizadas durante a pressão de seleção foram inferiores a 0,2 mg, de modo que em cada passagem foram utilizados três grupos: um grupo controle, que não recebeu tratamento, e mais dois grupos, que foram tratados com doses crescentes, gradativamente, a partir da dosagem do tratamento dos animais de origem, sucessivamente. O grupo tratado que resistiu ao tratamento foi passado adiante. No caso quando os dois grupos tratados em uma mesma passagem resistiram ao tratamento, foi passado adiante o grupo tratado com maior dosagem. Essas passagens foram feitas até chegar ao ponto que a dosagem de 0,2 mg, inicialmente considerada letal, não mais eliminou a infecção. Na Figura 17 é apresentado um esquema para o processo de seleção da cepa resistente de *A. ceylanicum*, com a dosagem de albendazol recebida por cada grupo.

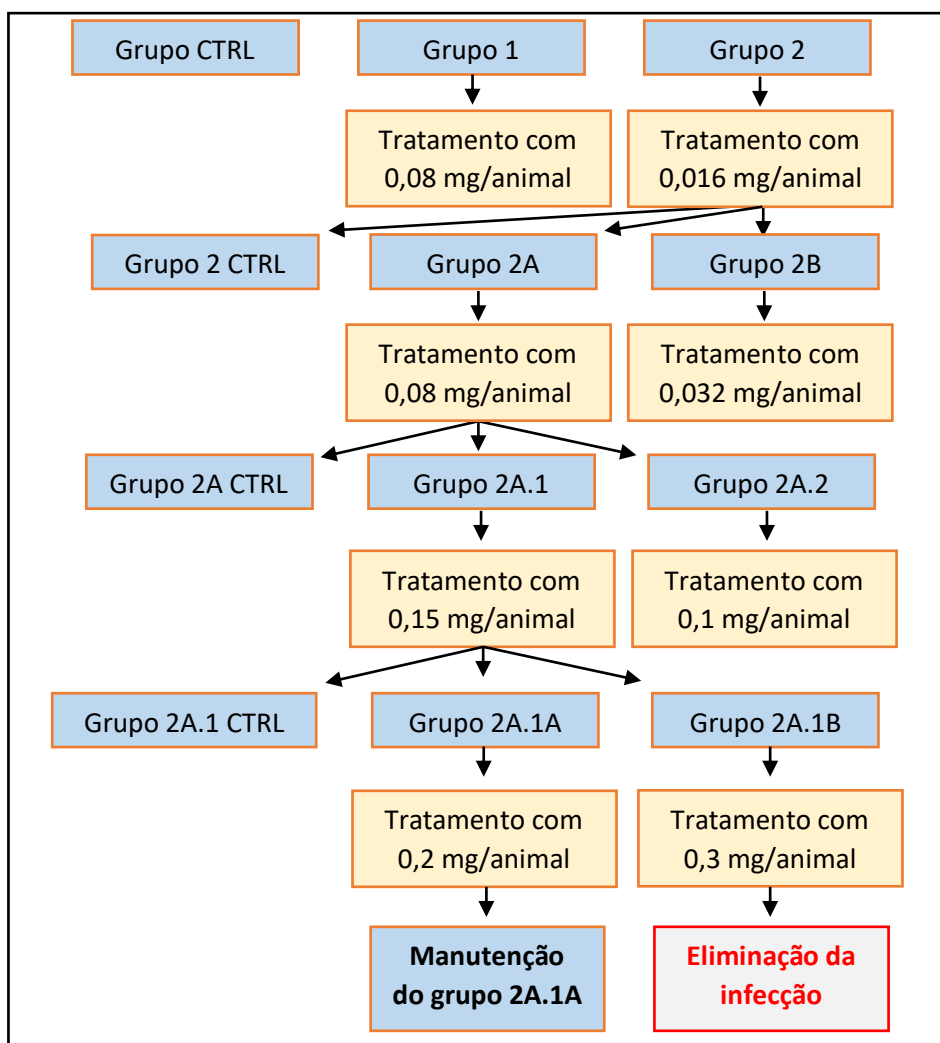


Figura 17 – Fluxograma para seleção da cepa resistente de *A. ceylanicum* através de passagens seriadas de infecção seguidas de tratamento. A nomenclatura de cada grupo se baseou no nome do grupo de origem. CTRL = controle

4.5.1. Infecção de hamsters com *A. ceylanicum*

Com as fezes de hamsters infectados, foram feitas coproculturas segundo Roberts e O’Sullivan (1950) e as larvas foram recuperadas pelo Método de Baermann-Moraes (Moraes, 1948). As larvas foram coletadas em tubo tipo Falcon de 15 mL, centrifugado a 2.400 xg por 5 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o volume do tubo completado para 10 mL com solução salina 0,85%. A observação da motilidade e a estimativa da quantidade de L3 foram realizadas em microscópio estereoscópico. Os grupos foram infectados por via oral com uma média de 100 L3, com auxílio de agulha de gavagem.

4.5.2. Estimativa de carga parasitária por quantidade de ovos liberados nas fezes

Durante o processo de seleção do isolado resistente, do 12º DPI até o dia da eutanásia, foi feita a quantificação de ovos por grama de fezes (OPG) para cada grupo. Essa quantificação foi realizada a cada dois dias em câmara de McMaster (Gordon e Whitlock, 1939), a fim de estimar a carga parasitária antes e após o tratamento.

4.5.3. Eutanásia, necrópsia e recuperação de vermes adultos

A eutanásia dos animais foi realizada no 30º DPI com sobredose de anestésico (45mg/kg de solução de cloridrato de xilazina e 240mg/kg de ketamina), via intraperitoneal. Em seguida, o animal foi colocado em decúbito dorsal e teve a cavidade abdominal aberta. O intestino delgado foi retirado e aberto longitudinalmente, seguido da raspagem da mucosa para desprendimento dos vermes adultos, em placa de Petri com solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pH 7,4. Os vermes recuperados foram quantificados e separados por sexo.

4.6. Caracterização das cepas resistente e sensível

Uma vez selecionada a cepa resistente ao albendazol, foi realizada a caracterização dessa cepa em comparação com a cepa sensível. Foi realizado um experimento com três grupos de hamsters (seis animais por grupo): um grupo controle não infectado, um grupo infectado com a cepa sensível e um terceiro grupo infectado com a cepa resistente, de maneira que cada grupo infectado recebeu um inóculo de 75 L3, de acordo com o item 4.5.1. Os animais foram eutanasiados no 25º DPI, de acordo com o item 4.5.3.

4.6.1. Comparação quanto à espoliação sanguínea e de ferro sérico

Nos dias 0 e 25º DPI, foram feitas duas coletas de 500 µL de sangue do plexo orbital de cada animal, por meio de uma pipeta de vidro, após aplicação de um anestésico ocular (cloridrato de proximetacaína 0,5%). Uma coleta foi realizada com EDTA 0,5 M e outra sem anticoagulante. O sangue com EDTA foi utilizado para avaliação de eritrograma, realizado no equipamento de análise hematológica de impedância

volumétrica (Abacus Júnior Vet, Áustria). O sangue sem EDTA foi centrifugado a 14.000 xg por 5 min. Com o soro obtido, foi feita a dosagem de ferro sérico, com kit comercial (Doles, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

4.6.2. Comparação quanto à massa dos animais

Foi realizada a aferição de massa corporal dos grupos para comparação entre infecção com a cepa resistente e cepa sensível. A massa de cada animal foi aferida através de uma balança semianalítica no dia da infecção e a cada seis dias, até o dia da eutanásia.

4.6.3. Comparação do número de ovos por grama de fezes, patência e taxa de fertilidade das fêmeas

A partir do 12º DPI, a cada dois dias, foi realizada a quantificação do OPG por grupo até o dia da eutanásia, conforme item 4.5.2. Esse procedimento também foi feito para determinação da patência das duas cepas. No dia da eutanásia, as fezes foram coletadas diretamente da porção final do intestino grosso de cada animal para quantificação de OPG individual. Foi realizado ainda o teste de fertilidade das fêmeas resistentes e sensíveis. As fêmeas recuperadas do intestino dos hamsters foram colocadas em placas de 12 poços contendo 10 mL de RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) e incubadas, em estufa, por 24 h, a 37 °C e 5% de CO₂. As fêmeas de um mesmo animal foram colocadas em um único poço. Após esse período, os vermes foram retirados da placa, o líquido de cada poço foi transferido para um tubo do tipo Falcon de 15 mL e centrifugado a 10.000 xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de formaldeído 10%. Todos os ovos presentes foram corados com lugol e quantificados em lâmina, através de microscópio óptico. Para determinação da taxa de fertilidade, o número de ovos contados em cada poço, após 24 h de incubação, foi dividido pelo número de fêmeas presentes no mesmo poço.

4.6.4. Comparação quanto aos níveis de expressão de hepcidina no hospedeiro

4.6.4.1. Extração de RNA total

De cada hamster, foi coletado o lobo esquerdo do fígado, o qual foi armazenado em RNA later (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), a -20 °C, até o momento do

uso. Os lobos retirados de cada animal foram postos em tubo de microcentrífuga de 2 mL, individualmente, com 1 mL de TRIzol (Invitrogen, Estados Unidos), seguido de homogeneização tecidual, com o auxílio de um homogeneizador de tecido. As amostras homogenizadas foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e incubadas por 5 min, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados em cada tubo 200 µl de clorofórmio, com homogeneização e incubação por 3 min, à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C. A fase aquosa de cada tubo foi transferida para outro tubo, seguida de adição de 500 µl de isopropanol e incubação por 10 min, à temperatura ambiente. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 xg por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 75 %, centrifugado a 7.500 xg por 5 min, a 4 °C e os sobrenadantes descartados. A etapa de lavagem foi repetida e os tubos foram invertidos por 10 min, à temperatura ambiente, para secagem. O RNA precipitado foi ressuspensão em 150 µl de água ultrapura, com incubação por 10 min, a 55 °C. A qualidade do RNA extraído (relação 260/280 e 260/230) foi avaliada pela leitura em aparelho espectrofotômetro Epoch (Biotek, Estados Unidos). O material foi armazenado a -80 °C, até o momento do uso.

4.6.4.2. Tratamento com DNase e síntese de cDNA

Os RNAs extraídos foram tratados com DNase usando o kit TURBO DNA-free (Ambion, Estados Unidos), para degradação de possíveis traços de DNA genômico. Essa reação foi realizada contendo 10 µg de RNA, 5 µl de tampão DNase 10x, 1 µl de turbo DNase e água em quantidade suficiente para volume final de 50 µl, com incubação por 25 min, a 37 °C. Posteriormente, a DNase foi inativada com a adição de 5 µl de reagente de inativação de DNase, com incubação por 5 min, à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 10.000 xg por 1,5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o RNA foi novamente dosado em aparelho espectrofotômetro Epoch (Biotek, Estados Unidos).

Após o tratamento com DNase, 2 µg de RNA total foram utilizados como molde para a síntese de cDNA, com o kit High Capacity cDNA Reverse Trascripton (Applied Biosystems, Estados Unidos). As reações ocorreram em um volume final de 20 µl, contendo 25 ng/µl de iniciadores randômicos, 500 µM de cada dNTP, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM de ditiotreitól (DTT) e 200 unidades da

transcriptase reversa, com incubação a 25°C por 10 min, 37 °C por 2 h, seguidos de 85 °C por 5 min. Simultaneamente, foram preparados os controles de transcrição sem adição da enzima transcriptase reversa para atuarem como controle negativo (RT-), demonstrando a ausência de DNA genômico.

4.6.4.3. PCR em tempo real (qPCR)

Os iniciadores utilizados na qPCR foram desenhados através do programa Oligo Explorer 1.4 (Gene link, Estados Unidos) com base na sequência de nucleotídeos do Genbank, sob número de acesso XM_005081868.1 e XM_005085546.2, para o gene da hepcidina e para o gene constitutivo hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT), respectivamente, ambos para a espécie de hamster *M. auratus*. Para amplificação do gene da hepcidina, foram utilizados os iniciadores *FHamp* e *RHamp*. Para o gene constitutivo, foram utilizados os iniciadores *FHPRT* e *RHPRT*. No Quadro 13 é mostrada a sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho de amplicon.

Quadro 13 – Iniciadores utilizados para análise da expressão do gene da hepcidina em *Mesocricetus auratus*, com seu respectivos tamanhos de amplicon.

Iniciador (5' – 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>FHamp</i> : CCT GTT TCT TGA TCC TCC TC	60	83
<i>RHamp</i> : CTG TAG TGC TTC AGG CTG TC	59	
<i>FHPRT</i> : TGG AGT GAT TAT GGA CAG GAC TGA	59	64
<i>RHPRT</i> : ATG GCC TCC CAT CTC TTT CA	58	

As reações de qPCR foram realizadas com o Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante, no aparelho StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Estados Unidos). As reações foram realizadas em triplicatas, contendo 2 µL de cDNA (20 ng de cada amostra), 0,3 µL de cada iniciador (com concentração final de 0,3 µM), 5 µL de SYBR e água ultrapura em quantidade suficiente para completar 10 µL. As condições de amplificação foram de 95 °C por 10 min, 40 ciclos com 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s. Um controle negativo sem a enzima transcriptase reversa e um controle negativo sem cDNA (substituído por água ultrapura) foram incluídos na placa, para confirmar a ausência de amplificação de DNA genômico e avaliar a presença de dímeros de iniciadores ou contaminação dos reagentes, respectivamente. A quantidade relativa de

transcritos-alvo em cada amostra foi determinada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

4.7. Teste de eclodibilidade de larva (EHT)

Após a eutanásia dos animais, aproximadamente 3 g de fezes foram recuperados da porção final do intestino grosso de cada hamster. Essas fezes foram transferidas para um tubo Falcon de 50 mL, que teve seu volume completado com solução saturada de açúcar, seguida de homogeneização em vórtex e centrifugação a 14.000 xg por 5 min. A parte superior do sobrenadante foi transferida para um novo tubo Falcon de 50 mL, o qual teve o volume completado com água destilada e centrifugado a 14.000 xg durante 5 min. O precipitado foi recuperado, analisado em microscópio e a concentração de ovos de *A. ceylanicum* foi ajustada para 50 ovos por 100 μ L de água. O EHT foi realizado de acordo com Humphries et al. (2013). As suspensões de albendazol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) foram preparadas em metanol (5 mg/mL) e diluídas em água destilada. O volume de 100 μ L contendo 50 ovos foi adicionado em poços individuais de uma placa de 96 poços contendo 100 μ L de uma solução de albendazol (concentrações finais = 0, 0,1, 1, 2 e 5 μ g/mL). As placas foram incubadas à temperatura ambiente e, após 48 h, o número de larvas foi contado em microscópio estereoscópico.

4.8. Varredura de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*

Selecionada a cepa resistente de *A. ceylanicum*, foram realizadas as análises para determinar os mecanismos que garantiam a sobrevivência dos vermes quando expostos ao fármaco. Portanto, inicialmente foi feita uma varredura de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 desse verme. Embora o genoma de *A. ceylanicum* esteja sequenciado, o mesmo está depositado como sequências completas de cromossomos. Portanto, para obtenção da sequência de cDNA da β -tubulina isotipo 1 desse parasito, foi feito um BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a partir da sequência de cDNA da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum* (número de acesso DQ294930.1 no GenBank) contra o genoma de *A. ceylanicum*. Em seguida, foi realizada a edição da sequência obtida no alinhamento, com a retirada dos possíveis íntrons.

Uma vez que a sequência do gene em questão de *A. ceylanicum* apresenta grande homologia com a sequência correspondente de *A. braziliense*, as análises de ambas as amostras foram feitas exatamente iguais. Os iniciadores utilizados para análise dos três códons de ambas as espécies estão descritos no Quadro 4.

O DNA dos exemplares de *A. ceylanicum* para as análises moleculares foi extraído segundo protocolo descrito no item 4.2. Os plasmídeos recombinantes sintetizados para uso como controle da presença ou ausência de mutação em *A. braziliense* (item 4.4.2) também foram utilizados nas análises de *A. ceylanicum*. Foram analisados os três códons de 50 vermes machos através de RFLP-PCR, sendo necessária a realização de mutagênese sítio-dirigida como uma etapa prévia para análise dos códons 198 e 200 (item 4.4.4.2).

Foram sequenciadas as regiões desses três códons de 10 amostras provenientes de vermes machos da cepa resistente. Para tal, foram realizadas PCRs com os mesmos iniciadores e nas mesmas condições descritas para síntese do controle sem mutação para *A. braziliense* (item 4.4.2.1), sem a etapa de clonagem. Os produtos de PCR foram purificados com polietilenoglicol – PEG (Promega, Estados Unidos) (item 4.10) e o sequenciamento ocorreu como explicado no item 4.13. Os iniciadores utilizados para sequenciamento foram os mesmos utilizados para a realização das segundas reações de PCR.

4.9. Construção da minibiblioteca de cDNA do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*

No intuito de tentar identificar outros possíveis SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 envolvidos no processo de resistência, foi construída uma minibiblioteca de cDNA do gene em questão da cepa resistente de *A. ceylanicum*. Essa parte do trabalho foi desenvolvida pelo residente pós-doutoral Dr. Pedro Aguiar e pela aluna de iniciação científica Talita Guimarães. Para tal, os iniciadores foram desenhados conforme descrito no item 4.4.1. Esses iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho de amplicon estão listados no Quadro 14.

Quadro 14 – Iniciadores utilizados para construção da minibiblioteca de cDNA do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*, suas respectivas temperaturas de anelamento e tamanho de amplicon.

Iniciador (5' – 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>FcDNA1</i> : TTC TCG ACT GCA ATC ATG CG	56	1.373
<i>RcDNA1</i> : ACG GTG GTG GTC TAC TCC T	57	
<i>FcDNA2</i> : ATC GGG TAT GGG AAC TCT C	54	Não se aplica*
<i>RcDNA2</i> : CAC GGA ACA TAG CAG CAA CA	55	

*Iniciadores utilizados separadamente, para sequenciamento.

Para construção da minibiblioteca, foi realizada a extração de RNA em pool de aproximadamente 100 vermes machos de *A. ceylanicum* provenientes de 7 hamsters infectados experimentalmente com a cepa resistente. A extração de RNA ocorreu conforme explicado para tecido, no item 4.6.4.1. O tratamento com DNase e a síntese de cDNA ocorreu conforme explicado no item 4.6.4.2.

Após a síntese do cDNA, foi realizada uma primeira PCR com os iniciadores *FcDNA1* + *RcDNA1* (1.373 pb), abrangendo todo o gene de interesse. As condições e volumes de todas essas PCRs foram as mesmas citadas no item 4.4.2. O volume de 2 μ l do produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) (Midsci, Estados Unidos), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos), para confirmação do tamanho do amplicon. Após confirmação, foi realizada a clonagem conforme item 4.11, e a recuperação de DNA plasmidial de 15 colônias de acordo com o item 4.12.

De posse do DNA plasmidial, foi realizado o sequenciamento dos 15 clones, conforme item 4.13. Foram utilizados quatro iniciadores para abranger toda a região de interesse, sendo que mais externamente, foram utilizados iniciadores M13 (descritos no item 4.11), que se anelam no próprio plasmídeo, e mais internamente, foram utilizados os iniciadores *FcDNA2* e *RcDNA2*. Na Figura 18 é mostrado o esquema dos iniciadores utilizados para sequenciamento de cDNA da cepa resistente.

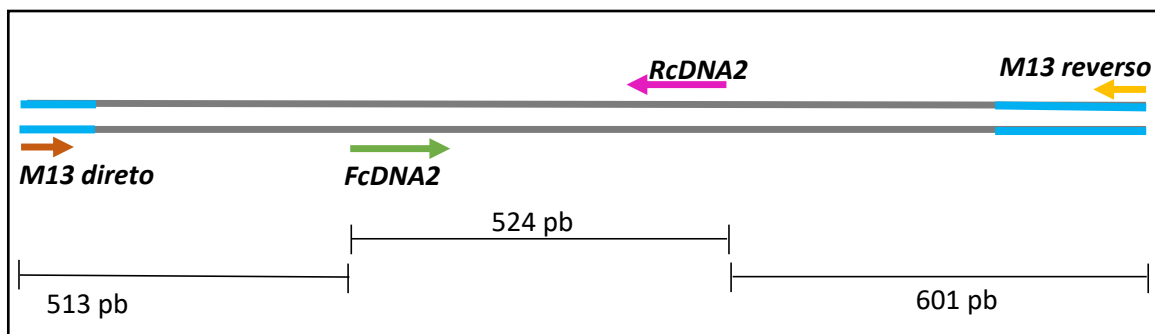


Figura 18 – Esquema representativo dos iniciadores utilizados para sequenciamento do cDNA da cepa resistente de *A. ceylanicum*, com os diferentes tamanhos dos fragmentos sequenciados. As sequências em azul correspondem ao plasmídeo enquanto que a sequência em cinza corresponde ao inserto clonado (1373 pb).

As sequências de aminoácidos referentes às sequências do DNA com mutação da cepa resistente foram obtidas a partir da ferramenta Transeq (www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/). Foi realizada uma comparação da sequência de aminoácidos referente ao DNA mutado com a sequência referência do banco de dados através da ferramenta Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

Uma vez analisadas as mutações presentes na minibiblioteca da cepa resistente, foram desenhados iniciadores para amplificar as regiões de todos os éxons do gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa sensível, a partir de DNA genômico, para se ter um parâmetro de comparação das sequências entre as duas cepas. Os iniciadores foram desenhados como explicado anteriormente (item 4.4.1) e estão listados no Quadro 15, com suas respectivas temperaturas de anelamento. Os iniciadores *Fa198/200Aby*, *Ra167Aby* e *Rb167Aby* foram os mesmos utilizados para as análises de sequência de *A. braziliense* e se encontram listados no Quadro 4. As PCRs ocorreram nas mesmas condições citadas no item 4.4.2, com temperatura de anelamento de 56 °C.

Quadro 15 – Iniciadores utilizados para análise da região exônica do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum* e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Iniciador (5' – 3')	Temperatura de anelamento (°C)
<i>Ftub1</i> : TTC ATT TCT CGC GCT CGC T	57
<i>Ftub2</i> : CAG TGG TGA ATC AGA TCT GC	54
<i>Ftub3</i> : GCT TGT GAT CCT CGA CAT G	54
<i>Rtub1</i> : AAT TCT CTA CGT CGC ATC CT	54
<i>Rtub3</i> : ACG GTG GTG GTC TAC TCC T	60

Foi extraído DNA genômico, individualmente, de cinco vermes machos da cepa sensível segundo protocolo descrito no item 4.2. Para análise de toda região de éxon dessas amostras, o gene em questão foi dividido em duas partes que foram amplificadas por nested-PCR, para obtenção de material suficiente para o sequenciamento. A Figura 19 mostra um esquema explicitando como foram feitas essas análises, com o tamanho dos amplicons obtidos em cada reação.

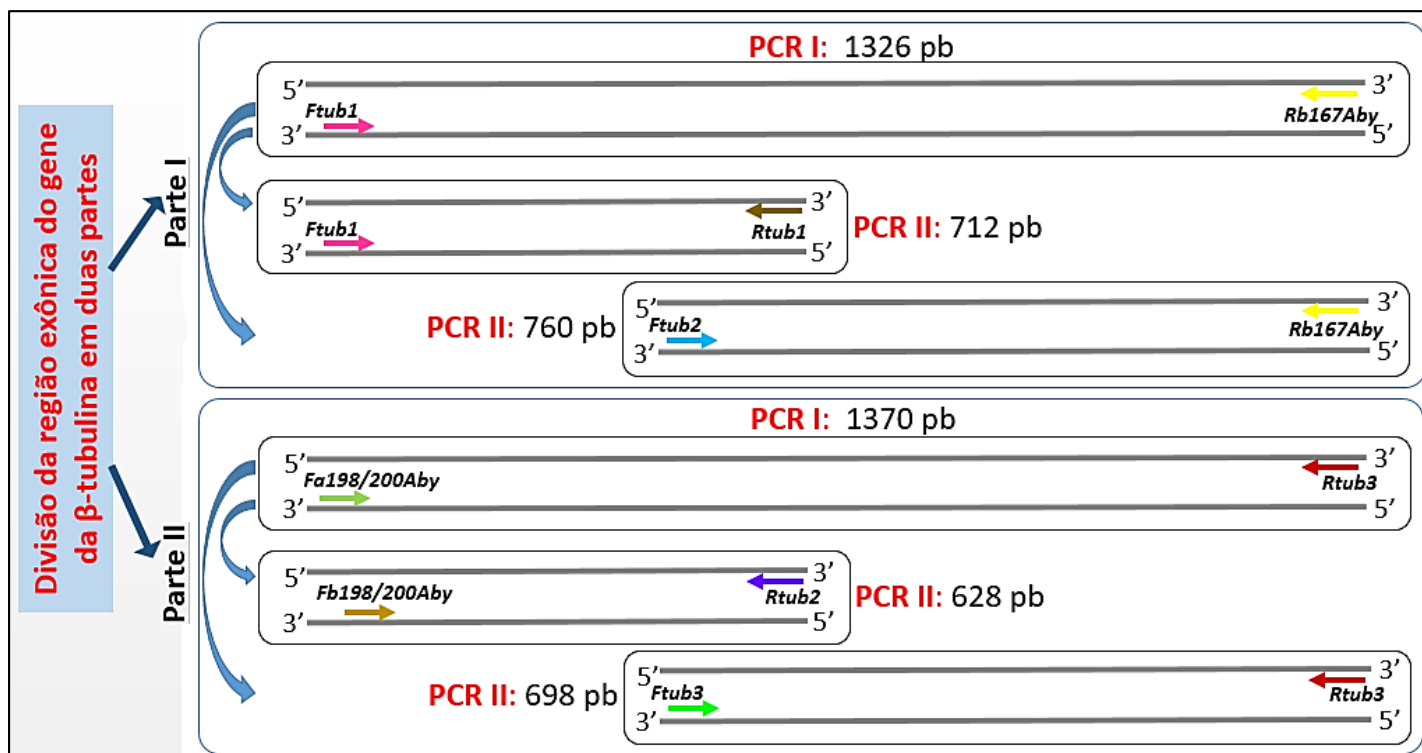


Figura 19 – Esquema representativo utilizado para análise da região exônica da cepa sensível de *A. ceylanicum*. O gene da β -tubulina isotipo 1 foi dividido em duas partes, com PCRs individuais. De cada PCR, foram feitas mais duas PCRs abrangendo as regiões de interesse.

Os produtos de PCR foram purificados com PEG (Promega, Estados Unidos) (item 4.10) e sequenciados (item 4.13). Os iniciadores utilizados para sequenciamento foram os mesmos utilizados para a realização das segundas PCRs. As sequências de cDNA da cepa resistente e as sequências das regiões exônicas obtidas a partir de DNA genômico da cepa sensível foram comparadas através do Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/),

4.10. Purificação do DNA

Os produtos de PCR utilizados para sequenciamento foram purificados com PEG (Promega, Estados Unidos) (20% polietilenoglicol 8.000 em solução de NaCl 2,5 M). A precipitação com o sistema PEG foi realizada misturando, em um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL, 1 volume do produto amplificado com 1 volume de PEG 20%, seguida de uma intensa homogeneização em vórtex. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 13.000 xg, a 25 °C por 45 min, com o subsequente descarte do sobrenadante e adição de 125 µL de etanol 20%. Foi realizada uma centrifugação a 13.000 xg, 25 °C por 15 min, descarte do sobrenadante, adição de igual volume de etanol 80% e centrifugação sob os mesmos parâmetros para retirada do excesso de sal. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 20 µL de água ultrapura. O material foi dosado, em duplicata, através de espectrofotômetro Epoch (Biotek, Estados Unidos) e armazenado a -20 °C.

Para purificação do produto de PCR excisado do gel de agarose, foi utilizado o kit GFX® PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, UK), segundo recomendação do fabricante. Inicialmente, utilizando uma lâmina de bisturi, a banda foi excisada do gel, transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e pesada em balança semianalítica. Foram adicionados 10 µl de tampão de captura para cada 10 mg de gel, seguida de incubação a 60 °C até completa dissolução do gel. Essa mistura foi homogeneizada em vórtex, transferida para uma coluna inserida em um tubo coletor e incubada por 1 min à temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 16.000 xg por 30 s, para associação do DNA à membrana da coluna. O filtrado presente no tubo coletor foi descartado e a coluna foi reinsertada no tubo. Foram adicionados 500 µl de tampão de lavagem na coluna, com centrifugação a 16.000 xg por 30 s, para remoção dos sais e outros contaminantes da membrana. O tubo coletor foi descartado e a coluna foi inserida em tubo de microcentrífuga de 1,5 µl, para eluição do DNA. Foram adicionados 20 µl do tampão de eluição no centro da membrana da coluna, seguido de incubação por 1 min à temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 16.000 xg por mais 1 min. O DNA eluído foi dosado, em duplicata, através de espectrofotômetro Epoch (Biotek, Estados Unidos) e estocado a -20 °C.

4.11. Clonagem

Os controles foram clonados com o kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Estados Unidos). O volume de 1,5 µl do produto de PCR foi incubado a 4 °C, por cerca de 16 h, na presença de 2,5 µl do tampão de ligação, 0,5 µl de vetor e 0,5 µl de DNA ligase. Posteriormente, foi realizada a termotransformação. O volume de 2 µl do produto de ligação foi transformado em 30 µl de células quimiocompetentes *Escherichia coli* da linhagem XL1-blue (Phoneutria, Brasil). As amostras foram transformadas com incubação em gelo por 10 min, seguida de choque térmico por 1,5 min a 42 °C e nova incubação em gelo por mais 2 min. As células bacterianas potencialmente transformadas foram incubadas por 1 h a 37 °C em 500 µl de meio líquido circlegrow (MP Biomedicals, Estados Unidos) pH 7,0, com posterior plaqueamento das mesmas em meio sólido seletivo circlegrow (MP Biomedicals, Estados Unidos), contendo ampicilina (100 µg/mL), IPTG (100 mM) e X-gal (500 µg/mL).

As placas foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 16 h. A presença dos insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foi confirmada por meio de uma PCR de colônia, utilizando diretamente uma pequena amostra de algumas colônias brancas retiradas da placa com o auxílio de um palito de madeira estéril. Essas amostras foram transferidas para um tubo contendo 5 µl de GoTaq Green Master Mix (Promega, Estados Unidos), 0,2 µl de cada iniciador M13 direto (5' - GTA AAA CGA CGG CCA G - 3') e reverso (5' - GGA AAC AGC TAT GAC CAT G - 3'), com concentração final de 0,2µM/iniciador e 4,6 µl de água ultrapura. Da mesma forma, foram preparadas PCRs com colônias azuis que funcionaram como controle negativo da clonagem. A PCR de colônia ocorreu sob a seguinte ciclagem: 95 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos a 95 °C por 1 min, 52 °C por 1 min, 72°C por 1 min e um passo final de extensão a 72°C por 8 min. Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos).

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

4.12. Recuperação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi recuperado através do kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Estados Unidos). A cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 xg em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. O sobrenadante foi descartado e o restante da cultura foi novamente centrifugado no mesmo tubo. O sobrenadante foi removido por inversão e o sedimento bacteriano foi ressuspensão em 250 µL de solução de ressuspensão de célula. Foram adicionados 250 µL de solução de lise para romper a membrana das bactérias, com 10 µL de protease alcalina para quebra de ligações peptídicas. O produto foi incubado por 5 min à temperatura ambiente, com adição de 350 µL de solução de neutralização. O lisado bacteriano foi centrifugado a 14.000 xg por 10 min. O sobrenadante (aproximadamente 850 µL) foi transferido para a coluna inserida em um tubo coletor, e centrifugado a 14.000 xg por 1 min, à temperatura ambiente. Foi descartado o líquido do tubo coletor e adicionados 750 µL de solução de lavagem na coluna, a qual foi centrifugada a 14.000 xg. O líquido do tubo coletor foi descartado e a coluna foi reinsertada. Esse procedimento de lavagem foi repetido usando 250 µL de solução de lavagem, centrifugado a 14.000 xg por 2 min, à temperatura ambiente. A coluna foi inserida em um novo tubo coletor e o DNA plasmidial foi eluído em 40 µL de água ultrapura, após centrifugação a 14.000 xg por 1 min, à temperatura ambiente. O DNA plasmidial foi estocado a -20 °C.

4.13. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado segundo método descrito originalmente por Sanger et al. (1977). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Estados Unidos) e ocorreram em placas de 96 poços, com volume final de 10 µL contendo 1 µM do iniciador direto ou reverso, aproximadamente 25 ng de produto de PCR purificado para cada 100 pb da amostra ou 100 ng no caso de plasmídeo, 4,0 µL de BigDye e água ultrapura suficiente para completar o volume. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Alemanha) com 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 60°C por 15 s e 60°C por 1 min.

Os nucleotídeos não incorporados foram retirados com adição de 1 µL de acetato de amônio (7,5 M) e 25 µL de etanol absoluto. Após incubação a 25 °C por 15 min, a placa foi centrifugada a 4.000 xg por 45 min a 25 °C. O sobrenadante foi descartado por

inversão e 150 µl de etanol 70% foram adicionados à amostra, seguindo de centrifugação a 4.000 xg por 15 min a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso por agitação em vórtex com 10 µl do tampão de solubilização contendo 70% de formamida e 1 mM de EDTA. O sequenciamento dos fragmentos foi executado no sequenciador automatizado ABI 3130xl/Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Estados Unidos) de 16 capilares. Cada amostra foi sequenciada no sentido direto e reverso, e a análise do cromatograma foi feita utilizando o software FinchTV (Geospiza, Estados Unidos).

4.14. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados gerados foi utilizado o software Graph Pad Prism 5. Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov. As análises entre dois grupos foram feitas com os métodos estatísticos teste T pareado ou não pareado. Para análise de três ou mais grupos, os dados foram submetidos aos testes ANOVA ou Repeated Measures ANOVA seguido do teste de Tukey. Foi utilizado o teste de Grubbs para detectar outliers. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p \leq 0,05$.

I

5. RESULTADOS

5.1. *A. caninum*

Foi tentado o estabelecimento da técnica de Tetraprimer ARMS-PCR para os códons 167 e 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. Depois de várias alterações nos protocolos, não foi obtido sucesso na padronização para análise do códon 167 (resultados não apresentados) e, portanto, para esse códon, optou-se pela realização da ARMS-PCR, no formato de duas reações individuais. No que diz respeito ao códon 198, a padronização da metodologia de Tetraprimer ARMS-PCR foi bem sucedida e utilizada para uma varredura do SNP nas amostras em estudo. Foram analisadas 327 amostras de DNA provenientes de vermes de seis estados brasileiros para ambos os códons, todavia nenhuma das amostras apresentou mutação. Nas Figuras 20 e 21 são apresentados géis demonstrativos da varredura da mutação nos códons 167 e 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*, respectivamente.

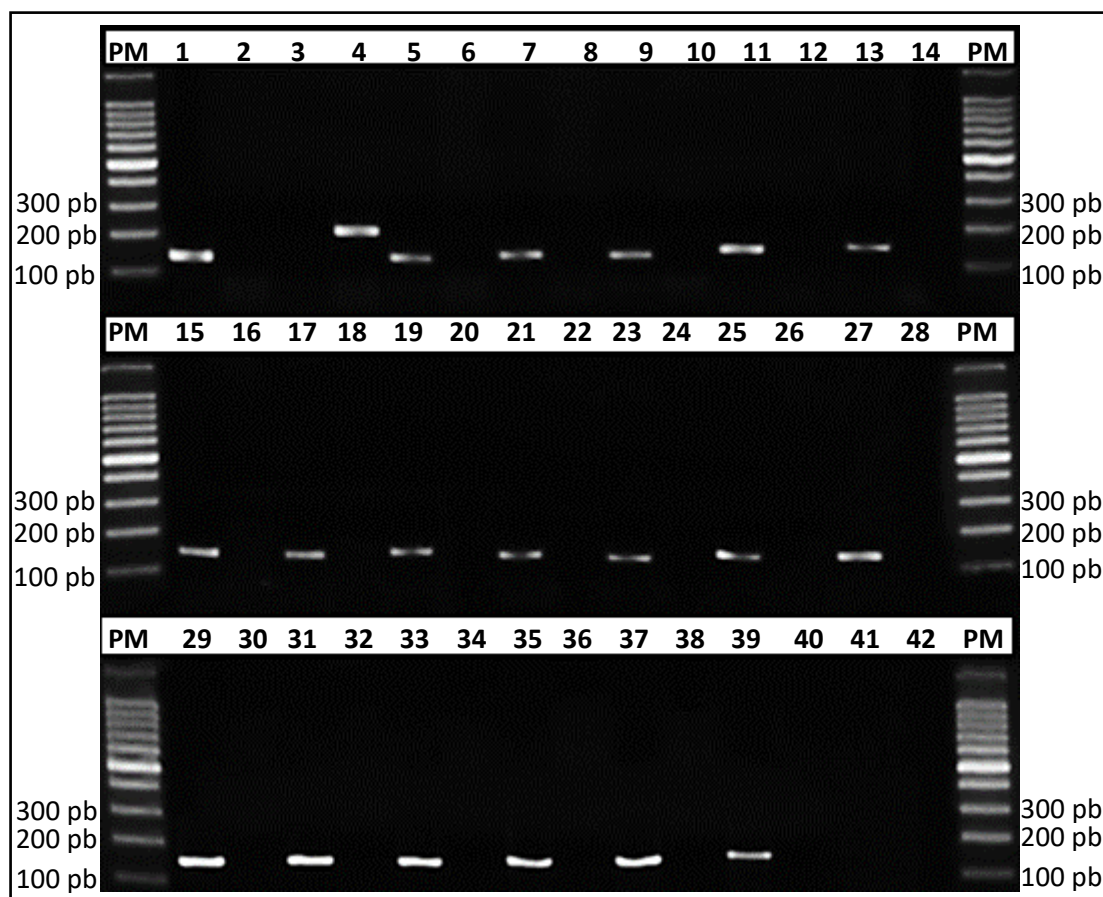


Figura 20 – Resultados demonstrativos da ARMS-PCR para varredura do códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. Amostras individuais de DNA genômico do nematódeo foram submetidas a duas reações com dois pares de iniciadores (ARMS-PCR), após uma primeira reação. As canaletas identificadas com número ímpar correspondem ao produto de PCR com combinação para detectar o fragmento sem mutação (*FsI67Ac* + *RbI67Ac* = 141 pb). As canaletas identificadas com número par correspondem ao produto da PCR com a combinação para detectar a mutação (*FaI67Ac* + *RrI67Ac* = 212 pb). Nas canaletas de 1 a 4 foram utilizados controles (1 e 2: plasmídeos sem mutação; 3 e 4: plasmídeo com mutação). Das canaletas 5 a 40, os produtos das duas reações para a mesma amostra de DNA genômico se encontram uma ao lado da outra. As canaletas 41 e 42 correspondem aos “brancos” das reações. A imagem mostra um gel de agarose 1%, corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos). PM: peso molecular de 100 pb.

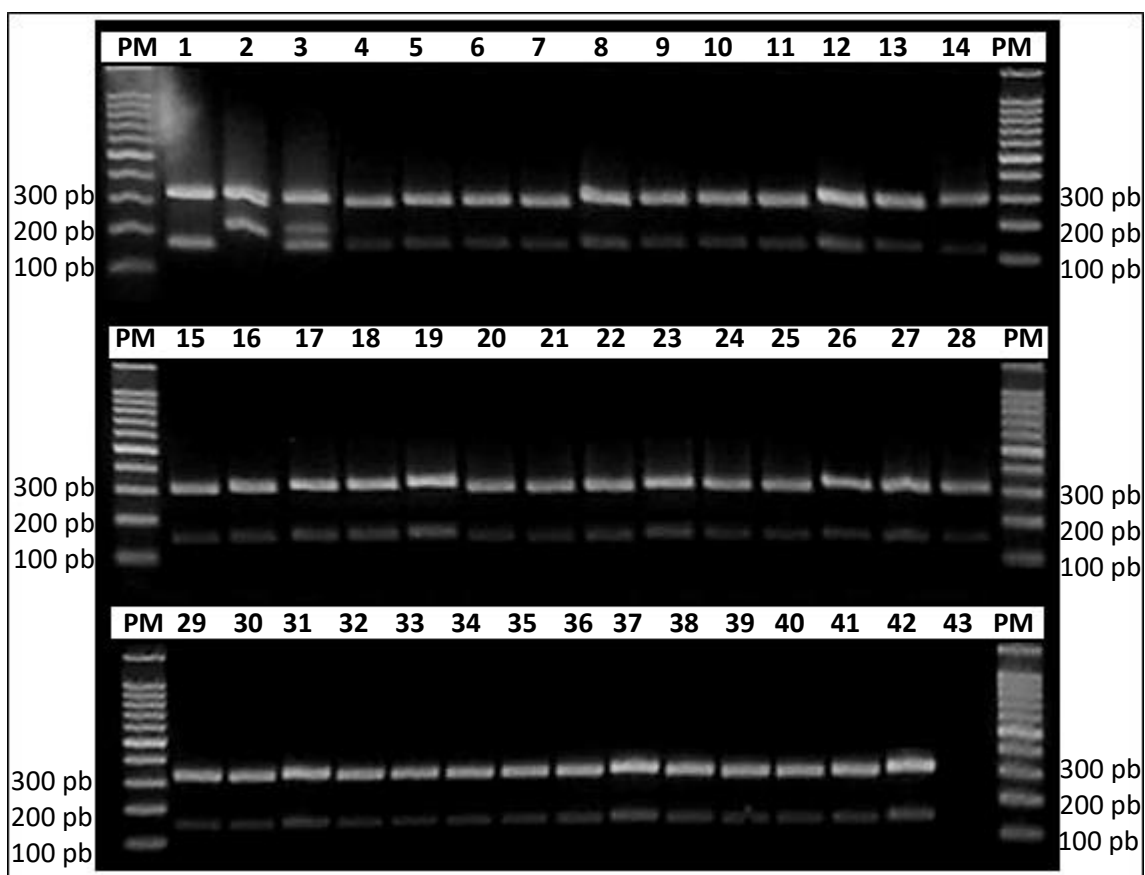


Figura 21 – Resultados demonstrativos da Tetraprimer ARMS-PCR para varredura do códon 198 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*. Amostras individuais de DNA genômico do nematódeo, após uma primeira PCR, foram submetidas à Tetraprimer ARMS-PCR. Nas canaletas de 1 a 3 foram utilizados controles (1: plasmídeo sem mutação; 2: plasmídeo com mutação; 3: mix de plasmídeos com e sem mutação). Fragmentos esperados (pb) – homocigoto sem mutação: 331 + 161, homocigoto com mutação: 331 + 217, e heterocigoto: 331 + 161 + 217. As canaletas de 4 a 42 apresentam produto de PCR de vermes sem mutação. A canaleta 43 corresponde ao “branco” da reação. A imagem mostra um gel de agarose 2%, corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos). PM: peso molecular de 100 pb.

5.2. *A. braziliense*

Todos os códons de *A. braziliense* foram analisados através de RFLP-PCR, entretanto, para análise dos códons 198 e 200, foi necessária a realização de uma etapa prévia de mutagênese sítio-dirigida. Foram examinadas 81 amostras de DNA provenientes de helmintos de dois estados brasileiros. Não foram encontradas as mutações para os códons 167 e 200 de ambos os locais. Para o códon 198, somente um dos exemplares, proveniente de Minas Gerais, apresentou mutação no códon 198, correspondendo a 1,2% (1/81) do total de amostras analisadas. Essa única mutação estava presente em um verme heterozigoto. Na Figura 22 são apresentados géis demonstrativos da varredura da mutação nos códons 167 (22A), 198 (22B) e 200 (22C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*, respectivamente. Na Figura 23 é apresentado o cromatograma resultante do sequenciamento da única amostra com mutação no códon 198.

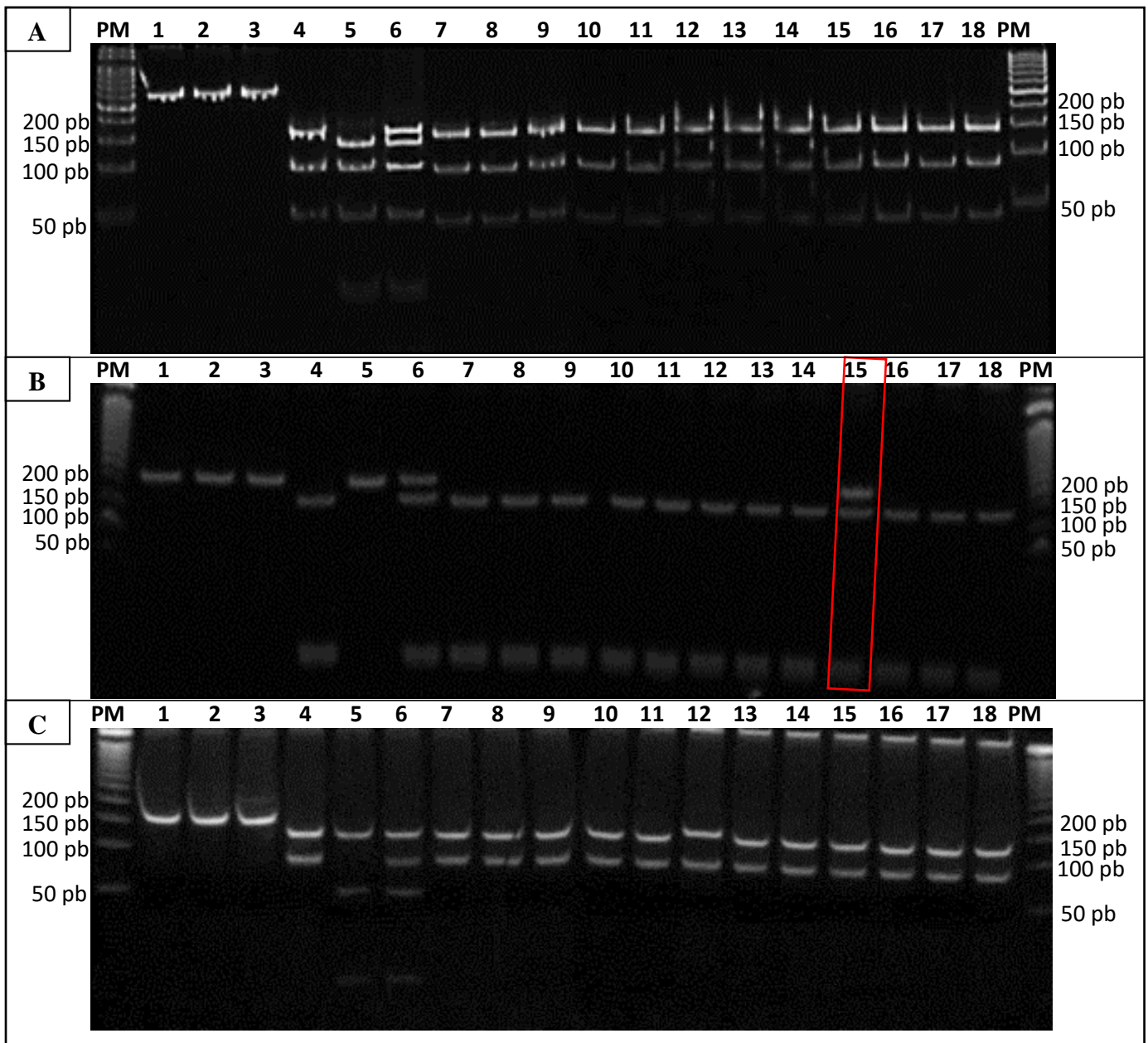


Figura 22 – Resultados demonstrativos da RFLP-PCR para varredura de SNPs nos códons 167(A), 198(B) e 200(C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*. Amostras individuais de DNA genômico do nematódeo, após duas PCRs, foram submetidas à digestão com enzima de restrição (*RsaI* para os códons 167 e 200; e *DdeI* para o códon 198). Nas canaletas de 1 a 6 foram utilizados controles (1 e 4: plasmídeo sem mutação; 2 e 5: plasmídeo com mutação; 3 e 6: plasmídeos com e sem mutação). Com exceção do produto de PCR com plasmídeos das canaletas de 1 a 3, todas as outras canaletas apresentam produtos após digestão. As canaletas de 7 a 18 apresentam produto de digestão de PCR utilizando DNA genômico de verme. Fragmentos esperados (pb) – códon 167: homocigoto sem mutação: 162 + 95 + 49, homocigoto com mutação: 138 + 95 + 49 + 24, heterocigoto: 162 + 138 + 95 + 49 + 24; códon 198: homocigoto sem mutação: 186 + 28, homocigoto com mutação: 214, heterocigoto: 214 + 186 + 28; códon 200: homocigoto sem mutação: 137 + 71, homocigoto com mutação: 137 + 41 + 30, heterocigoto: 137 + 71 + 41 + 30. As canaletas destacadas apresentam perfil de genótipo representativo de mutação. A imagem mostra géis de acrilamida 12%, corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos). PM: peso molecular de 50 pb.

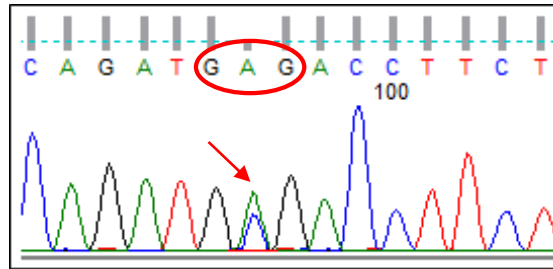


Figura 23 – Cromatograma correspondente ao sequenciamento da única amostra de *A. braziliense* que apresentou mutação no códon 198. A presença de dois picos na segunda base do códon destacado revela um helminto heterozigoto.

5.3. *N. americanus*

Os códons de *N. americanus* foram avaliados por RFLP-PCR, sem necessidade de uma etapa anterior de mutagênese sítio-dirigida. Foram analisadas 552 amostras de DNA provenientes de ovos individuais de 48 pacientes de seis estados brasileiros. Não foram encontradas as mutações no códon 167 para nenhuma amostra avaliada. Já para o códon 198, três ovos obtidos de um mesmo paciente do Ceará apresentaram mutação, (uma homozigose e duas heterozigoses), do qual foram avaliados 13 ovos. Três ovos de Minas Gerais apresentaram mutação no códon 198, provenientes de dois pacientes: um paciente que teve nove ovos avaliados (um ovo heterozigoto e um homozigoto); e outro paciente com 18 ovos analisados (um heterozigoto). Na Bahia, dois ovos apresentaram mutação no códon 198 (um homozigoto e um heterozigoto) de um paciente com 20 ovos analisados. Nenhuma amostra dos outros estados apresentou mutação no códon 198, portanto, a porcentagem total de ovos mutados nesse códon foi de 1,4% (8/552).

Os ensaios realizados para o códon 200 mostraram quatro ovos mutados nas amostras do Maranhão, as quais estavam distribuídas da seguinte forma: dois ovos homozigotos provenientes de dois pacientes que tiveram 11 e 12 ovos avaliados, e dois ovos homozigotos de um mesmo paciente com 10 ovos avaliados. Da Bahia, dois ovos se apresentaram heterozigotos provenientes de um paciente com 20 ovos avaliados, sendo que um desses ovos apresentou também heterozigose para o códon 198. Portanto, a porcentagem de ovos mutados no códon 200 foi de 1,1% (6/552). Na Figura 24 são apresentados géis demonstrativos da varredura das mutações para os códons 167 (24A), 198 (24B) e 200 (24C) do gene da β -tubulina de *N. americanus*, respectivamente. Na Figura 25 são mostrados os cromatogramas representativos do sequenciamento de vermes homozigotos mutados e heterozigotos para os códons 198 e 200.

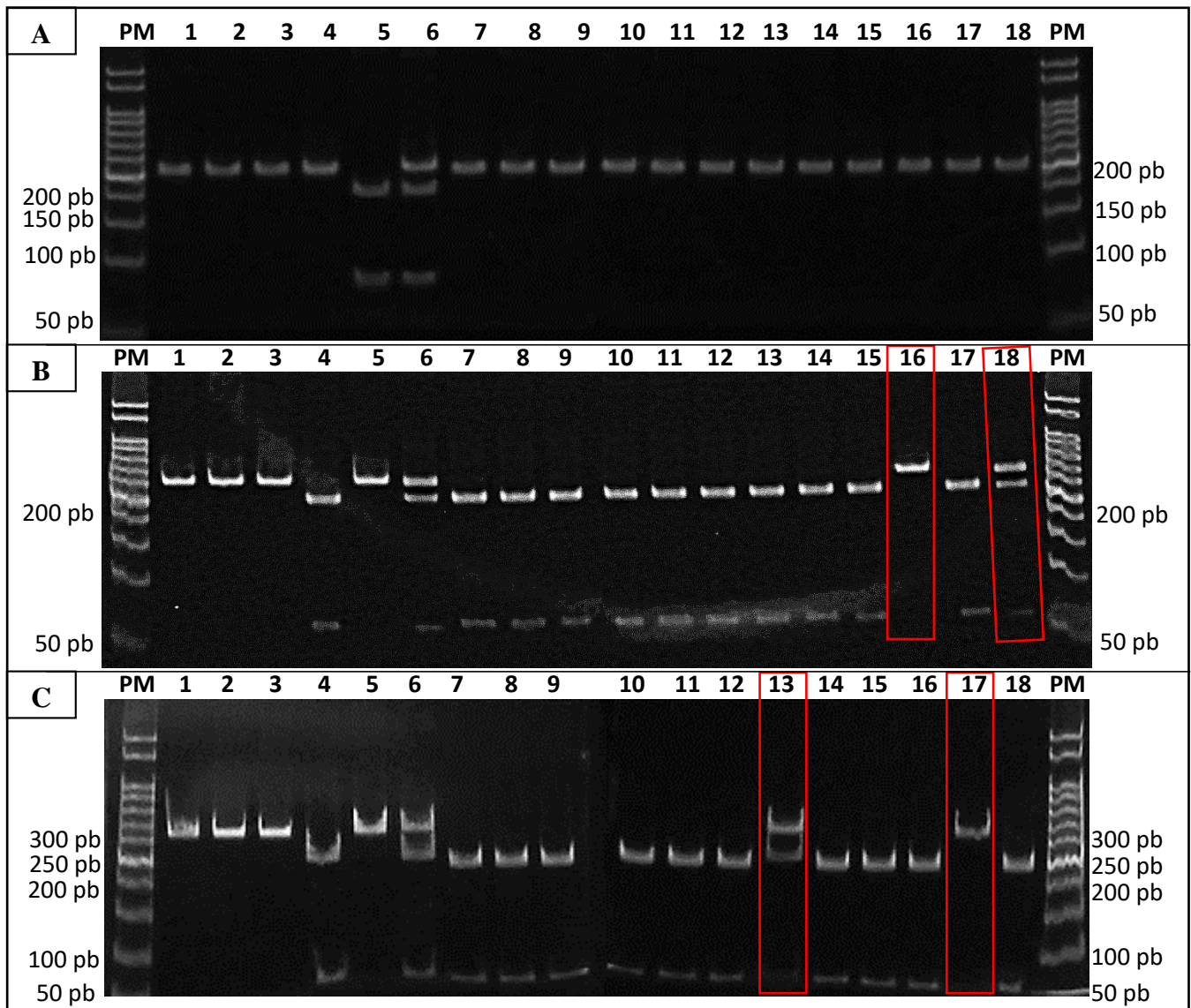


Figura 24 – Resultados demonstrativos da RFLP-PCR para varredura de SNPs nos códons 167(A), 198(B) e 200(C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus*. Amostras individuais de DNA genômico do nematódeo, após duas PCRs, foram submetidas à digestão com enzima de restrição (*Hpy8I*, *Alw26I* e *HpyAV* para os códons 167, 198 e 200, respectivamente). Nas canaletas de 1 a 6 foram utilizados controles (1 e 4: plasmídeo sem mutação; 2 e 5: plasmídeo com mutação; 3 e 6: mix de plasmídeos com e sem mutação). Com exceção do produto de PCR com plasmídeos das canaletas de 1 a 3, todas as outras canaletas apresentam produtos após digestão. As canaletas de 7 a 18 apresentam produto de digestão de PCR utilizando DNA genômico de ovo. Fragmentos esperados (pb) – códon 167: homozigoto sem mutação: 291, homozigoto com mutação: 210 + 81, heterozigoto: 291 + 210 + 81; códon 198: homozigoto sem mutação: 262 + 53, homozigoto com mutação: 315, heterozigoto: 315 + 262 + 53; códon 200: homozigoto sem mutação: 242 + 73, homozigoto com mutação: 315, heterozigoto: 315 + 242 + 73. As canaletas destacadas apresentam perfil de genótipo representativo de mutação. A imagem mostra géis de acrilamida 6%, corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos). PM: peso molecular de 50 pb.

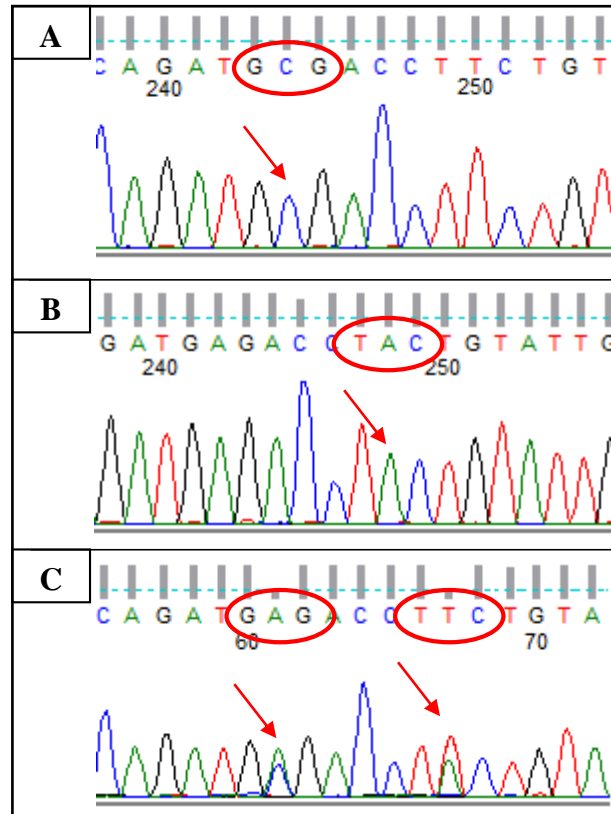


Figura 25 – Cromatograma representativo do sequenciamento das amostras de *N. americanus* que apresentaram mutação no códon 198 e 200 com perfil homocigoto (A e B, respectivamente). O cromatograma C representa o helminto que com dupla heterocigose para esses dois códon.

5.4. Seleção da cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol

Através de passagens seriadas de infecção seguidas de tratamento, foram necessárias quatro passagens para obtenção da cepa resistente de *A. ceylanicum*. Na Tabela 3 é mostrado o resultado da quantificação de OPG de cada grupo durante o experimento.

Tabela 3 – Resultados da quantificação de ovos por grama de fezes por grupo, em câmara de McMaster (Gordon e Whitlock, 1939), durante o processo de seleção da cepa resistente de *A. ceylanicum*.

Dia Grupo										
	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
CTRL	0	0	0	1000	1200	1500	4000	1700	2900	3200
1 (0,08 mg)	0	0	0	1100	1300	0	0	0	0	0
2 (0,016mg)	0	0	0	1000	3000	500	1200	1500	1100	1600
2 CTRL	0	0	500	900	1600	3700	2200	3200	5100	2200
2A (0,08 mg)	0	200	400	1000	1900	300	600	1700	5600	3100
2B (0,032 mg)	0	0	0	1400	1600	300	800	2200	3800	2900
2A CTRL	0	100	500	2000	7000	7400	6600	5000	7100	4500
2A.1 (0,15 mg)	0	100	600	2900	7300	0	200	100	100	100
2A.2 (0,01 mg)	0	200	500	2200	7600	100	100	200	600	900
2A.1 CTRL	0	0	1200	1400	2800	4000	3200	2100	4000	3200
2A.1A (0,2 mg)	0	100	900	1000	2100	200	600	900	1300	1900
2A.1B (0,3 mg)	0	0	600	1200	2400	0	0	0	0	0

5.5. Caracterização das cepas resistente e sensível

Após o estabelecimento da cepa resistente, as larvas recuperadas foram inoculadas em novos grupos de animais para a caracterização dos parâmetros parasitológicos e bioquímicos em comparação com a cepa sensível.

5.5.1. Quantificação de ovos por grama de fezes e patência

No Gráfico 1A é apresentada a comparação do OPG de *A. ceylanicum* de grupos de hamsters infectados com as cepas sensível e resistente, a partir do 12º DPI ao 24º DPI, mostrando que, em todos os pontos de coleta, a cepa sensível apresentou uma maior taxa de liberação de ovos nas fezes quando comparado com a cepa resistente, entretanto, a patência foi observada no 16º DPI para ambas as cepas. Com esses resultados, não foi possível fazer análise estatística, já que a coleta de fezes foi feita por grupo. No Gráfico

1B é apresentada a comparação do OPG individualmente, quantificado no dia da eutanásia.

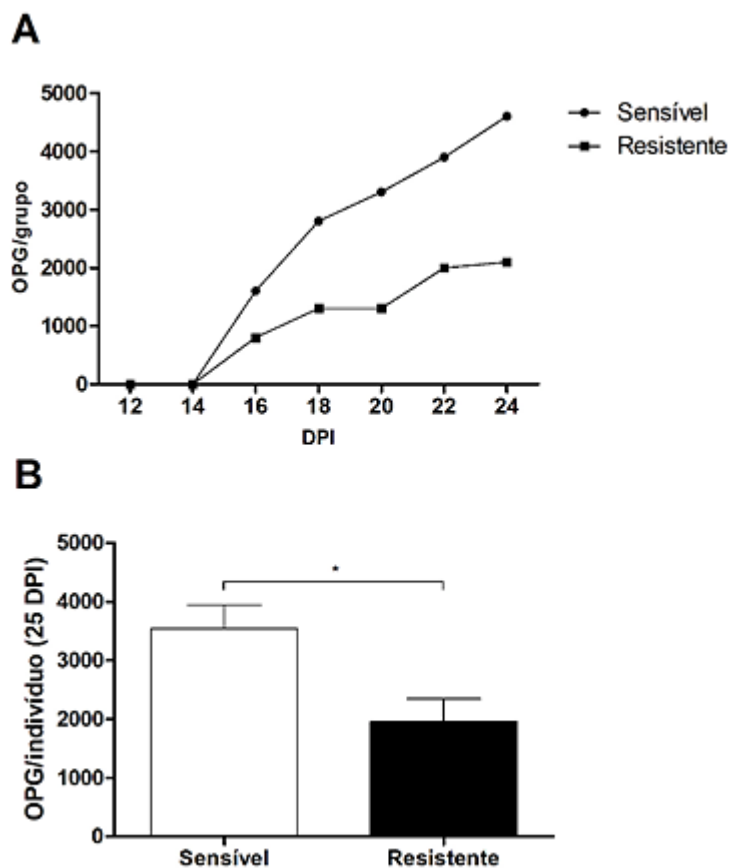


Gráfico 1 – Comparação em grupo (A) e individual (B) do número de ovos de *A. ceylanicum* por grama de fezes (OPG) de hamsters infectados com a cepa sensível e resistente. A quantificação individual somente foi realizada no dia da eutanásia dos animais. DPI = dia pós-infecção. n = 6. *p<0,05.

5.5.2. Recuperação de vermes

No Gráfico 2 é representada a quantificação de vermes adultos recuperados das cepas de *A. ceylanicum* sensível e resistente. No Gráfico 2A é mostrada a comparação do número de vermes machos e fêmeas por grupo, com diferença entre ambos, enquanto que no Gráfico 2B é representada a comparação do número total de vermes por grupo, mostrando uma maior recuperação de vermes no grupo infectado com a cepa sensível.

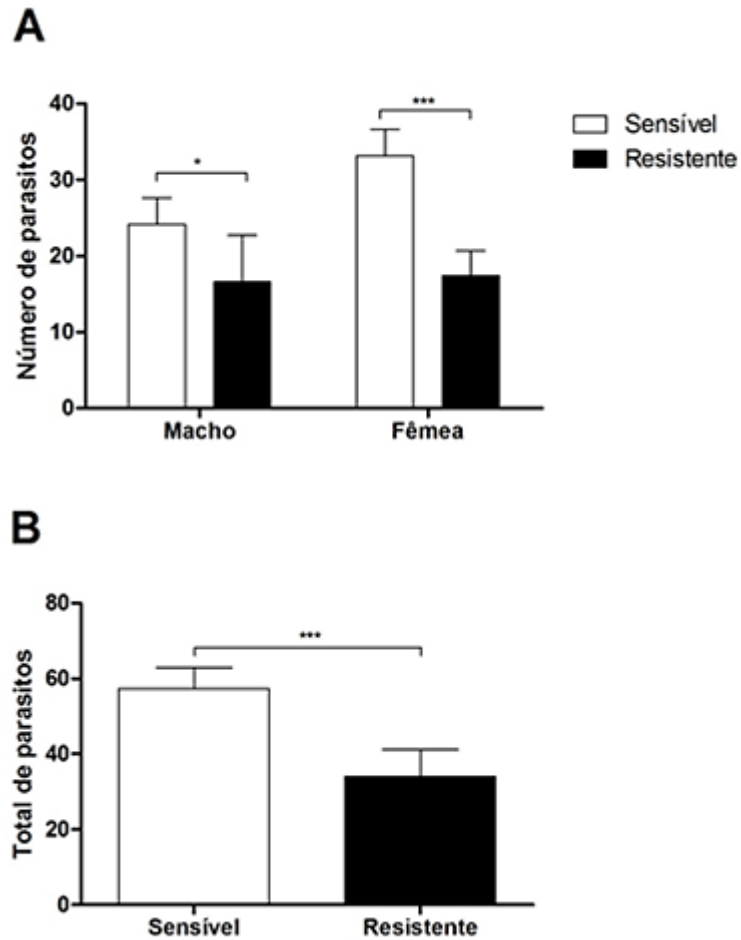


Gráfico 2 – Quantificação de vermes adultos recuperados das cepas de *A. ceylanicum* sensível e resistente. Número de vermes machos e fêmeas por grupo (A) e número total de vermes por grupo (B). Cada barra representa a média \pm desvio padrão do grupo (n = 6). *p<0,05; ***p<0,001.

5.5.3. Taxa de fertilidade

No Gráfico 3 é apresentada a taxa de fertilidade observada nas fêmeas de ambas as cepas, não denotando diferença estatística, ou seja, embora exista uma maior quantidade de fêmeas recuperadas na cepa sensível, a quantidade de ovos liberados por fêmea entre ambas as cepas é semelhante.

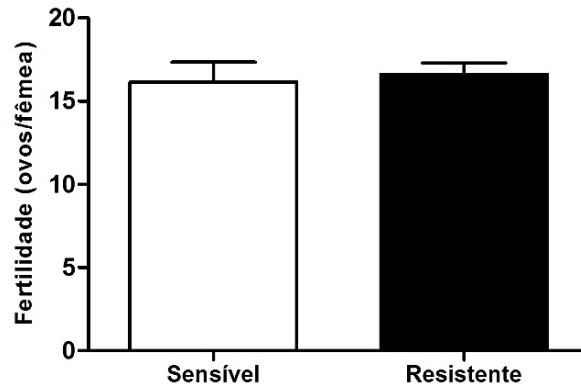


Gráfico 3 – Comparação da taxa de fertilidade em 24 h das fêmeas recuperadas dos grupos infectados com a cepa sensível e resistente de *A. ceylanicum*. Cada barra representa a média \pm desvio padrão do grupo (n = 6).

5.5.4. Eritrograma

No Gráfico 4 são apresentados os dados do eritrograma realizado no 25º DPI, com a contagem global de eritrócitos (4A), níveis de hemoglobina (4B), hematócrito (4C), volume corpuscular médio (VCM) (4D), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (4E), distribuição da largura das células vermelhas (RDW) (4F) e plaquetas (4G). Os resultados evidenciam uma diferença significativa nos parâmetros contagem global de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM entre os grupos infectados e o grupo controle não infectado, mas não foi observada diferença entre os grupos infectados com as duas cepas. Para os parâmetros RDW e plaquetas não foi observada diferença entre nenhum dos três grupos.

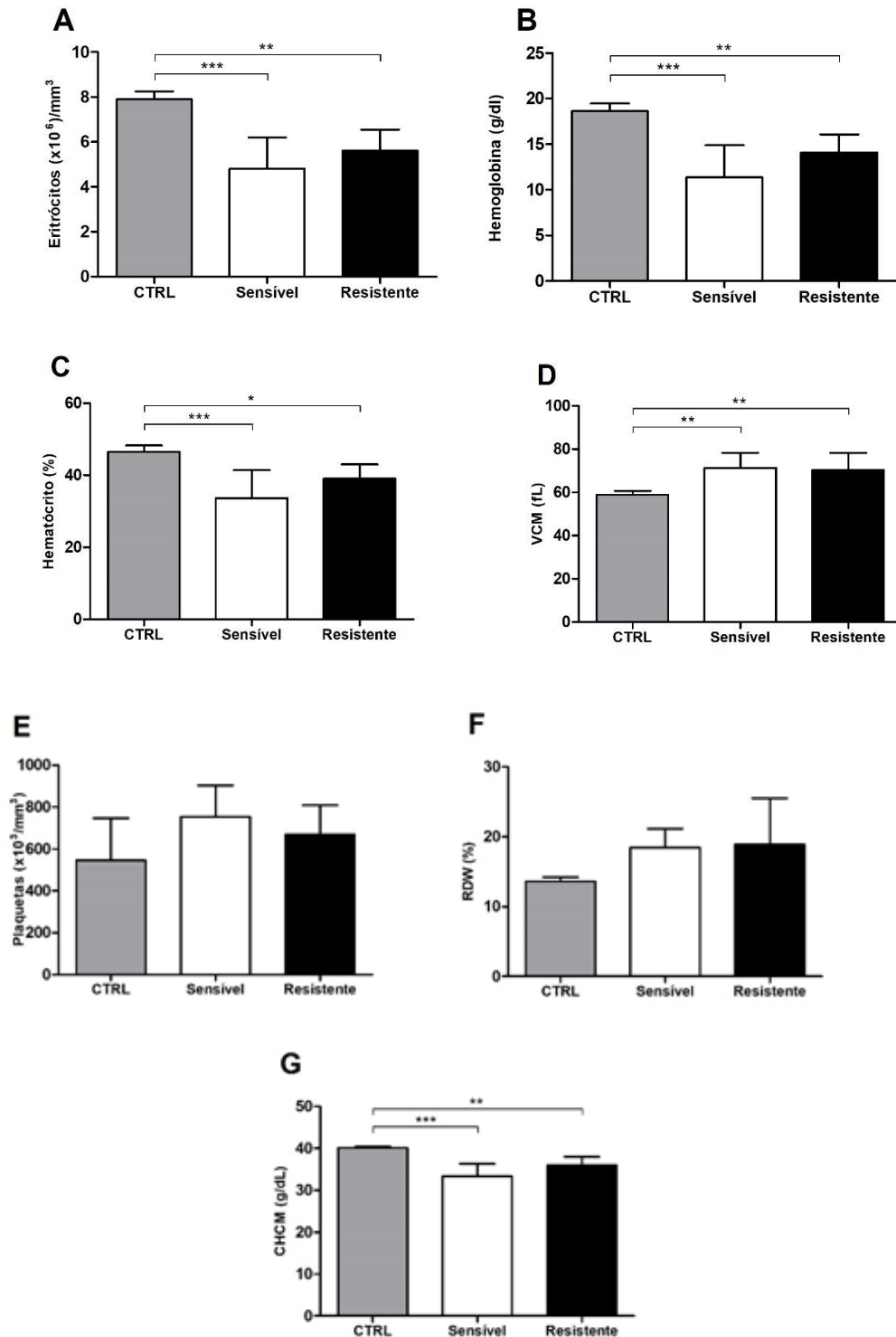


Gráfico 4 – Eritrograma realizado no 25º dia pós-infecção nos grupos controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*, com a contagem global de eritrócitos (A), níveis de hemoglobina (B), hematócrito (C), volume corpuscular médio (VCM) (D), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (E), distribuição da largura das células vermelhas (RDW) (F) e contagem de plaquetas (G). Cada barra representa a média \pm desvio padrão do grupo (n = 6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. CTRL = controle.

5.5.5. Dosagem de ferro sérico

Uma vez que os ancilostomídeos se alimentam de sangue, ocorre uma espoliação no que diz respeito aos estoques de ferro sérico. No Gráfico 5 é mostrada a dosagem de ferro sérico nos grupos de hamsters controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*, no 25° DPI, no qual não foi observada uma diferença entre os dois grupos infectados, mas foi observada uma diferença entre os grupos infectados e o grupo controle não infectado, em concordância com os resultados encontrados para hepcidina e para a série eritrocítica.

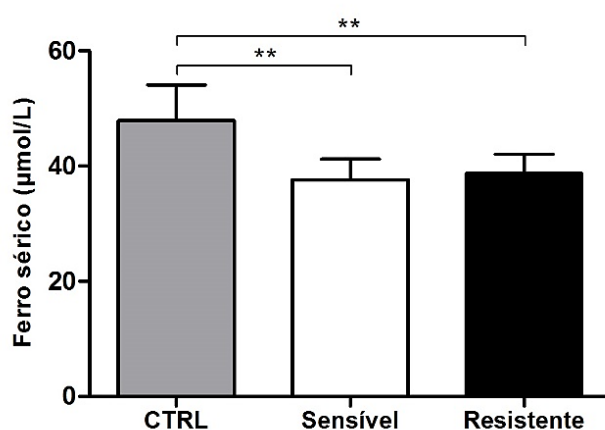


Gráfico 5 – Dosagem de ferro sérico realizado no 25° dia pós-infecção nos grupos controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*. Cada barra representa a média \pm desvio padrão do grupo (n = 6). **p<0,01. CTRL = controle.

5.5.6. Níveis de expressão de hepcidina no hospedeiro

Embora não houve diferença estatística entre os grupos infectados no que diz respeito à série sanguínea vermelha, seria possível que outro marcador mais sensível, como a análise de expressão do hormônio hepcidina no hospedeiro, fosse capaz de mostrar diferença de espoliação entre as cepas, já que foi observada uma diferença de recuperação de vermes. Como explicado anteriormente, esse hormônio está relacionado com o metabolismo de ferro do hospedeiro. No Gráficos 6 são mostrados os níveis de expressão de hepcidina no fígado dos grupos de hamsters controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*, no 25° DPI. Contudo, mesmo com o uso desse marcador, não foi observada uma diferença entre

os dois grupos infectados, porém, foi observada uma diferença entre os grupos infectados e o grupo controle não infectado, condizendo com os achados das análises da série eritrocítica.

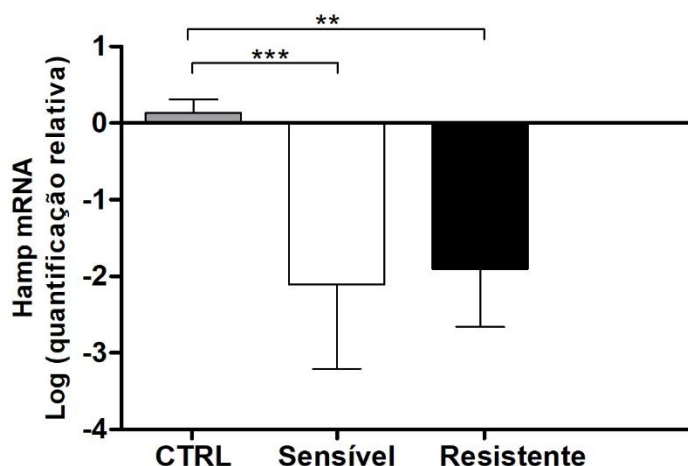


Gráfico 6 – Níveis de expressão de hepcidina no fígado dos grupos de hamsters controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*, no 25º dia pós-infecção. Cada barra representa a média \pm desvio padrão do grupo (n = 6). **p<0,01; ***p<0,001. CTRL = controle.

5.5.7. Aferição de massa

Levando em consideração uma maior recuperação de vermes na cepa sensível, seria possível que os animais infectados com essa cepa sofressem maior espoliação e, conseqüentemente, maior perda de massa. No Gráfico 7 é apresentada a massa dos grupos de hamsters controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*, no dia da infecção e a cada seis dias pós-infecção, mostrando que não houve diferença entre os dois grupos infectados, entretanto, houve diferença entre os grupos infectados e o grupo controle não infectado a partir do 12º DPI.

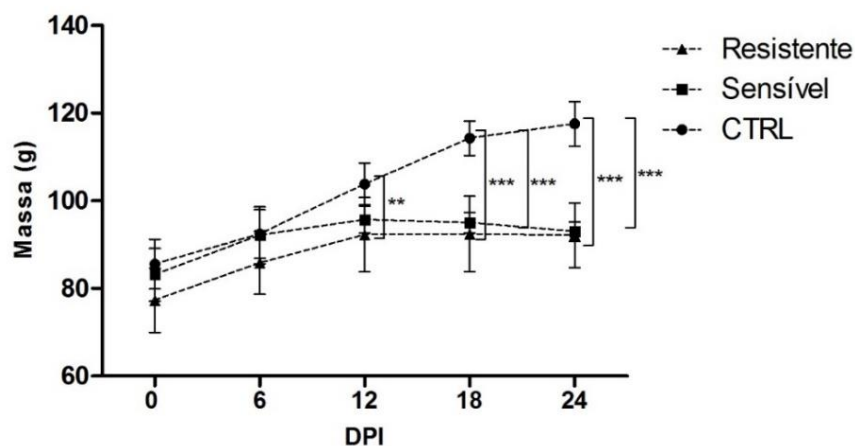


Gráfico 7 – Massa dos grupos de hamsters controle não infectado, infectado com a cepa sensível e infectado com a cepa resistente de *A. ceylanicum*, no dia da infecção (dia 0) e a cada seis dias pós-infecção. n = 6. **p<0,01; ***p<0,001. CTRL = controle.

5.6. Teste de eclodibilidade de larva (EHT)

O EHT apresentou diferença significativa no número de larvas quando os ovos foram incubados com as concentrações de 0,1; 1 e 2 µg/mL de albendazol. No Gráfico 8 é mostrada a porcentagem de eclodibilidade de larva de cada cepa na ausência do fármaco e na incubação com diferentes concentrações de albendazol.

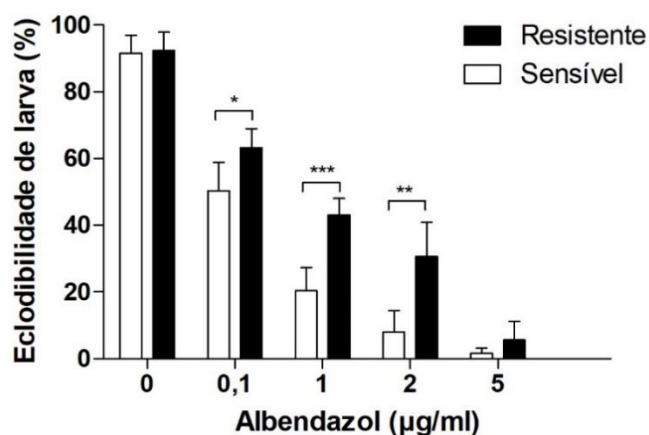


Gráfico 8 – Teste de eclodibilidade de larva da cepa resistente e sensível de *A. ceylanicum* ao albendazol. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. n = 50.

5.7. Varredura de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*

Foi analisado o DNA genômico de 50 vermes da espécie de *A. ceylanicum* da cepa resistente. Todos os três códons foram analisados por RFLP-PCR, todavia, foi necessária a realização de uma etapa de mutagênese sítio-dirigida para os códons 198 e 200. Nenhuma das amostras apresentaram os canônicos SNPs relacionados à resistência aos benzimidazóis. O sequenciamento de 20% (10/50) dessas amostras validou as técnicas padronizadas. Na Figura 26 são apresentados géis demonstrativos da varredura da mutação nos códons 167 (26A), 198 (26B) e 200 (26C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*, respectivamente. Na Figura 27 são apresentados cromatogramas representativos referentes ao sequenciamento das regiões dos códons 167, 198 e 200. Em vista dessa ausência de mutações, foi realizada a construção da minibiblioteca de cDNA da cepa resistente, no intuito de encontrar possíveis novos polimorfismos relacionados ao mecanismo de resistência da cepa selecionada.

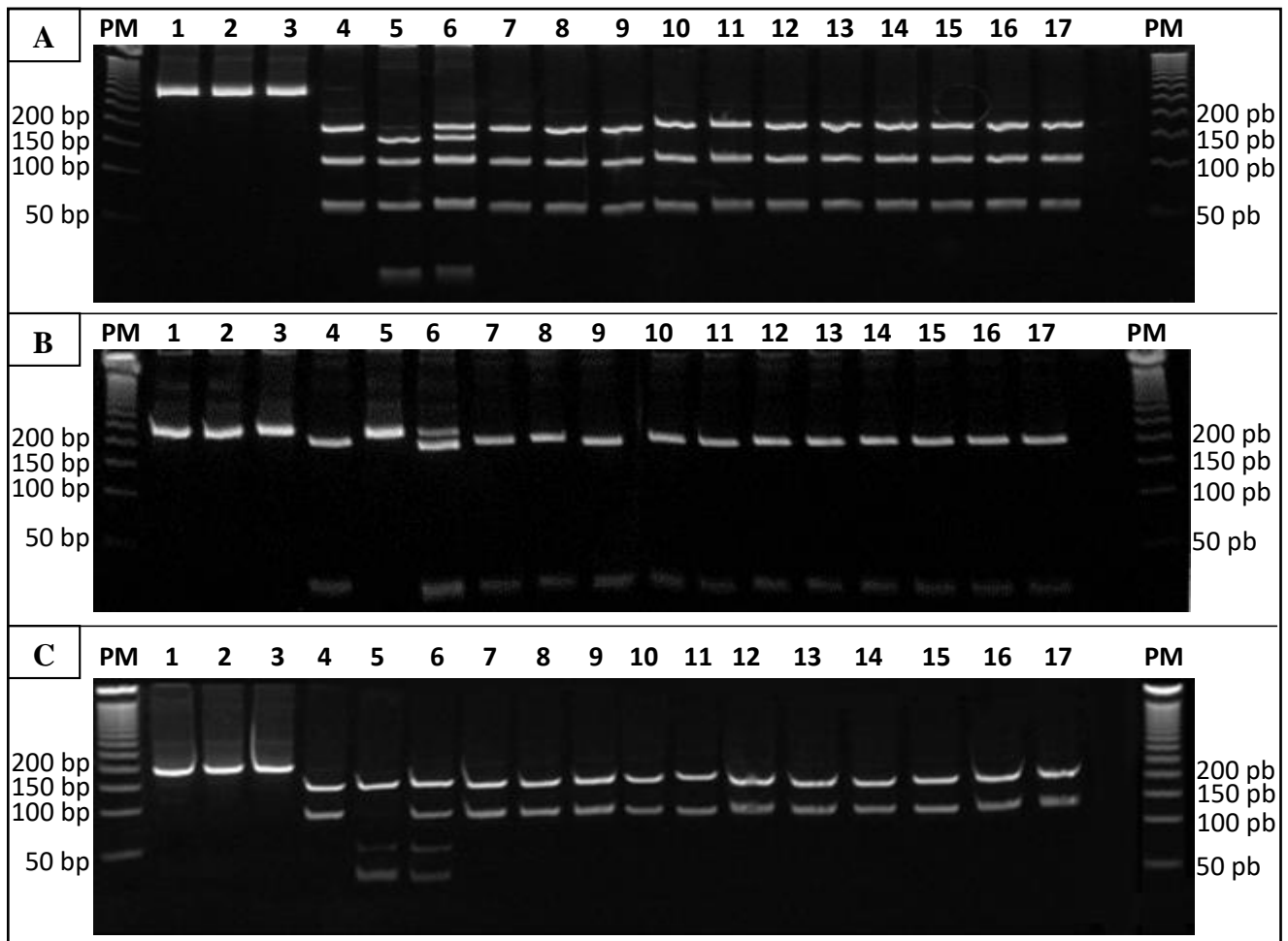


Figura 26 – Resultados demonstrativos da RFLP-PCR para varredura de SNPs nos códons 167(A), 198(B) e 200(C) do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*. Amostras individuais de DNA genômico do nematódeo, após duas PCRs, foram submetidas à digestão com enzima de restrição (*RsaI* para os códons 167 e 200; e *DdeI* para o códon 198). Nas canaletas de 1 a 6 foram utilizados controles (1 e 4: plasmídeo sem mutação; 2 e 5: plasmídeo com mutação; 3 e 6: mix de plasmídeos com e sem mutação). Com exceção do produto de PCR com plasmídeos das canaletas de 1 a 3, todas as outras canaletas apresentam produtos de PCR após digestão. As canaletas de 7 a 17 apresentam produto de PCR de vermes. Fragmentos esperados (pb) – códon 167: homocigoto sem mutação: 162 + 95 + 49, homocigoto com mutação: 138 + 95 + 49 + 24, heterocigoto: 162 + 138 + 95 + 49 + 24; códon 198: homocigoto sem mutação: 186 + 28, homocigoto com mutação: 214, heterocigoto: 214 + 186 + 28; códon 200: homocigoto sem mutação: 137 + 71, homocigoto com mutação: 137 + 41 + 30, heterocigoto: 137 + 71 + 41 + 30. A imagem mostra géis de acrilamida 12%, corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos). PM: peso molecular de 50 pb.

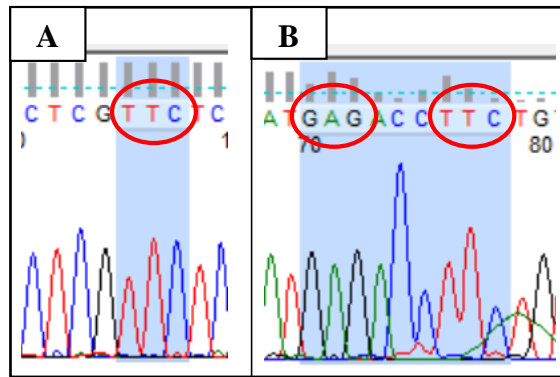


Figura 27 – Cromatogramas correspondentes às regiões dos códons 167 (A) e dos códons 198 e 200 do gene da β -tubulina da cepa de *A. ceylanicum* resistente.

5.8. Construção da minibiblioteca de cDNA do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum*

A partir do sequenciamento do cDNA de 15 clones da cepa resistente, foram observadas duas amostras com mutação, sendo que uma das amostras apresentou duas mutações. A amostra com uma mutação apresentou alteração no códon 177, com a troca de uma adenina por uma guanina [acarretando na substituição de um ácido aspártico (GAC) por uma glicina (GGC)]. A amostra com duas mutações apresentou alteração no códon 110 e no códon 390, com a troca de uma citosina por uma timina em ambos os códons [acarretando na substituição de uma alanina (GCT) por uma valina (GTT) no códon 110, e uma arginina (CGC) por uma cisteína (TGC) no códon 390]. Na Figura 28 são mostrados os cromatogramas dessas regiões nas quais foram observadas alterações na cepa resistente. Na Figura 29 é mostrada a comparação entre as duas sequências de aminoácidos referentes às sequências do DNA sem mutação e com mutação, a partir da ferramenta Clustal Omega.

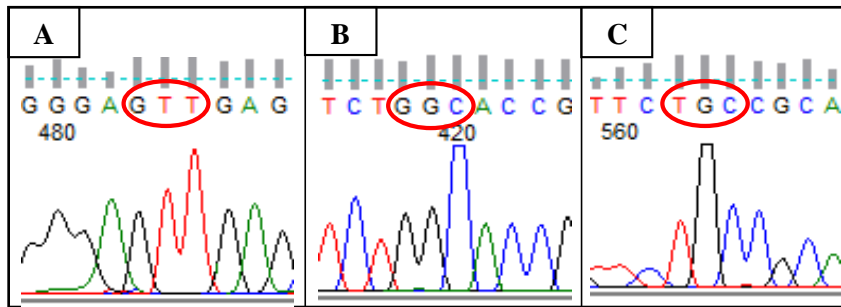


Figura 28 – Cromatogramas correspondentes ao sequenciamento das regiões dos códons 110 (A), 177 (B) e 390 (C) do gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa resistente de *A. ceylanicum*. Os códons que sofreram alteração encontram-se destacados.

```

CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment

Sequência_referência  MREIVHVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGIKPDGTYSGESDLQLERINVYNEAHGGKYV
Sequência_mutada      MREIVHVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGIKPDGTYSGESDLQLERINVYNEAHGGKYV
*****

Sequência_referência  PRAVLVDLEPGTMDSVRSRSGPYGQLFRPDNYVFGQSGAGNNWAKGHYTECAELVDNVLDVV
Sequência_mutada      PRAVLVDLEPGTMDSVRSRSGPYGQLFRPDNYVFGQSGAGNNWAKGHYTECAELVDNVLDVV
*****

Sequência_referência  RKEAEGCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMSSFSVVPSPKVSQITVV
Sequência_mutada      RKEAEGCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMSSFSVVPSPKVSQITVV
*****

Sequência_referência  EPYNATLSVHQLVENTDETFCIDNEALYDICFRTLKLTNPTYGDLNHLVSVTMSGVTTCL
Sequência_mutada      EPYNATLSVHQLVENTDETFCIDNEALYDICFRTLKLTNPTYGDLNHLVSVTMSGVTTCL
*****

Sequência_referência  RFPGQLNADLRKLAVMNMPFRLHFFMPGFAPLSAKGAQAYRALTVAELTQQMFDANKMM
Sequência_mutada      RFPGQLNADLRKLAVMNMPFRLHFFMPGFAPLSAKGAQAYRALTVAELTQQMFDANKMM
*****

Sequência_referência  AACDPRHGRYLTVAAFRGRMSMREVDDQMMSVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRG
Sequência_mutada      AACDPRHGRYLTVAAFRGRMSMREVDDQMMSVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRG
*****

Sequência_referência  LKMAATFVGNSTAIQELFKRISEQFTAMFGRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLIS
Sequência_mutada      LKMAATFVGNSTAIQELFKRISEQFTAMFGRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLIS
*****

Sequência_referência  EYQQYQEATADDMGDLDAEGGEEAYPEE*
Sequência_mutada      EYQQYQEATADDMGDLDAEGGEEAYPEE*
*****

```

Figura 29 – Alinhamento das duas sequências de aminoácidos referentes às sequências de cDNA da β -tubulina isotipo 1 de *A. ceylanicum* sem mutação e com mutação, a partir da ferramenta Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Os aminoácidos marcados correspondem aos locais nos quais as sequências divergiram.

O sequenciamento da região exônica do DNA genômico da cepa sensível de *A. ceylanicum* mostrou que três das cinco amostras apresentaram mutação que não se

repetiram em nenhum exemplar analisado da cepa resistente ou da cepa sensível. As mutações encontradas na cepa sensível ocorreram no códon 92, com a troca de uma timina por uma citosina (acarretando numa mutação silenciosa de TTT para TTC, que codificam uma fenilalanina), no códon 298, com a troca de uma adenina por uma timina [acarretando na substituição de uma asparagina (AAC) por uma isoleucina (ATC)] e no códon 371, com a troca de uma citosina por uma timina [com substituição de uma serina (TCG) por uma leucina (TTG)]. Na Figura 30 são mostrados os cromatogramas dessas regiões nas quais foram observadas alterações na cepa sensível.

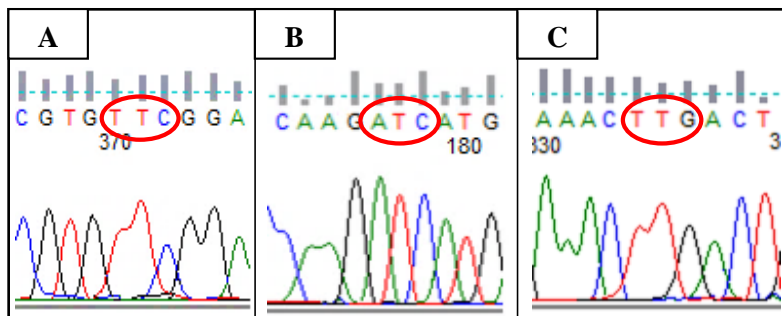


Figura 30 – Cromatogramas correspondentes ao sequenciamento das regiões dos códons 92 (A), 298 (B) e 371 (C) do gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa sensível de *A. ceylanicum*. Os códons que sofreram alteração encontram-se destacados.

6. DISCUSSÃO

O tratamento com anti-helmínticos é o principal meio de controle das helmintoses em geral, todavia, o uso indiscriminado desses medicamentos seleciona, na população alvo, parasitos naturalmente resistentes capazes de sobreviver à exposição à droga, podendo gerar linhagens de descendentes resistentes (Elard et al., 1998; Prichard et al., 2012; Albonico e Savioli, 2017). A resistência anti-helmíntica é definida como o resultado da habilidade de uma população de parasitos sobreviver ao efeito de doses terapêuticas em relação à população sensível da mesma espécie (Prichard et al., 1980). Esse evento tem sido associado à presença de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina de diversos helmintos (Kwa et al., 1994; Prichard, 2001; Ghisi et al., 2007).

Em um estudo anterior, foi realizada uma varredura da mutação no códon 200 de duas populações brasileiras de *A. caninum* (Furtado et al., 2014). No intuito de expandir a pesquisa, essa varredura foi estendida para os códons 167 e 198 dessa espécie e para os códons 167, 198 e 200 de *A. braziliense* e *N. americanus*. Assim, esse foi o primeiro trabalho que objetivou analisar SNPs ligados à resistência em três espécies de ancilostomídeos provenientes de vários estados do Brasil.

Para detecção das mutações relacionadas à resistência aos benzimidazóis, alguns testes têm sido propostos para helmintos (Schwenkenbecher et al., 2007; Walsh et al., 2007; Furtado e Rabelo, 2015) e fungos (McKay e Cooke, 1997; Fan et al., 2014). No presente trabalho, foram desenvolvidos testes moleculares para detecção de mutações no gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*, de modo que foram sintetizados controles para ausência e para a presença de cada SNP de todas as espécies.

Os códons 167 e 198 de *A. caninum* foram avaliados através de metodologias baseadas no sistema de amplificação refratária à mutação. Para tal, foi adicionada uma segunda incompatibilidade na posição 4 da extremidade 3' dos iniciadores desenhados para se anelar somente na presença da mutação (*Rr167Ac*, *Fr198Ac*) ou na ausência da mutação (*Fs167Ac*, *Rs198Ac*) (ver Figuras 9 e 10). Todavia, alguns autores não relataram a necessidade de adição dessa incompatibilidade, como Albonico et al. (2004) para análise do códon 200 de *N. americanus*. A adição dessa segunda incompatibilidade pode ser necessária para garantir o anelamento específico do iniciador em questão, assim como constatado por Furtado e Rabelo (2015) na análise do códon 200 de *A. caninum*. Esses autores salientaram que a ausência dessa segunda incompatibilidade tornou o iniciador

inespecífico, se anelando tanto na presença quanto na ausência da mutação, sugerindo que a necessidade de adição da mesma está relacionada à própria composição da sequência-alvo.

A análise do códon 167 de *A. caninum* foi possível por meio da padronização da técnica de ARMS-PCR, com duas reações para a mesma amostra, uma utilizando um par de iniciador para detectar o fragmento sem mutação e a outra com um par de iniciador para detectar o fragmento com mutação. Para essa análise, foi testada a técnica de Tetraprimer-PCR, com os quatro iniciadores na mesma reação, mas os resultados não foram satisfatórios (resultados não apresentados), com o aparecimento de muitos amplicons inespecíficos tanto para os plasmídeos recombinantes quanto para o DNA genômico. Todavia, para análise do códon 198 de *A. caninum* foram obtidos resultados satisfatórios com a Tetraprimer ARMS-PCR. A padronização dessa metodologia pode ser laboriosa devido à complexidade do bom funcionamento dos quatro iniciadores na mesma reação, podendo produzir mais fragmentos do que o esperado, já que não existe uma flexibilidade de alteração da sequência dos iniciadores, pois a região em que os iniciadores se anelam já é determinada pelo local do SNP, só sendo possível alterar os tamanhos dos iniciadores (Furtado e Rabelo, 2015). Essa técnica já foi aplicada para análise de SNPs ligados à resistência em outros helmintos (Niciura et al., 2012; Arafa et al., 2017) e fungos (Muñoz et al., 2009).

Um ponto negativo no desenvolvimento da ARMS-PCR é a ausência de iniciadores para o fragmento controle, como ocorre na Tetraprimer ARMS-PCR, mas isso pode ser resolvido a partir da realização de uma outra PCR, até mesmo utilizando iniciadores para um gene constitutivo. Todavia, como a ARMS-PCR é um teste de presença ou ausência de um SNP, uma das reações ou as duas, simultaneamente, têm que resultar em amplificação (Newton et al., 1989). Caso não haja amplificação em nenhuma das amostras, é possível que isso esteja relacionado à própria qualidade do DNA extraído, o que ressalta a importância da utilização dos plasmídeos recombinantes como controle. Outra desvantagem da ARMS-PCR em relação à Tetraprimer ARMS-PCR são os custos. Na primeira, como são realizadas duas reações, os custos são maiores quando comparados com a segunda, porém o resultado final é semelhante.

Tendo em vista que a padronização da Tetraprimer ARMS-PCR pode ser bastante complexa, as análises dos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. braziliense*, *A. ceylanicum* e *N. americanus* foram realizadas através de RFLP-PCR. Nabavi et al. (2011) e Tiwari et al. (2006) padronizaram a metodologia de RFLP-

PCR para detecção de SNP no códon 167 e no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *H. contortus*, respectivamente. Comparando essa técnica com as técnicas baseadas em amplificação refratária, existe uma desvantagem na RFLP-PCR pela necessidade de um tempo de incubação para ação enzimática, tornando o processo mais longo, além do custo relativamente elevado de algumas enzimas de restrição. Entretanto, a RFLP-PCR não necessita combinar diferentes iniciadores para realizar os ensaios.

Para analisar SNPs através de RFLP-PCR, é necessário que a mutação em questão crie ou desfaça um sítio de clivagem para alguma enzima de restrição, entretanto, nem sempre isso acontece, como observado para os códons 198 e 200 de *A. braziliense* e *A. ceylanicum*. Portanto, nessas ocasiões foi necessária a alteração em um dos iniciadores para que a PCR se constituísse em mutagênese sítio-dirigida, criando um sítio de clivagem em associação com a sequência do códon de interesse. Nesta metodologia, quanto maior o tamanho do iniciador que adicionará a alteração no DNA, melhor será a distinção dos genótipos no gel. Entretanto, nas análises para *A. braziliense* e *A. ceylanicum*, os iniciadores com alteração proposital (*Fsite198Aby* e *Fsite200Aby*) tinham o comprimento de 30 pb, um pouco maior do que os iniciadores usuais, mas permitiram a diferenciação dos genótipos de interesse. Shayan et al. (2007) desenvolveram um método semelhante para o códon 200 de *T. circumcincta*, com uma etapa inicial para criação do sítio de clivagem usando um iniciador de 42 pb responsável por incluir a alteração. Segundo esses autores, a técnica padronizada pode ser extrapolada para outras espécies com a mesma sequência-alvo. Essa premissa é válida para análise de todos os códons avaliados de *A. braziliense* e *A. ceylanicum*, já que os mesmos iniciadores, enzimas e plasmídeos recombinantes foram utilizados para ambas as espécies, as quais apresentam alta homologia nas sequências analisadas.

Trabalhos baseados em qPCR e sequenciamento já foram descritos na literatura para análises de SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 de helmintos (von Samson-Himmelstjerna et al., 2002; Walsh et al., 2007; Schwenkenbecher et al., 2007; Milhes et al., 2017). Todavia, esses métodos, embora sensíveis, exigem um equipamento específico, enquanto que as técnicas de amplificação refratária e RFLP-PCR exigem a utilização apenas de um termociclador convencional, fornecendo um resultado direto, sem necessidade de análise de gráfico ou cromatogramas. Rashwan et al. (2016) desenvolveram um ensaio de genotipagem de SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 de *N. americanus* usando o método SmartAmp2 (processo de amplificação inteligente). Segundo esses autores, a vantagem dessa técnica é que não há

necessidade de uso de equipamento sofisticado, além das reações ocorrerem em pouco tempo. Por outro lado, a combinação de vários iniciadores (de cinco a seis) numa mesma reação pode dificultar o bom funcionamento da mesma.

Alguns testes fenotípicos são descritos para diagnóstico de resistência anti-helmíntica, como o FERCT, que se baseia na contagem de ovos eliminados nas fezes antes e após o tratamento com anti-helmíntico. O FERCT é utilizado para diagnóstico fenotípico de resistência tanto em animais de produção como em humanos, sendo considerado positivo para resistência quando não se observa redução maior ou igual a 95% dos ovos excretados em relação aos números de ovos obtidos no pré-tratamento (Coles et al., 1992; Krücken et al., 2017). Embora existam relatos de padronização de FERCT para *A. braziliense* (Bienhoff et al., 2013) e para *N. americanus* (Diawara et al., 2013a), realizar o diagnóstico fenotípico de resistência em ancilostomídeos pode ser um problema, já que a quantidade de ovos liberados nas fezes do hospedeiro nem sempre é diretamente proporcional à quantidade de parasitos albergados. Krupp (1961) observou que cães infectados experimentalmente com maior carga de *A. caninum* liberaram menos ovos quando comparados com aqueles infectados com menor carga. Desse modo, avaliar resistência em hospedeiros infectados com ancilostomídeos a partir de FERCT pode não reproduzir o real cenário do problema.

No que concerne a trabalhos de genotipagem de vermes, o ideal seria usar ovo individual, como foi realizado para *N. americanus*, ou apenas verme macho na amostragem, já que os ovos dentro do útero da fêmea possuem DNA do macho que a fecundou. Ovos ainda no útero fecundados por machos homozigotos com mutação ou heterozigotos fariam as fêmeas homozigotas sem mutação parecerem heterozigotas (Schwenkenbecher e Kaplan, 2009). Isso poderia corresponder a uma limitação na varredura realizada nesse trabalho em *A. caninum* e *A. braziliense*, uma vez que foram analisadas amostras de machos e fêmeas. Todavia, a única mutação encontrada nessas duas espécies foi em um exemplar macho de *A. braziliense*. No caso da análise das sequências de *A. ceylanicum*, após seleção da cepa resistente, foram utilizados apenas exemplares machos, já que a disponibilidade de vermes era maior, uma vez que foram recuperados de hamsters experimentalmente infectados. Nesse caso, a exclusão das fêmeas não acarretou em prejuízo na amostragem.

Após padronização das técnicas moleculares, foi realizada a varredura nos SNPs de *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus* coletados de diferentes regiões do Brasil. Nenhuma das espécies avaliadas apresentou alteração no códon 167. Essa mutação foi

inicialmente descrita por Prichard (2001) para *H. contortus* e, posteriormente, relatada para *T. circumcincta* (Silvestre e Cabaret, 2002), ciatostomíneos (Drogemuller et al., 2004), *Haemonchus placei* (Brasil et al., 2012), *A. lumbricoides* e *T. trichiuria* (Diawara et al., 2013a). Schwenkenbecher et al. (2007) detectaram mutação no códon 167 e 200 em ancilostomídeos de crianças que receberam tratamento periodicamente, porém, em uma frequência muito baixa, associando esses dados com possível erro experimental da qPCR e sugerindo que, como a administração de fármaco nessa região foi focada apenas em crianças, isso confere uma quantidade de população em refugia suficiente para garantir a diluição de alelos de resistência. Shokrani et al. (2012) também não detectaram mutação no códon 167 em *H. contortus* coletados de três diferentes áreas do Irã, enquanto que Ishii et al. (2017) detectaram uma alta frequência (61,2%) dessa mutação em ciatostomíneos do Paraná. Blackhall et al. (2011), contrariando os resultados para a maioria das espécies, observou que em ciatostomíneos o polimorfismo no códon 167 foi mais frequente do que no códon 200. Pela proximidade filogenética (Blaxter et al., 1998), seria possível que isso ocorresse em ancilostomídeos, entretanto, os achados do presente trabalho não corroboram essa hipótese.

Não foi detectada a mutação no códon 198 das amostras analisadas em *A. caninum*. Por outro lado, essa mutação apresentou uma frequência relativa de 1,2% e 1,4% para *A. braziliense* e *N. americanus*, respectivamente, correspondendo, portanto, ao primeiro relato de mutação no códon 198 de *A. braziliense*. Para *N. americanus*, essa mutação foi descrita por Rashwan et al. (2016), a partir da análise de amostras de 110 indivíduos do Sri Lanka, contudo, essas análises foram realizadas em pool de 20 larvas e não individualmente, não sendo possível calcular a frequência da mutação por helminto. Nesse mesmo trabalho, das 110 amostras avaliadas, 12 apresentaram perfil de heterozigose e oito de homozigose. Sugere-se que isso pode ser útil em análises individuais, para determinar se o paciente alberga parasitos resistentes, o que pode auxiliar na escolha do fármaco a ser ministrado. Todavia, em inquéritos para determinar a frequência desses alelos na natureza, o ideal é usar exemplares individuais.

Embora pesquisada em algumas espécies, como em ciatostomíneos (Blackhall et al., 2011), *A. lumbricoides* (Diawara et al., 2013a; Rashwan et al., 2017) e *H. placei* (Ademola et al., 2015), a mutação no códon 198 somente foi descrita para *H. contortus* (Ghisi et al., 2007), *T. trichiuria* (Diawara et al., 2013a), *N. americanus* (Rashwan et al., 2016) e *T. circumcincta* (Redman et al., 2015). Schwenkenbecher e Kaplan (2009) pesquisaram, por qPCR, essa mutação em ovos e vermes adultos de *A. caninum*

recuperados de cães dos Estados Unidos, mas não a detectaram, sugerindo que estudos sistemáticos do genoma inteiro do verme podem ajudar a elucidar os mecanismos de resistência. Sugere-se que o fato da mutação no códon 198 não ser frequentemente investigada acarrete numa subestimação da sua frequência. É possível que essa mutação seja pouco descrita não pela sua inexistência nas populações, mas pela própria ausência de pesquisas. Os resultados obtidos para *A. braziliense* e *N. americanus* corroboram essa hipótese.

Como já citado, a varredura do códon 200 de *A. caninum* foi realizada anteriormente, com parte das amostras que foram utilizadas no presente trabalho, quando foi relatada pela primeira vez a presença da mutação no códon 200 dessa espécie, com frequência de 0,8% (Furtado et al., 2014). Para *A. braziliense*, não foi observada a mutação no códon 200, enquanto que para *N. americanus* esse número foi de 1,1%. Diawara et al. (2013a) também detectaram frequência da mutação no códon 200 em 2,3% de ovos individuais dessa mesma espécie em humanos do Quênia, mas não a detectaram no Haiti e no Panamá, assim como Rashwan et al. (2016) não a encontraram em *N. americanus* do Sri Lanka. Contrariando esses resultados, Diawara et al. (2013b) observaram uma frequência de 36% desse SNP em amostras de *N. americanus* do Haiti que foram submetidas à administração do fármaco em massa. Todavia, essa frequência foi realizada em pool de 10 ovos por hospedeiro, não representando a frequência individual por nematódeo.

As frequências das mutações encontradas nesse trabalho podem ser consideradas baixas quando comparadas com trabalhos para outros helmintos. Dixit et al. (2017) detectaram uma frequência de 86% da mutação no códon 200 em *H. contortus*, enquanto que Mohanraj et al. (2017) observaram que 100% das larvas dessa mesma espécie também apresentaram mutação no códon 200. De modo geral, pesquisas envolvendo parasitos de animais de produção tendem a apresentar uma elevada frequência de SNPs no gene da β -tubulina isotipo 1 (Chaudhry et al., 2014). Isso pode ser atribuído às próprias estratégias de controle, nas quais os animais de produção, por motivos econômicos, periodicamente são tratados massivamente com anti-helmínticos, o que acarreta em alta pressão de seleção e consequente isolamento de parasitos resistentes (Barrère et al., 2012).

A amostra de *A. braziliense* mutada no códon 198 foi heterozigota, enquanto que as amostras de *N. americanus* mutadas nos códons 198 e 200 foram homozigotas ou heterozigotas, de modo que somente um ovo de *N. americanus* apresentou alteração em mais de um códon, com dupla heterozigose. Zhang et al. (2016b) sugeriram que a dupla

heterozigose nesses dois códonos em populações de *H. contortus* da China indicam o uso excessivo de drogas ao longo do tempo, ao passo que Barrère et al. (2012) observaram que a dupla heterozigose nos códonos 167 e 200 conferiram resistência em *H. contortus* a uma dose três vezes maior do que a dose recomendada no tratamento. Nenhuma das amostras avaliadas nesse trabalho apresentou dupla homozigose. Esses dados estão de acordo com os achados de Lourdes Mottier e Prichard (2008) e Zhang et al. (2016b), sugerindo que a β -tubulina pode tolerar uma mutação, mas duas mutações homozigóticas a tornam disfuncional e incompatível com a vida (Hodgkinson et al., 2008).

Por uma questão de logística, não foi possível fazer um levantamento do histórico de vida dos humanos e dos cães utilizados na presente pesquisa. Não se sabe, por exemplo, se esses hospedeiros já foram submetidos a algum tipo de tratamento anti-helmíntico, qual o fármaco utilizado nesse tratamento, bem como sua periodicidade. Assim, a ausência ou baixa frequência das mutações em questão permite levantar duas hipóteses: 1. As populações em estudo não passaram por um tratamento em massa ou, se passaram, a periodicidade da quimioprofilaxia não foi suficiente para acarretar em altos níveis de alelos mutados; contudo, a heterogeneidade das amostras (coletadas de diferentes hospedeiros de seis estados para *N. americanus* e *A. caninum*, e de dois estados para *A. braziliense*) tornam essa hipótese improvável. 2. Os SNPs canônicos no gene da β -tubulina isotipo 1 podem não corresponder ao principal mecanismo de resistência nos ancilostomídeos. Essa segunda hipótese ganha força quando associada à ausência desses SNPs em ancilostomídeos que passaram por pressão de seleção em outras partes do mundo (Albonico et al., 2004; Diawara et al., 2013a). Além disso, a própria cepa de *A. ceylanicum* resistente selecionada nesse trabalho, discutida mais adiante, suporta essa ideia.

Em relação aos SNPs encontrados nesse trabalho por estado, o único exemplar de *A. braziliense* mutado no códon 198 foi obtido de um cão proveniente de Minas Gerais. Isso coincide com os achados para o códon 200 de *A. caninum*, nos quais foram observados apenas uma amostra mutada proveniente de um único cão também de Minas Gerais (Furtado et al., 2004). Alguns hospedeiros de ambos os trabalhos são os mesmos, mas os dois exemplares mutados não foram encontrados no mesmo cão.

As amostras mutadas para o códon 198 de *N. americanus* foram oriundas de um paciente da Bahia, um do Ceará e dois de Minas Gerais. Para o códon 200, as mutações foram originárias de três pacientes do Maranhão e de um paciente de Bahia. É possível que nesses quatro estados as populações sejam submetidas ao tratamento em massa de

forma mais periódica quando comparadas com populações dos estados do Piauí e Tocantins, que não apresentaram amostras mutadas. Todavia, a baixa frequência de pacientes albergando parasitos mutados não suporta essa hipótese. Sugere-se que sejam realizados estudos de coorte com um maior número de pacientes nesses estados, a fim de acompanhar o comportamento dessas mutações ao longo do tempo.

Não se sabe se os exemplares de *A. caninum* e *A. braziliense* utilizados nesse trabalho foram proveniente de cães de rua ou de cães domésticos. É provável que cães domésticos, que possivelmente recebem doses periódicas de anti-helmínticos, alberguem parasitos resistentes com maior frequência quando comparados com cães de rua. Sugere-se que outro ponto que pode retardar o estabelecimento de parasitos resistentes em cães de rua é a própria facilidade de diluição do alelo mutado. Mesmo na presença desses alelos, se a população já não recebe tratamento, a possibilidade desse alelo mutado ser sobrepujado pelo alelo sem mutação é mais alta, já que os cães, vagando pelas ruas, tendem a se contaminar de forma mais fácil, com uma alta população em refúgio disponível.

A. caninum pode causar enterite eosinofílica (Prociv e Croese, 1996) e, assim como *A. braziliense*, esses nematódeos são importantes agentes da síndrome da larva migrans cutânea (Hasslinger, 1986). Levando em consideração que os benzimidazóis apresentam o mesmo mecanismo de ação contra ovos, larvas e vermes adultos, sugere-se que SNPs no gene da β -tubulina confirmam resistência ao tratamento contra as larvas presentes em infecções cutâneas. Inclusive, já existe relato de falha no tratamento padrão com albendazol para esse tipo de infecção, ressaltando a possibilidade de resistência ao tratamento (Quashie e Tsegah, 2015). De acordo com Quashie e Tsegah (2015), se realmente existir resistência da larva a um fármaco padrão, a situação exige uma atenção imediata, a fim de evitar a persistência da larva, o que pode levar a complicações graves.

No que diz respeito à pressão de tratamento em hamsters, esse foi o primeiro trabalho a propor a seleção *in vivo* de uma cepa resistente de *A. ceylanicum*, após tratamento sucessivo com albendazol. Rufener et al. (2009) selecionaram *in vitro* uma cepa de *H. contortus* resistente ao tiabendazol após tratamento de oito gerações do parasito, sendo que a cada geração os ovos foram tratados com fármaco, em diluição seriada. Assim, as L3 provenientes do pool no qual o fármaco eliminou $\geq 95\%$ da população foram usadas para infectar ovinos. Esse protocolo de seleção foi diferente do proposto para seleção da cepa de *A. ceylanicum*, entretanto, a própria manutenção no que diz respeito ao custo e ao trabalho do modelo utilizado pode justificar essa diferença. O

nematódeo *A. ceylanicum* pode ser mantido facilmente em hamsters e, portanto, submeter grupos infectados a diferentes dosagens do fármaco *in vivo* torna o modelo mais fiel ao que acontece em campo. A desvantagem é que hamsters adquirem imunidade contra *A. ceylanicum* e não permitem reinfecção, o que impossibilita o uso dos mesmos animais durante o experimento (Behnke et al., 1997).

O EHT confirmou o diagnóstico fenotípico de resistência ao albendazol na cepa de *A. ceylanicum* que sofreu uma pressão de seleção. Nesse teste para avaliação da eclodibilidade das larvas, foram recuperados um maior número de larvas da cepa resistente em três concentrações de albendazol utilizadas (0,1; 1 e 2 µg/mL), com diferença significativa quando comparada com a cepa sensível. Humphries et al. (2013) avaliaram a sensibilidade de amostras de ancilostomídeos de humanos antes e após o tratamento com albendazol através do EHT. Esses autores observaram que na maior concentração do fármaco (5 µg/mL), a eclodibilidade foi 2,3 vezes maior nas amostras pós-tratamento, sugerindo que essa diferença não foi significativa devido à pequena amostragem. Segundo Albonico et al. (2005), o EHT é simples para ser realizado a campo e pode ser usado para monitorar a eficácia dos benzimidazóis em ancilostomídeos de humanos.

No intuito de desvendar os mecanismos envolvidos no processo de resistência, foi realizada uma varredura dos SNPs nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa de *A. ceylanicum* resistente. Os 50 vermes resistentes analisados através de RFLP-PCR e sequenciamento de 20% das amostras não apresentaram nenhuma dessas três mutações, o que sugere a participação de outros mecanismos moleculares. Ishii et al. (2017) observaram uma relação positiva entre resistência aos benzimidazóis e presença de mutação no códon 172 do gene da β -tubulina isotipo 1 de ciatostomíneos de equinos. SNPs nos códons 6, 50, 134, 165 e 240 desse mesmo gene já foram associados com resistência aos benzimidazóis em fungos (McKay e Cooke, 1997; Ma et al. 2005). Seria possível que essas alterações estivessem presentes em *A. ceylanicum*, levando em consideração o mesmo mecanismo de ação do fármaco em diferentes espécies. Dessa forma, a construção de uma minibiblioteca de cDNA do gene da β -tubulina poderia esclarecer novos possíveis SNPs.

Mutações não sinônimas nos códons 110, 177 e 390 do gene da β -tubulina foram encontradas a partir da análise da minibiblioteca de cDNA das amostras da cepa resistente, todavia, esses SNPs não foram reprodutíveis em diferentes amostras. É possível que essas alterações observadas a partir da análise da minibiblioteca estejam

relacionadas com resistência ao albendazol na cepa selecionada, contudo, a baixa frequência e a falta de reprodutibilidade desses SNPs, para diferentes clones, levam a crer que, se realmente estiverem relacionadas ao processo, essas alterações não correspondem ao principal mecanismo de resistência em *A. ceylanicum*. Embora uma mutação silenciosa no códon 92 tenha sido observada no gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa sensível, outras duas mutações não silenciosas nos códons 298 e 371 também foram detectadas nessa cepa. Esses dados levam a acreditar que essas mutações tanto na cepa resistente como na sensível se devem a um processo estocástico, possivelmente sem relação com a pressão seletiva que os vermes sofreram.

Em células tumorais, um tipo específico de regulação pós-transcrição, incluindo alteração na expressão ou atividade de micro-RNA (miRNA), tem sido relacionado com resistência ao tratamento (Devaney et al., 2010). Conforme Simon (2008), os miRNAs em *C. elegans* desempenham um importante papel no mecanismo de resistência ao fármaco, como o seguinte mecanismo: o micro-RNA do tipo 1 (miR-1) regula negativamente a expressão de dois receptores nicotínicos (nAChR), UNC-29 e UNC-63. Em situações onde o miR-1 se apresenta mutado, a expressão de UNC-29 e UNC-63 está aumentada, diminuindo a sensibilidade da acetilcolina e, conseqüentemente, ao levamisol. Kopp (2009) observou que após o tratamento com pirantel, mudanças nos níveis de transcrição dos genes nAChR UNC-29, UNC-38 e UNC-63 foram detectadas em *A. caninum*. Nesse mesmo trabalho, um isolado altamente resistente mostrou expressão diminuída dos três genes, em comparação com um isolado com um baixo nível de resistência, porém não foi avaliada a participação de miRNA no processo. Levando em consideração que pode existir resistência cruzada entre medicamentos de diferentes classes (Lourdes Mottier e Prichard, 2008), é possível que a cepa de *A. ceylanicum* resistente ao albendazol também seja resistente ao pirantel ou a outros medicamentos.

Lourdes Mottier e Prichard (2008) relataram que o uso periódico de ivermectina e moxidectina em cepas de *H. contortus* aumentou a frequência de mutação nos códons 167, 198 e 200 no gene da β -tubulina isotipo 1. Esteban-Ballesteros et al. (2017) observaram que após tratamento com ivermectina, a frequência da mutação no códon 200 no gene da β -tubulina isotipo 1 de *Trichostrongylus colubriformis* passou de 23,2% para 100%, enquanto que Ashraf et al. (2015) não observaram nenhuma relação entre esses SNPs e resistência à ivermectina ou à moxidectina em *H. contortus*. Seria interessante realizar testes *in vivo* com dosagens de diferentes drogas para tratamento da cepa de *A. ceylanicum* resistente. Além disso, seria importante determinar se essa cepa é resistente a

outros medicamentos da própria classe dos benzimidazóis, como o mebendazol. Entretanto, a falta de adaptação da cepa de *A. ceylanicum* resistente, discutida adiante, ocasionou a perda da mesma, acarretando na impossibilidade de realização desses testes.

Blackhall et al. (2008) sugeriram que outros mecanismos independentes do alvo de ligação do fármaco podem influenciar na resistência aos benzimidazóis em *H. contortus*, relatando que as alterações na família de genes da glicoproteína-P podem contribuir como mecanismo alternativo, sendo que uma das funções dessa proteína é permitir o efluxo da droga do interior da célula. Segundo os mesmos autores, esse mecanismo pode envolver um aumento da expressão da proteína em células intestinais do helminto, reduzindo assim o acesso da droga para outros tecidos do verme. Dessa forma, o mecanismo de resistência estaria relacionado a uma limitação da quantidade de droga a atingir o alvo (Kerboeuf et al., 2003; Beech et al., 2011). Wilkinson et al. (2012) sugeriram que um SNP no códon 687 de um dos genes da glicoproteína-P está associado à resistência ao triclabendazol em *Fasciola hepatica*. Contudo, Elliott e Spithill (2014) observaram a ausência desse mesmo SNP em duas populações australianas de *F. hepatica* comprovadamente resistentes ao triclabendazol. É possível que o mecanismo de resistência na cepa de *A. ceylanicum* selecionada esteja relacionado aos genes da família da glicoproteína-P, entretanto, os dados obtidos não permitem a comprovação dessa hipótese.

Melo e Bevilaqua (2005) sugerem que existem diferenças fisiológicas entre cepas resistentes e sensíveis, ressaltando a possibilidade de que cepas resistentes podem apresentar características mais patogênicas. Entretanto, os resultados observados no presente trabalho não suportam essa hipótese. Levando em consideração a quantidade de vermes recuperados em cada cepa, a baixa recuperação observada na cepa resistente leva a crer que a mesma é menos adaptada ao hospedeiro. Esses resultados contrariam os dados de Leignel e Cabaret (2001) para *T. circumcincta*, que observaram que não houve diferença significativa na sobrevivência dos vermes adultos resistentes e sensíveis, enquanto Melo (2005) observou uma maior recuperação de vermes *H. contortus* resistentes.

Prichard (2001) observou que cepas resistentes de *C. elegans* possuem disfunções na motilidade e na musculatura da faringe. É possível que isso ocorra na cepa selecionada nesse trabalho e que isso possa contribuir para a menor adaptação dos vermes resistentes. Outro fator que poderia contribuir pra essa menor adaptação seria uma menor taxa de eclosão de larvas a partir de ovos resistentes (Elard et al., 1998), porém, os

resultados do EHT mostraram que na ausência da droga, larvas sensíveis e resistentes apresentaram uma taxa de eclodibilidade semelhante.

No que diz respeito à espoliação causada pelas duas cepas, não foi observada uma diferença significativa de massa entre os grupos de hamsters infectados com as cepas resistente e sensível, em nenhum ponto de aferição, porém, foi observada uma diferença entre os dois grupos infectados quando comparados com o grupo controle não infectado. Serafim et al. (2014) também observaram diferença de massa entre o grupo de hamsters infectados com 75 L3 de *A. ceylanicum* e o grupo não infectado. Embora o grau de patogenicidade seja diretamente proporcional à quantidade de parasitos albergados (Hotez et al., 2006), a diferença na quantidade de vermes recuperados entre as cepas sensível e resistente não foi suficiente para resultar em uma diferença de massa entre os grupos.

Uma vez que a quantificação de OPG se mostrou menor no grupo de *A. ceylanicum* resistente, já era esperada uma menor taxa de recuperação de vermes nessa cepa, embora nem sempre isso seja válido, uma vez que uma baixa carga parasitária pode acarretar numa alta liberação de ovos (Krupp, 1961). Além disso, não houve diferença significativa entre a taxa de fecundidade das fêmeas entre as duas cepas. Esses achados são semelhantes aos resultados de Maingi et al. (1990), que também observaram que uma cepa sensível de *H. contortus* apresentou maior liberação de ovos, porém, a produção de ovos por fêmea foi semelhante entre as cepas, enquanto que Prichard (2001) observou que uma cepa resistente de *C. elegans* apresentou disfunção na oviposição.

Confrontando o fato de que a cepa resistente de *A. ceylanicum* apresentou uma menor quantidade de liberação de ovos nas fezes do hospedeiro, é possível que a nula ou baixa frequência de mutação observada nos códons 167, 198 e 200 das populações de *N. americanus* seja devido à baixa oviposição de ancilostomídeos resistentes. Seguindo essa hipótese, os hospedeiros poderiam albergar os parasitos resistentes que, por liberarem uma menor quantidade de ovos nas fezes, não seriam facilmente recuperados para a realização de genotipagem. Contudo, essa mesma teoria não pode ser aplicada aos nematódeos *A. braziliense* e *A. caninum*, já que para essas espécies foram utilizados vermes adultos.

Não foi observada uma diferença significativa entre grupos infectados com a cepa resistente e a cepa sensível nos parâmetros hemoglobina, hematócrito, número total de eritrócitos, CHCM, ferro sérico e plaquetas. Todavia, foram observadas diferenças nesses parâmetros entre os grupos infectados e o grupo controle não infectado. Sabe-se que os ancilostomídeos se alimentam de sangue e, conseqüentemente, de ferro do

hospedeiro, além de ocasionar dilacerações e hemorragia no intestino do hospedeiro (Loukas e Prociw, 2001). Entretanto, embora exista uma diferença significativa entre o número de vermes recuperados nos grupos infectados, isso não foi suficiente para acarretar em uma diferença estatística nos parâmetros supracitados.

Nesse sentido, a avaliação no nível de expressão de hepcidina poderia ser mais sensível para demonstrar uma diferença de patogenicidade entre as cepas, já que esse hormônio é considerado um biomarcador para a regulação da hemostasia de ferro no hospedeiro (Camaschella et al., 2016). Quando a oferta de oxigênio é inadequada, como ocorre na anemia, acontece uma diminuição do nível de expressão de hepcidina (Meynard et al., 2014). Entretanto, os resultados da avaliação do nível de expressão desse hormônio se mostraram condizentes com os achados hematológicos e de ferro sérico, apresentando diferença entre os grupos infectados e o grupo controle não infectado, mas sem diferença entre as cepas, o que demonstra que, em termos de patogenicidade, essas duas cepas apresentam um perfil semelhante. Esses achados contrariam os dados de Kelly et al. (1978) e de Melo (2005), que observaram o aumento da patogenicidade acompanhando o aumento do nível de resistência em *H. contortus*.

Em uma infecção por ancilostomídeos, a anemia provocada é do tipo microcítica e hipocrômica (Hotez et al., 2004). Dessa forma, no que concerne aos índices hematimétricos, esperava-se um VCM (índice que avalia a média dos volumes dos eritrócitos) diminuído nos grupos infectados em relação ao grupo controle não infectado. Entretanto, embora não exista diferença entre os grupos infectados, observou-se um aumento nos grupos infectados quando comparado ao grupo controle não infectado. Tal fato ocorre devido à fase da anemia na qual o hospedeiro se encontra (Hoffbrand, 2013). Na fase inicial da anemia, devido à perda de sangue, o organismo produz mais células vermelhas. Consequentemente, ocorre um aumento no número de células jovens no sangue periférico, como reticulócitos, que são células de grande tamanho (Lorenzi, 2006). Assim, o VCM pode apresentar um aumento que não condiz com a realidade fisiológica daquele hospedeiro.

Em relação ao RDW, índice que indica a anisocitose (variação de tamanho de eritrócitos representando a percentagem de variação dos volumes obtidos), não foi observada uma diferença significativa entre os grupos. Isso implica dizer que, embora exista diferença no volume dos eritrócitos entre os grupos infectados e o grupo não infectado (indicada pelo VCM), dentro de um mesmo grupo, essa variação não é significativa.

7. CONCLUSÃO

Embora um grande número de amostras de ancilostomídeos provenientes de vários estados do Brasil tenha sido analisado, não foram observadas as mutações no códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 em nenhuma das populações. Foram observadas as mutações no códon 198 de *A. braziliense* e *N. americanus*, numa frequência de 1,2% e 1,4%, respectivamente, ao passo que a mutação no códon 200 só esteve presente em *N. americanus*, numa frequência de 1,1%. Dessa forma, esse foi o primeiro trabalho a investigar polimorfismos associados a resistência aos benzimidazóis em *A. braziliense*, com a detecção de mutação no códon 198. As mutações nos códons 198 e 200 de *N. americanus* já tinham sido descritas na literatura, em baixa frequência, condizendo com os dados do presente trabalho.

Apesar da seleção bem sucedida de uma cepa resistente de *A. ceylanicum* ao albendazol, as análises moleculares aqui realizadas não foram capazes de determinar os mecanismos envolvidos neste processo. Os SNPs comumente associados com resistência aos benzimidazóis em outros helmintos não foram encontrados no gene da β -tubulina isotipo 1 da cepa selecionada. Além disso, através da análise de uma minibiblioteca, outros SNPs presentes nesse gene foram identificados. Possivelmente, esses SNPs não são responsáveis pelo processo de resistência, já que não foram reprodutíveis em diferentes amostras. Sugere-se que sejam feitos novos estudos, no intuito de avaliar outros alvos, como a diversidade genética da glicoproteína-P ou a expressão de genes e atividade de miRNAs.

As análises fenotípicas da cepa resistente nesse estudo permitiram um conhecimento da relação parasito-hospedeiro, bem como da biologia da cepa como um todo, evidenciando que essa cepa é menos adaptada à infecção, com menor carga parasitária e, conseqüentemente, menos ovos liberados nas fezes do hospedeiro. É possível que isso também ocorra em cães e em seres humanos, o que explicaria, em parte, os resultados obtidos na varredura de SNPs das populações de ancilostomídeos coletados a campo. Contudo, são necessários outros estudos para fundamentar essa hipótese.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams VJ, Lombard CJ, Dhansay MA, Markus MB, Fincham JE 2004. Efficacy of albendazole against the whipworm *Trichuris trichiura* - a randomised, controlled trial. *S Afr Med J* 94(12):972-976.

Ademola IO, Krücken J, Ramünke S, Demeler J, von Samson-Himmelstjerna G 2015. Absence of detectable benzimidazole-resistance associated alleles in *Haemonchus placei* in cattle in Nigeria revealed by pyrosequencing of β -tubulin isotype 1. *Parasitol Res* 114(5):1997-2001.

Aguayo-Ortiz R, Méndez-Lucio O, Medina-Franco JL, Castillo R, Yépez-Mulia L, Hernández-Luis F, Hernández-Campos A 2013a. Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to β -tubulin of *Trichinella spiralis*: insights from computational and experimental data. *J Mol Graph Model* 41:12-19.

Aguayo-Ortiz R, Méndez-Lucio O, Romo-Mancillas A, Castillo R, Yépez-Mulia L, Medina-Franco JL, Hernández-Campos A 2013b. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β -tubulin binding site model. *J Mol Graph Model* 45:26-37.

Ajanga A, Lwambo NJ, Blair L, Nyandindi U, Fenwick A, Brooker S 2006. *Schistosoma mansoni* in pregnancy and associations with anaemia in northwest Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:59-63.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P 2002. Molecular Biology of the Cell, 4ª edição, Garland Science, Nova York, Estados Unidos.

Albonico M, Bickle Q, Ramsan M, Montresor A, Savioli L, Taylor M 2003. Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. *Bull World Health Organ* 81(5):343-352.

Albonico M, Crompton DW, Savioli L 1999. Control strategies for human intestinal nematode infections. *Adv Parasitol* 42:277-341.

Albonico M, Ramsan M, Wright V, Jape K, Haji HJ, Taylor M, Savioli L, Bickle Q 2002. Soil-transmitted nematode infections and mebendazole treatment in Mafia Island schoolchildren. *Ann Trop Med Parasitol* 96(7):717-726.

Albonico M, Savioli L 2017. Hookworm: a neglected resurgent infection. *BMJ* 359:j4813.

Albonico M, Wright V, Bickle Q 2004. Molecular analysis of the beta-tubulin gene of human hookworms as a basis for possible benzimidazole resistance on Pemba Island. *Mol Biochem Parasitol* 134(2): 281-284.

Albonico M, Wright V, Ramsan M, Haji HJ, Taylor M, Savioli L, Bickle Q 2005. Development of the egg hatch assay for detection of anthelmintic resistance in human hookworms. *Int J Parasitol* 35(7):803-811.

Arafa WM, Holman PJ, Craig TM 2017. Genotypic and phenotypic evaluation for benzimidazole resistance or susceptibility in *Haemonchus contortus* isolates. *Parasitol Res* 116(2):797-807.

Ásbjörnsdóttir KH, Means AR, Werkman M, Walson JL 2017. Prospects for elimination of soil-transmitted helminths. *Curr Opin Infect Dis* 30(5):482-488.

Ashraf S, Mani T, Beech R, Prichard R 2015. Macrocyclic lactones and their relationship to the SNPs related to benzimidazole resistance. *Mol Biochem Parasitol* 201(2):128-134.

Bansal Y, Silakari O 2012. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review. *Bioorg Med Chem* 20(21):6208-6236.

Barrère V, Alvarez L, Suarez G, Ceballos L, Moreno L, Lanusse C, Prichard RK 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 186:344-349.

- Bartsch SM, Hotez PJ, Asti L, Zapf KM, Bottazzi ME, Diemert DJ, Lee BY 2016. The Global Economic and Health Burden of Human Hookworm Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 10(9):e0004922.
- Beech RN, Skuce P, Bartley DJ, Martin RJ, Prichard RK, Gilleard JS 2011. Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? *Parasitology* 138(2):160-74.
- Behnke IM, Guest J, Rose R 1997. Expression of acquired immunity to the hookworm *Ancylostoma ceylanicum* in hamsters. *Parasite Immunol* 19(7):309-318.
- Bennett A, Guyatt H 2000. Reducing intestinal nematode infection: efficacy of albendazole and mebendazole. *Parasitol Today* 16:71-74.
- Bentounsi B, Khaznadar A, Cabaret J 2012. Resistance of *Trichostrongylus* spp. (Nematoda) to benzimidazole in Algerian cattle herds grazed with sheep. *Parasitol Res* 110:1021-1023.
- Bethony J, Chen J, Lin S 2002. Emerging patterns of hookworm infection: influence of aging on the intensity of *Necator* infection in Hainan Province, People's Republic of China. *Clin Infect Dis* 35(11):1336-1344.
- Bienhoff SE, Kok DJ, Roycroft LM, Roberts ES 2013. Efficacy of a single oral administration of milbemycin oxime against natural infections of *Ancylostoma braziliense* in dogs. *Vet Parasitol* 195(1-2):102-105.
- Biocca E 1951. On *Ancylostoma braziliense* (de Faria, 1910) and its morphological differentiation from *A. ceylanicum* (Looss, 1911). *J Helminthol* 25:1-10.
- Blackhall WJ, Kuzmina T, von Samson-Himmelstjerna G 2011. β -Tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naive Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. *Parasitol Res* 109:1199-1203.
- Blackhall WJ, Prichard RK, Beech RN 2008. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Vet Parasitol* 152(1-2):101-107.

Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392(6671):71-75.

Bogan JA, Armour JA, Bairden K, Galbraith EA 1987. Time of release of oxfendazole from an oxfendazole pulse-release bolus. *Vet Rec* 121(12):280.

Bojar H, Kłapeć T 2012. Contamination of soil with eggs of geohelminths in recreational areas in the Lublin region of Poland. *Ann Agric Environ Med* 19(2):267-270.

Brasil BS, Nunes RL, Bastianetto E, Drummond MG, Carvalho DC, Leite RC, Molento MB, Oliveira DA 2012. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. *Int J Parasitol* 42(5):469-479.

Brooker S, Bethony JM, Hotez PJ 2004. Human hookworm infection in the 21st century. *Adv Parasitol* 58:197-288.

Brown A, Girod N, Billett EE, Pritchard DI 1999. *Necator americanus* (human hookworm) aspartyl proteinases and digestion of skin macromolecules during skin penetration. *Am J Trop Med Hyg* 60(5):840-847.

Brown HD, Matzuk AR, Ilves IR, Peterson LH, Harris AS, Sarett LH, Egerton JR, Yaksts JJ, Campbell WC, Cuckler AC 1961. Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole, a new anthelmintic. *J Am Chem Soc* 83(7):1764-1765.

Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC 2012. Goodman e Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica, 12ª edição, Artmed/McGraw-Hill, Porto Alegre, Brasil.

Burrows RB 1962. Comparative morphology of *Ancylostoma tubaeforme* (ZEDER, 1800) and *Ancylostoma caninum* (ERCOLANI, 1859). *J Parasitol* 48(5):715-718.

Camaschella C, Pagani A, Nai A, Silvestri L 2016. The mutual control of iron and erythropoiesis. *Int J Lab Hematol* 38 Suppl 1:20-26.

Chandra S, Prasad A, Yadav N, Latchumikanthan A, Rakesh RL, Praveen K, Khobra V, Subramani KV, Misri J, Sankar M 2015. Status of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* of goats from different geographic regions of Uttar Pradesh, India. *Vet Parasitol* 208(3-4):263-267.

Chaudhry U, Miller M, Yazwinski T, Kaplan R, Gilleard J 2014. The presence of benzimidazole resistance mutations in *Haemonchus placei* from US cattle. *Vet Parasitol* 204(3-4):411-415.

Coelho WM, Amarante AF, Apolinário JC, Coelho NM, Bresciani KD 2011. Occurrence of *Ancylostoma* in dogs, cats and public places from Andradina city, São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 53(4):181-184.

Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 44 (1-2):35-44.

Conway DP 1964. Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *Am J Vet Res* 25:844-846.

Davidse LC, Flach W 1977. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* 72(1):174-193.

Devaney E, Winter AD, Britton C 2010. microRNAs: a role in drug resistance in parasitic nematodes? *Trends Parasitol* 26(9):428-433.

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

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

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

Dixit AK, Das G, Dixit P, Singh AP, Kumbhakar NK, Sankar M, Sharma RL 2017. An assessment of benzimidazole resistance against caprine nematodes in Central India. *Trop Anim Health Prod* 49(7):1471-1478.

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

Drudge JH, Leland Se Jr, Wyant ZN 1957. Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine. I. Studies of mixed infections in experimental animals. *Am J Vet Res* 18(66):133-141.

Drudge JH, Szanto J, Wyant ZN, Elam G 1964. Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabensazole, ruelene, and phenothiazine. *Am J Vet Res* 25:1512-1518.

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

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

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

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

Elliott TP, Spithill TW 2014. The T687G SNP in a P-glycoprotein gene of *Fasciola hepatica* is not associated with resistance to triclabendazole in two resistant Australian populations. *Mol Biochem Parasitol* 198(1):45-47.

Esteban-Ballesteros M, Rojo-Vázquez FA, Skuce PJ, Melville L, González-Lanza C, Martínez-Valladares M 2017. Quantification of resistant alleles in the β -tubulin gene of field strains of gastrointestinal nematodes and their relation with the faecal egg count reduction test. *BMC Vet Res* 13(1):71.

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

Fan J, Luo Y, Michailides TJ, Guo L 2014. Simultaneous quantification of alleles E198A and H6Y in the β -tubulin gene conferring benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* using a duplex real-time (TaqMan) PCR. *Pest Manag Sci* 70(2):245-251.

Fortes FS, Molento MB 2013. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesq Vet Bras* 33(12):1391-1402.

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

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

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

Furtado LF, Bello AC, dos Santos HA, Carvalho MR, Rabelo ÉM 2014. First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. *Vet Parasitol* 206(3-4):313-316.

Furtado LF, Rabelo EM 2015. Development of a new amplification refractory mutation system for detection of a single nucleotide polymorphism linked to drug resistance in *Ancylostoma caninum*. *Genet Mol Res* 14(2):5103-5111.

Garg R, Yadav CL 2009. Genotyping of benzimidazole susceptible and resistant alleles in different populations of *Haemonchus contortus* from Himalayan and sub-Himalayan regions of North-West India. *Trop Anim Health Prod* 41(7):1127-1131.

George S, Levecke B, Kattula D, Velusamy V, Roy S, Geldhof P, Sarkar R, Kang G 2016. Molecular Identification of Hookworm Isolates in Humans, Dogs and Soil in a Tribal Area in Tamil Nadu, India. *PLoS Negl Trop Dis* 10(8):e0004891.

Geurden T, Hoste H, Jacquiet P, Traversa D, Sotiraki S, Frangipane D, Regalbono A, Tzanidakis N, Kostopoulou D, Gaillac C, Privat S, Giangaspero A, Zanardello C, Noé L, Vanimisetti B, Bartram D 2014. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Vet Parasitol* 201(1-2):59-66.

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

Gordon HM, Whitlock, H 1939. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Counc Sci Ind Res* 12:50-52.

Gordon RM, Young CJ 1922. Parasites in dogs and cats in Amazonas. *An Trop Med Parasito* 16(3):297-300.

Hansen TV, Thamsborg SM, Olsen A, Prichard RK, Nejsum P 2013. Genetic variations in the beta-tubulin gene and the internal transcribed spacer 2 region of *Trichuris* species from man and baboons. *Parasit Vectors* 6:236.

Hasslinger MA 1986. Helminths of carnivores relevant to veterinary practice. *Tierarztl Prax* 14(2):265-273.

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

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

Herper M 2013. How much does pharmaceutical innovation cost? A look at 100 companies. Forbes Magazine, Pharma & Healthcare. Disponível em: <http://www.forbes.com/sites/matthewherper/2013/08/11/the-cost-of-inventing-a-new-drug-98-companies-ranked/>. Acessado em 15 de agosto de 2017.

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

Hoffbrand AV 2013. Fundamentos em hematologia. 6ª edição, Artmed, Porto Alegre, Brasil.

Hotez PJ, Bethony J, Bottazzi ME, Brooker S, Buss P 2005. Hookworm: "the great infection of mankind". *PLoS Med* 2:177-181.

Hotez PJ, Bethony J, Bottazzi ME, Brooker S, Diemert D, Loukas A 2006. New technologies for the control of human hookworm infection. *Trends Parasitol* 22:327-331.

Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM, Bottazzi ME, Loukas A, Xiao S 2004. Hookworm Infection. *N Engl J Med* 351:799-807.

Hotez, PJ 2008. Hookworm and poverty. *Ann N Y Acad Sci* 1136:38-44.

Humphries D, Simms BT, Davey D, Otchere J, Quagraine J, Terryah S, Newton S, Berg E, Harrison LM, Boakye D, Wilson M, Cappello M 2013. Hookworm infection among school age children in Kintampo north municipality, Ghana: nutritional risk factors and response to albendazole treatment. *Am J Trop Med Hyg* 89(3):540-548.

Humphries D1, Mosites E, Otchere J, Twum WA, Woo L, Jones-Sanpei H, Harrison LM, Bungiro RD, Benham-Pyle B, Bimi L, Edoh D, Bosompem K, Wilson M, Cappello M 2011. Epidemiology of hookworm infection in Kintampo North Municipality, Ghana: patterns of malaria coinfection, anemia, and albendazole treatment failure. *Am J Trop Med Hyg* 84(5):792-800.

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

Inpankaew T, Schär F, Dalsgaard A, Khieu V, Chimnoi W, Chhoun C, Sok D, Marti H, Muth S, Odermatt P, Traub RJ 2014. High prevalence of *Ancylostoma ceylanicum* hookworm infections in humans, Cambodia, 2012. *Emerg Infect Dis* (6):976-982.

Ishii JB, Arenal A, Felix A, Yoshitani U, Beech R, Molento MB 2017. Diagnosis of resistance alleles in codon 167 of the beta-tubulin (Cya-tbb-1) gene from third-stage larvae of horse cyathostomins. *Res Vet Sci* 115:92-95.

Jabbar A, Iqbal Z, Kerboeuf D, Muhammad G, Khan MN, Afaq M 2006. Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci* 79(26):2413-2431.

Jardim-Botelho A, Brooker S, Geiger SM, Fleming F, Souza Lopes AC, Diemert DJ, Corrêa-Oliveira R, Bethony JM 2009. Age patterns in undernutrition and helminth infection in a rural area of Brazil: associations with ascariasis and hookworm. *Trop Med Int Health* 13(4):458-467.

Kalkofen UP 1987. Hookworms of dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 17(6):1341-1354.

Kaplan RM, Vidyashankar AN 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 186:70-78.

Keiser J, Utzinger J 2008. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 299(16):1937-1948.

Kelly JD, Hall AC 1979. Resistance of animal helminths to anthelmintics. *Adv Pharmacol Chemother* 16:89-128.

Kelly JD, Whitlock HV, Thompson HG, Hall CA, Martin IC, Le Jambre LF 1978. Physiological characteristics of free-living and parasitic stages of strains of *Haemonchus contortus*, susceptible or resistant to benzimidazole anthelmintics. *Res Vet Sci* 25(3):376-385.

Kenyon F, Hutchings F, Morgan-Davies C, van Dijk J, Bartley DJ 2017. Worm Control in Livestock: Bringing Science to the Field. *Trends Parasitol* 33(9):669-677.

Kepha S, Mwandawiro CS, Anderson RM, Pullan RL, Nuwaha F, Cano J, Njenga SM, Odiere MR, Allen E, Brooker SJ, Nikolay B 2017. Impact of single annual treatment and four-monthly treatment for hookworm and *Ascaris lumbricoides*, and factors associated with residual infection among Kenyan school children. *Infect Dis Poverty* 6(1):30.

Kerboeuf D, Blackhall W, Kaminsky R, von Samson-Himmelstjerna G 2003. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *Int J Antimicrob Agents* 22(3):332-346.

Keri RS, Hiremathad A, Budagumpi S, Nagaraja BM 2015. Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole-Based Medicinal Chemistry. *Chem Biol Drug Des* 86(1):19-65.

Knapp-Lawitzke F, Krücken J, Ramünke S, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J 2015. Rapid selection for β -tubulin alleles in codon 200 conferring benzimidazole resistance in an *Ostertagia ostertagi* isolate on pasture. *Vet Parasitol* 209(1-2):84-92.

Koenraadt H, Somerville SC, Jones AL 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Mol Plant Path* 82:1348-1354.

Koide K 1961. Epidemiological observations on *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* and *Trichostrongylus orientalis* infestations in Niigata Prefecture, Japan. *Niigata Igakkai Zasshi* 75:1164-1181.

Kopp SR 2009. Acetylcholine receptor subunit genes from *Ancylostoma caninum*: altered transcription patterns associated with pyrantel resistance. *Int J Parasitol* 39:435-441.

Krücken J, Fraundorfer K, Mugisha JC, Ramünke S, Sift KC, Geus D, Habarugira F, Ndoli J, Sendegeya A, Mukampunga C, Bayingana C, Aebischer T, Demeler J, Gahutu JB, Mockenhaupt FP, von Samson-Himmelstjerna G 2017. Reduced efficacy of albendazole against *Ascaris lumbricoides* in Rwandan schoolchildren. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 7(3):262-271.

Krupp IM 1961. Effects of crowding and of superinfection on habitat selection and egg production in *Ancylostoma caninum*. *J Parasitol* 47: 957-961.

Kwa MS, Veenstra JG, Roos MH 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol Biochem Parasitol* 63(2):299-303.

Lacey E 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 18:885-936.

Lacey E 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 6:112-115.

Lake SL, Matthews JB, Kaplan RM, Hodgkinson JE 2009. Determination of genomic DNA sequences for beta-tubulin isotype 1 from multiple species of cyathostomin and detection of resistance alleles in third-stage larvae from horses with naturally acquired infections. *Parasit Vectors* 2 Suppl 2:S6.

Lambert SM, Nishi SM, Mendonça LR, Souza BM, Julião FS, Gusmão PS, Almeida MA 2017. Genotypic profile of benzimidazole resistance associated with SNP F167Y and F200Y beta-tubulin gene in Brazilian populations of *Haemonchus contortus* of goats. *Vet Parasitol* 8:28-34.

Leignel V, Cabaret J 2001. Massive use of chemotherapy influences life traits of parasitic nematodes in domestic ruminants. *Funct Ecol* 15:569-574.

Lewis SA, Lee MG, Cowan NJ 1985. Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J Cell Biol* 101(3):852-861.

Liu X, Yin YN, Wu JB, Jiang JH, Ma ZH 2010. Identification and characterization of carbendazim-resistant isolates of *Gibberella zae*. *Plant Disease* 94:1137-1142.

Liu Y, Zheng G, Alsarakibi M, Zhang X, Hu W, Lu P, Lin L, Tan L, Luo Q, Li G 2013. Molecular Identification of *Ancylostoma caninum* Isolated from Cats in Southern China Based on Complete ITS Sequence. *Biomed Res Int* 2013:1-6.

Livak KJ, Schmittgen TD 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.

Lorenzi TF 2006. Manual de hematologia propedêutica e clínica, 4ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.

Loukas A, Hotez PJ, Diemert D, Yazdanbakhsh M, McCarthy JS, Correa-Oliveira R, Croese J, Bethony JM 2016. Hookworm infection. *Nat Rev Dis Primers* 2:16088.

Loukas A, Prociv P 2001. Immune responses in hookworm infections. *Clin Microbiol* 14(4):689-703.

Lourdes Mottier ML, Prichard RK 2008. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet Genomics* 18(2):129-140.

Lubega GW, Prichard RK 1990. Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high-affinity binding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 38(2):221-232.

Lubega GW, Prichard RK 1991. Beta-tubulin and benzimidazole resistance in the sheep nematode *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 47:129-137.

Ludueña RF 1998. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 178:207-275.

Lyndal-Murphy M, Swain AJ, Pepper PM 2014. Methods to determine resistance to anthelmintics when continuing larval development occurs. *Vet Parasitol* 199(3-4):191-200.

Ma Z, Yoshimura MA, Holtz BA, Michailides TJ 2005. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Manag Sci* 61:449-457.

Ma Z, Yoshimura MA, Michailides TJ 2003. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Appl Environ Biol* 69:7145-7152.

Mainigi N, Scott ME, Prichard RK 1990. Effect of selection pressure for thiabendazole resistance on fitness of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology* 100(2):327-335.

Mark DL, 1975. Survival of *Ancylostoma caninum* on bluegrass pasture. *J Parasitol* 63(3):484-488.

Marocco C, Bangert M, Joseph SA, Fitzpatrick C, Montresor A 2017. Preventive chemotherapy in one year reduces by over 80% the number of individuals with soil-transmitted helminthiasis causing morbidity: results from meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 111:12-17.

Marques JP, Guimarães CR, Boas AV, Carnaúba PU, Moraes JD 2012. Contamination of public parks and squares from Guarulhos (São Paulo State, Brazil) by *Toxocara* spp. and *Ancylostoma* spp. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54(5):267-271.

McKay GJ, Cooke LR 1997. A PCR-based method to characterise and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. *FEMS Microbiol Lett* 152(2):371-378.

Melo ACFL 2005. *Caracterização do nematóide de ovinos, Haemonchus contortus, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil*, Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Ceará, Brasil.

Melo ACFL, Bevilaqua CML 2005. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*. *Rev Port Cienc Vet* 100:141-146.

Meynard D, Babitt JL, Lin HY 2014. The liver: conductor of systemic iron balance. *Blood* 123(2):168-176.

Milhes M, Guillerm M, Robin M, Eichstadt M, Roy C, Grisez C, Prévot F, Liénard E, Bouhsira E, Franc M, Jacquet P 2017. A real-time PCR approach to identify anthelmintic-resistant nematodes in sheep farms. *Parasitol Res* 116(3):909-920.

Miranda RR, Tennessen JA, Blouin MS, Rabelo EM 2008. Mitochondrial DNA variation of the dog hookworm *Ancylostoma caninum* in Brazilian populations. *Vet Parasitol* 151(1):61-67.

Mohanraj K, Subhadra S, Kalyanasundaram A, Ilangopathy M, Raman M 2017. Genotyping of benzimidazole resistant and susceptible isolates of *Haemonchus contortus* from sheep by allele specific PCR. *J Parasit Dis* 41(1):282-288.

Moraes RG 1948. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. *Rev Serv Saúde Públ* 1:507-624.

Morrison AA, Mitchell S, Mearns R, Richards I, Matthews JB, Bartley DJ 2014. Phenotypic and genotypic analysis of benzimidazole resistance in the ovine parasite *Nematodirus battus*. *Vet Research* 45:116.

Mudenda NB, Malone JB, Kearney MT, Mischler PD, Nieto PM, McCarroll JC, Vounatsou P 2012. Modelling the ecological niche of hookworm in Brazil based on climate. *Geospat Health* 6:111-123.

Muñiz-Lagunes A, González-Garduño R, López-Arellano ME, Ramírez-Valverde R, Ruíz-Flores A, García-Muñiz G, Ramírez-Vargas G, Mendoza-de Gives P, Torres-Hernández G 2015. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in Campeche State, Mexico. *Trop Anim Health Prod* 47(6):1049-1054.

Muñoz C, Gómez Talquenca S, Volpe ML 2009. Tetra primer ARMS-PCR for identification of SNP in beta-tubulin of *Botrytis cinerea*, responsible of resistance to benzimidazole. *J Microbiol Methods* 78(2):245-246.

Nabavi R, Shayan P, Shokrani H, Eslami A, Bokaie S 2011. Evaluation of Benzimidazole Resistance in *Haemonchus contortus* Using Comparative PCR-RFLP Methods. *Iran J Parasitol* 6(2):45-53.

Nalubamba KS, Mudenda NB 2012. Anthelmintic efficacy in captive wild impala antelope (*Aepyceros melampus*) in Lusaka, Zambia. *Vet Parasitol* 186(3-4):532-537.

Napier LE, Gupta CRD, Majumdar DN 1941. The Treatment of Hookworm Anaemia. *Ind Med Gaz* 76(1):1-11.

Navitsky RC, Dreyfuss ML, Shrestha J, Khattry SK, Stoltzfus RJ, Albonico M 1998. *Ancylostoma duodenale* is responsible for hookworm infections among pregnant women in the rural plains of Nepal. *J Parasitol* 84:647-651.

Ndibazza J, Muhangi L, Akishule D, Kiggundu M, Ameke C, Oweka J, Kizindo R, Duong T, Kleinschmidt I, Muwanga M, Elliott AM 2010. Effects of deworming during pregnancy on maternal and perinatal outcomes in Entebbe, Uganda: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 50:531-540.

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17(7):2503-2516.

Niciura SC, Veríssimo CJ, Gromboni JG, Rocha MI, de Mello SS, Barbosa CM, Chiebao DP, Cardoso D, Silva GS, Otsuk IP, Pereira JR, Ambrosio LA, Nardon RF, Ueno TE, Molento MB 2012. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 190(3-4):608-612.

Njue AI, Prichard RK 2003. Cloning two full-length beta-tubulin isotype cDNAs from *Cooperia oncophora*, and screening for benzimidazole resistance-associated mutations in two isolates. *Parasitology* 127(6):579-588.

Nogales E 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69:277-302.

Organização Mundial de Saúde 2012. Soil-transmitted Helminthiasis: STH: Eliminating Soil-transmitted Helminthiasis as a Public Health Problem in Children: Progress Report 2001–2010 and Strategic Plan 2011–2020.

Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H 2007. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protoc* 2(11):2857-2864.

Palcy C, Silvestre A, Sauve C, Cortet J, Cabaret J 2010. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. *Vet J* 183:68-74.

Papadopoulos E 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Rumin Res* 76:99-103.

Papaiakovou M, Pilotte N, Grant JR, Traub RJ, Llewellyn S, McCarthy JS, Krolewiecki AJ, Cimino R, Mejia R, Williams SA 2017. A novel, species-specific, real-time PCR assay for the detection of the emerging zoonotic parasite *Ancylostoma ceylanicum* in human stool. *PLoS Negl Trop Dis* 11(7):e0005734.

Pape M, von Samson-Himmelstjerna G, Schnieder T 1999. Characterisation of the beta-tubulin gene of *Cylicocyclus nassatus*. *Int J Parasitol* 29(12):1941-1947.

Paveley RA, Bickle QD 2013. Automated Imaging and other developments in whole-organism anthelmintic screening. *Parasite Immunol* 35(9-10):302-313.

Pearson MS, Tribolet L, Cantacessi C, Periago MV, Valerio MA, Jariwala AR, Hotez P, Diemert D, Loukas A, Bethony J 2012. Molecular mechanisms of hookworm disease: Stealth, virulence, and vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 130:13-21.

Pion SDS, Chesnais CB, Weil GJ, Fischer PU, Missamou F, Boussinesq M 2017. Effect of 3 years of biannual mass drug administration with albendazole on lymphatic filariasis and soil-transmitted helminth infections: a community-based study in Republic of the Congo. *Lancet Infect Dis* 17(7):763-769.

Prichard RK 1973. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *Int J Parasitol* 3:409.

Prichard RK 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol* 17: 445-453.

Prichard RK 2007. Markers for benzimidazole resistance in human parasitic nematodes? *Parasitology* 134(8): 1087-1092.

Prichard RK, Basáñez MG, Boatman BA, McCarthy JS, García HH, Yang GJ, Sripa B, Lustigman S 2012. A Research Agenda for Helminth Diseases of Humans: Intervention for Control and Elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 6:1-14.

Prichard RK, Hall CA, Kelly JD, Martin IC, Donald AD 1980. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust Vet J* 56(5):239-251.

Prociv P, Croese J 1996. Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*: hookworms reappraised in the light of a "new" zoonosis. *Acta Trop* 62(1):23-44.

Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ 2014. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors* 7:37.

Pumidonming W, Salman D, Gronsang D, Abdelbaset AE, Sangkaeo K, Kawazu SI, Igarashi M 2017. Prevalence of gastrointestinal helminth parasites of zoonotic significance in dogs and cats in lower Northern Thailand. *J Vet Med Sci* 78(12):1779-1784.

Quashie NB, Tsegah E 2015. An unusual recurrence of pruritic creeping eruption after treatment of cutaneous larva migrans in an adult Ghanaian male: a case report with a brief review of literature. *Pan Afr Med J* 21:285.

Rashwan N, Bourguinat C, Keller K, Gunawardena NK, de Silva N, Prichard R 2016. Isothermal Diagnostic Assays for Monitoring Single Nucleotide Polymorphisms in *Necator americanus* Associated with Benzimidazole Drug Resistance. *PLoS Negl Trop Dis* 10(12):e0005113.

Rashwan N, Scott M, Prichard R 2017. Rapid Genotyping of β -tubulin Polymorphisms in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. *PLoS Negl Trop Dis* 11(1):e0005205.

Redman E, Whitelaw F, Tait A, Burgess C, Bartley Y, Skuce PJ, Jackson F, Gilleard JS 2015. The Emergence of Resistance to the Benzimidazole Anthelmintics in Parasitic Nematodes of Livestock Is Characterised by Multiple Independent Hard and Soft Selective Sweeps. *PLoS Negl Trop Dis* 9(2):e0003494.

Rendell DK 2010. Anthelmintic resistance in cattle nematodes on south-west Victorian properties. *Aust Vet J* 88(12):504-509.

Requejo-Fernández JA, Martínez A, Meana A, Rojo-Vázquez FA, Osoro K, Ortega-Mora LM 1997. Anthelmintic resistance in nematode parasites from goats in Spain. *Vet Parasitol* 73(1-2):83-88.

Rinaldi L, Morgan ER, Bosco A, Coles GC, Cringoli G 2014. The maintenance of anthelmintic efficacy in sheep in a Mediterranean climate. *Vet Parasitol* 203(1-2):139-143.

Ritchie LS 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull U S Army Med Dep* 8:326.

Roberts FHS, O'Sullivan PJ 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Aust J Agricult Res* 1:99-102.

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

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

Rufener L, Kaminsky R, Mäser P 2009. *In vitro* selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of beta-tubulin. *Mol Biochem Parasitol* 168(1):120-122.

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

Santos CS, Gomes AM, Souza FS, Marques SC, Lobo MP, Oliveira DC 2017. Representações sociais de profissionais de saúde sobre doenças negligenciadas. *Esc Anna Nery* 21(1):e20170016.

Sarkar R, Rose A, Mohan VR, Ajjampur SSR, Veluswamy V, Srinivasan R, Muliyl J, Rajshekhar V, George K, Balraj V, Grassly NC, Anderson RM, Brooker SJ, Kang G 2017. Study design and baseline results of an open-label cluster randomized community-intervention trial to assess the effectiveness of a modified mass deworming program in reducing hookworm infection in a tribal population in southern India. *Contemp Clin Trials Commun* 5:49-55.

Saunders GI, Wasmuth JD, Beech R, Laing R, Hunt M, Naghra H, Cotton JA, Berriman M, Britton C, Gilleard JS 2013. Characterization and comparative analysis of the complete *Haemonchus contortus* β -tubulin gene family and implications for benzimidazole resistance in strongylid nematodes. *Int J Parasitol* 43(6):465-475.

Schad GA 1979. *Ancylostoma duodenale*: maintenance through six generations in helminth-native pups. *Exp Parasitol* 47(2):246-253.

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

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

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

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

Seguel M, Gottdenker N 2017. The diversity and impact of hookworm infections in wildlife. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 6(3):177-194.

Serafim LR, da Silva JP, de Paiva NC, dos Santos HA, Quintão Silva MG, Carneiro CM, Dias SR, Rabelo ÉM 2014. The crowding effect in *Ancylostoma ceylanicum*: density-dependent effects on an experimental model of infection. *Parasitol Res* 113(12):4611-4621.

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

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

Shepherd C, Wangchuk P, Loukas A 2018. Of dogs and hookworms: man's best friend and his parasites as a model for translational biomedical research. *Parasit Vectors* 11(1):59.

Shiferaw MB, Zegeye AM, Mengistu AD 2017. Helminth infections and practice of prevention and control measures among pregnant women attending antenatal care at Anbesame health center, Northwest Ethiopia. *BMC Res Notes* 10(1):274.

Shokrani H, Shayan P, Eslami A, Nabavi R 2012. Benzimidazole-Resistance in *Haemonchus contortus*: New PCR-RFLP Method for the Detection of Point Mutation at Codon 167 of Isotype 1 β -Tubulin Gene. *Iran J Parasitol* 7(4):41-48.

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

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

Silvestre A, Humbert JF 2000. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. *Exp Parasitol* 95(4):271-276.

Silvestre A, Leignel V, Berrag B, Gasnier N, Humbert JF, Chartiere C, Cabaret J 2002. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Vet Res* 33(5):465-480.

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

Simon DJ 2008. The microRNA miR-1 regulates a MEF-2-dependent retrograde signal at neuromuscular junctions. *Cell* 133:903-915.

Skorping A, Read AF 1998. Drugs and parasites: global experiments in life history evolution? *Eco Lett* 1(1):10-12.

Soulsby EJJ 1965. Textbook of Veterinary Clinical Parasitology. 1ª edição, Oxford: Blackwell Scientific Publications, Hoboken, Estados Unidos.

Spinosa HS, Górnaiak SL, Bernardi MM 2017. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 6ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.

Stear MJ, Bairden K, McKeller QA, Scott I, Strain S, Bishop SC 1999. The relationship between the number and size of nematodes in the abomasum and the concentration of pepsinogen in ovine plasma. *Res Vet Sci* 67(1):89-92.

Tada Y, Fujitani T, Yoneyama M 1996. Subchronic toxicity of thiabendazole (TBZ) in ICR mice. *Food Chem Toxicol* 34(8):709-716.

Tarbiat B, Jansson DS, Tydén E, Höglund J 2017. Evaluation of benzimidazole resistance status in *Ascaridia galli*. *Parasitology* 144(10):1338-1345.

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

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

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

Vera JHS 2014. *Resistência anti-helmíntica em equinos na Região Oeste do Estado de São Paulo*, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Brasil.

Veríssimo CJ, Niciura SC, Alberti AL, Rodrigues CF, Barbosa CM, Chiebao DP, Cardoso D, da Silva GS, Pereira JR, Margatho LF, da Costa RL, Nardon RF, Ueno TE, Curci VC, Molento MB 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Vet Parasitol* 187(1-2):209-216.

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

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

Weatherhead JE, Hotez PJ, Mejia R 2017. The Global State of Helminth Control and Elimination in Children. *Pediatr Clin North Am* 64(4):867-877.

Wilkinson R, Law CJ, Hoey EM, Fairweather I, Brennan GP, Trudgett A 2012. An amino acid substitution in *Fasciola hepatica* P-glycoprotein from triclabendazole-resistant and triclabendazole-susceptible populations. *Mol Biochem Parasitol* 186(1):69-72.

Wiśniewski M, Jaros S, Bąska P, Cappello M, Wędrychowicz H 2013. *Ancylostoma ceylanicum* metalloprotease 6 DNA vaccination induces partial protection against hookworm challenge infection. *Acta Parasitol* 58(3):376-383.

Wiśniewski M, Łapiński M, Daniłowicz-Luebert E, Jaros S, Długosz E, Wędrychowicz H 2016. Vaccination with a cocktail of *Ancylostoma ceylanicum* recombinant antigens leads to worm burden reduction in hamsters. *Acta Parasitol* 61(3):556-561.

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

Zhang H, Brankovics B, van der Lee TA, Waalwijk C, van Diepeningen AA, Xu J, Xu J, Chen W, Feng J 2016a. A single-nucleotide-polymorphism-based genotyping assay for

simultaneous detection of different carbendazim-resistant genotypes in the *Fusarium graminearum* species complex. *PeerJ* 4:e2609.

Zhang H, Kong F, Wang X, Liang L, Schoen CD, Feng J, Wang Z 2017. Tetra-primer ARMS PCR for rapid detection and characterisation of *Plasmopara viticola* phenotypes resistant to carboxylic acid amide fungicides. *Pest Manag Sci* 73(8):1655-1660.

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

Zhang Z, Gasser RB, Yang X, Yin F, Zhao G, Bao M, Pan B, Huang W, Wang C, Zou F, Zhou Y, Zhao J, Fang R1, Hu M 2016b. Two benzimidazole resistance-associated SNPs in the isotype-1 β -tubulin gene predominate in *Haemonchus contortus* populations from eight regions in China. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 6(3):199-206.

PRODUÇÕES RESULTANTES DA EXECUÇÃO DA TESE

Furtado LF, Rabelo ÉM 2015. Molecular analysis of the F167Y SNP in the β -tubulin gene by screening genotypes of two *Ancylostoma caninum* populations. *Vet Parasitol* 210(1-2):114-117.

Furtado LF, Alves WP, Moreira TB, Costa Junior LM, Miranda RRC, Rabelo ÉML 2016. Standardization and application of the tetraprimer ARMS-PCR technique for screening of the E198A SNP in the β -tubulin gene of hookworm populations in Brazil. *Vet Parasitol* 224:65-67.

Furtado LF, de Paiva Bello AC, Rabelo ÉM 2016. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. *Acta Trop* 162:95-102.

Rabelo EM, Zuccherato LW, **Furtado LF**. Primers, kit para diagnóstico molecular de mutações relacionadas à resistência aos benzimidazóis em *Necator americanus*, e usos. 2018. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180051962, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 16/03/2018.



Molecular analysis of the F167Y SNP in the β -tubulin gene by screening genotypes of two *Ancylostoma caninum* populations



Luis Fernando Viana Furtado*, Élica Mara Leite Rabelo

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Departamento de Parasitologia, L4 237, Laboratório de Parasitologia Molecular, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2015

Received in revised form 18 March 2015

Accepted 20 March 2015

Keywords:

Ancylostoma caninum

Drug resistance

β -tubulin

F167Y

SNP

ABSTRACT

Mutations in the β -tubulin isotype 1 gene at codons 167 (F167Y), 198 (E198A) and 200 (F200Y) have been associated with benzimidazole resistance in helminths. The F200Y polymorphism has previously been described for *Ancylostom caninum*; however, the F167Y polymorphism has not been investigated in members of the Ancylostomatidae family. The aim of this study was to screen for the F167Y polymorphism in *A. caninum* isolates recovered from naturally infected dogs in two Brazilian states. No mutation was observed at codon 167 in the 230 analyzed samples from the two populations; however, it is possible that this change may be present at a low frequency in other populations of the same species. These results highlight the importance of monitoring the genetic basis involved in the drug resistance process.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hookworms are cosmopolitan worm members of the Ancylostomatidae family that infect humans and other animals worldwide. The most widespread species is *Ancylostoma caninum*, an intestinal parasite that can cause anemia and death in young dogs (Bowman et al., 2003). The primary method of control of helminth infections in general is a mass drug administration (MDA) program, which can select for strains resistant to treatment (Redman et al., 2015). One of the main drugs used in the treatment of hookworms is the benzimidazoles, which bind the β -tubulin protein and block the polymerization of microtubules. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the β -tubulin isotype 1 gene located at codons 167 (TTC/Phe \rightarrow TAC/Tyr), 198 (GAG/Glu \rightarrow GCG/Ala) and 200 (TTC/Phe \rightarrow TAC/Tyr) have been linked to benzimidazole resistance in some

nematodes (dos Santos et al., 2014). Moreover, there are reports of failure in the use of benzimidazoles in the treatment of hookworms (Flohr et al., 2007). The F200Y polymorphism has previously been described for *A. caninum* (Furtado et al., 2014) and the human hookworm (Diawara et al., 2013); however F167Y and E198A have not been described for members of the Ancylostomatidae family. Previous studies failed to find the E198A polymorphism in *A. caninum* (Schwenkenbecher and Kaplan, 2009; Furtado et al., 2014), while the F167Y polymorphism has never been investigated in this species. Therefore, the aim of this study was to perform a screen for the F167Y polymorphism in the β -tubulin isotype 1 gene in *A. caninum* isolates recovered from naturally infected dogs in two Brazilian states.

2. Materials and methods

Worms were recovered from dogs from two Brazilian state capitals: Teresina, Piauí (PI) and Belo Horizonte, Minas Gerais (MG). The dogs were routinely subjected to

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3490 2851; fax: +55 31 3409 2970.
E-mail address: lfvfurtado@gmail.com (L.F.V. Furtado).

Table 1

Primers used, their respective annealing temperatures and positions of the substitutions (when applicable). The positions where changes have been made are underlined.

Primer (5' - 3')	Change	Annealing temperature (°C)
<i>F1</i> : AAG AGG CCG AAG GAT GCG		58
<i>Fs</i> : GAT AGG ATC ATG TCC TGG TT	C → G	58
<i>R1</i> : ATT CAT CAT GAG AAA TCG CCA		58
<i>R2</i> : CCT TCG CCT TTT CTT ACG G		58
<i>Rr</i> : GGT GAG GGG ACA ACA CAG T	G → C	60
<i>R3</i> : GGA CAA CAG AGT ACG AGG A	A → T	58

euthanasia following the approved procedures of the Municipality Health Centers of the respective Brazilian cities by the Zoonoses Control Center (CCZ). Adult worms were collected during necropsy from 9 dogs from Piauí and 10 dogs from Minas Gerais. DNA extraction from individual worms was performed employing a technique described by Waldschmidt et al. (1997) using 107 worms collected from Piauí (38 males and 69 females) and 123 worms collected from Minas Gerais (65 males and 58 females) for a total of 230 worms (103 males and 127 females). All animal procedures were approved by the animal care ethics committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (Protocol 328/12).

The primers employed in this study were designed using the program Oligo Explorer 1.4 (Gene link, USA) based on the sequence available in the NCBI database (www.ncbi.nlm.nih.gov) under accession number DQ459314.1. Table 1 lists all of the primers, the primer annealing temperatures and the position of the base that was modified when applicable. The amplification-refractory mutation system (ARMS-PCR) described by Furtado and Rabelo (2015) for F200Y was used for the molecular analysis of F167Y. First, we synthesized controls for the presence and absence of the mutation. PCR amplifications were performed using GoTaq™ Green Master Mix (Promega, USA) with a final concentration of 0.2 μM of each primer. All amplification steps were performed in a Mastercycler™ (Eppendorf, Germany) thermocycler according to the following program: 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 58 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, with a final extension step at 72 °C for 8 min. A “blank” sample was included in all amplification runs in which the DNA was replaced with water to assess the presence of possible contaminants.

To synthesize the negative control for the mutated allele at codon 167 (TubN), an initial PCR amplification was performed with the primers *F1* and *R1* (477 bp) using genomic DNA from *A. caninum*. Next, a semi-nested PCR was performed using the primers *F1* and *R2* (315 bp), and the obtained fragment was sequenced to confirm the absence of the mutation. The fragment was subsequently cloned using the pGEM™-T Easy Vector System (Promega, USA), and then transformed into XL1-blue™ cells (Phonetría, Brazil) and recovered via miniprep (Wizard™ Plus Miniprep DNA Purification System, Promega, USA). To synthesize the mutated positive control (TubM), site-directed mutagenesis was performed using the Megaprimer-PCR

technique. The cloned TubN was employed as a template for PCR amplification using the primer combination *F1* and *R3* (205 bp). The *R3* primer was designed to include a mismatch at position 8 at the 3' end of the primer that replaced an A nucleotide with a T to mimic the mutated sequence. The reaction product was subjected to electrophoresis in a 1.0% agarose gel (w/v) (Midsci, USA) and the gel was stained with GelRed™ (Biotium, USA). Then, the fragment was excised from the gel and purified (Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, UK) and the concentration was determined. Approximately 20.0 ng of the first reaction product was used as a forward megaprimer in the second reaction in combination with the reverse *R2* primer (315 bp). The product of this reaction was purified, sequenced, cloned and recovered in the same way as described for TubN.

After construction of the plasmids, screening was performed using worm genomic DNA. A first PCR amplification with the primers *F1* and *R1* (477 bp) was performed for each sample, after which a second reaction was performed using the primers *Fs* + *R2* (141 bp) and *F1* + *Rr* (212 bp). The *Fs* primer was designed to anneal only to TTC (wild type allele), while the *Rr* primer was designed to anneal only to TAC (polymorphic allele). Both primers had a mismatch at position 4 at the 3' end to ensure high specificity. The products of these reactions were subjected to electrophoresis in 1.0% agarose gels (w/v) (Midsci, USA) with 0.5x TAE buffer, and the gels were stained with GelRed™ (Biotium, USA).

3. Results and discussion

No mutation was observed at codon 167 in the 230 analyzed samples from the two populations (Fig. 1 shows a representative agarose gel image of the PCR products). Schwenkenbecher et al. (2007) reported mutations at codon 167 of *Necator americanus* recovered from children who received periodic treatment, but at a very low frequency; furthermore, the authors considered that these findings may have resulted from experimental variation in the real-time PCR analyses. This mutation has previously been described for *Ascaris lumbricoides* (Diawara et al., 2013), cyathostomes (Drogemüller et al., 2004), *Haemonchus contortus* (Prichard, 2001), *Haemonchus placei* (Brasil et al., 2012), *Teladorsagia circumcincta* (Silvestre and Cabaret, 2002) and *Trichuris trichiuria* (Diawara et al., 2013).

The F167Y polymorphism is usually found at lower frequencies in field samples compared to the other SNPs (i.e., F200Y and E198A) (Silvestre and Cabaret, 2002; Von Samson-Himmelstjerna et al., 2009). This fact gives rise to a hypothesis that position 167 may not represent a hot spot mutation with polymorphism occurring in a low frequency. However, most studies have only investigated the F200Y polymorphism, which may partly explain the large number of reports related to this SNP (Diawara et al., 2013; Morrison et al., 2014). The fact that F167Y has not been frequently investigated may underestimate its true frequency. For example, this polymorphism has never been investigated in hookworms despite the fact F167Y may correspond to the main mechanism of resistance to benzimidazoles in cyathostomes (Silvestre and Cabaret, 2002).

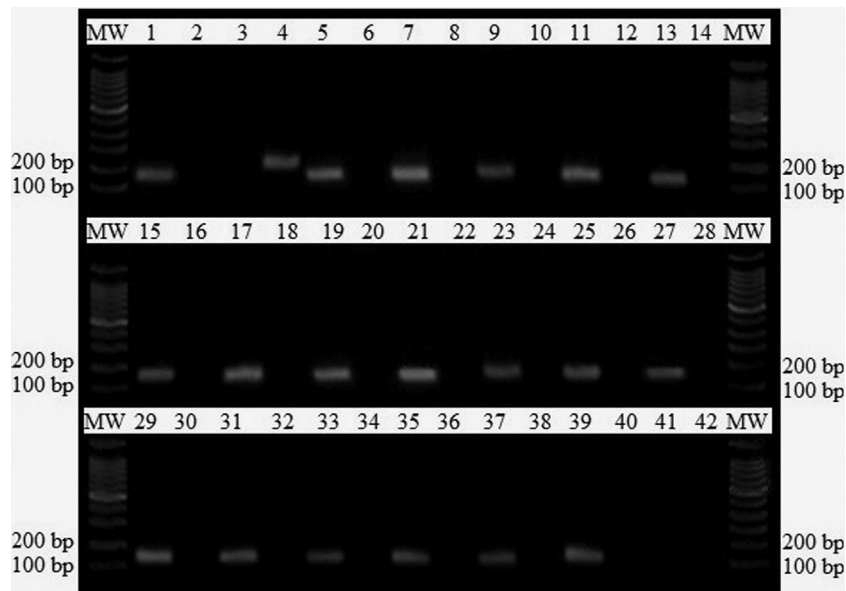


Fig. 1. Representative PCR results from the screening of codon 167. Individual worm genomic DNA samples were subjected to PCR amplification with two sets of primers. Lanes indicated by odd numbers correspond to PCR products obtained using the primer combination *F_s* and *R₂* to detect the fragment without the mutation (141 bp), while the even-numbered lanes correspond to PCR products obtained using the primer combination *F₁* and *R_r* to detect the fragment with the mutation (212 bp). In lanes 1–4, synthesized controls were used (lanes 1 and 2: TubN (plasmid with a fragment of the β -tubulin gene without the polymorphism at codon 167) and lanes 3 and 4: TubM (plasmid with a fragment of the β -tubulin gene with the polymorphism at codon 167)). For each sample, the two reactions were analyzed side-by-side. All lanes represent products from worms homozygous for the wild-type allele. Lanes 41 and 42 correspond to the blank controls for the reactions. The image shows an agarose gel (1%) stained with GelRed™ (Biotium, USA). MW: 100 bp molecular weight.

Considering the phylogenetic relatedness of these two species, it would be expected that hookworms would also present a similar polymorphism frequency at this codon; however, our results do not support this hypothesis.

In addition to nematodes, a mutation at codon 167 has been described for fungi resistant to benzimidazoles (Ma et al., 2005). Although our results showed no mutations at codon 167, it is possible that this alteration is present in *A. caninum* considering that the drug has the same mechanism of action in all of these different organisms. Moreover, it is possible that this alteration is present even in human hookworms, because there are reports of failures in the treatment of ancylostomiasis using benzimidazoles (Albonico et al., 2004; Humphries et al., 2013). However, more studies are needed to corroborate this possibility.

As stated in a previous study by our group (Furtado et al., 2014) the worms analyzed came from strays dogs, therefore it is conceivable that these dogs have not been previously exposed to antihelminthics treatment what could accounts for the lack of drug resistance selection in this population. However the aim of the study was to perform a general screening of the *A. caninum* population. That may or may not include worms that have been exposed to drugs.

We conclude that there were no changes to codon 167 in the analyzed populations. However it is possible that this change may be present in other populations of the same species, albeit at a low frequency similar to the polymorphism frequency found at codon 200 when these same populations were analyzed (Furtado et al., 2014). Nevertheless, monitoring the genetic basis involved in the drug

resistance process is important, because early detection of genotypes associated with resistance allows for the development of effective measures to control helminths.

Acknowledgments

We thank the workers of the Zoonoses Control Centers of the Brazilian cities where the samples were obtained for their cooperation. This work received financial support from PRPq/UFGM, CNPq (Process number 470968/2014-1) and FAPEMIG (Process number APQ-01924-13).

References

- Albonico, M., Wright, V., Bickle, Q., 2004. Molecular analysis of the beta-tubulin gene of human hookworms as a basis for possible benzimidazole resistance on Pemba Island. *Mol. Biochem. Parasitol.* 134 (2), 281–284.
- Bowman, D.D., Rock, T., Heaney, K., Neumann, N.R., Ulrich, M., Amodie, D., 2003. Persistent efficacy of moxidectin canine sustained-release injectable against experimental infections of *Ancylostoma caninum* and *Uncinaria stenocephala* in dogs. *Vet. Ther.* 4, 228–233.
- Brasil, B.S., Nunes, R.L., Bastianetto, E., Drummond, M.G., Carvalho, D.C., Leite, R.C., Molento, M.B., Oliveira, D.A., 2012. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 42 (5), 469–479.
- Diawara, A., Halpenny, C.M., Churcher, T.S., Mwandawiro, C., Kihara, J., Kaplan, R.M., Streit, T.G., Idaghdour, Y., Scott, M.E., Basáñez, M.G., Prichard, R.K., 2013. Association between response to albendazole treatment and β -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (5), e2247.
- dos Santos, J.M., Monteiro, J.P., Ribeiro, W.L., Macedo, I.T., Camurça-Vasconcelos, A.L., Vieira, L.S., Bevilacqua, C.M., 2014. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in

- Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil? Vet. Parasitol. 199 (3–4), 160–164.
- Drogemuller, M., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2004. Beta-tubulin complementary DNA sequence variations observed between cyathostomins from benzimidazole-susceptible and -resistant populations. J. Parasitol. 90 (4), 868–870.
- Flohr, C., Tuyen, L.N., Lewis, S., Minh, T.T., Campbell, J., Britton, J., Williams, H., Hien, T.T., Farrar, J., Quinnell, R.J., 2007. Low efficacy of mebendazole against hookworm in Vietnam: two randomized controlled trials. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76, 732–736.
- Furtado, L.F., Bello, A.C., Dos Santos, H.A., Carvalho, M.R., Rabelo, E.M., 2014. First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*? Vet. Parasitol. 206 (3–4), 313–316.
- Furtado, L.F., Rabelo, E.M., 2015. Development of a new amplification-refractory mutation system for detection of a single nucleotide polymorphism linked to drug resistance in *Ancylostoma caninum*. Genet. Mol. Res., in press.
- Humphries, D., Simms, B.T., Davey, D., Otchere, J., Quagraine, J., Terryah, S., Newton, S., Berg, E., Harrison, L.M., Boakye, D., Wilson, M., Cappello, M., 2013. Hookworm infection among school age children in Kintampo north municipality, Ghana: nutritional risk factors and response to albendazole treatment. Am. J. Trop. Med. Hyg. 89 (3), 540–548.
- Ma, Z., Yoshimura, M.A., Holtz, B.A., Michailides, T.J., 2005. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. Pest Manag. Sci. 61, 449–457.
- Morrison, A.A., Mitchell, S., Mearns, R., Richards, I., Matthews, J.B., Bartley, D.J., 2014. Phenotypic and genotypic analysis of benzimidazole resistance in the ovine parasite *Nematodirus battus*. Vet. Res. 45 (1), 116.
- Prichard, R.K., 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. Trends Parasitol. 17, 445–453.
- Redman, E., Whitelaw, F., Tait, A., Burgess, C., Bartley, Y., Skuce, P.J., Jackson, F., Gilleard, J.S., 2015. The emergence of resistance to the benzimidazole anthelmintics in parasitic nematodes of livestock is characterised by multiple independent hard and soft selective sweeps. PLoS Negl. Trop. Dis. 9 (2), e0003494.
- Silvestre, A., Cabaret, J., 2002. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? Mol. Biochem. Parasitol. 120, 297–300.
- Schwenkenbecher, J.M., Albonico, M., Bickle, Q., Kaplan, R.M., 2007. Characterization of beta-tubulin genes in hookworms and investigation of resistance-associated mutations using real-time PCR. Mol. Biochem. Parasitol. 156, 167–174.
- Schwenkenbecher, J.M., Kaplan, R.M., 2009. Real-time PCR assays for monitoring benzimidazole resistance-associated mutations in *Ancylostoma caninum*. Exp. Parasitol. 122, 6–10.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., Walsh, T.K., Donnan, A.A., Carrière, S., Jackson, F., Skuce, P.J., Rohn, K., Wolstenholme, A.J., 2009. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. Parasitology 136 (3), 349–358.
- Waldschmidt, A.M., Salomão, T.M.F., Barros, E.G., Campos, L.A.O., 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). Brazil J. Genet. 20 (3), 421–423.



Standardization and application of the tetraprimer ARMS-PCR technique for screening of the E198A SNP in the β -tubulin gene of hookworm populations in Brazil

Luis Fernando Viana Furtado^a, William Pereira Alves^a, Thayse Batista Moreira^a, Livio Martins Costa Junior^b, Rodrigo Rodrigues Cambraia Miranda^c, Éliada Mara Leite Rabelo^{a,*}

^a Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, L4 237, Laboratório de Parasitologia Molecular, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia, Av. dos Portugueses, 1966, 65500000, São Luís, Maranhão, Brazil

^c Universidade Estadual Vale do Acaraú, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Av. da Universidade, 850, Betânia, 62040-370, Sobral, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2015
Received in revised form 3 May 2016
Accepted 12 May 2016

Keywords:

β -tubulin
Tetraprimer ARMS-PCR
Drug resistance
Hookworms

ABSTRACT

The tetraprimer ARMS-PCR technique is efficient for SNP detection and can be used to search for polymorphisms associated with drug resistance. However, the establishment of this methodology is not always straightforward because of the constraints on primer design due to the restrictions of the polymorphic regions. Here, we describe the standardization of the tetraprimer ARMS-PCR methodology for the detection of a SNP at codon 198 of the *Ancylostoma caninum* β -tubulin gene. This SNP is associated with resistance to albendazole in various nematodes. The methodology was used to screen 327 individuals from 6 different locations. No mutation was found in any of the samples. This methodology will be useful for screening for the E198A SNP in the β -tubulin gene of canine hookworms in a broader population to determine whether this SNP is associated with benzimidazole resistance in this species. The method could also be adapted for the analysis of other SNPs in other nematode species.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Ancylostoma caninum is a hookworm that parasitizes the small intestine of canid species (Bowman et al., 2003). One of the methods of controlling these worms is based on administration of benzimidazoles, which can result in the selection of resistant parasites (Humphries et al., 2012). Benzimidazoles are a group of drugs that hinder the polymerization of microtubules by binding to the β -tubulin protein (Lacey, 1988). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the β -tubulin isotype 1 gene at codons 167 (TTC/Phe → TAC/Tyr – F167Y), 198 (GAG/Glu → GCG/Ala – E198A) and 200 (TTC/Phe → TAC/Tyr – F200Y) have been linked to benzimidazole resistance (von Samson-Himmelstjerna et al., 2007).

Because anthelmintic resistance has become a problem, a number of tests have been developed to assess the anthelmintic resistance genotype (von Samson-Himmelstjerna, 2006; von

Samson-Himmelstjerna et al., 2007). PCR based on the amplification refractory mutation system (tetraprimer ARMS-PCR) is a very useful tool for SNP analysis (Ye et al., 2001). This technique uses four primers, two external and two internal, in the same reaction, one primer to anneal to the non-mutated DNA and one primer to anneal to the mutated DNA.

Though in a low frequency, the F200Y SNP has been described for *A. caninum* (Furtado et al., 2014). The F167Y and E198A SNPs, despite being surveyed, have not been identified in *A. caninum* either by ARMS-PCR analysis of the F167Y SNP (Furtado and Rabelo, 2015a) or by real time PCR (qPCR) for both the F167Y and E198A SNPs (Schwenkenbecher and Kaplan, 2009). The failure to detect these SNPs may be due to the possibility that the sampled population was not large enough. Therefore, the aim of the present study was to standardize a molecular tool based on the tetraprimer ARMS-PCR and perform a screen for the E198A SNP in the β -tubulin isotype 1 gene in *A. caninum* populations.

All animal procedures were approved by the animal-care Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (Protocol 328/12). Worms were obtained from 6 Brazilian cities, Belo Hori-

* Corresponding author at: Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: elidam.rabelo@gmail.com (É.M.L. Rabelo).

zonte (Minas Gerais), Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Curitiba (Paraná), Ribeirão Preto (São Paulo), São Luís (Maranhão) and Teresina (Piauí). Adult worms were collected at necropsy from the small intestines of dogs (5 to 11 dogs from each locality) of undefined breeds, which are routinely submitted for euthanasia following the approved procedures of the Municipality Health Center from Brazilian cities by the Zoonoses Control Center (CCZ). Adult hookworms of *A. caninum* were identified morphologically and frozen at -80°C until use. DNA was extracted from the worms from each location, which varied in number: 46 were from Maranhão, 44 were from Mato Grosso do Sul, 112 were from Minas Gerais, 34 were from Paraná, 80 were from Piauí and 11 were from São Paulo, totaling 327 worms, according to [Waldschmidt et al. \(1997\)](#).

The primers employed in this study were designed using the program Oligo Explorer 1.4 (Gene link, USA) based on the sequence available in the NCBI database (GenBank accession no. DQ459314). [Table 1](#) lists the primer sequences, annealing temperatures and the position of the base that was modified. To standardize this molecular technique, we first synthesized controls for the presence and absence of the mutation. To synthesize the negative control for the mutated allele at codon 198 (*TubE*), an initial PCR amplification was performed with the primers *Fa198* and *Ra198* (588 bp) using genomic DNA from *A. caninum*. Next, nested PCR was performed using the primers *Fb198* and *Rb198* (331 bp), and the obtained fragment was sequenced to confirm the absence of a mutation. The fragment was subsequently cloned using the pGEMTM-T Easy Vector System (Promega, USA) and transformed into XL1-blueTM cells (Phonutria, Brazil) and recovered via miniprep (WizardTM Plus Miniprep DNA Purification System, Promega, USA).

To synthesize the mutated positive control (*TubA*), site-directed mutagenesis was performed using the Megaprimer-PCR technique. The cloned *TubE* was used as a template for PCR amplification using the primer combination of *Fmut* and *Rb198* (210 bp). The *Fmut* primer was designed to include a mismatch at position 8 of the 3' end of the primer that replaced an A nucleotide with a C to mimic the mutated sequence. The reaction product was subjected to electrophoresis in a 1.0% agarose gel (w/v) (Midsci, USA) with 0.5X TAE buffer, and the gel was stained with GelRedTM (Biotium, USA). The fragment was excised from the gel and purified (Illustra GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, UK), and the concentration was determined. Approximately 20.0 ng of the first reaction product was used as a forward mega-primer in the second reaction, in combination with the reverse *Fb198* primer (331 bp). The product was purified, sequenced, cloned and recovered in the same way as described for *TubE*.

PCR amplifications for synthesis of the controls were performed using GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), with a final concentration of 0.2 μM for each primer. All amplification steps were performed in a Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) thermocycler according to the following program: 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 30 cycles at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, 59 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 8 min. In all amplification runs, a "blank" sample was included in which the DNA was replaced with water. After construction of the plasmids, the standardization of the tetraprimer ARMS-PCR technique was performed with the primers *Fb198*, *Rb198*, *Fr198*

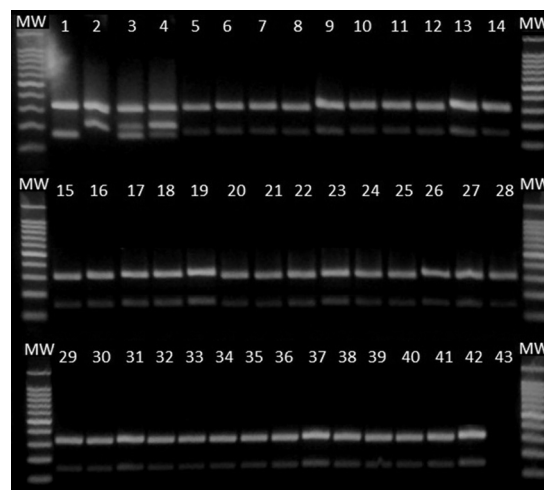


Fig. 1. Representative PCR results from screening of the E198A SNP. Individual worm genomic DNA samples were subjected to tetraprimer ARMS-PCR. In lanes 1–4, controls were used (Lane 1: *TubE*; Lane 2: *TubA*; Lane 3: *TubE*+*TubA*; Lane 4: genomic DNA+amplicon corresponding to fragment with mutation). There were 3 possible results, a homozygous worm without mutation (331 bp + 161 bp), a homozygous worm mutant (331 bp + 217 bp) and a heterozygous worm (331 bp + 161 bp + 217 bp). Lanes 5–42 present PCR products of homozygous worms without a mutation. Lane 43 correspond to the blank control for the reactions. The image shows an agarose gel (2%) that was stained with GelRedTM (Biotium, USA). MW: 100 bp molecular weight.

and *Rs198* in the same reaction. The *Fb198*+*Rb198* combination resulted in the amplification of the control fragment (331 bp), while *Fr198*+*Rb198* results in the amplification of the fragment with a mutation (217 bp), and *Fb198*+*Rs198* results in the amplification of the fragment without a mutation (161 bp). That is, there were 3 possible outcomes, homozygous worms presenting no mutations (331 bp + 161 bp), homozygous mutated worms (331 bp + 217 bp) and heterozygous worms (331 bp + 161 bp + 217 bp). To ensure that the amplification would produce three fragments in a natural event of heterozygosity, a third control was performed which was a mixture of genomic DNA from a homozygotic worm without mutation, plus the 217 bp fragment that was amplified from the mutated control. The concentration of internal primers used (*Fr198* and *Rs198*) was 0.9 μM , whereas the concentrations of the external primers (*Fb198* and *Rb198*) was 0.2 μM , in an attempt to counterbalance the intentional mismatch. After technical standardization, all *A. caninum* DNA samples were subjected to a genotype screening of the E198A SNP. Initially, conventional PCR was performed using primers *Fa198* and *Ra198* (588 bp), and then a second reaction was performed using the 4 primers (*Fb198*, *Rb198*, *Fr198* and *Rs198*).

The non-mutated homozygous profile was detected in all 327 samples analyzed (representative gel shown in [Fig. 1](#)). [Schwenkenbecher and Kaplan \(2009\)](#) also reported no mutation in codon 198 of *A. caninum* analyzed by qPCR. This mutation has already been described for *Haemonchus contortus* ([Ghisi et al., 2007](#)) and *Trichuris trichiuria* ([Diawara et al., 2013](#)). However, it has not been described, in human hookworms, *Ascaris lumbricoides* and

Table 1
Primers used, their respective annealing temperatures and positions of the substitutions (when applicable). The positions where changes have been made are underlined.

Name	Sequence (5'–3')	Position change (3'–end)	Change	Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)
<i>Fa198</i>	GAC GGG TTG GTT CTA GCC AT			60
<i>Fr198</i>	CCA GTT GGT TGA GAA TAC AGT TGC	4	A → T	59
<i>Fb198</i>	TGT AGT GAA AAA GCA GTC TCG			59
<i>Ra198</i>	AGC CGA AAG TGG AGC AAA TC			60
<i>Rb198</i>	AGG TAG TGA CAC CGG ACA TT			59
<i>Rs198</i>	CCT CGT TAT CAA TAC AGA AGC TCT	4	G → C	59
<i>Fmut</i>	GTT GAG AAT ACA GAT GCG ACC TTC	8	A → C	59

cyathostomes (Blackhall et al., 2011; Diawara et al., 2013). The F200Y SNP has been described for hookworms in a low frequency in parasites collected from dogs (Furtado et al., 2014) and from human (Diawara et al., 2013). Furtado and Rabelo (2015a) did not detect the F167Y SNP in *A. caninum*. We also found the E198A SNP to be absent in the populations we examined. In addition, the fact that female worms have also been used in this study might create problems with respect to facilitating accurate allele frequency analysis. Eggs inside females would present DNA from many males, therefore, homozygous susceptible females harboring DNA from heterozygous or homozygous mutant males would make those females appear to be heterozygotes. While this was not an impediment to the current study, and might enhance a study which sought to simply highlight the existence of a mutated allele in a population, it does represent a limitation for studies that might wish to accurately quantify the frequency of a mutated allele within the population.

The molecular tool standardized in this work corresponds to a specific and sensitive method. According to Furtado and Rabelo (2015b), although the tetraprimer ARMS-PCR technique can produce a straightforward result, its standardization, in which 4 primers must work together, is not always readily accomplished. Niciura et al. (2012) have succeeded in using the technique for analyzing polymorphism in *H. contortus*. However, the standardization of this technique was impractical for the search of the same SNP in hookworms (Furtado et al., 2014). The main drawback of this methodology, is that the primers annealing to the target DNA sequence needs to be strictly paired, without allowing for adjustment of primer pair compatibility. The use of primers in pairs separately (ARMS-PCR) is a good alternative in such cases. This methodology has been used for the independent analyses of 200 and 167 SNP on the β -tubulin isotype-1 gene from *A. caninum* (Furtado et al., 2014; Furtado and Rabelo, 2015a). However, these analyses are more laborious and costly because they require twice the number of reactions when compared to tetraprimer ARMS-PCR.

Schwenkenbecher and Kaplan (2009) developed an assay to detect a resistance SNP at codon 198, which provides a powerful tool for detection of an increasing frequency of resistance-associated mutations. Schwenkenbecher et al. (2007) reported mutations at codon 167 of *Necator americanus*, but at a very low frequency and they considered that these results may have resulted from experimental variation in the qPCR analyses. This technique would be a more appropriate tool for analyzing eggs from a faecal sample, since this represents a pooled population. In practice, it is obviously much easier, and less invasive, to obtain hookworm eggs than to obtain adults worms. On the other hand, tetraprimer ARMS-PCR may have advantages in an experimental setting where the emphasis might be more on genotyping single worms. In addition, a conventional thermal cycler is sufficient to implement tetraprimer ARMS-PCR, and the results could be obtained directly, making them less subject to interpretation errors (Furtado and Rabelo, 2015b).

Although we have analyzed samples of *A. caninum* from 6 populations, we found the E198A SNP to be absent in all populations examined. It is worth mentioning that no other study involving SNP linked to resistance in hookworms has been conducted analyzing such a large number of samples. However, it should be considered that dogs used in this study were euthanized at CCZ. Therefore, no information concerning drug treatment was available. It is conceivable that parasites with a higher frequency of SNPs related to resistance could be present in dogs receiving successive treatments. We suggest that a larger number of samples, including other geographical regions, must be analyzed in order to find out whether

this SNP is present in this species. Dogs experimentally infected with *A. caninum* subjected to constant treatments could help to elucidate the molecular mechanisms involved in the process of resistance to benzimidazole. After determination of SNPs involved in this process, it would be crucial to monitor their presence using reliable molecular techniques, in this way programs directed to prevent anthelmintic resistance could be better conducted.

Acknowledgments

We thank the workers of the Zoonoses Control Centers (CCZs) of the Brazilian cities where the samples were obtained for their cooperation. This work received financial support from PRPq/UFMG, CNPq (Process number 470968/2014-1) and FAPEMIG (Process number APQ-02417-16).

References

- Blackhall, W.J., Kuzmina, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2011. β -Tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naïve Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. *Parasitol. Res.* 109, 1199–1203.
- Bowman, D.D., Rock, T., Heaney, K., Neumann, N.R., Ulrich, M., Amodie, D., 2003. Persistent efficacy of moxidectin canine sustained-release injectable against experimental infections of *Ancylostoma caninum* and *Uncinaria stenocephala* in dogs. *Vet. Ther.* 4, 228–233.
- Diawara, A., Halpenny, C.M., Churher, T.S., Mwandawiro, C., Kihara, J., Kaplan, R.M., Streit, T.G., Idaghdour, Y., Scott, M.E., Basañez, M.G., Prichard, R.K., 2013. Association between response to albendazole treatment and β -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (5), e2247.
- Furtado, L.F., Rabelo, É.M., 2015a. Molecular analysis of the F167Y SNP in the β -tubulin gene by screening genotypes of two *Ancylostoma caninum* populations. *Vet. Parasitol.* 210 (1–2), 114–117.
- Furtado, L.F., Rabelo, E.M., 2015b. Development of a new amplification-refractory mutation system for detection of a single nucleotide polymorphism linked to drug resistance in *Ancylostoma caninum*. *Genet. Mol. Res.* 14 (2), 5103–5111.
- Furtado, L.F., Bello, A.C., Dos Santos, H.A., Carvalho, M.R., Rabelo, E.M., 2014. First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. *Vet. Parasitol.* 206 (3–4), 313–316.
- Ghisi, M., Kaminsky, R., Mäser, P., 2007. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 144, 313–320.
- Humphries, D., Nguyen, S., Boakye, D., Wilson, M., Cappello, M., 2012. The promise and pitfalls of mass drug administration to control intestinal helminth infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 584–589.
- Lacey, E., 1988. The role of the cytoskeletal protein tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18, 885–936.
- Niciura, S.C., Veríssimo, C.J., Gromboni, J.G., Rocha, M.I., de Mello, S.S., Barbosa, C.M., Chiebao, D.P., Cardoso, D., Silva, G.S., Otsuk, I.P., Pereira, J.R., Ambrosio, L.A., Nardon, R.F., Ueno, T.E., Molento, M.B., 2012. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 190 (3–4), 608–612.
- Schwenkenbecher, J.M., Kaplan, R.M., 2009. Real-time PCR assays for monitoring benzimidazole resistance-associated mutations in *Ancylostoma caninum*. *Exp. Parasitol.* 122, 6–10.
- Schwenkenbecher, J.M., Albonico, M., Bickle, Q., Kaplan, R.M., 2007. Characterization of beta-tubulin genes in hookworms and investigation of resistance-associated mutations using real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156, 167–174.
- Waldschmidt, A.M., Salomão, T.M.F., Barros, E.G., Campos, L.A.O., 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Braz. J. Genet.* 20 (3), 421–423.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W.J., McCarthy, J.S., Skuce, P.J., 2007. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. *Parasitology* 134 (Pt. 8), 1077–1086.
- von Samson-Himmelstjerna, G., 2006. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 136 (2), 99–107.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R., Day, I.N., 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic. Acids. Res.* 29 (17), e88.



Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis



Luis Fernando Viana Furtado, Ana Cristina Passos de Paiva Bello, Élide Mara Leite Rabelo*

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Departamento de Parasitologia, L4 237, Laboratório de Parasitologia Molecular, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2015

Received in revised form 16 June 2016

Accepted 18 June 2016

Available online 23 June 2016

Keywords:

Drug resistance

Benzimidazole

β -tubulin

Polymorphisms

Mass drug administration

ABSTRACT

Helminth parasites cause significant morbidity and mortality in endemic countries. Given the severity of symptoms that helminths may elicit in the host, intervention with prophylactic and therapeutic measures is imperative. Treatment with benzimidazoles is the most widely used means of combatting these parasites. However, widespread use of these drugs can select for drug-resistant parasite strains. In this review, we approach the problem of benzimidazole resistance in helminths in both humans and animals, focusing on the properties of the drug, the molecular mechanisms of drug resistance and how resistance is diagnosed.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Helminthiasis and benzimidazoles	95
2. The problem of anthelmintic resistance and predisposing factors	96
3. Differences between strains resistant and susceptible to anthelmintics	97
4. Molecular mechanisms involved in the resistance process	97
5. Methods for the detection of benzimidazole resistance	99
6. Concluding remarks	100
Acknowledgments	101
References	101

1. Helminthiasis and benzimidazoles

Human intestinal infections caused by helminth parasites result in significant morbidity and mortality in endemic countries. In 2010, it was estimated that 819, 438.9 and 464.4 million people worldwide were infected with *Ascaris lumbricoides*, hookworms and *Trichuris trichiura*, respectively (Pullan et al., 2014). These infections are closely related to poor conditions involving health, housing, hygiene, sanitation and low levels of education, thus affecting low-income populations and immunocompromised individuals (Silvestri et al., 2013). Besides its importance in human medicine, helminth infections in veterinary medicine also features

a huge problem. Parasitic diseases are among the leading causes of illness in both domestic animals and livestock, being responsible for high economic losses, especially in farm animals (Barrère et al., 2012; Roeber et al., 2013).

There are several consequences of parasitism caused by helminthes in humans and animals, including malnutrition, anorexia and irritability (Scott et al., 2013; Hotez et al., 2014). Because vaccines are not yet a reality for preventing helminth infections, treatment with different classes of anthelmintics has been the most widely used means to combat nematodes in general (Prichard et al., 2012; Taman and Azab, 2014). Currently, available anthelmintics possess different mechanisms of action and can either act locally in the gastrointestinal tract or systemically to eliminate all developmental forms of the organism in question (Vercruyssen et al., 2012).

* Corresponding author.

E-mail address: eliidam.rabelo@gmail.com (É.M.L. Rabelo).

Table 1
Common chemical structures and variations in radicals of representative components of the benzimidazole group (adapted from Brunton et al., 2012).

Common chemical structure		
R1	R2	Drug
		Thiabendazole
		Mebendazole
		Albendazole

One of the most commonly used groups of anthelmintic drugs is the benzimidazoles due to their low cost, wide range, and ease of administration. The successful production of thiabendazole in the 1960s by Brown et al. (1971) was a stimulus for the production of similar chemical formulations and facilitated the development of thiabendazole derivatives. Fenbendazole, oxfendazole, thiabendazole and oxibendazole are representatives of this group, although albendazole and mebendazole are the best-known drugs, with widespread use both in human and veterinary medicine (Prichard et al., 2012; Swanson et al., 2012; Barrère et al., 2012). Pro-benzimidazoles such as febantel, thiophanate and netobimin are anthelmintics that undergo transformation to benzimidazoles via rumen and liver metabolism in ruminants (Bogan and Armour, 1987). Benzimidazoles have a common chemical structure varying only in their radical groups, which are directly related to drug toxicity. For example, thiabendazole has a thiazole-type ring at position 2 and shows significant toxicity. This toxicity may compromise treatments and has resulted in less frequent usage (Tada et al., 1996). Table 1 shows the common structures and variations in radical groups of some members of this group.

Eukaryotes exhibit different sensitivities to benzimidazole compounds (Davidse and Flach, 1977). However, these drugs have a common primary mechanism of action, i.e., inhibition of the formation of microtubules, which are hollow structures formed by heterodimers of α - β -tubulin (Mandelkow and Mandelkow, 1990). Two large families of genes encode the α and β tubulin subunits. Each family, depending on the species, is composed of genes encoding different tubulin isoforms that possess highly conserved domains and undergo post-translational modifications (Ludueña, 1998). Furthermore, these isoforms can be preferentially expressed in specific cells and tissues. Therefore, the different combinations of α and β isoforms explain the many biological functions of microtubules, such as mitosis, cell motility, secretion and intracellular transport (Huzil et al., 2006; Fuchs et al., 2013). Microtubules are structures that are continuously polymerized by the addition of a heterodimer of α - β -tubulin to one end of the chain and loss of a heterodimer on the opposite side (Mandelkow and Mandelkow, 1990). The binding of benzimidazoles to β -tubulin occurs while the microtubule is losing a heterodimer, causing shortening and the subsequent disappearance of the microtubule (Lacey, 1988). Because microtubules play a fundamental role in the maintenance of cellular homeostasis, their loss inhibits many different mechanisms resulting in the death of all forms of parasitic helminths; thus, these drugs possess eggicidal, larvicidal and adulticidal action (Nogales, 2000). Benzimidazoles also have other mechanisms of action, such as inhibition of mitochondrial enzyme

fumarate reductase, reduced glucose transport and uncoupling of oxidative phosphorylation (Lacey 1988, 1990; Oxberry et al., 2001).

The exact site of drug binding to the β -tubulin protein is not known, although predictions have been made based on docking studies (Aguayo-Ortiz et al., 2013). The N-terminal region of the protein is described as an area of high binding affinity for the drug. According to the molecular modelling proposed by Robinson et al. (2004), the atomic structure of the α - β -tubulin dimer shows that residue 200 and the other implicated residues linked to benzimidazole resistance are buried within the protein, a position inaccessible to the solvent. However, as it is pointed out by the authors proteins are dynamic structures and they suggest several means by which these residues could become accessible to benzimidazoles. One of these mechanisms would be by the movement of the side-chains of some surface residues exposing the binding site residues. Other possibility would be by the widening of the "cleft" between the N-terminal and intermediate domains on the dissociation of dimeric tubulin into monomers during microtubule dynamics. A further possibility discussed by the authors is that the alteration in β -tubulin conformation may arise during GTP hydrolysis (Robinson et al., 2004). This would be consistent with the claim that binding occurs to the dimer during loss from the microtubule.

2. The problem of anthelmintic resistance and predisposing factors

Anthelmintic resistance has been described as the condition in which the normal dosage of a drug does not promote a consistent reduction in worm burden and excreted eggs (Silvestre et al., 2009). Thus, the first sign of resistance is provided by an increase in the number of parasites able to survive a drug dose that would be lethal to most of the sensitive population of the same species.

Currently there is evidence of resistance to the three available groups of anthelmintics in animals: benzimidazoles/probenzimidazole, tetrahydropyrimidines and macrocyclic lactones (Barrère et al., 2012; Bentounsi et al., 2012; Veríssimo et al., 2012; Falzon et al., 2013; Chaudhry et al., 2014; Muñiz-Lagunes et al., 2015). Resistance to benzimidazoles in animals has been reported in America (Brasil et al., 2012), Africa (Bentounsi et al., 2012), Asia (Garg and Yadav, 2009), Europe (Geurden et al., 2014) and Oceania (Rendell, 2010). This problem is aggravated by the limited development of novel anthelmintic drugs (Waller, 2006). According to Shalaby (2013), even when new drugs are developed, helminths will inevitably also develop resistance to these drugs. Indeed, there are already reports of the failure of monepantel against *Teladorsagia*

circumcincta and *Trichostrongylus colubriformis*, an anthelmintic that is relatively new to the market (Scott et al., 2013).

According to Jabbar et al. (2006), the development of anthelmintic resistance is influenced by factors that can be classified as genetic, biological or operational. Genetic factors relate to the frequency and perpetuation of genotypes linked to resistance, whereas biological factors are linked to pathogenic, morphological and parasitological changes that can vary in cases where the worm is resistant or sensitive (see item 3). However, the operating factors are most important because they form the basis of control programs.

With regard to operational factors, several control programs have been proposed in veterinary medicine (Kaplan and Vidyashankar, 2012). For example, the strategic treatment program is based on several epidemiological studies and involves treating all animals during peak periods of parasite burden when conditions for parasite development in the environment are unfavorable (i.e., a significant portion of the helminth fauna are exposed to the drug). This can cause large selection pressure leading to the establishment of resistant strains because it reduces the subpopulation of the free-living stage (called refugia) contaminating the environment, thereby preventing dilution of the resistance genotype. In this situation, weather conditions are directly linked to resistance; Rinaldi et al. (2014) linked the Mediterranean climate, with its hot and dry summers, as a predisposing factor for the development of anthelmintic resistance because the refugia population can be eradicated under these unfavorable conditions. According to Shalaby (2013), as the relative abundance of the refugia population increases, the rate of development of resistance decreases.

A short interval between treatments may result in very intense selection pressure on the worms (Knapp-Lawitzke et al., 2015). Additionally, other factors may predispose the establishment of resistance, such as the administration of incorrect doses (Silvestre et al., 2009). The dose to be administered to animals depends on weight; however, the weight calculation is often estimated based on an average of the herd, resulting in the administration of incorrect doses that are not effective for treatment and allowing survival of resistant parasites (Craig, 1993).

The introduction of animals harboring subpopulations of resistant parasites into a new group is one factor related to the emergence of these genotypes in a given region. For example, the first report of resistance in Spain was described after the importation of goats from the UK (Requejo-Fernández et al., 1997). Várady et al. (1994) reported international import of resistant parasites from small ruminants in New Zealand. This situation can be extrapolated to the import of human parasites from regions that undergo constant Mass Drug Administration (MDA), when individuals travelling for either work or leisure may disperse parasites possessing alleles related to resistance.

Despite the fact that the genotypes of resistance has been well characterized in nematodes of small ruminants and equines, this process is not restricted to parasites of veterinary importance. In recent years, studies have highlighted the importance of this in helminths infecting humans, demonstrating similar molecular mechanisms involved in the resistance process (Diawara et al., 2009, 2013a). According to Humphries et al. (2012), MDA in humans is a means of control with the potential to limit the transmission of helminths. In risk groups, this strategy ensures that infection levels are kept below those associated with morbidity, often resulting in improvements in health and child development (Tchuente, 2011). However, as the diversity of drugs available in the market is restricted, periodic MDA becomes a risky strategy because it induces a strong selection pressure for resistant strains (Prichard et al., 2012). This tends to aggravate the situation of parasitoses in areas with low levels of sanitation because individuals with constant exposure can be reinfected and increase their parasite load,

which is not effectively eliminated by treatment (Furtado et al., 2014).

3. Differences between strains resistant and susceptible to anthelmintics

Although the mechanism is not completely understood, it is believed that genotypes related to anthelmintic resistance may be accompanied by changes influencing other nematode characteristics, such as the survival rate of eggs and larvae in the environment, pathogenicity and infectivity (Prichard, 2001). Resistant parasites may present a more pathogenic profile, as observed by Kelly et al. (1978) for *Haemonchus contortus*, leading to death of the host and, consequently, decreasing the frequency of genotypes related to resistance. However, mechanisms such as the high survivability of free-living stages of resistant parasites offset the premature death of the host, disseminating their alleles in the population.

Divergent results have been described for *T. circumcincta* related to resistant and sensitive phenotypes. Leignel and Cabaret (2001) reported that adult *T. circumcincta* sensitive to benzimidazoles are larger in length than resistant adults, with a concomitant increase in female fertility. However, in an analysis of the characteristics of *T. circumcincta* populations sensitive and resistant to benzimidazoles, Elard et al. (1998) observed no significant difference in parameters including oviposition, rate of development of eggs to filarid larvae, ability of larvae to colonize the host and survival of adult worms. Resistant strains of the free living nematode *Caenorhabditis elegans* present abnormalities in motility, oviposition and in pharynx muscles that may be lethal to the nematode (Prichard, 2001).

4. Molecular mechanisms involved in the resistance process

The mechanisms involved in benzimidazole resistance are well established for some nematodes (Lubega and Prichard, 1990; Kwa et al., 1994). Characteristic single nucleotide polymorphisms (SNP) at codons 167, 198 and 200 of the β -tubulin gene are responsible for causing benzimidazole resistance in helminths (Kwa et al., 1994; Prichard, 2001; Ghisi et al., 2007). Although no crystal structure of the protein bearing any of these SNPs has been produced, it is believed that the presence of the SNPs in the parasite's β -tubulin gene cause a conformational change in the protein, resulting in molecular and biochemical alterations that prevent the association of the drug with its binding site (Lacey, 1988; Waller, 1990; Roos, 1990). According to Lubega and Prichard (1990), benzimidazole resistant strain of *H. contortus* exhibits a significant decrease in the expression of high-affinity benzimidazole receptors compared to the benzimidazol-sensitive strain. However, the association constant (K_a) values for the high affinity receptor are similar between the two strains. Additionally, other mutations in the β -tubulin gene have also been described for fungi that do not respond to benzimidazole treatment (McKay and Cooke, 1997).

The change in codon 200 is most often related to the resistance profile, whereas the change at codon 198 is less frequent. Helminths susceptible to benzimidazole present the TTC codon at position 200, which encodes a phenylalanine. The substitution of a second thymine for an adenine results in a tyrosine replacing the phenylalanine and may characterize the resistance phenotype (Kwa et al., 1994). Mammals naturally have a tyrosine at codon 200, which may be one reason the drug is not highly toxic for them (Lewis et al., 1985).

The change in codon 167 is similar to that at codon 200 and also results in a phenylalanine substitution for tyrosine (Prichard, 2001). The mutation at codon 198 is also characterized by the sub-

Table 2
SNPs in the β -tubulin isotype 1 gene related to benzimidazole resistance in helminthes.

Codon Number	Aminoacid replacement	Helminth	Reference
167	Phe → Tyr	<i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Cylicocycylus nassatus</i> , <i>Cyathostomum pateratum</i> , <i>Cyathostomum coronatum</i> , <i>Cyathostomum catinatum</i> , <i>Cylicostephanus longibursatus</i> and <i>Cylicostephanus goldi</i> <i>Haemonchus contortus</i> <i>Haemonchus placei</i> <i>Teladorsagia circumcincta</i> <i>Trichuris trichiuria</i>	Diawara et al., 2013a Drogemuller et al., 2004 Prichard, 2001 Brasil et al., 2012 Silvestre and Cabaret, (2002) Diawara et al., 2013a
198	Glu → Ala	<i>Haemonchus contortus</i> <i>Trichuris trichiuria</i>	Ghisi et al., 2007 Diawara et al., 2013a
200	Phe → Tyr	Human hookworms <i>Ancylostoma caninum</i> <i>Cooperia oncophora</i> <i>Cyathostomum coronatum</i> <i>Cylicocycylus nassatus</i> <i>Haemonchus contortus</i> <i>Haemonchus placei</i> <i>Teladorsagia circumcincta</i> <i>Trichostrongylus axei</i> <i>Trichostrongylus colubriformis</i> <i>Trichuris trichiuria</i> <i>Wuchereria bancrofti</i>	Diawara et al., 2013a Furtado et al., 2014 Njue and Prichard, 2003 von Samson-Himmelstjerna et al., 2002 Pape et al., 1999 Kwa et al., 1994 Chaudhry et al., 2014 Elard and Humbert, 1999 Palcy et al., 2010 Silvestre and Humbert, 2000 Diawara et al., 2009 Schwab et al., 2005

stitution of only one base, with the triplet GAG coding for glutamic acid mutated to GCG encoding an alanine (Ghisi et al., 2007). Table 2 shows the SNPs associated with resistance that have been described to date in some nematodes.

A drug-sensitive population of nematodes contains a subpopulation of individuals with a genetic ability to survive treatment. Thus, the drug is not a mutagenic agent, but it is the agent that changes the genetic composition of the population. The frequent use of the drug causes selection pressure in which the parasites harboring the mutated codon (that already exist naturally in the population) are able to tolerate the administered dosage, while those that do not present the mutation suffer the effect of the drug (Prichard, 2007). With the elimination of the sensitive population, the next generation will consist of the progeny of parasites that survived the treatment, inheriting the ability to survive exposure to the anthelmintic.

Three hypotheses were proposed by Silvestre et al. (2009) regarding the appearance of these polymorphisms associated with resistance in a natural populations of Trichostrongylid nematodes from goat: (1) the resistant allele may have existed as an ancestral allele that was introduced into farms during early herd formation of the flock; (2) spontaneous mutation may have generated new alleles after the constitution of the herd; and (3) sexual recombination between susceptible and resistant alleles may have generated new variants of existing resistant alleles. Although Silvestre et al. (2009) raise these three hypotheses for a specific isolated nematode population, we suggest that these hypotheses can be considered for different populations of helminths.

Mutations that confer resistance to benzimidazoles may be present alone or in combination, resulting in different levels of resistance and varying among populations of the same species (Blackhall et al., 2011; Barrère et al., 2012). Silvestre and Cabaret (2002) suggested that three different combinations may occur between the two most commonly associated codons (167 and 200). Thus, a single homozygous mutation of one of the two possible sites would be sufficient to confer resistance, double homozygous mutations would theoretically confer tolerance to higher doses of the drug, and double heterozygous mutations would confer a higher level of resistance than a single heterozygous mutation. However, double homozygous mutations have never been observed in the same helminth, suggesting that β -tubulin may tolerate one mutation, whereas two homozygous mutations would result in

dysfunctional β -tubulin incompatible with life (Hodgkinson et al., 2008). The results of Lourdes Mottier and Prichard (2008) support this idea, as no association of homozygous mutations was observed in drug resistant populations of *H. contortus*. It is interesting to note that until the present moment, the three possible mutations in the β -tubulin gene have never been described to occur together in a same allele. Therefore, it is conceivable that this phenomenon would be incompatible with life. On the other hand, one can not ruled out the possibility that, as these SNPs occurs randomly, in different frequencies, the chance of simultaneously identifying the three different SNPs, in a same allele, may be small. Additionally, it is also important to consider that most of the studies analyzing the common β -tubulin SNPs are not performed in a sufficiently large population. Therefore, the chances of detecting all three SNPs in the same allele are low. We suggest that the verification of whether the presence of two or three of these modifications is lethal/detrimental could be tested in *C. elegans*. A first alternative would be to select, *in vitro*, a *C. elegans* resistant strain, similarly to what was recently achieved to ivermectin and moxidectin (Ménez et al., 2016) and then searching for the presence of the possible associated mutations. Another alternative would be analyzing heterologous expression for the three mutations in the same individual. Functional analysis of a mutation in the β -tubulin gene at codon 200 has been successfully carried out in *C. elegans* by heterologous expression of parasite benzimidazole-sensitive alleles, benzimidazole-resistant alleles and *in vitro* mutagenized β -tubulin gene constructs (Kwa et al., 1995).

Elard and Humbert (1999) demonstrated that in small ruminants, only *T. circumcincta* worms homozygous recessive for codon 200 survived benzimidazole treatment despite the fact that homozygous recessive, homozygous dominant and heterozygous genotypes were all initially present in the population. Silvestre and Cabaret (2002) reported survival of populations homozygous dominant at codon 200 with mutations at codon 167 (either homozygous recessive or heterozygous) and concluded that only the mutation at codon 167 was sufficient for resistance to treatment. The survival of *A. lumbricoides* populations after albendazole treatment has been described; the molecular characterization of these worms showed that they were heterozygous at codon 167, with no polymorphism in the two other codons associated with resistance (198 and 200) (Diawara et al., 2013a). The SNP at position 198 was first described by Ghisi et al. (2007) in *H. contortus* populations present-

ing resistance to albendazole. In this work, the mutation was also present at codon 200 but not in the same sample, and no mutation was detected at codon 167. In contrast, *in vitro* selection of resistant strains of the same species performed by Rufener et al. (2009) demonstrated that a mutation was only observed at codon 198 but not at codons 167 and 200. Although some studies had searched for the mutation at codon 198 in other nematodes, such as human hookworms, *A. lumbricoides* and cyathostome from equines, to date this mutation has only been reported in *H. contortus* and *T. trichiura* (Schwenkenbecher and Kaplan, 2009; Blackhall et al., 2011; Barrère et al., 2012; Diawara et al., 2013a).

The frequency of these SNPs in nematodes founds in livestock tends to be higher than in domesticated animals, because these animals are frequently subjected to drug treatments that lead to drug selection pressure on their parasite populations. Drug resistance is often reported in *H. contortus*, and this situation can be associated with various factors including the biotic potential of the parasite itself, which releases approximately 200,000 eggs per day. Thus, after elimination of the drug-sensitive population by treatment, the resistant population takes over. In the United States, Chaudhry et al. (2014) detected a frequency of mutation at codon 200 of 90.6% in codon 200 of the β -tubulin isotype 1 gene in *H. contortus* recovered from cattle. Nunes et al. (2013) analyzed the frequency of this SNP in isolates of *H. contortus* obtained from herds of goats, sheep and buffaloes raised in Brazil and observed that the allelic frequency of the mutation ranged from 7.0% to 43.0%. This result indicated that benzimidazole resistance can be found in nematodes isolated from all species of ruminants.

Recently, SNPs were detected in *T. trichiura* at codons 167, 198 and 200 of the β -tubulin gene in samples collected in the field, whereas in *A. lumbricoides*, a mutation was observed only at codon 167 (Diawara et al., 2013a). In a similar study, the SNP at codon 200 was observed in *T. trichiura* but not in *A. lumbricoides*, leading to the hypothesis that the low efficacy observed in the treatment of trichuriasis with benzimidazole may be due to the high frequency of this SNP in this worm population (Diawara et al., 2009). However, Hansen et al. (2013) analyzed *T. trichiura* obtained from humans in Uganda and from baboons from different localities and did not detect any of these SNPs in the β -tubulin gene.

Schwenkenbecher et al. (2007) reported a very low frequency of mutated codons 167 and 200 in the β -tubulin gene of *Necator americanus* recovered from children who received periodic treatment, furthermore, the authors considered that these findings may result from experimental variation in real-time PCR analyses. Schwenkenbecher and Kaplan (2009) and Furtado et al. (2016) analyzed codon 198 of *Ancylostoma caninum* but did not detect any polymorphisms, albeit a large number of individuals from a broad geographical area have been analyzed in the second case. Recent studies have shown the presence of the SNP at codon 200 in hookworms from humans in Kenya, but at a low frequency (approximately 2.3%) (Diawara et al., 2013a). Furtado et al. (2014) detected a frequency of mutation at codon 200 of 0.8% in *A. caninum* collected from dogs from two Brazilian regions, emphasizing that this low frequency may be related to the fact that the dogs used for the analyses were stray dogs that possibly have never been treated with anthelmintics. Furthermore, when these same *A. caninum* samples were searched to mutations at the codon 167, no mutation was detected to this position (Furtado and Rabelo (2015a). According to these findings, the F167Y polymorphism seems to be usually present in a lower frequency, suggesting that SNP at codon 167 may not represent a hot spot mutation. On the other hand, most studies searching for polymorphisms in the β -tubulin gene have only investigated the F200Y polymorphism, which may partly explain the large number of reports related to this SNP.

Annual doses of albendazole co-administered with diethylcarbamazine or ivermectin in humans are used for treatment of

lymphatic filariasis in endemic areas to treat and stop the spread of the disease. This MDA may select for resistant helminths. However, Hoti et al. (2003) did not find the mutation linked to resistance at codon 200 of the β -tubulin gene in *Wuchereria bancrofti*, whereas Schwab et al. (2005) detected the mutation at codon 200 for this parasite at a frequency of 2.7% in organisms isolated from individuals from Ghana. This polymorphism was 31.6% higher in the treated population compared with the untreated population, highlighting the vulnerability of MDA as a control strategy.

In fungi, benzimidazole resistance has been associated with a mutation in the β -tubulin gene at codons 6, 50, 134, 165, 167, 198, 200 and 240 (McKay and Cooke, 1997; Ma et al., 2005). Ghisi et al. (2007) suggested that these alterations may also be present in nematodes, considering that the drug acts by the same mechanism in these different organisms. This proposed mechanism demonstrates the need to search for other targets with polymorphisms, particularly in cases in which resistance is reported to anthelmintic treatment without detection of mutations corresponding to the common SNPs described for the β -tubulin gene as reported by Albonico et al. (2004).

5. Methods for the detection of benzimidazole resistance

Different methods have been developed to establish a phenotypic or genotypic diagnosis of resistance to anthelmintics. In recent years, *in vitro* bioassay tests such as the egg hatching test (EHT) and *in vivo* tests as the fecal egg count reduction test (FECRT) have been described for the diagnosis of phenotypic resistance to benzimidazole, mainly in production animals (Lyndal-Murphy et al., 2014). However, despite being indicated by the “World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology”, these methods only detect resistance when at least 25.0% of the population of nematodes present the resistance genotype, i.e., when the resistant population has already been established (Papadopoulos, 2008).

According to Prichard (2007), it is difficult to confirm resistance in parasites of humans, especially those that have no free-living stages (e.g., *W. bancrofti*) and those that cannot be maintained in animal models. For these reasons, as well as the low sensitivity of phenotypic tests, there is a need to develop molecular methods for the diagnosis of anthelmintic resistance.

Some molecular methods have been proposed as new alternatives for the diagnosis of anthelmintic resistance, which may be able to compensate for the limitations identified in the EHT and FECRT. According to Roeber et al. (2013), despite the progress achieved in the molecular field, there is no practical molecular test for the detection of resistance to more than one class of anthelmintic. Furthermore, the majority of these molecular assays require the use of filarioid larvae and adult nematodes. Additionally, Diawara et al. (2013a) evaluated SNPs related to resistance in samples of eggs of *A. lumbricoides*, *T. trichiura* and hookworms collected in the field and reported limitations in the tests for individual eggs due to the small yield following DNA extraction.

Currently, different tests based on molecular analyses have been described for the detection of SNPs in the β -tubulin gene. Furthermore, rapid progress and development of new methodologies has continued to produce tests that are more sensitive and affordable. Using these new tests, molecular analysis of the mechanisms involved in the process of resistance can be elucidated and the frequency of specific alleles can be determined. According to Torres-Acosta et al. (2012), the lack of diagnosis of resistance in many countries of the American continent can be attributed in part to the lack of technical knowledge and/or financial resources needed to perform the surveys.

Most of these molecular assays are based on the polymerase chain reaction (PCR) that according to Roos et al. (1995) can detect

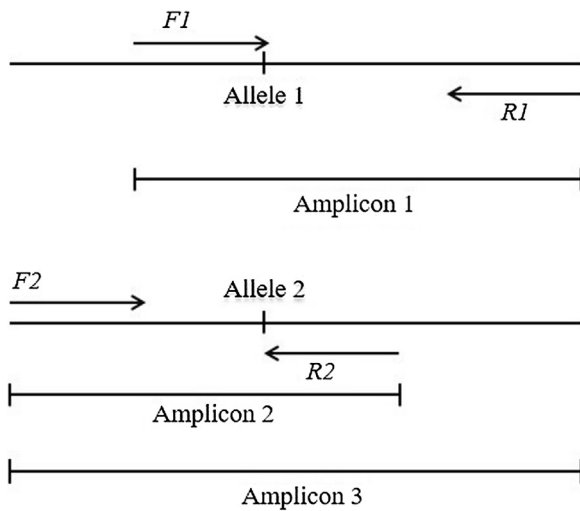


Fig. 1. Schematic representation of the Tetra-primer ARMS-PCR for SNP analysis. An *Amplicon 3* hypothetical amplicon is produced by the external primers (*F2* and *R1*). This amplicon serves as an intra-tube amplification control. Allele 1 is detected by amplification of *F1* and *R1* (*Amplicon 1*). Allele 2 is detected by amplification of primers *F2* and *R2* (*Amplicon 2*).

resistance even when only 1.0% of the parasite population is resistant. Among these techniques, PCR based on the amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) is one of the most frequently reported. This technique is based on the principle that conventional Taq DNA polymerase has no 3′-5′ exonuclease activity, and thus, a mismatch between the 3′ end of the primer and the template DNA prohibits amplification (Ye et al., 2001). This technique uses only one primer pair for the reaction. In contrast, the variant methodology Tetraprimer ARMS-PCR uses four primers in the same reaction (two external and two internal primers): one for annealing to the non-mutated allele and another primer to anneal to the mutated allele, as described by Niciura et al. (2012) for *H. contortus*. In this reaction, two or three fragments of different sizes are produced: a fragment that is the reaction control, a second fragment produced when the individual is homozygous or two more fragments generated if the individual is heterozygous. Fig. 1 shows the scheme of this technique.

Furtado et al. (2016) standardized a molecular technique based on tetraprimer ARMS-PCR for the detection of a specific SNP at codon 198 in *A. caninum*. In this work, it was reported that the shortcoming in extrapolating species-specific protocols is mainly due to the complexity of working with four primers in the same reaction. These primer sets can produce more fragments than expected without the flexibility to change the region where the primers anneal. Therefore, in some situations it is necessary to perform the ARMS-PCR technique in separate reactions for each allele (Furtado and Rabelo, 2015b). Another important albeit controversial factor is the addition of a mismatch to increase reaction specificity because the presence of the natural mismatch at the 3′ end position of the primer is not sufficient to prevent nonspecific amplification (Ye et al., 2001).

Alvarez-Sánchez et al. (2005) described the technique of real-time PCR (qPCR) as an alternative for detecting benzimidazole resistance in trichostrongylids from sheep. In this methodology, the authors claimed that it was possible to calculate the proportion of each allelic variant without requiring post-PCR processing. According to the authors, this technique substantially improved resistance detection especially in terms of time compared with allele-specific PCR and in terms of sensitivity compared with bioassays. Papers published using this technique are scarce, but in general they show satisfactory efficacy in resistance detection (von Samson-

Himmelstjerna et al., 2002; Walsh et al., 2007; Schwenkenbecher et al., 2007).

Because polymorphisms related to benzimidazole resistance are characterized by a point mutation, this change can create or invalidate a binding site for restriction enzymes. Thus, it is possible to use the restriction fragment length polymorphism PCR (RFLP-PCR) technique based on the idea that the base change will result in a cut in the fragment only in one of the alleles. A study using this methodology was conducted by Tiwari et al. (2006) for the detection of an SNP in codon 200 of the β -tubulin gene of *H. contortus*. However, the use of this methodology is not always possible; depending on the sequence, the base exchange will not create or invalidate restriction sites unless an initial step of creating the site for cleavage is performed, as shown by Shayan et al. (2007) for the detection of an SNP in codon 200 of the β -tubulin gene of *T. circumcincta*. This methodology has the disadvantage of adding another PCR step to the process.

Sequencing has also been used to detect SNPs from field samples. For example, Drogemuller et al. (2004) sequenced the full cDNA of the β -tubulin gene from a cyathostome strain resistant to benzimidazole and was able to detect a mutation in codon 167 in comparison to the wild type sequence. This work described a new SNP linked to benzimidazole resistance in nematodes. The advantage of this technique is that it allows the analysis of multiple SNPs in the gene without the need for PCR for each mutation. Variants of conventional sequencing techniques such as pyrosequencing have been described as effective methods to detect these mutations. Diawara et al. (2009) described this technique as reliable, quick and easy, allowing analysis of SNPs from a large number of egg samples or other stages of the parasite within a short period of time. von Samson-Himmelstjerna et al. (2009) evaluated mutations at codon 200 in *H. contortus* using qPCR and pyrosequencing and found good agreement between the methods, emphasizing that pyrosequencing was faster and easier to perform. According to Diawara et al. (2013b), a major limitation in the use of pyrosequencing in the field is the cost of the equipment; however, this method has the advantage of providing an accurate assessment of SNPs within a short period of time.

6. Concluding remarks

For instance, the failure of benzimidazole treatment in hookworm and other nematode-associated diseases in humans cannot be explained by known SNPs. The SNPs in codons 167, 198 and 200 of the β -tubulin gene are often reported in various studies as mechanisms underlying drug resistance; however, few studies have analyzed the complete β -tubulin gene or other isoforms (when applicable). Other questions remain: Might other SNPs be involved in the development of benzimidazole resistance? Could molecular markers other than SNPs in the β -tubulin gene be used to detect drug resistance? To better identify drug resistance mechanisms, the selection and study of albendazole-resistant strain should be performed. Blackhall et al. (2008) presented genetic evidence of selection at a P-glycoprotein locus during selection for benzimidazole resistance in *H. contortus*. Hookworms would very well fit to this proposal, as these parasites can be easily kept in animal models. Moreover, questions about the association of SNPs in the β -tubulin with other phenotypic characteristics, related to higher pathogenicity of resistant worms, needs to be evaluated further. The lack of perspectives to the development of new drugs in the near future, the absence of effective vaccines against helminths and the problem of increasing resistance mainly as a result of the use of MDA, makes the adoption of alternative measures necessary to minimize the problem. The sooner this process is implemented, the greater the chances to slow down the spread of resistance.

Acknowledgments

This work received financial support from PRPq/UFMG, CNPq (Process number 470968/2014-1) and FAPEMIG (Process number APQ-02417-16).

References

- Aguayo-Ortiz, R., Méndez-Lucio, O., Romo-Mancillas, A., Castillo, R., Yépez-Mulia, L., Medina-Franco, J.L., Hernández-Campos, A., 2013. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel ϵ -tubulin binding site model. *J. Mol. Graph. Model* 45, 26–37.
- Albonico, M., Wright, V., Bickle, Q., 2004. Molecular analysis of the beta-tubulin gene of human hookworms as a basis for possible benzimidazole resistance on Pemba Island. *Mol. Biochem. Parasitol.* 134 (2), 281–284.
- Alvarez-Sánchez, M.A., Pérez-García, J., Cruz-Rojo, M.A., Rojo-Vázquez, F.A., 2005. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. *Vet. Parasitol.* 129 (3–4), 291–298.
- Barrère, V., Alvarez, L., Suarez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Lanusse, C., Prichard, R.K., 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 186, 344–349.
- Bentounsi, B., Khaznadar, A., Cabaret, J., 2012. Resistance of *Trichostrongylus* spp. (Nematoda) to benzimidazole in Algerian cattle herds grazed with sheep. *Parasitol. Res.* 110, 1021–1023.
- Blackhall, W.J., Prichard, R.K., Beech, R.N., 2008. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Vet. Parasitol.* 152 (1–2), 101–107.
- Blackhall, W.J., Kuzmina, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2011. β -Tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naïve Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. *Parasitol. Res.* 109, 1199–1203.
- Bogan, J., Armour, J., 1987. Anthelmintic for ruminants. *Int. J. Parasitol.* 17, 483–491.
- Brasil, B.S., Nunes, R.L., Bastianetto, E., Drummond, M.G., Carvalho, D.C., Leite, R.C., Molento, M.B., Oliveira, D.A., 2012. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 42 (5), 469–479.
- Brown, H.D., Matzuk, A.R., Ilves, I.R., Peterson, L.H., Harris, A.S., Saret, L.H., Egerton, J.R., Yaksts, J.J., Campbell, W.C., Cuckler, A.C., 1971. Antiparasitic drugs IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *J. Am. Chem. Soc.* 83, 1764–1765.
- Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C., 2012. Goodman E Gilman – As Bases Farmacológicas Da Terapêutica, twelfth edition. Artmed/McGraw-Hill, Porto Alegre, Brazil, p. 1821.
- Chaudhry, U., Miller, M., Yazwinski, T., Kaplan, R., Gilleard, J., 2014. The presence of benzimidazole resistance mutations in *Haemonchus placei* from US cattle. *Vet. Parasitol.* 204 (3–4), 411–415.
- Craig, T.M., 1993. Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 46, 121–131.
- Davidse, L.C., Flach, W., 1977. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Cell. Biol.* 72, 174–193.
- Diawara, A., Drake, L.J., Suswillo, R.R., Kihara, J., Bundy, D.A., Scott, M.E., Halpenny, C., Stothard, J.R., Prichard, R.K., 2009. Assays to detect beta-tubulin codon 200 polymorphism in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e397.
- Diawara, A., Halpenny, C.M., Churcher, T.S., Mwandawiro, C., Kihara, J., Kaplan, R.M., Streit, T.G., Idaghdour, Y., Scott, M.E., Basañez, M.G., Prichard, R.K., 2013a. Association between response to albendazole treatment and β -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (5), e2247.
- Diawara, A., Schwenkenbecher, J.M., Kaplan, R.M., Prichard, R.K., 2013b. Molecular and biological diagnostic tests for monitoring benzimidazole resistance in human soil-transmitted helminths. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88 (6), 1052–1061.
- Drogemüller, M., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2004. Beta-tubulin complementary DNA sequence variations observed between cyathostomins from benzimidazole-susceptible and -resistant populations. *J. Parasitol.* 90 (4), 868–870.
- Elard, L., Humbert, J.F., 1999. Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol. Res.* 85 (6), 452–456.
- Elard, L., Sauve, C., Humbert, J.F., 1998. Fitness of benzimidazole-resistant and -susceptible worms of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Parasitology* 117, 571–578.
- Falzon, L.C., Menzies, P.I., Shakya, K.P., Jones-Bitton, A., Vanleeuwen, J., Avula, J., Stewart, H., Jansen, J.T., Taylor, M.A., Learmount, J., Peregrine, A.S., 2013. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario. *Canada Vet. Parasitol.* 193 (1–3), 150–162.
- Fuchs, M.A., Ryan, L.A., Chambers, E.L., Moore, C.M., Fairweather, I., Trudgett, A., Timson, D.J., Brennan, G.P., Hoey, E.M., 2013. Differential expression of liver fluke β -tubulin isotypes at selected life cycle stages. *Int. J. Parasitol.* 43 (14), 1133–1139.
- Furtado, L.F., Rabelo, É.M., 2015a. Molecular analysis of the F167Y SNP in the β -tubulin gene by screening genotypes of two *Ancylostoma caninum* populations. *Vet. Parasitol.* 210 (1–2), 114–117.
- Furtado, L.F., Rabelo, É.M., 2015b. Development of a new amplification-refractory mutation system for detection of a single nucleotide polymorphism linked to drug resistance in *Ancylostoma caninum*. *Genet. Mol. Res.* 14 (2), 5103–5111.
- Furtado, L.F., Bello, A.C., dos Santos, H.A., Carvalho, M.R., Rabelo, É.M., 2014. First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. *Vet. Parasitol.* 206 (3–4), 313–316.
- Furtado, L.F., Alves, W.P., Moreira, T.B., Costa Júnior, L.M., Miranda, R.R.C., Rabelo, É.M.L., 2016. Standardization and application of the tetraprimer ARMS-PCR technique for screening of the E198A SNP in the β -tubulin gene of hookworm populations in Brazil. *Vet. Parasitol.* 224, 65–67.
- Garg, R., Yadav, C.L., 2009. Genotyping of benzimidazole susceptible and resistant alleles in different populations of *Haemonchus contortus* from Himalayan and sub-Himalayan regions of North-West India. *Trop. Anim. Health Prod.* 41 (7), 1127–1131.
- Geurden, T., Hoste, H., Jacquet, P., Traversa, D., Sotiraki, S., Frangipane di Regalbono, A., Tzanidakis, N., Kostopoulou, D., Gaillac, C., Privat, S., Giangaspero, A., Zanardello, C., Noé, L., Vanimisetti, B., Bartram, D., 2014. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Vet. Parasitol.* 201 (1–2), 59–66.
- Ghisi, M., Kaminsky, R., Mäser, P., 2007. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 144, 313–320.
- Hansen, T.V., Thamsborg, S.M., Olsen, A., Prichard, R.K., Nejsum, P., 2013. Genetic variations in the beta-tubulin gene and the internal transcribed spacer 2 region of *Trichuris* species from man and baboons. *Parasites Vectors* 6, 236.
- Hodgkinson, J.E., Clark, H.J., Kaplan, R.M., Lake, S.L., Matthews, J.B., 2008. The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *Int. J. Parasitol.* 38 (10), 1149–1160.
- Hotez, P.J., Woc-Colburn, L., Bottazzi, M.E., 2014. Neglected tropical diseases in Central America and Panama: review of their prevalence, populations at risk and impact on regional development. *Int. J. Parasitol.* 44 (9), 597–603.
- Hoti, S.L., Subramaniam, K., Das, P.K., 2003. Detection of codon for amino acid 200 in isotype 1 beta-tubulin gene of *Wuchereria bancrofti* isolates, implicated in resistance to benzimidazoles in other nematodes. *Acta Trop.* 88, 77–81.
- Humphries, D., Nguyen, S., Boakye, D., Wilson, M., Cappello, M., 2012. The promise and pitfalls of mass drug administration to control intestinal helminth infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 584–589.
- Huzil, J.T., Ludueña, R.F., Tuszyński, J., 2006. Comparative modelling of human β tubulin isotypes and implications for drug binding. *Nanotechnology* 17 (4), 90–100.
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M.N., Afaq, M., 2006. Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci.* 79 (26), 2413–2431.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186, 70–78.
- Kelly, J.D., Whitlock, H.V., Thompson, H.G., Hall, C.A., Martin, I.C., Le Jambre, L.F., 1978. Physiological characteristics of free-living and parasitic stages of strains of *Haemonchus contortus*, susceptible or resistant to benzimidazole anthelmintics. *Res. Vet. Sci.* 25 (3), 376–385.
- Knapp-Lawitzke, F., Krücken, J., Ramünke, S., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., 2015. Rapid selection for β -tubulin alleles in codon 200 conferring benzimidazole resistance in an *Ostertagia ostertagi* isolate on pasture. *Vet. Parasitol.* 209 (1–2), 84–92.
- Kwa, M.S., Veenstra, J.G., Roos, M.H., 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63 (2), 299–303.
- Kwa, M.S., Veenstra, J.G., Van Dijk, M., Roos, M.H., 1995. Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 246 (4), 500–510.
- Lacey, E., 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18, 885–936.
- Lacey, E., 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today* 6, 112–115.
- Leignel, V., Cabaret, J., 2001. Massive use of chemotherapy influences life traits of parasitic nematodes in domestic ruminants. *Funct. Ecol.* 15, 569–574.
- Lewis, S.A., Lee, M.G., Cowan, N.J., 1985. Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J. Cell Biol.* 101, 852–861.
- Lourdes Mottier, M., Prichard, R.K., 2008. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet. Genom.* 18 (2), 129–140.
- Lubega, G.W., Prichard, R.K., 1990. Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high-affinity binding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38 (2), 221–232.
- Ludueña, R.F., 1998. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* 178, 207–275.
- Lyndal-Murphy, M., Swain, A.J., Pepper, P.M., 2014. Methods to determine resistance to anthelmintics when continuing larval development occurs. *Vet. Parasitol.* 199 (3–4), 191–200.
- Ménez, C., Alberich, M., Kansoh, D., Blanchard, A., Lespine, A., 2016. Acquired tolerance to ivermectin and moxidectin after drug selection pressure in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* [Epub ahead of print].

- Ma, Z., Yoshimura, M.A., Holtz, B.A., Michailides, T.J., 2005. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Manag. Sci.* 61, 449–457.
- Mandelkow, E., Mandelkow, E.M., 1990. Microtubular structure and tubulin polymerization. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2 (1), 3–9.
- McKay, G.J., Cooke, L.R., 1997. A PCR-based method to characterise and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152 (2), 371–378.
- Muñiz-Lagunes, A., González-Garduño, R., López-Arellano, M.E., Ramírez-Valverde, R., Ruíz-Flores, A., García-Muñiz, G., Ramírez-Vargas, G., Mendoza-de Gives, P., Torres-Hernández, G., 2015. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in Campeche State, Mexico. *Trop. Anim. Health. Prod.* 47 (6), 1049–1054.
- Niciura, S.C., Veríssimo, C.J., Gromboni, J.G., Rocha, M.I., de Mello, S.S., Barbosa, C.M., Chiebao, D.P., Cardoso, D., Silva, G.S., Otsuk, I.P., Pereira, J.R., Ambrosio, L.A., Nardon, R.F., Ueno, T.E., Molento, M.B., 2012. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 190 (3–4), 608–612.
- Njue, A.I., Prichard, R.K., 2003. Cloning two full-length beta-tubulin isotype cDNAs from *Cooperia oncophora*, and screening for benzimidazole-resistance-associated mutations in two isolates. *Parasitology* 127 (6), 579–588.
- Nogales, E., 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277–302.
- Nunes, R.L., dos Santos, L.L., Bastianetto, E., de Oliveira, D.A., Brasil, B.S., 2013. Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from buffalo, goat and sheep herds. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22 (4), 548–553.
- Oxberry, M.E., Gear, T.G., Prichard, R.K., 2001. Assessment of benzimidazole binding to individual recombinant tubulin isotypes from *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 122 (6), 683–687.
- Palcy, C., Silvestre, A., Sauve, C., Cortet, J., Cabaret, J., 2010. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. *Vet. J.* 183, 68–74.
- Papadopoulos, E., 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Rumin. Res.* 76, 99–103.
- Pape, M., von Samson-Himmelstjerna, G., Schnieder, T., 1999. Characterisation of the beta-tubulin gene of *Cylicocyclus nassatus*. *Int. J. Parasitol.* 29 (12), 1941–1947.
- Prichard, R.K., 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol.* 17, 445–453.
- Prichard, R.K., 2007. Markers for benzimidazole resistance in human parasitic nematodes? *Parasitology* 134 (8), 1087–1092.
- Prichard, R.K., Basáñez, M.G., Boatín, B.A., McCarthy, J.S., García, H.H., Yang, G.J., Sripa, B., Lustigman, S., 2012. A research agenda for helminth diseases of humans: intervention for control and elimination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (4), e1549.
- Pullan, R.L., Smith, J.L., Jasrasaria, R., Brooker, S.J., 2014. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites Vectors* 21, 7–37.
- Rendell, D.K., 2010. Anthelmintic resistance in cattle nematodes on 13 south-west Victorian properties. *Aust. Vet. J.* 88 (12), 504–509.
- Requejo-Fernández, J.A., Martínez, A., Meana, A., Rojo-Vázquez, F.A., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., 1997. Anthelmintic resistance in nematode parasites from goats in Spain. *Vet. Parasitol.* 73 (1–2), 83–88.
- Rinaldi, L., Morgan, E.R., Bosco, A., Coles, G.C., Cringoli, G., 2014. The maintenance of anthelmintic efficacy in sheep in a Mediterranean climate. *Vet. Parasitol.* 203 (1–2), 139–143.
- Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., Fairweather, I., 2004. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J. Mol. Graph. Model* 23, 275–284.
- Roeber, F., Jex, A.R., Gasser, R.B., 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance – an Australian perspective. *Parasites Vectors* 27 (6), 153.
- Roos, M.H., 1990. The molecular nature of benzimidazole resistance in helminths. *Parasitol. Today* 6 (4), 125–127.
- Roos, M.H., Kwa, M.S.G., Grant, W.N., 1995. New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitol. Today* 11, 148–150.
- Rufener, L., Kaminsky, R., Mäser, P., 2009. In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of β -tubulin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 168, 120–122.
- Schwab, A.E., Boakye, D.A., Kyelem, D., Prichard, R.K., 2005. Detection of benzimidazole resistance-associated mutations in the filarial nematode *Wuchereria bancrofti* and evidence for selection by albendazole and ivermectin combination treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 234–238.
- Schwenkenbecher, J.M., Kaplan, R.M., 2009. Real-time PCR assays for monitoring benzimidazole resistance-associated mutations in *Ancylostoma caninum*. *Exp. Parasitol.* 122, 6–10.
- Schwenkenbecher, J.M., Albonico, M., Bickle, Q., Kaplan, R.M., 2007. Characterization of beta-tubulin genes in hookworms and investigation of resistance-associated mutations using real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156, 167–174.
- Scott, I., Pomroy, W.E., Kenyon, P.R., Smith, G., Adlington, B., Moss, A., 2013. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 198 (1–2), 166–171.
- Shalaby, H.A., 2013. Anthelmintics resistance; how to overcome it? *Iran. J. Parasitol.* 8 (1), 18–32.
- Shayan, P., Eslami, A., Borji, H., 2007. Innovative restriction site created PCR-RFLP for detection of benzimidazole resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol. Res.* 100 (5), 1063–1068.
- Silvestre, A., Cabaret, J., 2002. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 297–300.
- Silvestre, A., Humbert, J., 2000. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. *Exp. Parasitol.* 95 (4), 271–276.
- Silvestre, A., Sauve, C., Cortet, J., Cabaret, J., 2009. Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. *Mol. Ecol.* 18 (24), 5086–5100.
- Silvestri, C., Greganti, G., Arzeni, D., Morciano, A., Castelli, P., Barchiesi, F., Cirioni, O., Giacometti, A., 2013. Intestinal parasitosis: data analysis 2006–2011 in a teaching hospital of Ancona, Italy. *Infez. Med.* 1, 34–39.
- Swanson, S.J., Phares, C.R., Mamo, B., Smith, K.E., Cetron, M.S., Stauffer, W.M., 2012. Albendazole therapy and enteric parasites in United States-bound refugees. *N. Engl. J. Med.* 66, 1498–1507.
- Tada, Y., Fujitani, T., Yoneyama, M., 1996. Subchronic toxicity of thiabendazole (TBZ) in ICR mice. *Food Chem. Toxicol.* 34 (8), 709–716.
- Taman, A., Azab, M., 2014. Present-day anthelmintics and perspectives on future new targets. *Parasitol. Res.* 113 (7), 2425–2433.
- Tchuenté, L.A.T., 2011. Control of soil-transmitted helminths in sub-Saharan Africa: diagnosis, drug efficacy concerns and challenges. *Acta Trop.* 120 (Suppl. 1), S4–11.
- Tiwari, J., Kumar, S., Kolte, A.P., Swarnkar, C.P., Singh, D., Pathak, K.M., 2006. Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. *Vet. Parasitol.* 138 (3–4), 301–307.
- Torres-Acosta, J.F., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuéllar-Ordaz, J.A., 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. *Vet. Parasitol.* 189 (1), 89–96.
- Váradý, M., Praslicka, J., Corba, J., 1994. Treatment of multiple resistant field strain of *Ostertagia* spp. in Cashmere and Angora goats. *Int. J. Parasitol.* 24 (3), 335–340.
- Veríssimo, C.J., Niciura, S.C., Alberti, A.L., Rodrigues, C.F., Barbosa, C.M., Chiebao, D.P., Cardoso, D., da Silva, G.S., Pereira, J.R., Margatho, L.F., da Costa, R.L., Nardon, R.F., Ueno, T.E., Curci, V.C., Molento, M.B., 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 187, 209–216.
- Veracruz, J., Leveck, B., Prichard, R., 2012. Human soil-transmitted helminths: implications of mass drug administration. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25 (6), 703–708.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Witzendorff, C., Sievers, G., Schnieder, T., 2002. Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. *Vet. Parasitol.* 3, 227–235.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Walsh, T.K., Donnan, A.A., Carrière, S., Jackson, F., Skuce, P.J., Rohn, K., Wolstenholme, A.J., 2009. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology* 136 (3), 349–358.
- Waller, P.J., 1990. Resistance in nematode parasites of livestock to the benzimidazole anthelmintics. *Parasitol. Today* 6 (4), 127–129.
- Waller, P.J., 2006. From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Vet. Parasitol.* 139, 1–14.
- Walsh, T.K., Donnan, A.A., Jackson, F., Skuce, P., Wolstenholme, A.J., 2007. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. *Vet. Parasitol.* 144 (3–4), 304–312.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R., Day, I.N., 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 29 (17), e88.



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

Número do Processo: BR 10 2018 005196 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

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

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 340946430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): "PRIMERS, KIT PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA AOS BENZIMIDAZÓIS EM *Necator americanus*, E USOS"

Resumo: A presente invenção trata de primers e um kit, os quais são específicos para a detecção de mutações associadas à resistência aos benzimidazóis, nos códons 167, 198 e 200 do gene da beta-tubulina de *Necator americanus*, preferencialmente através da técnica molecular de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP-PCR).

Figura a publicar: 4

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 3

Nome: ÉLIDA MARA LEITE RABELO

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço:

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 2 de 3

Nome: LUCIANA WERNECK ZUCCHERATO

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço:

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Inventor 3 de 3

Nome: LUIS FERNANDO VIANA FURTADO

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço:

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

PRODUÇÕES RESULTANTES DAS COLABORAÇÕES

Rabelo ÉML, Miranda RRC, **Furtado LF**, Redondo RAF, Tennessen JA, Blouin MS 2017. Development of new microsatellites for the hookworm *Ancylostoma caninum* and analysis of genetic diversity in Brazilian populations. *Infect Genet Evol* 51:24-27.

Jordania da Silva V, Dias SRC, Maioli TU, Serafim LR, **Furtado LF**, Quintão Silva MDG, Faria AMC, Rabelo ÉML 2017. Obesity induction in hamster that mimics the human clinical condition. *Exp Anim* 66(3):235-244.

Mello ÉM, **Furtado LF**, Rabelo ÉML, Pinto HÁ 2017. DNA barcoding of metacestodes found in the *Guerlinguetus ingrami* (Rodentia: Sciuridae) reveals the occurrence of *Hydatigera taeniaeformis* sensu stricto (Cyclophyllidea: Taeniidae) in the Americas. *Parasitol Int* 67(2):115-118.

Rabelo EM, Zuccherato LW, **Furtado LF**, Medeiros CS. Iniciadores e kit para diagnóstico molecular de mutações em *Ascaris lumbricoides* associadas à resistência aos benzimidazóis, e usos. 2017. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170139077. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 27/06/2017

—Original—

Obesity induction in hamster that mimics the human clinical condition

Vivian JORDANIA DA SILVA^{1,2}, Sílvia Regina Costa DIAS^{1,3}, Tatiani Uceli MAIOLI⁴,
Luciana Ribeiro SERAFIM¹, Luis Fernando Viana FURTADO¹, Maria da Gloria QUINTÃO SILVA²,
Ana Maria Caetano de FARIA⁵, and Élide Mara Leite RABELO¹

¹Molecular Parasitology Laboratory, Parasitology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Antônio Carlos Ave, 6627, Pampulha. CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Center University UNA, Guajajaras St, 175, Center. CEP 30180-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³Center University Estácio Juiz de Fora, Av. Presidente João Goulart, 600, Cruzeiro do Sul. CEP 36030-900. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

⁴Nutrition Department, Nursing School, Federal University of Minas Gerais. Alfredo Balena Ave, 190, Santa Efigênia, CEP 30130-100.

⁵Biochemistry and Immunology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Antônio Carlos Ave, 6627, Pampulha. CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Abstract: Although obesity is well established in hamsters, studies using diets with high levels of simple carbohydrate associated with lipids are necessary to assess the impact of this type of food in the body. In this study a high sugar and butter diet (HSB) and high temperature were employed towards this end. Obesity was successfully induced at a temperature of 30.3°C to 30.9°C after 38 days feeding the animals an HSB diet. It was shown that although diet is important for the induction of obesity, temperature is also essential because at a temperature slightly below the one required, obesity was not induced, even when the animals were fed for a longer period (150 days). The obese clinical condition was accompanied by biochemical and hematological changes, as increased cholesterol and triglyceride levels and increased leukocyte numbers, similar to alterations observed in obese humans. Furthermore, it was demonstrated that increasing the intake of simple carbohydrates associated with lipids provided evidence of inflammation in obese animals.

Key words: AIN-93, hamster, high sugar and butter diet, obesity, temperature

Introduction

Obesity is increasing gradually due to poor diet and sedentary lifestyles in the population around the world. According to the World Health Organization [54], approximately 1.9 billion adults have a body mass index (BMI) in the overweight range, and approximately 600 million are obese. This condition may be characterized as low intensity inflammation caused by the increased

body weight and adipose tissue expansion, increasing the predisposition to cardiovascular diseases, dyslipidemias, cancer, chronic kidney disease, and type 2 diabetes [30].

Hypercaloric and high fat diets have been widely used for inducing obesity in animal models because there is a similarity with the pathogenesis of obesity in humans [11]. Considering the physiological similarity to humans, pigs have been used as good models for these studies

(Received 20 January 2017 / Accepted 7 March 2017 / Published online in J-STAGE 28 March 2017)

Address corresponding: É.M.L. Rabelo, Molecular Parasitology Laboratory, Parasitology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Antônio Carlos Ave, 6627, Pampulha. CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Supplementary Figures: refer to J-STAGE: <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/exanim>

Table 1. AIN-93 M diet formulated for maintenance of adult rodents and the high sugar and butter diet

Ingredient	g/kg diet	
	AIN-93M (CTRL diet)*	High sugar and butter (HSB) diet
Cornstarch	465.692	265.692
Casein (>85% protein)	140.000	140.000
Dextrinizedcornstarch	155.000	–
Sucrose	100.000	265.000
Soybean oil	40.000	40.000
Fibre (cellulose)	50.000	50.000
Mineral mix (AIN-93 M-MX)	35.000	35.000
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10.000	10.000
L-Cystine	1.800	1.800
Choline bitartrate	2.500	2.500
Tert-butylhydroquinone	0.008	0.008
Unsalted butter	–	190.000
TOTAL	1,000	1,000
Kcal/g of diet	3.8	4.8
Carbohydrate (%)	76	45
Protein (%)	15	12
Lipid (%)	9	44

Note: Adapted from Reeves, *et al.* [39].

[47], but work with these animals in laboratories turns out to be unfeasible due to the physical structures required. Mice [52], rats [53] and hamsters have also served as models for studying obesity [50].

Some pathogens, particularly hookworms [34], *Leishmania* sp. [3], Hantavirus [42], and Ebola virus [12] are more likely or exclusively infective for particular groups of rodents, as hamsters. Furthermore, hamsters are used as a model of cardiomyopathy, diabetes, muscular dystrophy, cancer and other diseases [16]. Despite the obesity model be established in hamster, studies using diets high in simple carbohydrates and lipids, that would contribute on the understanding of some chronic diseases, are scarce in the literature, requiring further investigation as suggested by Greenwood *et al.* [20]. Morgantini *et al.* [32] shows that high glycemic carbs interfere with the absorption of lipids and contribute to the development of low intensity inflammation, as glucose has the ability to activate genes related to inflammation by epigenetic mechanisms. Hamsters are considered seasonal hibernators, a characteristic that can manifest at any time of the year depending on environmental conditions and is influenced by annual periods and shorter days and various physiological parameters [4, 22, 26]. Therefore, it is conceivable that the induction of obesity will be influenced by these parameters. Thus, the objective of this study was to induce obesity in hamsters (*Mesocricetus auratus*) in different annual periods and assessing for temperature interference in weight

gain. Furthermore, we evaluated to which extension obesity induced by a diet with a high concentration of simple carbohydrates and lipids interferes with clinical and haematological parameters of animals compared to controls.

Materials and Methods

Ethical statement

All animal procedures were approved by the Animal Care Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, protocol number 194/2011) and were performed under the guidelines of the Brazilian Council of Animal Experimentation (CONCEA) and strictly followed Brazilian law for “Procedures for the Scientific Use of Animals” (11.794/2008).

Experimental diets

The composition of the manipulated diets in the present study was based on the AIN-93 M rodent diet as recommended by the American Institute of Nutrition (1993) with modifications of the fat components and carbohydrates as described by Maioli *et al.* [28]. The diets were offered to animals as pellets, and each diet group was maintained until the day of euthanasia. The animals were fed on diets *ad libitum*. The composition of AIN-93 M (CTRL) and the high sugar and butter diet (HSB) diet are described in Table 1.

Experimental design

This study was performed using female hamsters (*Mesocricetus auratus*) (4–6 weeks old). They were housed in the Animal Facility at the Department of Parasitology, UFMG, with a 12 h light/dark cycle. Water and manipulated diet were provided *ad libitum*. Animals at the facility are routinely treated before experiments with one 5 mg/kg dose of Ivomec® (Ivomec Gold 1%, Merial Saúde Animal Ltda, SP, Brazil) via gavage to eliminate possible parasitic infections. The hamsters were randomly distributed into two groups each that were fed either AIN-93 M (CTRL) [39] or a high sugar and butter diet (HSB) modified from AIN-93 M [28]. The diets of each group were maintained until the day of euthanasia. Two experiments (12 hamsters/each) were conducted to evaluate the effect of temperature on hamster eating behaviour and its influence on hamster weight gain: 1) April–September (fall–spring, 150 days), and 2) December–March (summer, 68 days). A third experiment (12 hamsters) was conducted from June to November (winter–spring, 150 days) following the same methodology, and the results are not presented, but are discussed. During the first experiment, a heater was installed on the 60th day of the experiment in the animal house to increase the room temperature. The findings of the first experiment were used to standardize and optimize the weight gain of the animals for the remaining experiments. In experiment 2 and 3, the heater was maintained from the first day of the experiment. The animal house temperature was measured daily. The meteorological data for the duration of the experiments were obtained from the National Institute of Meteorology of Brazil (INMET).

Assessing obesity condition

The parameters used to consider an animal obese were biochemical and haematological changes, increased adiposity percentage and significant weight gain compared to the control group. After animals reached a statistically significant weight gain, they were euthanized by an overdose of anaesthetic solution administered intraperitoneally (240 mg/kg ketamine plus 45 mg/kg xylazine chloride solution, Cetamin® and Xilazin®, Syntec, Brazil).

Measurement of hamster weight

The weight of the hamsters was measured on day 0 of the experiment and every 7 days until the end of the

experiments using a semi-analytical balance.

Consumption of food and water

The diets were offered *ad libitum* to each group of animals. The consumption of diets per group was calculated by the difference in grams of food offered and remaining food found in the cages daily. Water consumption was measured twice a week and was calculated by the difference in millilitres of water offered and remaining water found in the bottle. Food and water consumption values are expressed as the mean for each group.

Blood collection and haematological parameters

The blood samples were collected on the first day of the diet (day 0) and every 30 or 38 days until the end of the experiment, based on the study of Pacanaro *et al.* [34]. The hamsters were fasted for 12 h prior to individual blood collection from the sublingual vein. Two aliquots of blood were collected: one with EDTA-potassium fluoride solution added to each sample (Doles, Goiânia, Brazil), to obtain plasma, and other, without anticoagulant, to obtain serum after centrifugation. The blood was used to evaluate red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) numbers. The cells were counted with a Newbauer chamber. The WBC differential count was determined with smears stained with May-Grunwald-Giemsa and examined under a light microscope (Olympus BH2, Japan).

Blood biochemical parameters

The animals were fasted for 12 h before blood collection. The biochemical parameters evaluated from plasma were total cholesterol and triglycerides and from serum, was evaluated fasting glucose. All measurements were performed using commercial kits (Doles, Goiânia, Brazil). Reference values for female hamsters were obtained from Gad [16].

Visceral adiposity

One day before the end of the experiment, all animals were weighed. After euthanasia, the visceral adipose tissue was recovered from each animal and weighed [34]. The visceral adiposity index was determined by the formula:

$$\text{Adiposity} = \frac{\text{Weight of visceral adipose tissue recovered} \times 100}{\text{Total weight of the live animal}}$$

Statistical analysis

All data were examined for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. For analysis between two groups, Student's *t*-test was used for parametric data, and the Wilcoxon Matched Pairs or Mann-Whitney test was used for nonparametric data. The Kruskal-Wallis test was used followed by Dunn's post-hoc test for comparisons of three or more groups of nonparametric data. One-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test was used for parametric data. The Grubbs test was used to detect outliers, which were removed from the sample. All tests were considered significant at the $P < 0.05$ level. All analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Experiment 1: Fall-Spring

Figure 1a shows the temperature values outside and inside the animal house and the weight gain of both groups. The heater, installed on the 60th day of the experiment, increased the temperature of the animal house from 25.1°C to 30.3°C (Supplementary Fig. S1a). The weight difference between the CTRL and HSB groups began after the 90th day (30 days after installation of the heater unit in the room). Consequently, 150 days after starting the diet, the HSB group showed a significant increase in visceral fat (approximately 2×) (Fig. 1b). The external maximum temperature averaged 25.7°C in the period during which this experiment was performed.

After installing the heater, two animals of the HSB group showed aggressive behaviour and dominance in the cage. These animals interfered with the feeding performance of the remaining animals in the cage and were removed from the experiment. After the isolation of the dominant animals, the aggressive behavior persisted to the remaining animals, being detected by fights among the females and wounds in the body, but without interference in the weight gain. There was a significant difference in the weight gain between the feed intake of the CTRL (9.94 ± 1.78 g/day/animal) and the HSB (7.79 ± 0.19 g/day/animal) groups ($P < 0.05$), whereas no difference was observed for water consumption (data not shown).

There was a significant difference in the levels of total triglycerides (Fig. 2a), cholesterol (Fig. 2b) and glucose (Fig. 2c), with increased levels of cholesterol and triglycerides to the animals from the HSB group compared to the control group. This difference was higher

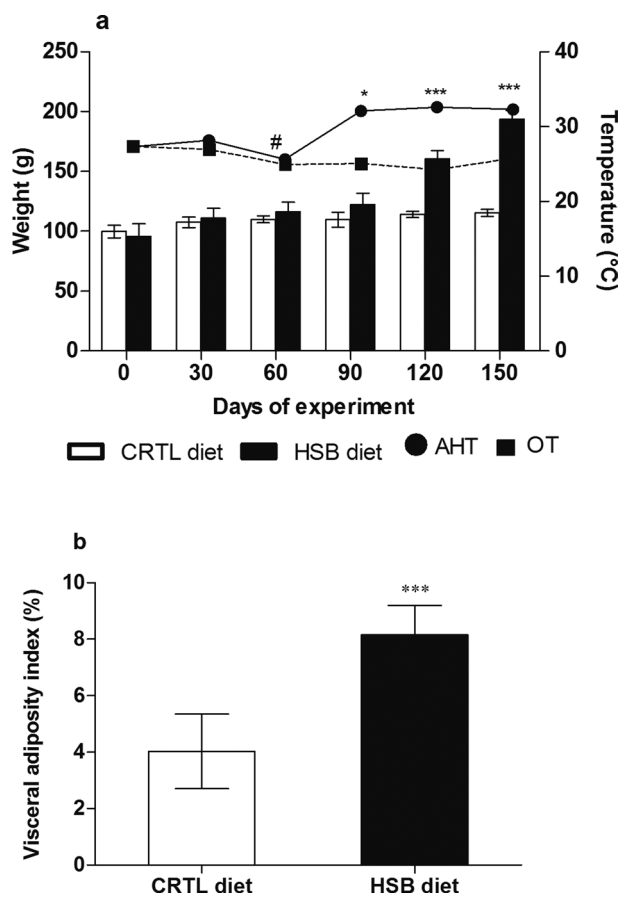


Fig. 1. (a) Hamster body weight in grams (bars) and temperature inside and outside the animal house (lines). (b) Visceral Adiposity Index at 150 days (as a percentage). Hamsters fed the AIN 93 M diet (CTRL, $n=6$) and hamsters fed the high sugar and butter diet (HSB, $n=4$). Animal house temperature (AHT) and outside temperature (OT) in degrees Celsius (°C). # Start of heater use in the animal house. * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$. The data are shown as the mean \pm standard deviation.

from day 90 to the end of the experiment for total triglycerides ($P < 0.01$) and cholesterol ($P < 0.001$), while the HSB group only showed increase in blood glucose ($P < 0.001$) from day 120 to the end of the experiment.

After 60 days of the experiment (installation of heater), hamsters fed with the high sugar and butter diet had an increase in the number of leukocytes (Fig. 3a). After the 120th day of the experiment, we observed an increase in the number of neutrophils (Fig. 3b) and lymphocytes (Fig. 3c). The monocytes were elevated from the 60th day until the end of the experiment (Fig. 3d).

Experiment 2: Summer

After it has been demonstrated the need of a heater to

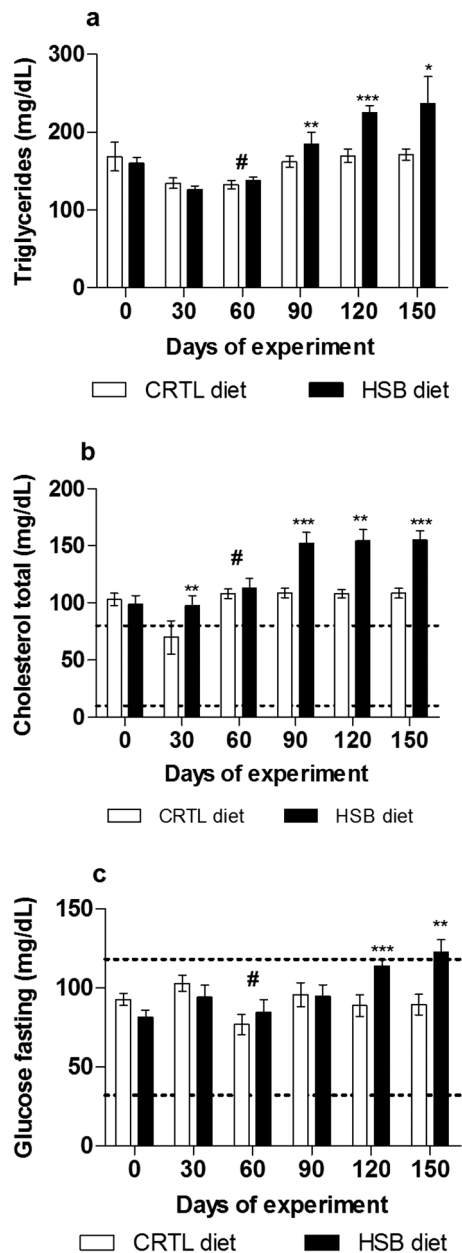


Fig. 2. (a) Triglycerides in milligrams per deciliter. (b) Cholesterol in milligrams per deciliter. (c) Glucose fasting in milligrams per deciliter. Hamsters fed the AIN-93 M diet (CTRL, $n=6$) and hamsters fed the high sugar and butter diet (HSB, $n=6$ or 4). # beginning of use of the heater in the animal house. * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$. The data are shown as the mean \pm standard deviation.

maintain the animal house temperature higher than the outside temperature, new experiments were performed to analyse other parameters, as visceral adiposity (experiments 2 and 3, data not shown). For these experiments, the animals were fed the same diet offered to

animals in the first experiment.

The external temperature average for experiment 2 was 29.6°C, and the average temperature of the animal house was 30.9°C (Supplementary Fig. S1c). As in experiment 1, there was a significant difference between the feed intake of the CTRL group (8.97 ± 1.97 g/day/animal) and the HSB group (7.49 ± 0.23 g/day/animal) ($P<0.05$). No difference was observed in water consumption (data not shown). In this experiment, the HSB group had significantly different weights at the 38th day ($P<0.01$) of the experiment, and the experiment was extended for 30 days more, to analyze possible biochemical and haematological alterations, and the weights difference between the two groups remained significantly different ($P<0.01$).

Two animals from the HSB group died during the experimentation period. Therefore, the weight and visceral adiposity values for this group were measured on the 68th day for four animals. Nevertheless, the obesity had been established with significant differences between the HSB and CTRL groups as demonstrated on both parameters, final weight (Supplementary Fig. S2a) and visceral adiposity (Supplementary Fig. S2b).

In experiment 2, the HSB group had elevated levels of triglycerides ($P<0.001$; Supplementary Fig. S3a) and cholesterol ($P<0.01$; Supplementary Fig. S3b) within 38 days, which remained the case until the end of the experiment. Blood glucose levels were significantly lower in the CTRL group at the 38th day ($P<0.01$), but this did not continue through the end of the experiment. The glucose levels remained within the reference values for hamsters, and no difference was observed at the 68th day (Supplementary Fig. S3c).

The HSB group of experiment 2 had increased WBC cells from the 38th day until the end of the experiment in animals fed the high sugar and butter diet ($P<0.01$; Supplementary Fig. S4a). On the 38th day, we observed an increase in neutrophils and monocytes ($P<0.01$; Supplementary Fig. S4b and $P<0.001$; Supplementary Fig. S4d, respectively). However, on the 68th day, we observed a decline of these cells and a predominance of lymphocytes ($P<0.01$) in the blood of animals from the HSB group (Supplementary Fig. S4c).

As previously mentioned, experiment 2 had two deaths from the HSB group at 50 and 59 days, and it was observed that these animals had an excessive increase in leukocyte numbers, with values of 24,800 and 23,560 leukocyte/mm³ for each animal.

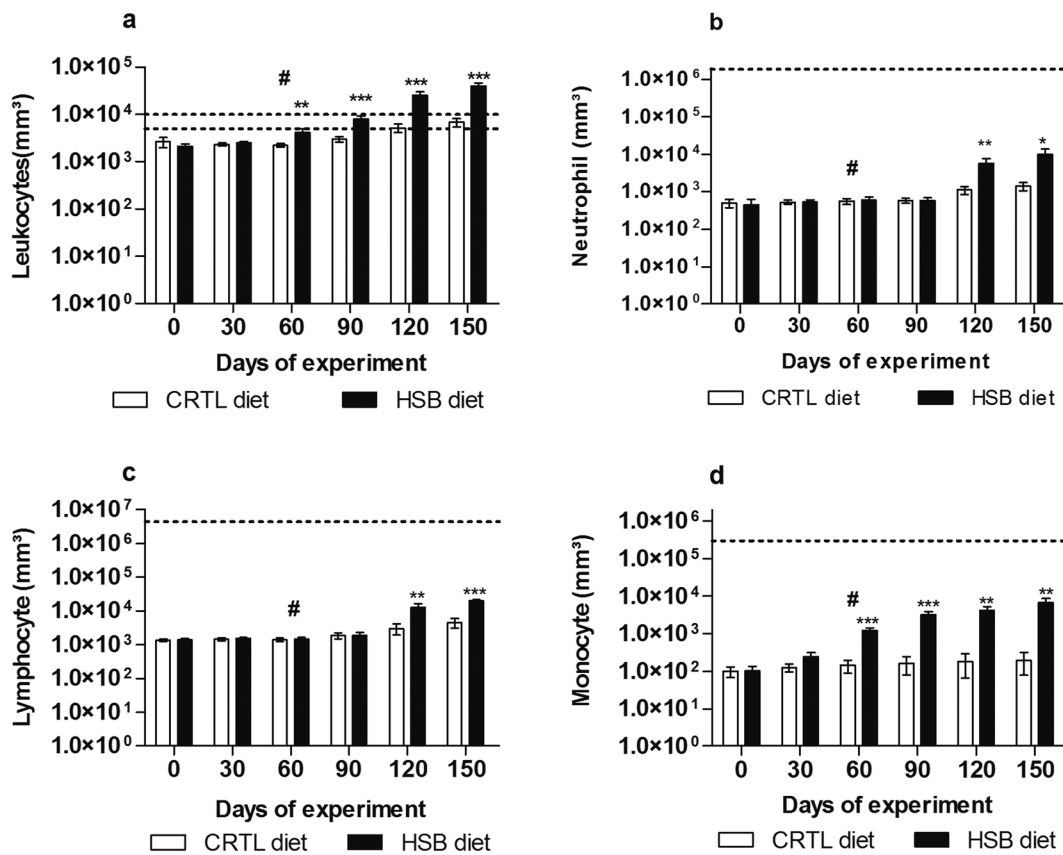


Fig. 3. Total and differential leukocyte counts. (a) Leukocytes per mm³ of blood. (b) Neutrophils per mm³ of blood. (c) Lymphocytes per mm³ of blood. (d) Monocyte per mm³ of blood. Hamsters fed the AIN 93 M diet (CTRL, n=6) and hamsters fed the high sugar and butter diet (HSB, n=6 or 4). # beginning of heater use in the animal house. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$. The data are shown as the mean \pm standard deviation.

Discussion

The main genesis of obesity in humans is due to the ingestion of a high fat and high sugar diet. Considering that obesity represents a serious global problem, the establishment of experimental models that can be extrapolated to human's physiological conditions is crucial. Different strategies have been used to establish animal's models to study obesity, as an example by lesion of the medial hypothalamus region that is responsible for satiety [40]. However, in most of the situations the induced obesity does not results in an ideal model of study, because the parameters that are altered by high fat and high sugar diet could not be achieved. In this work, a clinical condition of obesity was established in a hamster model using a high sugar and butter diet and high temperatures.

The influence of temperature observed in experiment 1 demonstrates that temperature needs to be under close surveillance when inducing obesity in hamsters. Accord-

ing to Wade and Bartness [50], it is harder to induce obesity in hamsters in seasons other than summer, corroborating our data. The difficulty on the development of obesity induction protocols is because these animals have a distinct metabolism: they can hibernate at any time of year according to the environmental conditions, which may influence weight gain [4, 22, 27]. It was also observed a behavior of dominance and stress, to all groups. This behavior is common in models maintained in group. However, the animals from the HSB group exhibited an extremely aggressive behavior and cage dominance, preventing weight gain for the other animals. The stress and aggressiveness observed in obese animals can lead to an increase in cortisol levels, causing various physiological changes in the body. Recent studies have demonstrated the involvement of the 11 β -HSD1 enzyme (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1) in the activation of cortisol in adipose tissue and its relation to the development of obesity and insulin resistance, as corti-

sol is an insulin-antagonistic [21, 35].

Experiment 1 covered three seasons (fall, winter and spring), with a natural temperature average of 25.7°C throughout the period. Unlike other studies described in the literature [5, 24], that reported the induction of obesity in hamsters at temperatures below 25°C, hamsters in this study only reached obesity after the introduction of a heater into the animal house that increased the temperature by 5.2°C (25.1°C to 30.3°C). These results were replicated in experiment 2 (supplementary data). These data corroborate the results of Zhao [56], which indicated that temperature was an essential factor in the accumulation of fat in hamsters. Cannon and Nedergaard [8] observe that the ideal temperature for housing rodents would be 30°C because, this is a zone of thermal neutrality to these animals, with results that can be compared to the humans thermal neutrality zone. The work done by Zhang *et al.* [57] has shown that the activity of the mitochondria at a temperature of 30°C is lower in hamsters, thus reducing thermogenesis. The consumption of a hyperlipid diet, leads to an increase in oxidative stress, resulting in the elevation of free fatty acids, hyperglycemia and postprandial hypertriglyceremia [14]. These factors are responsible for the elevation of reactive oxygen species, formation of superoxide anion and production of proinflammatory cytokines [10]. Apparently, increased oxidative stress decreases the activity of the uncoupling protein 1 (UCP1), present in brown adipose tissue besides being involved in mechanisms that aggravate morbidity in obese individuals [57]. Although brown adipose tissue is present mainly in newborn humans, it is known to be of some importance for adults and its metabolism is conditioned by changes in temperature, mainly when it drop off, and that is associated with weight loss. However, the interruption of the cold exposure due to the increase of the temperature on internal environments, leads to the weight gain and thermogenesis decreases [29].

In experiment 3 (data not shown), performed during winter and spring, even using the heater, the temperature was not increased above 28.8°C and, even after 150 days, we were unable to induce obesity in the animals. Coherently with the results found on the two previous experiments, where obesity was accompanied by biochemical and haematological changes, no such alterations were detected in this experiment to any of the evaluated parameters. This can be explained by the fact that with higher temperature, animals required less energy to keep

their body temperature, resulting in a positive energy balance [49]. Kodama and Pace [25] showed that the decrease in temperature decreased the accumulation of body fat in hamsters, as observed in this study, and the narrow temperature variation range (30.3°C and 30.9°C in experiments 1 and 2, respectively, to 28.8°C, in experiment 3, Supplementary Fig. S1e) may be indicative that the temperature for Syrian hamsters is really a determining factor for the induction of obesity. Although the present study did not induce obesity in a temperature equal or lower than 28.8°C, other studies have demonstrated induction of obesity in experimental models at a temperature lower than the one established in this work [8, 49]. However, these studies did not characterize the season in which the experiments were conducted. Meisel *et al.* [31] showed that obesity induction is influenced by the way animals are housed, showing that female hamsters housed in groups exhibited greater adiposity than individually housed animals. The grouping of animals leads to an increase in temperature, reducing the energy expenditure necessary to maintain body temperature, which results in a positive energy balance. Moreover, the grouping may cause stress to the animals because hamsters live alone under natural conditions [6, 18]. Foster *et al.* [15] found that hamsters subjected to stress showed statistically increased food intake, weight gain and adiposity. Given that animals in this study were housed in groups, this may have favoured the weight gain for both the HSB group and the CTRL group. In our experiments, the animals from the HSB group ingested a smaller amount of food when compared to animals from the CTRL group, which demonstrated that the gain in weight and visceral fat were not caused by hyperphagia but by the high calorie modified diet. These data are similar to those found by Ramirez [36]. On the other hand, the volume of water was not different for the CTRL and HSB groups in any of the experiments, contrary to the findings, of Townsend *et al.* [48] in an experiment using mice.

Carbohydrates are a major source of energy for the functioning of the body. However, excessive consumption of carbohydrates, causes the expansion of adipose tissue, hyperglycemia and increased cholesterol [7, 9, 43, 55], whereas the exaggerated consumption of fat also produces these changes and promotes non-alcoholic fatty liver disease [17]. Furthermore, it has been demonstrated that the type of ingested carbohydrate correlates to the degree of inflammation intensity and with

the outcome of cardiovascular diseases [17]. This fact is related to the speed that the body absorb each type of carbohydrate influencing the ability to raise the glycemic index. Although the relationship between inflammation and the intake of carbohydrates is still obscure [20], evidence indicates a possible change of pro-inflammatory cytokines [19]. The high fat diet is a more natural way to induce obesity and is able to cause alterations of the biochemical parameters in experimental models [9, 23, 33].

Studies have shown the association of hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia with obesity, indicating that the increased levels of these molecules is related to predisposition to heart disease [2, 37, 41, 44]. The consumption of a diet high in fat and simple carbohydrates interferes with fat absorption because sugar presents the capacity of increases lipid storage on the enterocytes and of stimulate the secretion of chylomicrons [32]. As a hormonally active tissue, visceral adipose tissue releases different bioactive molecules and hormones that are able to interact with the immune system of the individual, interfering in many pathologic processes.

Many authors have reported an increase in white blood cells, triglycerides and body mass index in obese individuals, relating these results to the inflammation seen in obesity. Whereas the inflammatory response is associated with an increase in macrophages, other cell types are involved in the inflammation mechanism of the adipose tissue, such as neutrophils, mast cells, B lymphocytes and T lymphocytes [13, 38, 45, 51]. These results corroborate the results found in the present study in which leucocytosis was induced with an increase in lymphocytes, monocytes, and neutrophils. Neutrophils play an important role in the inflammatory response and in the recruitment of macrophages [46]. They also have the ability to respond to inflammatory stimuli and are the first cells to arrive at the site of inflammation [1].

In conclusion, this study showed that the temperature and the season influence the obesity establishment in Syrian-hamsters using a diet with high simple carbohydrates and lipids. The temperature above 30°C provides the ideal conditions for establishment of obesity in this model. Furthermore, the change in the type of food caused haematological and biochemical changes, similar to what is observed in human obesity, and provided evidence of inflammation in hamsters fed with HSB diet (obese animals).

Acknowledgments

This work was supported by CAPES – Process number: 23038.005297/2011–39, FAPEMIG – Process number: APQ 02456–12 and Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG. SRCD was supported by Universidade Estácio de Sá (Estácio/UNESA). EMR was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

References

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S.H.I.V. 2016. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
2. Austin, M.A., Hokanson, J.E., and Edwards, K.L. 1998. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Cardiol.* 81:(4A): 7B–12B. [Medline] [CrossRef]
3. Baharia, R.K., Tandon, R., Sahasrabudhe, A.A., Sundar, S., and Dube, A. 2014. Nucleosomal histone proteins of *L. donovani*: a combination of recombinant H2A, H2B, H3 and H4 proteins were highly immunogenic and offered optimum prophylactic efficacy against *Leishmania* challenge in hamsters. *PLoS One* 9: e97911. [Medline] [CrossRef]
4. Barabino, D.J. and Dybowski, C. 1992. Nuclear magnetic resonance of hydrogen sorbed by powdered palladium metal and alumina-supported palladium. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 1: 5–12. [Medline] [CrossRef]
5. Bhatena, J., Kulamarva, A., Martoni, C., Urbanska, A.M., Malhotra, M., Paul, A., and Prakash, S. 2011. Diet-induced metabolic hamster model of nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 4: 195–203. [Medline]
6. Brain, P.F. 1972. Effects of isolation/grouping on endocrine function and fighting behavior in male and female golden hamsters. (*Mesocricetus auratus* Waterhouse). *Behav. Biol.* 7: 349–357. [Medline] [CrossRef]
7. Browning, J.D., Baker, J.A., Rogers, T., Davis, J., Satapati, S., and Burgess, S.C. 2011. Short-term weight loss and hepatic triglyceride reduction: evidence of a metabolic advantage with dietary carbohydrate restriction. *Am. J. Clin. Nutr.* 93: 1048–1052. [Medline] [CrossRef]
8. Cannon, B. and Nedergaard, J. 2009. Thermogenesis challenges the adipostat hypothesis for body-weight control. *Proc. Nutr. Soc.* 68: 401–407. [Medline] [CrossRef]
9. Chang, J.S., Chen, Y.C., Owaga, E., Palupi, K.C., Pan, W.H., and Bai, C.H. 2014. Interactive effects of dietary fat/carbohydrate ratio and body mass index on iron deficiency anemia among Taiwanese women. *Nutrients* 6: 3929–3941. [Medline] [CrossRef]
10. Choi, S.W., Benzie, I.F.F., Ma, S.W., Strain, J.J., and Hannigan, B.M. 2008. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic. Biol. Med.* 44: 1217–1231. [Medline] [CrossRef]
11. Diniz, Y.S., Burneiko, R.M., Seiva, F.R., Almeida, F.Q., Galhardi, C.M., Filho, J.L., Mani, F., and Novelli, E.L. 2008. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *Int. J. Cardiol.* 124: 92–99. [Medline] [CrossRef]
12. Ebihara, H., Zivcec, M., Gardner, D., Falzarano, D., LaC-

- asse, R., Rosenke, R., Long, D., Haddock, E., Fischer, E., Kawaoka, Y., and Feldmann, H. 2013. A Syrian golden hamster model recapitulating ebola hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 207: 306–318. [Medline] [CrossRef]
13. Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., and Levy, R. 2008. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res.* 49: 1894–1903. [Medline] [CrossRef]
 14. Esposito, K. and Giugliano, D. 2006. Diet and inflammation: a link to metabolic and cardiovascular diseases. *Eur. Heart J.* 27: 15–20. [Medline] [CrossRef]
 15. Foster, M.T., Solomon, M.B., Huhman, K.L., and Bartness, T.J. 2006. Social defeat increases food intake, body mass, and adiposity in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290: R1284–R1293. [Medline] [CrossRef]
 16. Gad, S.C. 2007. *Animal Models in Toxicology*, 2nd ed. London, New York.
 17. Gao, M., Ma, Y., and Liu, D. 2015. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLoS One* 10: e0119784. [Medline] [CrossRef]
 18. Germann, P.G., Kohler, M., Ernst, H., Baumgart, H., and Mohr, U. 1990. The relation of amyloidosis to social stress induced by crowding in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Z. Versuchstierkd.* 33: 271–275. [Medline]
 19. Goletzke, J., Buyken, A.E., Joslowski, G., Bolzenius, K., Remer, T., Carstensen, M., Egert, S., Nöthlings, U., Rathmann, W., Roden, M., and Herder, C. 2014. Increased intake of carbohydrates from sources with a higher glycemic index and lower consumption of whole grains during puberty are prospectively associated with higher IL-6 concentrations in younger adulthood among healthy individuals. *J. Nutr.* 144: 1586–1593. [Medline] [CrossRef]
 20. Greenwood, D.C., Threapleton, D.E., Evans, C.E., Cleghorn, C.L., Nykjaer, C., Woodhead, C., and Burley, V.J. 2013. Glycemic index, glycemic load, carbohydrates, and type 2 diabetes: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care* 36: 4166–4171. [Medline] [CrossRef]
 21. Hewagalamulage, S.D., Lee, T.K., Clarke, I.J., and Henry, B.A. 2016. Stress, cortisol, and obesity: a role for cortisol responsiveness in identifying individuals prone to obesity. *Domest. Anim. Endocrinol.* 56:(Suppl): S112–S120. [Medline] [CrossRef]
 22. Hoffman, R.A., Hester, R.J., and Towns, C. 1965. Effect of light and temperature on the endocrine system of the golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse). *Comp. Biochem. Physiol.* 15: 525–533. [Medline] [CrossRef]
 23. Im, J.Y., Ki, H.H., Xin, M., Kwon, S.U., Kim, Y.H., Kim, D.K., Hong, S.P., Jin, J.S., and Lee, Y.M. 2015. Anti-obesity effect of *Triticum aestivum* sprout extract in high-fat-diet-induced obese mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79: 1133–1140. [Medline] [CrossRef]
 24. Kim, H., Bartley, G.E., Arvik, T., Lipson, R., Nah, S.Y., Seo, K., and Yokoyama, W. 2014. Dietary supplementation of chardonnay grape seed flour reduces plasma cholesterol concentration, hepatic steatosis, and abdominal fat content in high-fat diet-induced obese hamsters. *J. Agric. Food Chem.* 62: 1919–1925. [Medline] [CrossRef]
 25. Kodama, A.M. and Pace, N. 1964. Effect of environmental temperature on hamster body fat composition. *J. Appl. Physiol.* 19: 863–867. [Medline]
 26. Krelstein, M.S., Thomas, M.P., and Horowitz, J.M. 1990. Thermal effects on long-term potentiation in the hamster hippocampus. *Brain Res.* 520: 115–122. [Medline] [CrossRef]
 27. Lewis, C.J., Becker, J.J., Manis, A.D., Hamilton, J.S., Horowitz, J.M., and Horowitz, B.A. 2012. Neuroprotection supports signal processing in the hippocampus of Syrian hamsters, a facultative hibernator. *Neurosci. Lett.* 520: 20–25. [Medline] [CrossRef]
 28. Maioli, T.U., Gonçalves, J.L., Miranda, M.C.G., Martins, V.D., Horta, L.S., Moreira, T.G., Godard, A.L., Santiago, A.F., and Faria, A.M. 2016. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. *Inflamm. Res.* 65: 169–178. [Medline] [CrossRef]
 29. Mavrogianni, A., Johnson, F., Ucci, M., Marmot, A., Wardle, J., Oreszczyn, T., and Summerfield, A. 2013. Historic variations in winter indoor domestic temperatures and potential implications for body weight gain. *Indoor Built Environ.* 22: 360–375. [Medline] [CrossRef]
 30. Meigs, J.B. 2010. Epidemiology of type 2 diabetes and cardiovascular disease: translation from population to prevention: the Kelly West award lecture 2009. *Diabetes Care* 33: 1865–1871. [Medline] [CrossRef]
 31. Meisel, R.L., Hays, T.C., Del Paine, S.N., and Luttrell, V.R. 1990. Induction of obesity by group housing in female Syrian hamsters. *Physiol. Behav.* 47: 815–817. [Medline] [CrossRef]
 32. Morgantini, C., Xiao, C., Dash, S., and Lewis, G.F. 2014. Dietary carbohydrates and intestinal lipoprotein production. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 17: 355–359. [Medline] [CrossRef]
 33. Ouchfoun, M., Eid, H.M., Musallam, L., Brault, A., Li, S., Vallerand, D., Arnason, J.T., and Haddad, P.S. 2016. Labrador tea (*Rhododendron groenlandicum*) attenuates insulin resistance in a diet-induced obesity mouse model. *Eur. J. Nutr.* 55: 941–954. [Medline] [CrossRef]
 34. Pacanaro, C.P., Dias, S.R., Serafim, L.R., Costa, M.P., Aguiar, E., Paes, P.R., Alvarez-Leite, J.I., and Rabelo, E.M. 2014. Evaluation of biochemical, hematological and parasitological parameters of protein-deficient hamsters infected with *Ancylostoma ceylanicum*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8: e3184. [Medline] [CrossRef]
 35. Park, S.Y., Bae, J.H., and Cho, Y.S. 2014. Cortisone induces insulin resistance in C2C12 myotubes through activation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and autocrinal regulation. *Cell Biochem. Funct.* 32: 249–257. [Medline] [CrossRef]
 36. Ramirez, I. 1990. Does dietary hyperphagia contradict the lipostatic theory? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 117–123. [Medline] [CrossRef]
 37. Rapp, R.J. 2002. Hypertriglyceridemia: a review beyond low-density lipoprotein. *Cardiol. Rev.* 10: 163–172. [Medline] [CrossRef]

38. Rausch, M.E., Weisberg, S., Vardhana, P., and Tortoriello, D.V. 2008. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int. J. Obes.* 32: 451–463. [Medline] [CrossRef]
39. Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C. Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123: 1939–1951. [Medline]
40. Rowland, N.E., Miceli, M.O., Malsbury, C.W., Baile, C.A., Della-Fera, M.A., Gingerich, R.L., and Caputo, F.A. 1986. Medial hypothalamic lesions in Syrian hamsters: characterization of hyperphagia and weight gain. *Physiol. Behav.* 36: 513–521. [Medline] [CrossRef]
41. Sacks, F.M. 2001. The relative role of low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in coronary artery disease: evidence from large-scale statin and fibrate trials. *Am. J. Cardiol.* 88:(12A): 14N–18N. [Medline] [CrossRef]
42. Safronetz, D., Ebihara, H., Feldmann, H., and Hooper, J.W. 2012. The Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Res.* 95: 282–292. [Medline] [CrossRef]
43. Saleh, J., Sniderman, A.D., and Cianflone, K. 1999. Regulation of Plasma fatty acid metabolism. *Clin. Chim. Acta* 286: 163–180. [Medline] [CrossRef]
44. Sposito, A.C., Mansur, A.P., Maranhão, R.C., Martinez, T.R.L., Aldrighi, J.M., and Ramires, J.A.F. 2001. Triglyceride and lipoprotein (a) are markers of coronary artery disease severity among postmenopausal women. *Maturitas* 39: 203–208. [Medline] [CrossRef]
45. Strissel, K.J., DeFuria, J., Shaul, M.E., Bennett, G., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. 2010. T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1918–1925. [Medline] [CrossRef]
46. Talukdar, S., Oh, D.Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., Ofrecio, J., Lin, M., Brenner, M.B., and Olefsky, J.M. 2012. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* 18: 1407–1412. [Medline] [CrossRef]
47. Thomas, T.R., Pellechia, J., Rector, R.S., Sun, G.Y., Sturek, M.S., and Laughlin, M.H. 2002. Exercise training does not reduce hyperlipidemia in pigs fed a high-fat diet. *Metabolism* 51: 1587–1595. [Medline] [CrossRef]
48. Townsend, K.L., Lorenzi, M.M., and Widmaier, E.P. 2008. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. *Endocrine* 33: 176–188. [Medline] [CrossRef]
49. Wade, G.N. 1983. Dietary obesity in golden hamsters: reversibility and effects of sex and photoperiod. *Physiol. Behav.* 30: 131–137. [Medline] [CrossRef]
50. Wade, G.N. and Bartness, T.J. 1984. Seasonal obesity in Syrian hamsters: effects of age, diet, photoperiod, and melatonin. *Am. J. Physiol.* 247: R328–R334. [Medline]
51. Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112: 1796–1808. [Medline] [CrossRef]
52. Winzell, M.S. and Ahrén, B. 2004. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53:(Suppl 3): S215–S219. [Medline] [CrossRef]
53. Woods, S.C., Seeley, R.J., Rushing, P.A., D'Alessio, D., and Tso, P. 2003. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J. Nutr.* 133: 1081–1087. [Medline]
54. World Health Organization (WHO) Obesity and overweight. WHO, Fact sheet 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
55. Yanai, H., Katsuyama, H., Hamasaki, H., Abe, S., Tada, N., and Sako, A. 2015. Effects of dietary fat intake on HDL metabolism. *J. Clin. Med. Res.* 7: 145–149. [Medline] [CrossRef]
56. Zhao, Z.J. 2011. Serum leptin, energy budget, and thermogenesis in striped hamsters exposed to consecutive decreases in ambient temperatures. *Physiol. Biochem. Zool.* 84: 560–572. [Medline] [CrossRef]
57. Zhang, J.Y., Zhao, X.Y., Wang, G.Y., Wang, C.M., and Zhao, Z.J. 2016. Food restriction attenuates oxidative stress in brown adipose tissue of striped hamsters acclimated to a warm temperature. *J. Therm. Biol.* 58: 72–79. [Medline] [CrossRef]



Short communication

Development of new microsatellites for the hookworm *Ancylostoma caninum* and analysis of genetic diversity in Brazilian populations



Élida Mara Leite Rabelo ^{a,*}, Rodrigo Rodrigues Cambraia de Miranda ^b, Luis Fernando Viana Furtado ^a, Rodrigo Aparecido Fernandes Redondo ^c, Jacob Adam Tennesen ^d, Michael Scott Blouin ^d

^a Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas – CBAB, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Av. da Universidade 850, campus Betânia, CEP 62040-370 Sobral, Ceará, Brazil

^c HTS Laboratory, The Francis Crick Institute, 1 Midland Road NW1 1AT, London, United Kingdom

^d Department of Integrative Biology, Oregon State University, Corvallis, OR, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2016

Received in revised form 9 March 2017

Accepted 10 March 2017

Available online 10 March 2017

Keywords:

Ancylostoma caninum

Microsatellite

Genetic diversity

ABSTRACT

Considering the great efforts towards formulating a vaccine against hookworms, and the concerns about the spread of drug resistance through hookworm populations, it is justified to study the molecular diversity and population genetic structure of these nematodes. This work had the aim to develop microsatellite markers to investigate the genetic structure and the molecular diversity of Brazilian populations of *Ancylostoma caninum*. Seven microsatellites markers were successfully used to characterize five Brazilian populations. These findings may contribute to a better comprehension of the ecology, patterns of transmission, drug resistances and development of immunotherapeutic strategies in hookworms.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The hookworm *Ancylostoma caninum* is considered one of the primary causes of death in newborn dogs (Miller, 1966). Besides its importance in animal health, this parasite has zoonotic potential, with several reports of cutaneous larva migrans (Bowman et al., 2010). Furthermore, it is considered a causative agent of eosinophilic enteritis in humans (Prociv and Croese, 1990).

Recurrent drug resistance has been reported to the drug of choice, benzimidazole, and genetic polymorphism related to drug resistance has been described in *A. caninum* populations (Furtado et al., 2014). Furthermore, despite all efforts to control hookworms, no effective vaccine has been discovered (Hawdon, 2014). Knowledge of population genetic structure in this species may therefore inform us about the likelihood that drug resistance alleles selected for in one population will rapidly spread to other populations via gene flow. Similarly, knowledge of genetic structure can inform us about the likelihood that vaccines developed against one strain of the parasite will work on all populations (Chow et al., 2008).

Although genetic diversity of hookworm populations has been studied using mitochondrial markers (Hawdon et al., 2001; Hu et al., 2004; Miranda et al., 2008) and microsatellites markers have been described

for *A. caninum* (Schwenkenbecher and Kaplan, 2007), no study used microsatellites to characterize the genetic diversity in this worm. This study identified and characterized seven microsatellite loci in the genome of *A. caninum*, and used them to evaluate the genetic diversity of Brazilian populations of this parasite.

2. Material and methods

2.1. Population studied and DNA extraction

Populations of *A. caninum* were obtained from 5 different geographical regions from Brazil. The localities and number of worms per population are shown in Table S1. DNA extraction was performed as described in a previous study from our group (Miranda et al., 2008).

2.2. Identification and selection of DNA microsatellite loci of *A. caninum*

Approximately 104,000 *A. caninum* sequences were retrieved from the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), and submitted to the Tandem Repeats Finder software (<http://tandem.bu.edu/trf.html>) (Benson, 1999).

Thirty eight microsatellite loci including dinucleotides, trinucleotides and tetranucleotides repeats were selected and tested by nested PCR in a single tube, according to the methodology described by

* Corresponding author.

E-mail address: rabelo@icb.ufmg.br (É.M.L. Rabelo).

Table 1
Expected (He) and observed (Ho) heterozygosity, F_{IS} , for each locus used in the five Brazilian populations of *A. caninum*.

Locus	Ac07					Ac19					Ac23					Ac26				
	BH	CG	CT	RP	SL	BH	CG	CT	RP	SL	BH	CG	CT	RP	SL	BH	CG	CT		
Pop.	35	43	34	10	49	33	40	34	11	46	33	38	27	10	45	16	26	23		
N_{IG}	70	86	68	20	98	66	80	68	22	92	66	76	54	20	90	32	52	46		
N_{CG}	9 (0)	11 (0)	10 (0)	8 (1)	12 (2)	8 (1)	10 (4)	9 (2)	5 (0)	8 (1)	10 (1)	11 (0)	10 (2)	5 (0)	12 (2)	10 (1)	7 (0)	13 (4)		
A(u)	0.802	0.835	0.862	0.884	0.903	0.606	0.772	0.812	0.758	0.768	0.798	0.795	0.863	0.721	0.879	0.871	0.591	0.882		
H_E	0.457	0.512	0.353	0.900	0.429	0.576	0.775	0.824	0.818	0.717	0.758	0.395	0.630	0.300	0.622	0.625	0.538	0.522		
H_O	0.433*	0.390*	0.594*	-0.019	0.528*	0.050	-0.003	-0.015	-0.084	0.066	0.052	0.507*	0.274*	0.597*	0.295*	0.289*	0.091	0.414*		
F_{IS}																				

N_{IG} = number of genotyped individuals; N_{CG} = number of gene copies; A = number of alleles identified and U the number of unique alleles per locus per population; H_E = expected heterozygosity; H_O = observed heterozygosity; F_{IS} = "structuring index of individuals in a subpopulation"; * $P < 0.05$ (significance level = 0.05).

Table 1
Expected (He) and observed (Ho) heterozygosity, F_{IS} , for each locus used in the five Brazilian populations of *A. caninum*.

Locus	Ac26					Ac30					Ac31					Ac32				
	RP	SL	BH	CG	CT	RP	SL	BH	CG	CT	RP	SL	BH	CG	CT	RP	SL	BH	CG	CT
Pop.	3	21	24	41	29	4	44	33	45	35	11	46	32	40	35	11	44	35	44	44
N_{IG}	6	42	48	82	58	8	88	66	90	70	22	92	64	80	70	22	88	88	88	88
N_{CG}	2 (0)	11 (3)	15 (1)	11 (0)	16 (2)	5 (0)	14 (2)	9 (0)	11 (0)	11 (2)	5 (0)	15 (2)	3 (1)	4 (0)	6 (0)	3 (0)	3 (0)	6 (0)	6 (0)	6 (0)
A(u)	0.333	0.863	0.913	0.881	0.917	0.858	0.880	0.767	0.841	0.851	0.714	0.896	0.543	0.655	0.612	0.697	0.686	0.686	0.686	0.686
H_E	0.333	0.381	0.458	0.341	0.655	0.500	0.614	0.667	0.844	0.457	0.364	0.783	0.344	0.400	0.600	0.364	0.500	0.500	0.500	0.500
H_O	0.000	0.565*	0.503*	0.615*	0.289*	0.454	0.306*	0.133	-0.004	0.467*	0.503*	0.128*	0.371*	0.392*	0.021	0.490*	0.273*	0.273*	0.273*	0.273*
F_{IS}																				

N_{IG} = number of genotyped individuals; N_{CG} = number of gene copies; A = number of alleles identified and U the number of unique alleles per locus per population; H_E = expected heterozygosity; H_O = observed heterozygosity; F_{IS} = "structuring index of individuals in a subpopulation"; * $P < 0.05$ (significance level = 0.05).

Table 2
Analysis of molecular variance (AMOVA) held to the Brazilian populations of *Ancylostoma caninum* using the seven microsatellites DNA loci.

Variation source	g.l.*	Square sum	Components variation	Variation %
Among populations	R _{ST} 4	3840.17	14.83	8.85
	F _{ST} 4	54.21	0.18	6.12
Among individuals within a population	R _{ST} 172	27,576.06	44.41	26.49
	F _{ST} 172	523.889	0.83154	27.90
Within individuals	R _{ST} 177	15,566	108.46	64.68
	F _{ST} 177	298	1.96678	65.99
Total	R _{ST}	46,982.23	167.70	
	F _{ST}	876.10	2.98	
Fixation index (to the 7 loci)	(R _{ST})	F _{IS} = 0.290		
		F _{ST} = 0.088		
		F _{IT} = 0.353		
	(F _{ST})	F _{IS} = 0.297		
		F _{ST} = 0.061		
		F _{IT} = 0.340		

The F_{ST} data, R_{ST} and the molecular variance (AMOVA) were calculated using the Arlequin program 3:11. All calculated *P* values to the fixation index were statistically significant (*P* < 0.05).

Schuelke (2000). Table S2 shows the loci evaluated in this study, the synthesized primers, and PCR conditions.

2.3. Data analysis

The raw data obtained from ABI Prism 3100 Genetic Analyzer were analyzed using the Genotyper software NT version 3.7 (Applied Biosystems). The expected heterozygosity (He) (not influenced by sample size; Nei, 1978), observed heterozygosity (Ho), average number of alleles per locus and F_{IS}, were calculated using Arlequin version 3.11 (Excoffier et al., 1992). This same software was used to test Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium (Fisher's exact test, 10,000 "Race"). Null alleles were estimated using MicroChecker (<http://www.microchecker.hull.ac.uk/>, Oosterhout et al., 2006).

3. Results and discussion

The thirty eight primer pairs were tested by nested PCR reaction under different annealing temperatures (data not shown). Most of the evaluated loci produced no amplicon. Seven loci were successfully amplified and genotyped. Table S1 shows number of alleles found in each loci and the number of individuals sampled per population. Not all samples amplified at all loci, most probably due to the presence of polymorphisms at the primer annealing sites. Indeed some sequence difference is expected given the genetic diversity observed in hookworm population in this study and in a previous work, using the same samples, to a different molecular marker (Miranda et al., 2008). Since samples used in this study were successfully amplified in another work using a different marker (Furtado et al., 2016), poor DNA quality was excluded as a cause of impaired amplifications.

Table 1 presents the number of identified alleles, the observed (Ho) and expected (He) heterozygosity indexes and the inbreeding coefficient (F_{IS}) to each locus for each Brazilian population of *A. caninum*. All studied populations showed a high degree of genetic diversity, with polymorphisms in all evaluated loci. Number of alleles per population at each locus ranged from 2 to 16 whereas the number of alleles per locus ranged from six (Ac32) to 23 (Ac23 and Ac30).

Observed F_{IS} values were high (F_{IS} > 0.35) and statistically significant for most loci and populations (Table 1). Several factors may cause high F_{IS} within populations, such as null alleles, as has been reported to *Haemonchus contortus* (Redman et al., 2015), nonrandom mating due to inbreeding, or a Wahlund effect (e.g. cryptic subdivision within each population). Null alleles were detected in practically all loci (Table S3).

The amplification of the microsatellite markers identified here proved to be quite heterogeneous. These loci showed, in general, significant levels of polymorphism in all populations with most of the diversity allocated within individuals (R_{ST} ≈ 65%), but with notable variation among populations (R_{ST} ≈ 9%) (Table 2).

Geographic distance is not the main isolation barrier for many helminth species, which have generally low population structure (Blouin et al., 1999; Hawdon et al., 2001). In this work we observed moderate genetic differentiation among Brazilian subpopulations of *A. caninum*, which suggests that geographical distance may restrict gene flow between some populations. This pattern of low to moderate population differentiation and absence of isolation due to geographical distance is in agreement with a study of the anthrophilic hookworms, *Necator americanus* in China, in an equivalent geographical scale to the one presented here (Hawdon et al., 2001). Furthermore, the population structure observed in *Ascaris suum* and *Ascaris lumbricoides* from pigs and humans are also similar to our findings (Anderson, 1995; Anderson and Jaenike, 1997). In contrast, studies on Trichostrongylid nematodes using microsatellite DNA and mitochondrial markers (Otsen et al., 2000; Grillo et al., 2007; Redman et al., 2008) often find higher genetic diversity and less population structure. This difference may be due to a larger effective population size in trichostrongylids, which leads to high levels of genetic diversity and lower rates of genetic drift (Blouin et al., 1999).

In conclusion new molecular markers for the characterization of hookworm's populations were developed and tested. Furthermore, we show that the sampled *A. caninum* populations presented a degree of genetic diversity and population structure similar to that of other hookworms and *Ascarid nematodes*. These results are also consistent with those of a previous study using the same samples and analyzing the cytochrome *c* oxidase subunit I gene (Miranda et al., 2008). The new microsatellites markers will be useful for studies on molecular ecology and in the assessment and control strategies for these parasites worldwide.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.008>.

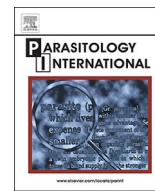
Acknowledgements

This work received financial support from CNPq (Process number 470968/2014-1) and FAPEMIG (Process number APQ-02417-16).

References

- Anderson, T.J., 1995. *Ascaris* infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. *Parasitology* 110, 215–219.
- Anderson, T.J., Jaenike, J., 1997. Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. *Parasitology* 115, 325–342.
- Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27, 573–580.
- Blouin, M.S., Liu, J., Berry, R.E., 1999. Life cycle variation and the genetic structure of nematode populations. *Heredity* 83, 253–259.
- Bowman, D.D., Montgomery, S.P., Zajac, A.M., Eberhard, M.L., Kazacos, K.R., 2010. Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. *Trends Parasitol.* 26 (4), 162–167.
- Chow, C., Gauci, C.G., Vural, G., Jenkins, D.J., Heath, D.D., Rosenzvit, M.C., Harandi, M.F., Lightowers, M.W., 2008. *Echinococcus granulosus*: variability of the host-protective EG95 vaccine antigen in G6 and G7 genotypic variants. *Exp. Parasitol.* 119 (4), 499–505.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Furtado, L.F., Bello, A.C., dos Santos, H.A., Carvalho, M.R., Rabelo, É.M., 2014. First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. *Vet. Parasitol.* 206 (3–4), 313–316.
- Furtado, L.F., Alves, W.P., Moreira, T.B., Costa Junior, L.M., Miranda, R.R., Rabelo, É.M., 2016. Standardization and application of the tetraprimer ARMS-PCR technique for screening of the E198A SNP in the β -tubulin gene of hookworm populations in Brazil. *Vet. Parasitol.* 224, 65–67.
- Grillo, V., Jackson, F., Cabaret, J., Gilleard, J.S., 2007. Population genetic analysis of the ovine parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta* and evidence for a cryptic species. *Int. J. Parasitol.* 7, 435–447.

- Hawdon, J.M., 2014. Controlling soil-transmitted helminths: time to think inside the box? *J. Parasitology* 100 (2), 166–188.
- Hawdon, J.M., Li, T., Zhan, B., Blouin, M.S., 2001. Genetic structure of populations of the human hookworm, *Necator americanus*, in China. *Mol. Ecol.* 10 (6), 1433–1437.
- Hu, M., Chilton, N.B., Gasser, R.B., 2004. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: recent progress, and implications for population genetics and systematics. *Adv. Parasitol.* 56, 134–211.
- Miller, T.A., 1966. Anthelmintic activity of thienium p-chlorobenzene sulfonate against various stages of *Ancylostoma caninum* in young dogs. *Am. J. Vet. Res.* 116, 54–59.
- Miranda, R.R., Tennessen, J.A., Blouin, M.S., Rabelo, E.M., 2008. Mitochondrial DNA variation of the dog hookworm *Ancylostoma caninum* in Brazilian populations. *Vet. Parasitol.* 151 (1), 61–67.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583–590.
- Oosterhout, V., Weetman, C.D., Hutchinson, W.F., 2006. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Mol. Ecol. Notes* 6, 255–256.
- Otsen, M., Plas, M.E., Lenstra, J.A., Roos, M.H., Hoekstra, R., 2000. Microsatellite diversity of isolates of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 69–77.
- Prociv, P., Croese, J., 1990. Human eosinophilic enteritis caused by dog hookworm *Ancylostoma caninum*. *Lancet* 335 (8701), 1299–1302.
- Redman, E., Packard, E., Grillo, V., Smith, J., Jackson, F., Gilleard, J.S., 2008. Microsatellite analysis reveals marked genetic differentiation between *Haemonchus contortus* laboratory isolates and provides a rapid system of genetic fingerprinting. *Int. J. Parasitol.* 38, 111–122.
- Redman, E., Whitelaw, F., Tait, A., Burgess, C., Bartley, Y., Skuce, P.J., Jackson, F., Gilleard, J.S., 2015. The emergence of resistance to the benzimidazole anthelmintics in parasitic nematodes of livestock is characterised by multiple independent hard and soft selective sweeps. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003494.
- Schuelke, M., 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18, 233–234.
- Schwenkenbecher, J.M., Kaplan, R.M., 2007. Development and characterization of microsatellite markers for the canine hookworm, *Ancylostoma caninum*. *Parasitol. Res.* 100 (5), 1015–1021.



Short communication

DNA barcoding of metacestodes found in the *Guerlinguetus ingrami* (Rodentia: Sciuridae) reveals the occurrence of *Hydatigera taeniaeformis* sensu stricto (Cyclophyllidea: Taeniidae) in the Americas

Érica Munhoz Mello^{a,b}, Luis Fernando Viana Furtado^a, Élide Mara Leite Rabelo^a, Hudson Alves Pinto^{a,*}

^a Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde, Belo Horizonte, MG, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Barcoding
Metacestode
Squirrel
Strobilocercus

ABSTRACT

The existence of cryptic species in the genus *Hydatigera*, cyclophyllid cestodes, mainly of felids, was recently described based on molecular studies of parasites from Asia, Europe and Africa. However, the occurrence of *H. taeniaeformis* sensu stricto (s.s.), the species more widely distributed and with a presumed specificity for murid rodents as intermediate hosts, has not been formally described in Americas. In the present study, during necropsy of an Ingram's squirrel specimen, *Guerlinguetus ingrami*, found dead in the municipality of Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, strobilocerci were found in the liver. The metacestodes were subjected to morphological and molecular studies. Sequences of the COI barcode region were obtained and used for phylogenetic analyses. The morphology and measures of the rostellar hooks were compatible with the ones described for *H. taeniaeformis* s.s. This identification was confirmed by a molecular phylogenetic approach (96.2–99.7% similarity with isolates of the parasite from Europe and Asia). This is the first molecular confirmation of the existence of *H. taeniaeformis* s.s. on the American continent. Moreover, the involvement of sciurid rodents in the transmission of *H. taeniaeformis* s.s. is discussed here as a probable case of parasite spillover.

The taeniid cestodes belonging to the genus *Hydatigera* Lamarck, 1816 are intestinal parasites, mainly of felids. The life cycle of these helminths involves rodent intermediate hosts, in which strobilocercus larvae are formed in the liver. The type species of the genus, *Hydatigera taeniaeformis* (= *Taenia taeniaeformis*), is distributed worldwide, and its larval stage (*Cysticercus fasciolaris* Rudolphi, 1808) has been reported in several species of rodents. Recent molecular studies of samples of *Hydatigera taeniaeformis* sensu lato (s.l.) from Asia, Europe and Africa revealed the occurrence of cryptic species in this genus, resulting in the splitting of the species to *Hydatigera taeniaeformis* sensu stricto (s.s.), *Hydatigera kamiyai* Iwaki in Lavikainen et al. 2016 and an undescribed species or an intraspecific variant, so far, considered as *Hydatigera* sp. [1].

On the American continent, reports of the occurrence of *H. taeniaeformis* s.l. in both domestic felids and rodents are not uncommon. However, only recently the few molecular information from isolates of these parasites became available. Among these, Martinez et al. (2013) [2] obtained 28S rDNA and cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) sequences for an Argentinian isolate of *H. taeniaeformis* s.l. found in

domestic mice. Although phylogenetic analysis based on an undeposited COI sequences, as presented in the article by Martinez et al. (2013) [2], did not allow the specific identification of the parasite, biological data suggests that this isolate corresponds to *H. taeniaeformis* s.s. [1]. In North America, Hoopes et al. (2015) [3] obtained nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (ND1) sequences from eggs of different species of taeniids found in cats from Canada. According to Lavikainen et al. (2016) [1], the comparison of these sequences with mitogenomic data revealed the presence of *H. kamiyai* and *Hydatigera* sp. in North America. These data represent the only information available on the molecular diversity of *Hydatigera* spp. on the American continent.

In the present study, a specimen of *Guerlinguetus ingrami* (Thomas, 1901) (Rodentia, Sciuridae) was found dead and received by the Control Center of Zoonoses from the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil on October 19, 2016. Laboratory test was negative for rabies and the gross necropsy did not reveal changes that could indicate the cause of death. During search for helminths, strobilocerci were found in the liver of the rodent, excised, and then mechanically

* Corresponding author at: Laboratório de Biologia de Trematoda, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, C.P. 486, 30123-970 Belo Horizonte, Brazil.

E-mail address: HUDSONALVES13@ICB.UFMG.BR (H.A. Pinto).

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.10.005>

Received 17 August 2017; Received in revised form 13 September 2017; Accepted 17 October 2017

Available online 18 October 2017

1383-5769/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

excysted. A portion of the material obtained was pressed between glass slides, fixed in formalin, stained, and mounted for morphological study. Some scoleces were cut and processed for the study of the rostellar hooks after diaphanization with lactophenol, and mounting of non-permanent preparations. Morphological analysis and imaging were performed using a Leica microscope coupled with the Leica DM500 digital camera. Measures of the rostellar hooks were taken with the aid of an eyepiece and the follow traits were evaluated: total length, apical length and basal length.

For the molecular study, parasite samples were fixed in 95% ethanol and stored at -20 °C until processing. For DNA extraction, worm fragment (approximately 3 mm) was incubated in 20 µl of lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% Nonidet P-40, 0.45% Tween 20, 0.01% gelatin, 100 µg Proteinase K, and 10% β-mercaptoethanol) at 57 °C for approximately 17 h, followed by inactivation of proteinase K at 80 °C for 20 min. The DNA was stored at 5 °C until further use. PCR for amplification of the COI barcode region was performed using the conditions and primers (Dice1F and Dice11R) described by Van Steenkiste et al. (2015) [4]. Despite efforts to standardize the sequencing directly from PCR products, the sequencing was all the time of low quality. Therefore, we decide to clone the fragment to obtain good sequences. The amplicon was cloned using the pGEM-T Easy Vector System (Promega), then transformed into XL1-blue cells (Phonotria Bio). Recombinant plasmid DNA was isolated using the Wizard Plus Miniprep DNA Purification System (Promega). Plasmids were sequenced in both directions by capillary electrophoresis using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) and POP7 polymer on an ABI 3730 (Applied Biosystems). Obtained sequences were edited and assembled in a contiguous sequence (585 bp) using the Chromas Pro version 2.0.1 software (Technelysium). Sequence similarity searches were performed online on the BOLD system (www.boldsystems.org) and GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

For the construction of the phylogenetic tree, congeneric samples with available COI barcode sequences were considered. The sequences were aligned, and the best nucleotide substitution model (GTR + G + I) was determined based on Akaike Information Criterion corrected (AICc) in MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>). Phylogenetic analyses were performed by Neighbor-Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) methods. NJ and ML trees were obtained in MEGA7, and 1000 bootstrap replicates were chosen to calculate bootstrap support. BI was performed in MrBayes version 3.2.6 (<http://mrbayes.sourceforge.net>) using Markov chain Monte Carlo (MCMC) searches on two simultaneous runs of four chains for 1000,000 generations, sampling trees every 100 generations. The first 25% of the trees sampled were discarded as 'burn-in', and Bayesian posterior probabilities were calculated for the remaining trees. *Echinococcus vogeli* (AB208546) was used as an outgroup. The

sequence obtained was deposited at GenBank under accession number MF944107.

Six metacestodes were found individually encapsulated in the liver of the *G. ingrami* specimen evaluated in the present study. The general characteristics of the strobilocerci found, such as the number (39), the size [large hook: 389 (383–390) µm; small hook: 237 (226–240) µm], and the shape of the rostellar hooks, were in accordance with that described for metacestodes of *H. taeniaeformis* s.s. by other authors [1,2,5]. Molecularly, it was found that the parasite collected from *G. ingrami* differed 0.3–3.8% from isolates of *H. taeniaeformis* s.s. found in Belgium, China, Japan, and the Canary Islands (Table 1). This molecular difference is similar to the intraspecific variation known for *H. taeniaeformis* s.s. (0.3–5.1%), which was based on analysis of another COI region (located approximately 200 bp above the barcode region sequenced here) [1,6,7]. The Brazilian isolate of *H. taeniaeformis* s.s. differs significantly from the congeneric samples with COI barcode sequences available [11.3–11.8% from *H. kamiyai*, 10.1% from *Hydatigera* sp., 14.9% from *Hydatigera krepkogorski* (Schulz & Landa, 1934), and 17.9% from *Hydatigera parva* (Baer, 1924)]. These results were corroborated by the phylogenetic analyses, in which trees obtained by NJ, ML and BI produced similar topology, grouping the Brazilian sample with *H. taeniaeformis* s.s. (Fig. 1).

The only previous study involving a South American isolate of *Hydatigera* was conducted in Argentina, in which 28S rDNA sequences had 100% similarity to sequences of *H. taeniaeformis* from India and Kenya [2]. Although the authors stated that COI sequences were obtained, they do not correspond to the barcode region used in this study and were not deposited in GenBank. The authors only commented that the Argentinian isolate was 99% similar to the isolate of the parasite obtained from India (accession number: FJ939135) by Malsawmtluangi et al. (2011) [5]. During our molecular analyses, the Indian sequence was compared to sequences from the same COI region available in GenBank (most of them obtained by Lavikainen et al., 2016 [1]), showing a similarity of 96.2–99.7% among sequences of *H. taeniaeformis* s.s. from different countries in Africa, Asia, Europe, and Oceania (data not shown). This information confirms the presence of *H. taeniaeformis* s.s. in India and indirectly suggests the probable existence of the parasite in Argentina. New molecular studies are needed to determine the diversity of *Hydatigera* spp. from South America. Such studies will possibly reveal the presence of other species of *Hydatigera* on the subcontinent, including *H. kamiyai* and *Hydatigera* sp. that were already reported in North America [1,2].

The existence of metacestodes of *H. taeniaeformis* s.l. in synanthropic rodents (rats and mice) in different countries of Latin America, including Brazil, has been described in the past and in recent reports [e.g. 2,8,9]. However, little is known about the involvement of wild rodents in the transmission of *Hydatigera* on the American continent. According to Lavikainen et al. (2016) [1], besides molecular differences, the

Table 1

Pairwise distance (uncorrected p-distance in percentage) between COI barcoding sequences of *Hydatigera taeniaeformis* obtained from metacestodes found in *Guerlinguetus ingrami* from Brazil and other sequences of *Hydatigera* spp.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
(1) <i>Hydatigera taeniaeformis</i> Brazil											
(2) <i>Hydatigera taeniaeformis</i> Belgium (AB745096)	0.3										
(3) <i>Hydatigera taeniaeformis</i> Canary Islands (LL732920)	3.8	3.4									
(4) <i>Hydatigera taeniaeformis</i> Japan (AB745097)	2.2	1.9	4.4								
(5) <i>Hydatigera taeniaeformis</i> China (FJ597547)	1.0	0.7	3.8	1.9							
(6) <i>Hydatigera taeniaeformis</i> China (NC014768)	1.0	0.7	3.8	1.9	0.0						
(7) <i>Hydatigera kamiyai</i> Germany (JQ663994)	11.5	11.1	10.8	11.8	11.5	11.5					
(8) <i>Hydatigera kamiyai</i> Finland (AB731761)	11.3	10.9	10.6	11.6	11.3	11.3	0.2				
(9) <i>Hydatigera kamiyai</i> Japan (AB745098)	11.8	11.5	11.1	12.1	11.8	11.8	1.4	1.2			
(10) <i>Hydatigera</i> sp. France (LC008533)	10.1	9.7	10.6	10.3	10.1	10.1	7.2	7.0	6.8		
(11) <i>Hydatigera krepkogorski</i> China (AB731762)	14.9	14.5	14.5	14.2	14.5	14.5	15.6	15.4	15.2	13.2	
(12) <i>Hydatigera parva</i> Spain (AB731760)	17.9	17.6	17.4	18.1	17.9	17.9	19.5	19.3	19.0	18.3	16.9

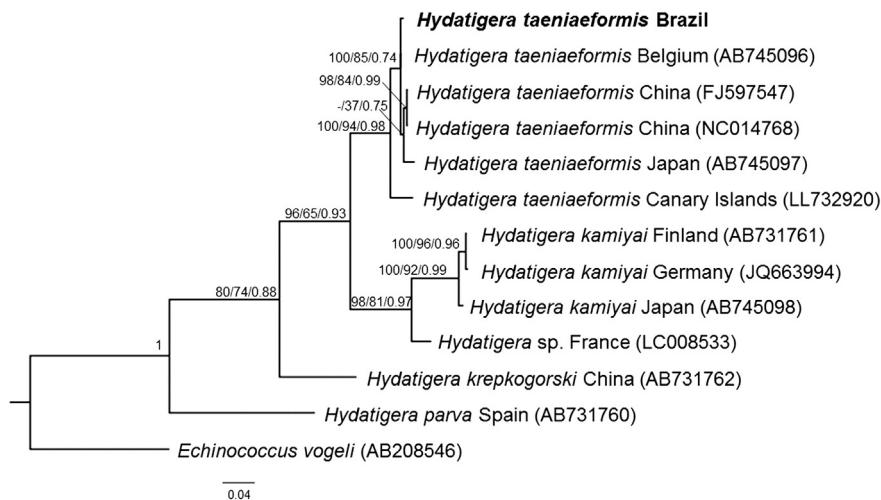


Fig. 1. Bayesian Inference (BI) tree based on partial mitochondrial COI gene sequences obtained from metacestodes of *Hydatigera taeniaeformis* found in *Guertlinguetus ingrami* from Brazil (in bold) and sequences available for *Hydatigera* spp. The numbers near each node indicate the support of the nodes (NJ/ML/BI), corresponding to percentages of the bootstrap test (1000 replicates) obtained in Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) analyses and the posterior probabilities obtained by BI. Missing data indicate nodes not found in the respective method.

specificity for the intermediate host group can be used as a characteristic to differentiate species of *Hydatigera*, with *H. taeniaeformis* s.s. restricted to murine rodents. In the present study, *H. taeniaeformis* s.s. is reported for the first time in a species of squirrel from Latin America, making *G. ingrami* a new intermediate host registered for this taeniid. This finding reveals that a non-murine rodent, i.e., members of family Sciuridae, can be infected with *H. taeniaeformis* s.s. and that the alleged host specificity of the cryptic species of *Hydatigera* is not strict.

There are few reports on the infection of *H. taeniaeformis* s.l. in squirrels. In the USA, *Sciurus niger rufiventer* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) and *Sciurus carolinensis* (Gmelin, 1788) were found naturally infected (revised by [10]), and in England, *S. carolinensis* was reported harboring metacestodes of the parasite [11]. The absence of morphometric (especially of rostellar hooks) and molecular data makes it impossible to perform the identification of the species of *Hydatigera* found in previously infected squirrels. The involvement of various species of squirrels in the transmission of other species of taenids, including *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786), *Taenia taxidiensis* Skinker, 1935, *Taenia rillei* Loewen, 1929, and *Versteria mustelae* (Gmelin, 1790) (= *Taenia mustelae*), has been reported by other authors [12–14]. From an epidemiological point of view, it is known that domestic felines are predators of sciurid rodents [15], which favors the transmission of *Hydatigera* spp.

Experimental infection studies revealed differences in infectivity and development of isolates of *Hydatigera* in different hosts [16,17]. However, additional studies aiming to broaden knowledge about the interaction between rodents of the family Sciuridae and *Hydatigera* spp. are needed, including the determination of ecological parameters in naturally infected hosts and the experimental susceptibility of this group of rodents. Such studies may reveal whether the present and previous reports of sciurids infected with these cestodes are rare cases of infection or are common events, however understudied. Although it is known that the infection of rodents with *H. taeniaeformis* s.l. is associated with the occurrence of pathological alterations, including chronic liver inflammation adjacent to the metacestodes and development of liver fibrosarcoma, which are associated with the occurrence of rodent mortality [10,18], it is not possible to state that the cause of the death of the *G. ingrami* specimen evaluated was due to infection by this parasite.

The finding of *H. taeniaeformis* s.s. in wild animals may indicate that there is an occurrence of parasite spillover, that is, the transmission of infectious agents from domestic animals to wild animals [19]. This cestode was possibly introduced to South America through domestic cats, a result of a human-mediated event. The occurrence of synanthropic rodents (mice and rats) contributes to the maintenance of the life cycle of *H. taeniaeformis* s.l., as verified by several reports of the

parasite in domestic cats and synanthropic rodents. The possibility of wild rodents, which inhabit the peridomicile, that may be infected by this parasite was suggested by Rodríguez-Vivas et al. (2011) [9] in Mexico, although in their studies, only rats and mice were found infected with *H. taeniaeformis* s.l. On the other hand, 11/132 (8.33%) specimens of the cricetid *Akodon azarae* (Fischer, 1829) collected from a poultry farm in Argentina were found infected with *H. taeniaeformis* s.l. [20]. Interestingly, these authors did not find the parasite in any of the 53 necropsied mice. The *G. ingrami* specimen evaluated in the present study was found dead in an urban environment, and the source of infection was possibly due to feces from domestic or stray cats naturally infected with *H. taeniaeformis* s.s.

New molecular studies are needed to increase the understanding of the *Hydatigera* spp. in South America. Moreover, 36 haplotypes of *H. taeniaeformis* s.s. were characterized from isolates of the parasite from the Old World [1], and the diversity of haplotypes of the parasite from the American continent needs to be further evaluated. Such studies may result in new insights regarding the global scale of the origin and dispersion of the *Hydatigera* species, including hypotheses about the introduction and dispersion of the parasite in the Americas.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq (doctoral scholarship to LFVF and research scholarship to EMLR) CAPES (process number: 23038.005297/2011-39), and Pró-Reitoria de Pesquisa from Universidade Federal de Minas Gerais (Edital 02/2017). The authors are grateful to the Control Center of Zoonoses from the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

References

- [1] A. Lavikainen, T. Iwaki, V. Haukialmi, S.V. Konyaev, M. Casiraghi, N.E. Dokuchaev, A. Galimberti, A. Halajian, H. Henttonen, M. Ichikawa-Seki, T. Itagaki, A.V. Krivopalov, S. Meri, S. Morand, A. Näreaho, G.E. Olsson, A. Ribas, Y. Terefe, M. Nakao, Reappraisal of *Hydatigera taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda: Taeniidae) sensu lato with description of *Hydatigera kamiyai* n. Sp. Int. J. Parasitol. 46 (2016) 361–374.
- [2] M.L. Martínez, M.G. Domínguez, G.E. Morici, R. Cavia, D.P. Montes de Oca, R. Lovera, J.H. Schapiro, J.L. Caracostantogolo, Identificación morfológica y molecular de *Cysticercus fasciolaris* aislado de un roedor (*Rattus norvegicus*) de la provincia de Buenos Aires (Argentina). Rev. Argent. Microbiol. 45 (2013) 150–153.
- [3] J. Hoopes, J.E. Hill, L. Polley, C. Fernando, B. Wagner, J. Schurer, E. Jenkins, Enteric parasites of free-roaming, owned, and rural cats in prairie regions of Canada. Can. Vet. J. 56 (2015) 495–501.
- [4] N. Van Steenkiste, S.A. Locke, M. Castelin, D.J. Marcogliese, C.L. Abbott, New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). Mol. Ecol. Resour. 15 (2015) 945–952.
- [5] C. Malsawmtluangi, P.K. Prasad, D.K. Biswal, V. Tandon, Morphological and molecular identification of the metacestode parasitizing the liver of rodent hosts in

- bamboo growing areas of mizoram, northeast India, *Bioinformation* 7 (2011) 393–399.
- [6] M. Nakao, A. Lavikainen, T. Iwaki, V. Haukisalmi, S. Konyaev, Y. Oku, M. Okamoto, A. Ito, Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): proposals for the resurrection of *Hydatigera* Lamarck, 1816 and the creation of a new genus *Versteria*, *Int. J. Parasitol.* 43 (2013) 427–437.
- [7] G. Zhang, J. Chen, Y. Yang, N. Liu, W. Jiang, S. Gu, X. Wang, Z. Wang, Utility of DNA barcoding in distinguishing species of the family Taeniidae, *J. Parasitol.* 100 (2014) 542–546.
- [8] O.P. Forattini, Nota sobre a incidência de "*Capillaria hepatica*" (Brancoft, 1893) e "*Cysticercus fasciolaris*" (Rudolphi, 1808), nos ratos da Cidade de São Paulo, *Rev. Med.* 31 (1947) 161–162.
- [9] R.I. Rodríguez-Vivas, J.A. Panti-May, J. Parada-López, S.F. Hernández-Betancourt, H.A. Ruiz-Piña, The occurrence of the larval cestode *Cysticercus fasciolaris* in rodent populations from the Cuxtal ecological reserve, Yucatan, Mexico, *J. Helminthol.* 85 (2011) 458–461.
- [10] W.W. Gallati, Fibrosarcoma associated with the cysticercus of *Taenia taeniaeformis* in the liver of a muskrat, *Ohio J. Sci.* 56 (1956) 71–75.
- [11] J.N. Oldham, Studies on Parasites of the grey squirrel (*Sciurus carolinensis* Gmelin) from South Eastern England. J. R.T. Leiper Supplement, *Helminthol.* 1961, pp. 127–130.
- [12] J.L. Mahrt, S.J. Chai, Parasites of red squirrels in Alberta, Canada, *J. Parasitol.* 58 (1972) 639–640.
- [13] L.M. Shults, N.L. Stanton, Helminth parasites of the wyoming ground squirrel, *Spermophilus elegans* Kennicott, 1863, *Great Basin Nat.* 47 (1987) 103–104.
- [14] Y.R. Yang, T. Liu, X. Bai, B. Boufana, P.S. Craig, M. Nakao, A. Ito, J.Z. Zhang, P. Giraudoux, D.P. McManus, Natural infection of the ground squirrel (*Spermophilus* spp.) with *Echinococcus granulosus* in China, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009) e518.
- [15] V.R. Simpson, J. Hargreaves, H.M. Butler, N.J. Davison, D.J. Everest, Causes of mortality and pathological lesions observed post-mortem in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Great Britain, *BMC Vet. Res.* 9 (2013) 229.
- [16] T. Iwaki, N. Nonaka, M. Okamoto, Y. Oku, M. Kamiya, Developmental and morphological characteristics of *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) in *Clethrionomys rufocanus bedfordiae* and *Rattus norvegicus* from different geographical locations, *J. Parasitol.* 80 (1994) 461–467.
- [17] N. Nonaka, T. Iwaki, M. Okamoto, H.K. Ooi, Y. Oku, M. Ohbayashi, M. Kamiya, Infectivities of four isolates of *Taenia taeniaeformis* to various rodents, *J. Vet. Med. Sci.* 56 (1994) 565–567.
- [18] L. Dvoráková, J. Prokopic, *Hydatigera taeniaeformis* (Batsch, 1786) as the cause of mass deaths of muskrats, *Folia Parasitol.* 31 (1984) 127–131.
- [19] P. Daszak, A.A. Cunningham, A.D. Hyatt, Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health, *Science* 287 (2000) 443–449.
- [20] M.H. Miño, E.J. Rojas Herrera, J. Notarnicola, The wild rodent *Akodon azarae* (Cricetidae: Sigmodontinae) as intermediate host of *Taenia taeniaeformis* (Cestoda: Cyclophyllidae) on poultry farms of central Argentina, *Mastozool. Neotrop.* 20 (2013) 406–412.

Fishborne Zoonotic Trematodes Transmitted by *Melanoides tuberculata* Snails, Peru

Eduardo A. Pulido-Murillo, Luis Fernando V. Furtado, Alan L. Melo, Élica M.L. Rabelo, Hudson A. Pinto

Author affiliation: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2403.172056>

We investigated the transmission of the fishborne trematodes *Centrocestus formosanus* and *Haplorchis pumilio* by *Melanoides tuberculata* snails in Peru. We report on results of experimental, morphological, and molecular approaches and discuss the potential risk for future human cases, given the existence of food habits in the country involving the ingestion of raw fish.

The World Health Organization has estimated that the number of humans infected with fishborne trematodes exceeds 18 million, and >500 million persons are at risk of infection (1). Among the causative agents of these trematodiasis are representatives of the family Heterophyidae, which are small intestinal parasites from birds and mammals, including humans (1–3). Infection by heterophyids can be considered an emerging disease because of a set of factors, including high prevalence, reported mainly in Asia; outbreaks caused by *Ascocotyle longa* trematodes in Brazil; the introduction of *Centrocestus formosanus* trematodes and *Haplorchis pumilio* flukes from Asia into the Americas; and the involvement of larvae of *Procerovum varium* flukes as causative agents of human ocular disease (3–5).

Of the 30 species of heterophyids recognized worldwide (4), 7, including *C. formosanus* and *H. pumilio*, are transmitted by the red-rimmed melania or Malaysian trumpet snail, *Melanoides tuberculata* (6). Even though human infection by these 2 heterophyids has not been reported in the Americas, the possibility of future cases must be considered, especially in countries like Peru, whose inhabitants consume ceviche, a culinary dish prepared with raw fish. Thus, the evaluation of the involvement of *M. tuberculata* snails in the transmission of heterophyids in this country is needed given the potential public health concern related to these parasites.

In this study, we collected snails in 2 areas of the central coast of Peru, the Ventanilla Wetlands Regional Conservation Area (VWRCA) (11°52'31"S; 77°8'37"W) and the Pantanos de Villa Wildlife Refuge (PVWR) (12°12'33"S; 76°59'28"W), during December 2015 and January, June, and July 2016.

Identification of the collected *M. tuberculata* snail specimens was based on conchiliological features according to previously published reports (7,8). We placed the specimens individually into polystyrene plates containing dechlorinated water, subjected them to photostimulation, and examined them under a stereomicroscope. We examined cercariae, fluke larvae, in a light microscope after vital staining (0.05% Nile blue sulfate) and preliminarily identified 2 cercarial types, pleurolophocercous (Figure, panel A) and parapleurolophocercous (Figure, panel E). We used samples of the cercariae for experimental infection of vertebrate hosts to obtain other developmental stages for identification. Experiments were conducted in accordance with the local animal experimentation ethics committee (Comissão de Ética no Uso de Animais, Universidade Federal de Minas Gerais, protocol 20/2016).

We exposed 2 groups of *Poecilia reticulata* guppies (n = 30) individually to 50–100 cercariae of each larval type. We euthanized fish surviving at 30 days postinfection and collected metacercariae found in the gills (Figure, panels B, C) of fish infected with pleurolophocercous cercariae and in the bases of the fins (Figure, panels F and G) of fish exposed to parapleurolophocercous cercariae. We administered metacercariae orally to dexamethasone-immunosuppressed mice. Adult parasites recovered in the small intestines of mice at 6–7 days postinfection were fixed, stained, and mounted on permanent slides. We studied the morphology of the experimentally obtained stages using a light microscope for identification according to taxonomic works (2,9).

We used ethanol-fixed aliquots of cercarial types obtained in *M. tuberculata* snails for molecular characterization. We extracted DNA using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA) and amplified a fragment of the 28S rDNA by PCR using the primers Dig12 (forward) and 1500R (reverse) with PCR conditions as previously described (10). We purified the PCR products with 20% polyethylene glycol 8000 (Promega) and sequenced them in an ABI3730 automated sequencer using Pop-7 Polymer and the ABI Big-Dye v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We edited the sequences we obtained using ChromasPro version 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia), compared them with data available in GenBank, and used them for phylogenetic analyses based on the maximum likelihood method using MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>) and Bayesian inference method using MrBayes 3.1.2 (<http://mrbayes.sourceforge.net/>). We deposited the obtained sequences in GenBank (accession nos. MG738251 and MG738252).

From the experimental infection of mice, we obtained adult parasites identified as *C. formosanus* (Figure, panel D) and *H. pumilio* (Figure, panel H). Molecular data revealed that the samples of *C. formosanus* and *H. pumilio* cercariae found in *M. tuberculata* snails from Peru are conspecific isolates from Vietnam and Thailand (99.8%–100% similarity),

a finding supported by phylogenetic analyses (online Technical Appendix, <http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/22/6/17-2056-Techapp1.pdf>). In total, we collected 6,731 *M. tuberculata* snails, of which 112 (1.66%) were found to be infected with heterophyid cercariae. We found *C. formosanus* cercariae in 71 (1.8%) of 3,874 snails collected in VWRCA and in 29 (1.0%) of 2,857 snails collected in PVWR. We found *H. pumilio* cercariae in 12 of 2,857 (0.4%) snails from PVWR.

The presence of *C. formosanus* and *H. pumilio* trematodes in *M. tuberculata* snails from Peru reveals the need to focus attention on the possible effect of these fishborne agents on human health. The increasing number of reports of these trematodes in the Americas indicates that the geographical areas they have invaded are expanding. This finding should serve as a warning, particularly given the popularity of dishes based on raw fish.

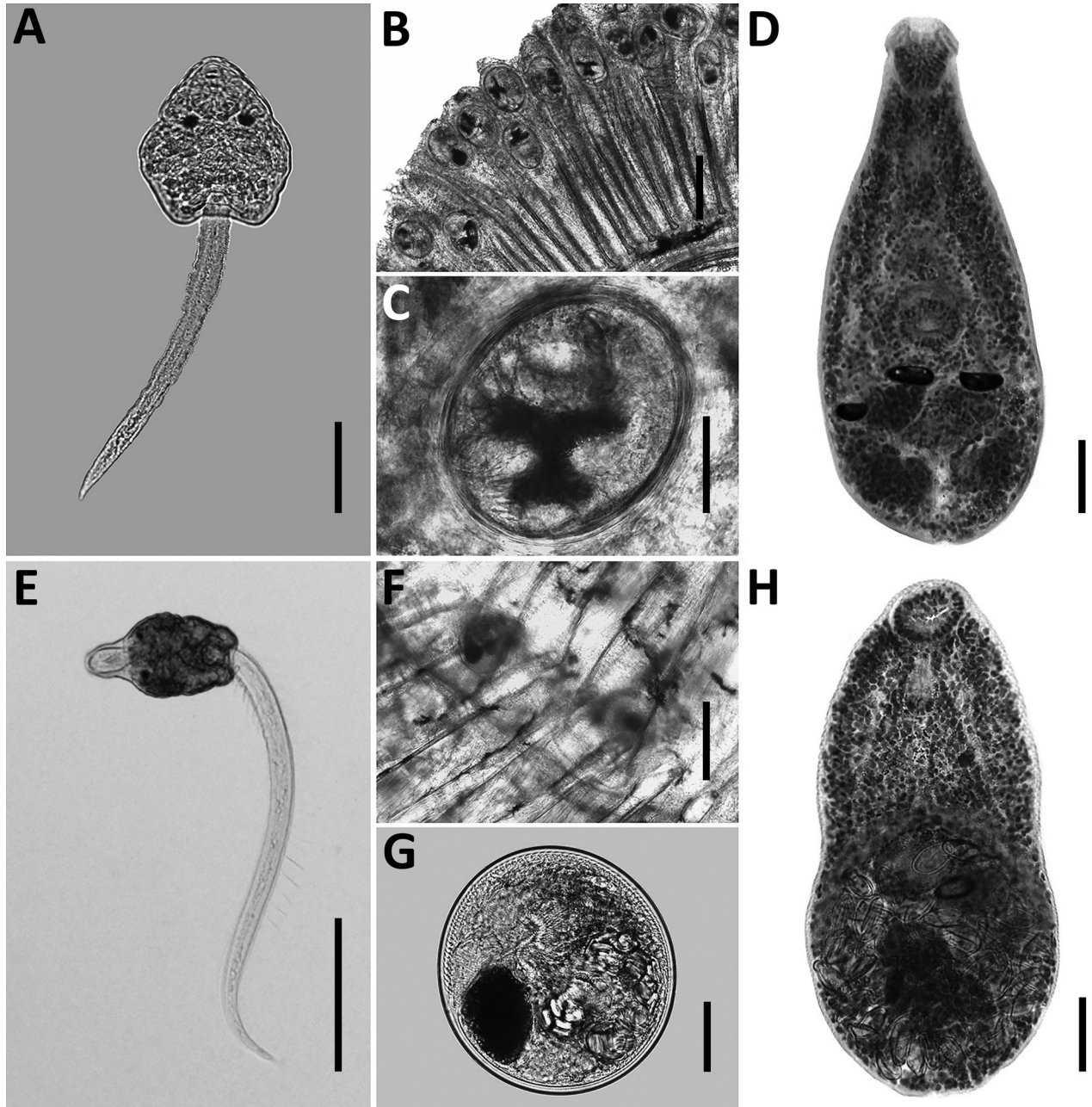


Figure. Species of heterophyids transmitted by *Melanoides tuberculata* snails in Peru. A–D) *Centrocestus formosanus*: cercaria (pleurolophocercous type) (A), encysted metacercariae in gills of *Poecilia reticulata* (B, C), and adult parasite obtained in experimentally infected mouse (D). E–H) *Haplorchis pumilio*: cercaria (parapleurolophocercous type) (E), metacercariae found at the base of the caudal fin of *P. reticulata* (F–G), and adult recovered in experimentally infected mouse (H). Scale bars indicate 50 μ m in panels A, C, D, G, and H), 200 μ m in panels B, E, and F. A color version of this figure is available online (<http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/24/3/17-2056-F1.htm>).

Acknowledgments

We thank Fernando Gil and Aldo López for the authorization for the development of the research in PVWR and VWRA, respectively. Thanks are due to the biologist Christian Carazas and the engineer José Junco for help in some sampling of snails; to Rosa Martínez for the use of the laboratory at Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Peru; and to Airton Lobo for technical support. We are grateful to Sara Vanessa Brant for constructive suggestions in the earlier version of this work.

This project was supported financially by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (process no. 23038.005297/2011-39) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (scholarship to E.A.P.M. and L.F.V.F.).

About the Author

Mr. Pulido-Murillo is a PhD student from Peru working in the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. His research interests focus on morphological and molecular study of zoonotic helminths.

References

- Chai JY, Darwin Murrell K, Lymbery AJ. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Int J Parasitol.* 2005;35:1233–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.013>
- Pearson J. Family Heterophyidae Leiper, 1909. In: Bray RA, Gibson DI, Jones A, editors. *Keys to the Trematoda*. Vol. III. London: CAB International and Natural History Museum; 2008, p. 113–142.
- Keiser J, Utzinger J. Emerging foodborne trematodiasis. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1507–14. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1110.050614>
- Chai JY, Jung BK. Fishborne zoonotic heterophyid infections: an update. *Food Water Parasitol.* 2017 [Epub ahead of print]. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2017.09.001>
- Arya LK, Rathinam SR, Lalitha P, Kim UR, Ghatani S, Tandon V. Trematode fluke *Procerovum varium* as cause of ocular inflammation in children, South India. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:192–200 <https://doi.org/10.3201/eid2202.150051>. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2202.150051>
- Pinto HA, de Melo AL. A checklist of trematodes (Platyhelminthes) transmitted by *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae). *Zootaxa.* 2011;2799:15–28.
- Pointier JP, David P, Jarne P. The biological control of the snail hosts of schistosomes: the role of competitor snails and biological invasions. In: Toledo R, Fried B, editors. *Biomphalaria* snails and larval trematodes. New York: Springer; 2011. p. 215–38.
- Simone LRL. Land and freshwater mollusks of Brazil. São Paulo: Editora Gráfica Bernardi & Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; 2006.
- Scholz T, Aguirre-Macedo ML, Salgado-Maldonado G. Trematodes of the family Heterophyidae (Digenea) in Mexico: a review of species and new host and geographical records. *J Nat Hist.* 2001;35:1733–72. <http://dx.doi.org/10.1080/00222930152667087>
- Tkach VV, Littlewood DTJ, Olson PD, Kinsella JM, Swiderski Z. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). *Syst Parasitol.* 2003;56:1–15. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1025546001611>

Address for correspondence: Hudson Alves Pinto, Laboratório de Biologia de Trematoda, Department of Parasitology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, C.P. 486, 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; email: hudsonalves13@icb.ufmg.br

LETTER

Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Canada, 2017

Alan R. Katz

Author affiliation: University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, USA

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2403.171892>

To the Editor: I read with great interest the report by Lefebvre et al. about a *Neisseria gonorrhoeae* isolate identified in Canada demonstrating a ceftriaxone MIC of 1 mg/L (1). The authors note: “As of October 15, 2017, only 5 ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates had been reported worldwide (MIC range 0.5–2 mg/L).” The authors cite published reports from Spain, Japan, Australia, and France.

I would like to clarify that additional *N. gonorrhoeae* isolates have been identified with ceftriaxone MICs ≥ 0.5 mg/L. Since 1987, as part of the Gonococcal Isolate Surveillance Project, the Centers for Disease Control and Prevention has been testing *N. gonorrhoeae* isolates for ceftriaxone susceptibility. During 1987–2016, the Centers for Disease

Control and Prevention identified and reported 5 isolates with ceftriaxone MICs of 0.5 mg/L in the United States. These isolates were found in San Diego, California (1987); Cincinnati, Ohio (1992 and 1993); Philadelphia, Pennsylvania (1997); and most recently, Oklahoma City, Oklahoma (2012) (2). Therefore, although the number of *N. gonorrhoeae* isolates with ceftriaxone MICs ≥ 0.5 mg/L identified globally to date has been small, these Gonococcal Isolate Surveillance Project findings should be acknowledged. Continued and enhanced global surveillance of gonococcal isolates for antimicrobial susceptibility testing is imperative.

References

- Lefebvre B, Martin I, Demczuk W, Deshaies L, Michaud S, Labbe AC, et al. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Canada, 2017 [cited 2017 Nov 19]. Epub ahead of print. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2402.171756>
- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases surveillance 2016 [cited 2017 Nov 19]. https://www.cdc.gov/std/stats16/CDC_2016_STDS_Report-for-508WebSep21_2017_1644.pdf

Address for correspondence: Alan R. Katz, University of Hawaii at Manoa, Office of Public Health Studies, Biomedical Sciences Bldg, Rm D104M, 1960 East-West Rd, Honolulu, HI 96822, USA; email: katz@hawaii.edu



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

Número do Processo: BR 10 2017 013907 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal de Minas Gerais

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

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

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 34094774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

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

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

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: ÉLIDA MARA LEITE RABELO

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço:

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 2 de 4

Nome: LUCIANA WERNECK ZUCCHERATO

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço:

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 30411-308

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 3 de 4

Nome: LUIS FERNANDO VIANA FURTADO

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço:

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 4 de 4

Nome: CELI DA SILVA MEDEIROS

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

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

Endereço:

Cidade: Sabará

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br