



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Associação entre polimorfismo no gene da glicoproteína-P (PgP) e resistência múltipla a anti-helmínticos em *Haemonchus contortus* e identificação de fatores de risco relacionados

SUELEN SCARPA DE MELLO

São Carlos

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

SUELEN SCARPA DE MELLO

Associação entre polimorfismos no gene da glicoproteína-P (PgP) e resistência múltipla a anti-helmínticos em *Haemonchus contortus* e identificação de fatores de risco relacionados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientadora: Simone Cristina Méo Niciura

São Carlos

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M527ap

Mello, Suelen Scarpa de.

Associação entre polimorfismos no gene da glicoproteína-P (PgP) e resistência múltipla a anti-helmínticos em *Haemonchus contortus* e identificação de fatores de risco relacionados / Suelen Scarpa de Mello. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

68 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Genética e evolução. 2. Marcador molecular. 3. Helminto. I. Título.

CDD: 575 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**“Associação entre polimorfismo no gene da glicoproteína-P (PgP) e
resistência múltipla a anti-helmínticos em *Haemonchus contortus* e
identificação de fatores de risco relacionados”**

Dissertação de Mestrado de

SUELEN SCARPA DE MELLO

Banca Examinadora

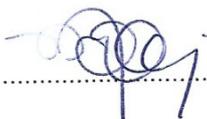
Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura


.....

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Aníbal


.....

Profa. Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira


.....

Aos meus pais, meu irmão, minha avó e ao meu Amor. Por todo amor, dedicação, paciência e confiança. E por serem a razão da minha vida. Meu porto seguro.

Com carinho, dedico este trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

“Queremos ter certezas e não dúvidas, resultados e não experiências, mas nem mesmo percebemos que as certezas só podem surgir das dúvidas e os resultados somente através das experiências.”

(Carl Gustav Jung)

Agradecimentos

A Deus por me mostrar o caminho, me dar força, paciência e fé, perseverando ao longo da minha difícil caminhada.

Aos meus pais, Sidnei e Suselaine, pelo exemplo de dignidade e perseverança, pela confiança na minha capacidade e sólida formação que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este mestrado, meus eternos agradecimentos.

Ao meu irmão Diego pelo incentivo recebido ao longo destes anos, obrigado pelo amor, alegria e atenção sem reservas e seu exemplo de determinação.

À minha avó Maria Scarpa, um exemplo de força e perseverança, pelo apoio e amor que me dedica e ao meu avô querido (Domingos Scarpa - in memoriam), que sempre torceu por mim e acreditou que tudo isso se tornaria possível.

Ao meu namorado, Wanderson, companheiro de todas as horas, pela sua compreensão, respeito, tolerância, por todas as atitudes que o faz merecedor do meu amor.

Em especial à minha orientadora Dra. Simone Cristina Méo Niciura, pelos ensinamentos, pela confiança ao longo dos anos de convivência, pela amizade, e, sobretudo, sua paciência em todos os momentos.

A Dra. Luciana pela amizade, conselhos, ensinamentos científicos e de vida.

A Dra. Márcia Oliveira e Dra. Ana Carolina Chagas, por sempre se mostrarem dispostas em contribuir para realização deste trabalho.

Ao Dr. Waldomiro Barioni Jr. pelos ensinamentos, pela força e *energia* boa que transmite para todos com quem convive.

Ao Dr. Maurício Mudado e Dr. Wilson Malagó Jr. pela amizade, disponibilidade, pelo apoio e ajuda.

Ao Prof^o Dr. Alessandro Amarante e Prof^o Dr. Marcelo Molento por contribuírem com esse trabalho enviando amostras dos parasitas.

Aos meus amigos do laboratório de Biotecnologia Animal (Embrapa Pecuária Sudeste): Adriana Somavilla, Andressa, Alexandre, Daniela, Kamilla, Marcela, Marina, Mirelly, Mônica, Polyana, Priscila, Tatiane, Vitor, Vanessa, Viviane, Welisson, pela amizade, companheirismo, paciência e pelos nossos momentos de descontração na hora do café.

Aos amigos do laboratório de Sanidade Animal: Eliane, Luciana, Rafaela, Renata, Rodrigo, Talita Barban, Thalita e Thuane por sempre estarem dispostos a ajudar, amizade e pela companhia agradável.

À Flavia, Gilbertinho e Márcio pela ajuda, amizade e convivência.

Aos meus amigos, Adelita, Cristiane, Diana, Katheryne, Juliana Gromboni, Talita Gagliardi, Tiago, agradeço pelas incontáveis coisas de valor inestimável que me ensinaram e continuam me ensinando pelos incríveis momentos de alegria e tristeza que compartilhamos.

À Larissa Miranda, minha amiga querida que mesmo distante sempre se fez presente em minha vida, pela dedicação, amizade, apoio e carinho dedicado, nos últimos 17 anos.

Ao meu grande amigo Andrey pela sua amizade incondicional, pelo ânimo e incentivo em todos os momentos que mais precisei.

Ao amigo Guilherme pela amizade, paciência, incentivo e análise estatística do estudo.

As minhas amigas Adriana Somavilla, Juliana Afonso e Marina Ibelli pela amizade, apoio e trocas de conhecimentos às altas da madrugada.

Aos amigos Gisele e João Gouvêia, pela amizade e principalmente por me auxiliarem nos momentos em que mais precisei, agradeço imensamente!

À Embrapa Pecuária Sudeste, por ter permitido a realização dos meus experimentos.

À CAPES pela bolsa de estudos e a EMBRAPA pelo auxílio financeiro.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pelos ensinamentos e formação, assim como as secretárias pela atenção e dedicação.

Por fim, o meu profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação e torceram pelo sucesso desta jornada.

Resumo

Entre os parasitas de ovinos, *Haemonchus contortus* é o nematoide mais prevalente e patogênico em áreas tropicais, causando grandes perdas econômicas. As alterações no gene que codifica a glicoproteína-P de membrana (PgP) foram associadas com a resistência a múltiplas drogas. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene PgP em *H. contortus* por comparação de dois isolados com diferentes status de resistência a anti-helmínticos. Para esse fim, uma ovelha foi infectada experimentalmente com o isolado suscetível (McMaster, Austrália) e outra ovelha com o isolado multirresistente (Embrapa2010, Brasil) de *H. contortus*. Fezes dos animais infectados foram submetidas à coprocultura para a obtenção de larvas e, após o abate das ovelhas, *H. contortus* adultos foram colhidos do abomaso e individualmente submetidos à extração de DNA. Para a avaliação de possíveis marcadores moleculares de isolamento geográfico, larvas oriundas de coprocultura de dois outros isolados brasileiros (Bahia e Pernambuco), com status de resistência não determinado, também foram submetidas à extração de DNA. Após amplificação por PCR do DNA extraído de *H. contortus* adultos, um fragmento do gene PgP foi sequenciado e foram identificados seis SNPs (posição descrita em relação à sequência do contig 004690 do Wellcome Trust Sanger Institute): 508 (A>G, em éxon), 580 (G>A), 601 (G>C), 800 (G>A), 845 (G>T) e 878 (G>T), os cinco últimos em íntrons. O teste exato de Fisher, por meio da correção de Bonferroni, revelou associação significativa ($P < 0,01$) entre os SNPs 508, 580, 601, 845 e 878 e o estado de resistência a anti-helmínticos. Desses SNPs, o 601 e o 878 estão em desequilíbrio de ligação e formam os haplótipos CC, que está associado ($P < 0,05$) à resistência, e GG, à suscetibilidade. Levando em consideração que em *H. contortus* há considerável diferenciação genética entre áreas continentais distintas, as frequências dos SNPs foram comparadas entre os isolados brasileiros e o isolado suscetível australiano e foi verificado que os SNPs 580 e 845 podem estar associados ao isolamento geográfico. Conclui-se que os SNPs 508, 601 e 878 no gene de glicoproteína-P podem ser marcadores moleculares para a resistência múltipla a anti-helmínticos, e os SNPs 580 e 845 candidatos a marcadores de isolamento geográfico em *H. contortus*. Nós desenvolvemos um *software* para Análise de Risco de Desenvolvimento de Resistência Parasitária a Anti-Helmínticos em Ovinos (SARA) que fornecerá informações que poderão orientar a utilização racional de anti-helmínticos.

Palavras-Chave: *Haemonchus contortus*. Glicoproteína-p. Resistência múltipla a anti-helmínticos. Marcador molecular

Abstract

Among the sheep parasites, *Haemonchus contortus* is the most prevalent and pathogenic nematode in tropical areas, causing huge economic losses. Alterations in the gene encoding the membrane P-glycoprotein (PgP) have been associated with multidrug resistance. The goal of this study was to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the PgP gene in *H. contortus* by comparing two isolates with different status of anthelmintic resistance. For this purpose, two ewes were experimentally infected, one with a susceptible *H. contortus* isolate (McMaster, Australia) and the other with a multidrug-resistant isolate (Embrapa2010, Brazil). Feces from infected animals were submitted to coproculture in order to obtain larvae and, after the slaughter of the ewes, adults *H. contortus* were collected from abomasum and individually submitted to DNA extraction. For the evaluation of potential molecular markers of geographic isolation, larvae originating from coprocultures of two other Brazilian isolates (Bahia and Pernambuco), with no determined resistance status, were also submitted to DNA extraction. After PCR amplification of DNA extracted from adults *H. contortus*, a fragment of the PgP gene was sequenced and six SNPs (position described in relation to the sequence of contig 004690 from the Wellcome Trust Sanger Institute) were identified : 508 (A> G in exon), 580 (G> A), 601 (G> C), 800 (G> A), 845 (G> T), and 878 (G> T), the last five in introns. The Fisher's exact test, applying the Bonferroni correction, revealed a significant association ($P < 0.01$) between 508, 580, 601, 845 and 878 SNPs and the state of resistance to anthelmintics. Among these SNPs, 601 and 878 are in linkage disequilibrium and form the CC haplotype associated ($P < 0.05$) to resistance and the GG haplotype associated to susceptibility. Considering that there is considerable genetic differentiation between different continental areas in *H. contortus*, the frequencies of the SNPs were compared between the Brazilian isolates and the susceptible Australian one. It was found that the SNPs 580 and 845 may be associated with geographic isolation. We conclude that the 508, 601 and 878 SNPs in the P-glycoprotein gene can be molecular markers for multiple resistance to anthelmintics, and that the 580 and 845 SNPs can be candidate markers of geographical isolation in *H. contortus*. We developed software for Risk Analysis Development of Parasitic Resistance to Anthelmintics in Sheep (SARA) which will provide information that may guide the rational use of anthelmintics.

Key words: *Haemonchus contortus*. P-glycoprotein. Multidrug resistance to anthelmintics. Molecular marker

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fragmento amplificado do gene da glicoproteína-P, com destaque aos íntrons (nucleotídeos sublinhados) e éxons, em *Haemonchus contortus* e posições e tipo de cada SNP identificado (nucleotídeos destacados em cores). 36
- Figura 2.** Desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs do gene PgP para o isolado suscetível de *H. contortus*. O LD entre os SNPs foi mensurado pela estatística r^2 (em %). A cor branca representa $r^2 = 0$ (ausência de LD), a preta, $r^2 = 1$ (ou 100% - completo LD) e as cores intermediárias, valores intermediários. Os SNPs 508, 580, 601, 800, 845 e 878 estão numerados de 1 a 6, respectivamente. 39
- Figura 3.** Desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs do gene PgP para o isolado resistente de *H. contortus*. O LD entre os SNPs foi mensurado pela estatística r^2 (em %). A cor branca representa $r^2 = 0$ (ausência de LD), a preta, $r^2 = 1$ (ou 100% - completo LD) e as cores intermediárias, valores intermediários. Os SNPs 508, 580, 601, 800, 845 e 878 estão numerados de 1 a 6, respectivamente. 39
- Figura 4.** Alinhamento múltiplo pelo programa MultAlin das sequências do fragmento do gene da glicoproteína-P de *Haemonchus cortortus* dos isolados sequenciados neste estudo (R: resistente; S: suscetível; 1 a 10: Bahia; 21 a 210: Pernambuco) comparados aos dois genomas de referência (McMaster e MHco3(ISE).N1). 46
- Figura 5.** Layout do *software* Análise de Risco de Desenvolvimento de Resistência Parasitária a Anti-Helmínticos em Ovinos (SARA). Em A, mostra a tela inicial, em B é um exemplo das informações do *software* e C representa o modo como são apresentadas as questões a serem respondidas. 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Frequências alélicas e genótípicas e análises de associação de polimorfismos no gene da glicoproteína-p em larvas suscetíveis e resistentes de *Haemonchus contortus*. 38
- Tabela 2.** Associação com base em haplótipos para os SNPs 601 e 878 do gene da glicoproteína-P em isolados suscetíveis e resistentes de *Haemonchus contortus*. 41
- Tabela 3.** Comparação das frequências alélicas e genótípicas para os polimorfismos no gene da glicoproteína-p em *Haemonchus contortus* entre os isolados brasileiros (resistente, Bahia e Pernambuco) e australiano (suscetível). 43
- Tabela 4.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos (SNP) encontrados no gene da glicoproteína-p (PgP) em *Haemonchus contortus*. 45

LISTA DE ABREVIATURAS

AADs	Derivados de amino-acetonitrila
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
Indel	inserção/deleção
LD	Desequilíbrio de ligação
MDR1	Gene de resistência a múltiplas drogas
PgP	Glicoproteína-P
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
transportadores ABC	cassete de ligação ao ATP

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Helmintos gastrintestinais: <i>Haemonchus contortus</i>	15
2.2. Anti-helmínticos.....	17
2.3. Mecanismos genéticos de resistência parasitária a anti-helmínticos	18
2.4. Glicoproteína-P (PgP)	21
2.5. Fatores de risco de manejo associados à resistência parasitária.....	22
2.6. Alternativas de controle de parasitoses em ovinos.....	23
3. OBJETIVO GERAL	25
3.1. Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Delineamento experimental.....	26
4.2. Infecção experimental	28
4.3. Colheita de vermes adultos	28
4.4. Extração de DNA	29
4.5. Desenho de primers.....	30
4.6. Amplificação por PCR do gene da glicoproteína-P (PgP)	30
4.7. Sequenciamento e identificação de polimorfismos gênicos.....	31
4.8. Validação de polimorfismo no gene da PgP como marcador molecular de resistência múltipla a anti-helmínticos em larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	31
4.8.1 Extração de DNA de larvas.....	32
4.8.2. Nested-PCR para identificação de polimorfismos no gene PgP em <i>Haemonchus contortus</i>	32
4.8.3. Eletroforese em gel de agarose para confirmação da amplificação do gene.....	33
4.8.4. Sequenciamento e identificação de polimorfismos gênicos.....	33
4.9. Desequilíbrio de ligação (LD).....	33
4.10. Análises estatísticas.....	33
4.11. Alinhamento de sequências.....	34
4.12. Desenvolvimento de uma ferramenta de tomada de decisão para o controle da resistência parasitária	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO.....	66

1. INTRODUÇÃO

A importância econômica da produção de ovinos aumentou em todo o mundo simultaneamente ao aparecimento de resistência parasitária. Entre helmintos gastrintestinais que acometem os ovinos, destaca-se a espécie *Haemonchus contortus*, parasita que possui notável capacidade de desenvolver resistência a todos os fármacos utilizados para seu controle (GILLEARD, 2013).

Os anti-helmínticos são os principais agentes de controle de parasitoses na ausência de tratamentos alternativos (LESPINE et al., 2012). Assim, é importante não fazer uso de tratamentos ineficazes, pois além de não eliminar os parasitas, esses medicamentos podem gerar custos desnecessários, levar à contaminação das pastagens e dos tecidos animais com seus resíduos e aumentar o nível da resistência (BARRÈRE et al., 2013).

Por centenas de milhões de anos, os parasitas adaptaram-se aos desafios e às oportunidades de evolução, o que sugere que tais helmintos continuarão a evoluir e a desenvolver mecanismos complexos com objetivo de vencer os efeitos das drogas destinadas à sua eliminação (SARGISON, 2012). Com isso, vários polimorfismos gênicos foram associados à resistência a anti-helmínticos. Os primeiros polimorfismos foram descritos em genes alvo de drogas, como o polimorfismo F200Y no isotipo 1 do gene da β -tubulina, em estudo prévio observamos que esse polimorfismo não explicava a resistência múltipla nas propriedades avaliadas, por isso buscamos nesse estudo avaliar um gene que pode estar associado à resistência múltipla. As alterações no gene que codifica a glicoproteína-P de membrana (PgP), que modula a concentração da droga no receptor alvo (KERBOEUF et al., 2003), foram associadas com a resistência múltipla. A PgP ou *ABCBI*, produto do gene *MDR1* (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002), promove o efluxo e diminui a concentração intracelular de droga (CHATURVEDI et al., 2013), promovendo subdosagem e conferindo resistência a várias drogas simultaneamente.

O diagnóstico aprimorado de doenças parasitárias e da resistência é etapa crucial para a prevenção, a sobrevivência, o controle e a epidemiologia de parasitas. Com essa finalidade, a biologia molecular é a técnica de diagnóstico da resistência que permite suplantar limitações observadas nos métodos parasitológicos tradicionais, que são pouco confiáveis, demorados ou mais tardios (GASSER et al., 2008).

É difícil determinar os fatores de risco relacionados à resistência às drogas, devido a diferentes estratégias de manejo utilizadas nas diferentes propriedades (SARGISON et al., 2007). Assim, é necessário o desenvolvimento de um estudo nas condições locais sobre os

fatores de risco de manejo relacionados à resistência de maneira a orientar os produtores de ovinos a respeito das estratégias para o seu controle.

Com base nisto, o presente trabalho teve como objetivo identificar polimorfismos no gene da glicoproteína-P (PgP), envolvido na resistência múltipla a anti-helmínticos, e validar sua utilização como marcador molecular de resistência múltipla em *Haemonchus contortus*. Além de desenvolver uma ferramenta (software) que contribua para a tomada de decisão para o controle da resistência parasitária.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Helmintos gastrintestinais: *Haemonchus contortus*

Um dos principais problemas encontrados na ovinocultura, que prejudica de maneira considerável o aproveitamento econômico desses animais, são as parasitoses gastrintestinais. Os ovinos, em qualquer faixa etária, são parasitados por helmintos, que atrasam o desenvolvimento corporal dos cordeiros, além de afetar a produção e a qualidade da carne e da lã (PINHEIRO, 1979). Desse modo, é essencial que seja feito o controle desses parasitas para a produção rentável dos animais, e o principal método de controle baseia-se no uso de anti-helmínticos (PRICHARD, 1990). Na Austrália, o custo anual associado às doenças parasitárias em bovinos e ovinos foi estimado em mais de 1 bilhão de dólares (GASSER et al., 2008).

Haemonchus contortus é o parasita que promove as maiores perdas econômicas em rebanhos de pequenos ruminantes de todo o mundo, devido ao seu alto poder de patogenicidade e prolificidade. Prevalente em ovelhas das regiões tropicais e subtropicais, esse parasita pertence à superfamília Trichostrongyloidea e age no abomaso de ovinos, caprinos e bovinos (GARRETSON, 2007). É um verme prolífico, e as fêmeas produzem até 10.000 ovos por dia, sendo que a população no pasto é frequentemente maior do que a encontrada parasitando os ruminantes. Tal tamanho populacional aliado à sua elevada taxa de reprodução e à grande variedade de seu ambiente são favoráveis à alta diversidade genética (PRICHARD, 2001). Como consequência, há alta aptidão em gerar novas mutações, sendo que qualquer uma que estiver sob seleção positiva, como as mutações de resistência aos anti-helmínticos, pode torna-se fixa e ter sua frequência aumentada (GILLEARD, 2013).

O *H. contortus* possui cariótipo $2n = 11$ em machos e $2n = 12$ em fêmeas, sendo XO macho e fêmea XX (REDMAN et al., 2008a). Os vermes adultos possuem sexos separados,

com reprodução sexual do tipo poliândrica, no qual uma única fêmea acasala-se repetidamente com vários machos. Assim, a prole de uma fêmea pode ter uma descendência F1 derivada de genótipos de dois a quatro machos diferentes (REDMAN et al., 2008a).

Esse helminto é visível a “olho nu”, as fêmeas possuem de 18 a 30 mm, os machos, de 10 a 20 mm (UENO; GONÇALVES, 1994) e seu ovo é de tamanho médio, com dimensões 74 x 44 µm (TAYLOR; COOP; WALL, 2010). Além disso é um verme hematófago, podendo causar danos locais ao hospedeiro, anemia, perda de peso, edema submandibular, redução do potencial zootécnico e morte súbita em casos de infecção super aguda ou surto.

Segundo descrição de Taylor e colaboradores (2010), cada verme remove cerca de 0,05 mL de sangue diariamente por ingestão e extravasamento das lesões, de modo que um ovino parasitado com 5.000 *H. contortus* pode perder cerca de 250 mL de sangue diariamente. Na hemoncose aguda, a anemia torna-se aparente cerca de 2 semanas após a infecção, e é caracterizada por queda progressiva e notável no volume globular. O resultado final pode ser a morte ou animais gravemente infectados ou enfraquecidos (WHITE; MEEUSEN; NEWTON, 2001).

O *Haemonchus* tem ciclo de vida direto no qual os vermes adultos vivem no abomaso e seus ovos são eliminados junto com as fezes do hospedeiro no pasto. No pasto, após a muda para L1 e L2, eles podem se desenvolver em larvas de terceiro estágio ou larvas infectantes (L3) em um curto período de 5 dias, embora o desenvolvimento possa ser retardado por semanas ou meses em condições frias (TAYLOR; COOP; WALL, 2010). Após ingestão pelos hospedeiros e perda da cutícula no rúmen, as larvas mudam duas vezes em estreita aposição às glândulas gástricas. Imediatamente antes da muda final, elas desenvolvem a lanceta perfurante que as tornam capazes de obter sangue a partir dos vasos da mucosa. Como parasitas adultos, movem-se livremente na superfície da mucosa. O período pré-patente é de 2-3 semanas em ovinos (TAYLOR; COOP; WALL, 2010).

A sobrevivência do parasita é facilitada por um fenômeno chamado hipobiose (desenvolvimento interrompido), que ocorre quando as condições climáticas são desfavoráveis para larvas e adultos. O desenvolvimento dos parasitas pode ser interrompido dentro do hospedeiro ou no pasto, permanecendo em estado de “hibernação” até que as condições ideais de desenvolvimento ocorram. Nessa fase, se o anti-helmíntico não apresentar ação sobre as formas em hipobiose, ele não surtirá efeito, pois não tem o poder de se manter na corrente sanguínea tempo suficiente para atingir essas larvas e removerá somente os vermes adultos (KOHEK JUNIOR, 1998).

Os vermes em *refugia* podem estar no estágio larval nos pastos, dentro dos animais não tratados ou em fases em que o nematoide não é suscetível ao tratamento (COLES, 2005). O tamanho da população em *refugia* tem um papel crucial na manutenção da eficácia das drogas, atrasando o processo de seleção para a resistência, uma vez que a progênie dos parasitas que sobreviveram ao tratamento (ou seja, resistentes) irá se desenvolver junto com os vermes livres em *refugia* (MOLENTO, 2004).

2.2. Anti-helmínticos

O controle dos parasitas gastrintestinais é realizado, essencialmente, com o uso de anti-helmínticos (CHARLES, 1989). Assim, o primeiro sinal do aparecimento de resistência anti-helmíntica é através da falha nesse tipo de controle (SANGSTER, 2001).

No Brasil, cinco classes de anti-helmínticos de amplo espectro estão disponíveis comercialmente: i) benzimidazóis, ii) imidazotiazóis; iii) salicilanilidas; iv) lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) (PRICHARD, 2008) e v) derivados de amino-acetonitrila (AADs) (KAMINSKY et al., 2008). Nas duas últimas décadas, as AADs foram a única nova classe de anti-helmínticos desenvolvidos para ruminantes. Os AADs são eficazes mesmo em rebanhos com resistência a todas as classes de anti-helmínticos (KAMINSKY et al., 2008; PRICHARD; GEARY, 2008).

Cada classe de anti-helmíntico de amplo espectro possui um mecanismo de ação diferente: os benzimidazóis ligam-se à β -tubulina e evitam a polimerização dos dímeros de tubulina em microtúbulos e, além disso, inibem a fumarato-redutase e o transporte de glicose; os imidazotiazóis e as salicilanilidas são agonistas de receptores de acetilcolina e provocam contração muscular e paralisia; já as lactonas macrocíclicas abrem canais iônicos e causam paralisia neuromuscular, inclusive da faringe; e as AADs atuam em receptores de acetilcolina específicos do nematoide (ALMEIDA; AYRES, 1996; COLES et al., 2006; KAMINSKY et al., 2008).

Para todos os anti-helmínticos, a resistência foi observada poucos anos após seu lançamento. Por exemplo, a fenotiazina foi lançada em 1940 e a resistência a ela foi relatada em 1957; a resistência ao tiabendazol (1961) em 1964; ao levamisol (1970) em 1979; à ivermectina (1981) em 1988; e à moxidectina (1991) em 1995 (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009). Era esperado que o uso inadequado dos AADs levasse ao aparecimento da resistência, e isso já foi relatado em rebanho caprino (SCOTT et al., 2013). Por isso, torna-se

imprescindível o uso adequado dos anti-helmínticos de maneira a tornar sua eficiência mais duradoura.

Como o processo de desenvolvimento de anti-helmínticos é bastante demorado e caro em comparação à velocidade de surgimento de resistência, é imprescindível retardar o desenvolvimento da mesma, para garantir que os agentes anti-helmínticos existentes sejam eficazes durante períodos mais longos de tempo. À primeira vista, parece mais fácil abandonar um produto anti-helmíntico a partir do momento que sua ineficácia é constatada em lugar de realizar testes de resistência no rebanho. Entretanto, a rotação anual de grupo de anti-helmíntico não impede o estabelecimento da resistência (SARGISON et al., 2007) e, em casos de elevada resistência, nem a combinação de produtos químicos pode surtir efeito (COLES, 2005). Além disso, o uso frequente de anti-helmínticos aumenta a resistência, pois seleciona os nematoides que sobrevivem ao tratamento e que irão formar a próxima geração de vermes (COLES, 2005). Em todo o mundo, parasitas com resistência múltipla aos anti-helmínticos são altamente prevalentes, não sendo incomum encontrar rebanhos onde a resistência existe para todas as classes de anti-helmínticos disponíveis no mercado naquele momento (HOWELL et al., 2008; CEZAR et al., 2010; DA CRUZ et al., 2010; VERÍSSIMO et al., 2012).

2.3. Mecanismos genéticos de resistência parasitária a anti-helmínticos

O Haemonchus contortus possui bastante variabilidade no DNA nuclear, e a taxa de mutação no seu DNA mitocondrial é cerca de dez vezes maior do que a observada em vertebrados. Assim observa-se nesse parasita grande variabilidade genética, tanto em uma população local quanto entre populações geograficamente separadas ou selecionadas por drogas (PRICHARD, 2001).

O uso indiscriminado dos anti-helmínticos acarreta o surgimento da resistência parasitária, sendo agravado pelo fácil acesso que o produtor tem a esses medicamentos, o que leva à queda da eficácia devido à seleção de parasitas resistentes (MOLENTO, 2004). A resistência é definida como o aumento na proporção de indivíduos numa população, que carrega um gene ligado à resistência (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009). Geralmente a frequência alélica é superior a 90% (BEECH, 2008), consistindo na maior frequência de indivíduos que são capazes de tolerar doses de uma determinada droga em relação à população normal (PRICHARD et al., 1980). O desenvolvimento de resistência anti-helmíntica é um processo evolutivo no qual os indivíduos que sobrevivem ao tratamento

contribuem seus genes para a próxima geração (BLACKHALL et al., 2008). Assim, após algumas gerações, a frequência de indivíduos sobreviventes aumenta na população (BLACKHALL et al., 2008), levando à ineficácia do tratamento.

A resistência é completa quando a dose máxima da droga tolerada pelo hospedeiro não possui mais efeito sobre o parasita (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009). Além disso, a resistência pode ser manifestada pela diminuição do tempo de efeito de um tratamento, o que resulta na necessidade de aplicações mais frequentes do produto (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009). Quando há a resistência a mais de duas bases farmacológicas, esse fenômeno é denominado de resistência múltipla (MOLENTO, 2004).

A resistência aos anti-helmínticos em determinados parasitas gastrintestinais de ovelhas está próxima de ser insolúvel. O crescimento de tal resistência nas fazendas do mundo todo e os métodos com potencial para atrasar consideravelmente o seu desenvolvimento estão se tornando disponíveis no mercado, contudo sua aplicação nas fazendas tem provado ser problemática (VAN WYK; REYNECKE, 2011), uma vez que alguns produtores fazem o uso das drogas de forma negligente. Por essa razão, as técnicas de biologia molecular poderiam ser usadas para monitorar a resistência e correlacionar com os fatores de risco para o manejo dos rebanhos de ovinos. Desse modo, o diagnóstico de resistência juntamente com as práticas de manejo adequadas podem melhorar o controle dos endoparasitas e retardar o desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos (NICIURA et al., 2012).

Devido à diversidade genética na população, os parasitas respondem de forma diferente aos tratamentos e observa-se frequentemente, nos ensaios de titulação da dose, uma variação nas respostas a um anti-helmíntico. A frequência e a intensidade dos tratamentos, associada à maior ou menor disseminação dos alelos para resistência na população de parasitas determinam a taxa de seleção da resistência (PRICHARD, 2001).

Entre os mecanismos moleculares de resistência a anti-helmínticos, a resistência ao benzimidazol foi o primeiro a ser elucidado. Beech e colaboradores (1994) relataram que a tubulina é o sítio alvo de benzimidazóis nos parasitas, e que a resistência aos benzimidazóis é mediada pela redução da afinidade de ligação à β -tubulina, resultando no aumento da tolerância à droga. A primeira mutação descrita no isotipo 1 do gene da β -tubulina foi uma transversoão T para A (códon TTC é modificado para TAC), levando à uma substituição de fenilalanina por uma tirosina na posição 200: o polimorfismo F200Y (KWA; VEENSTRA; ROOS, 1994). As lactonas macrocíclicas ligam-se a canais de GluCl e entram nas células, resultando em hiperpolarização de células neuromusculares e paralisia (BLACKHALL et al.,

2008). Assim, os polimorfismos L256F e A169V no gene que codifica a subunidade α do canal GluCl já foram associados à resistência à ivermectina e à moxidectina em *Haemonchus contortus* (BLACKHALL et al., 2008). O gene para o canal GluCl não parece estar envolvido na resistência ao benzimidazol (BLACKHALL et al., 2008). Além dos canais GluCl, modificações que alteram o alvo das drogas, tal como o polimorfismo K169R no gene que codifica o ácido γ -aminobutírico (GABA) (BLACKHALL et al., 2008) e o canal iônico ligado a dopamina (HcGGR3) (RAO et al., 2009) já foram relacionadas à resistência às lactonas macrocíclicas. A resistência ao levamisol foi associada ao polimorfismo no gene do receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) em *Ascaris suum* (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009). Tais receptores estão presentes na junção neuromuscular, na faringe, no músculo da cabeça e no gânglio central (PRICHARD, 2008).

As várias maneiras com que os indivíduos sobreviventes toleram os efeitos dos anti-helmínticos (BLACKHALL et al., 2008; PRICHARD, 2008; JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009) são:

- a) Variações no gene alvo ou na proteína alvo que resultam em menor afinidade de ligação pela droga. Exemplos de polimorfismos que conferem resistência a drogas em *Haemonchus contortus*: F200Y no isotipo 1 do gene da β -tubulina (resistência a benzimidazol) e L256F no gene GluCl (resistência a lactonas macrocíclicas).
- b) Diferenças alélicas ou na expressão de um gene que podem afetar o efeito da droga na proteína alvo sem afetar a afinidade de ligação.
- c) Redução da concentração do anti-helmíntico em seu sítio alvo por alterações em mecanismos de transporte ou por mudanças na permeabilidade celular. Por exemplo, alterações na proteína de membrana glicoproteína-P, que exporta as drogas das células, reduz a concentração intracelular e promove a subdosagem. Esse mecanismo confere resistência a múltiplas drogas.
- d) Capacidade diferencial de metabolização, efluxo ou detoxificação (como o sistema glutathiona-tioredoxina e o citocromo P450) do anti-helmíntico de maneira a alterar sua efetividade. Esses mecanismos também provocam desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas simultaneamente.

Caso o mecanismo de resistência seja relacionado à presença de mutações nos genes envolvidos na atuação do fármaco, os anti-helmínticos com o mesmo modo de ação têm propensão de partilhar o mesmo mecanismo de resistência. Contudo, diferentes anti-helmínticos de mesma classe de ação podem não ter o mesmo nível de resistência, caso o

mecanismo de resistência seja dependente da modulação da concentração da droga. Tal fato é consequência do efeito de diferentes substituintes químicos no transporte ou no metabolismo (PRICHARD, 2001).

Dessa forma, a compreensão do desenvolvimento da resistência é crucial para prolongar a eficácia dos anti-helmínticos existentes e para desenvolver marcadores para monitorar a resistência a drogas, além de ser benéfico para o desenvolvimento de novos agentes químicos e de novos alvos de drogas (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009).

2.4. Glicoproteína-P (PgP)

Os transportadores ABC (cassete de ligação ao ATP, *ATP-binding cassette*) constituem uma importante classe de bombas proteicas ligadas à membrana, que agem principalmente na exportação de moléculas hidrofóbicas do citoplasma, atuando na remoção de moléculas tóxicas na superfície da mucosa do trato intestinal do parasita. O estudo dos transportadores ABC é de grande importância clínica, pois a superprodução de proteínas dessa classe de transportadores contribui para a resistência de células tumorais a fármacos quimioterápicos (ALBERTS et al., 2010).

As glicoproteínas-P (PgP) pertencem a essa família de transportadores ABC, são proteínas de transporte localizadas na membrana celular que promovem o efluxo de fármacos (MOLENTO; PRICHARD, 1999) e possuem especificidade uma ampla variedade de substratos (SCHWAB et al., 2003). Essas proteínas, que são produtos do gene *MDR1*, aparentemente agem como bombas de efluxo de xenobióticos, removendo seus substratos da dupla camada lipídica para o espaço extracelular (MOLENTO; PRICHARD, 1999).

Assim, modificações no gene que codifica a PgP foram associadas à resistência múltipla, pois afetam o transporte de ivermectinas, benzimidazóis (BLACKHALL et al., 2008) e imidazotiazóis (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009). Essas modificações não envolvem alteração no alvo das drogas (BLACKHALL et al., 2008), mas sim redução na quantidade da droga que atinge o sítio alvo (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009). Uma vez que a glicoproteína-P é dependente de energia, compostos que inibem o transporte por competição direta ou por ligação à glicoproteína-P podem reverter a resistência, como exemplo os bloqueadores de canais de cálcio (verapamil e nifedipina), os imunossupressores (ciclosporina A e PSC 833), os anti-arrítmicos (quinina e amiodarona) e os inibidores de protease HIV (sequinavir e retanavir) (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009). Os inibidores da glicoproteína-P foram capazes de aumentar e restaurar a sensibilidade à ivermectina em isolados de nematoides resistentes de *T. circumcincta* e *H. contortus* (BARTLEY et al.,

2009). Kerboeuf e Guégnard (2011) mostraram, por meio da avaliação do transporte da Rodamina 123 (R123), um substrato para a PgP, que a maioria dos anti-helmínticos que são ativos contra nematoides interagem com a PgP. Riou e colaboradores (2003) relataram a existência de bombas de PgP em ovos de *Haemonchus contortus*, e confirmaram que o colesterol pode modular a atividade da PgP e alterar o nível de resistência a agentes anti-helmínticos. Recentemente, um estudo investigou nove sequências homólogas de PgP de *H. contortus* para analisar as possíveis mudanças nos níveis de expressão de PgP associados à resistência à ivermectina (WILLIAMSON; WOLSTENHOLME, 2012). Contudo não foram encontradas alterações significativas nos níveis de expressão de mRNA da PgP entre os isolados resistentes e suscetíveis às drogas. Os resultados na literatura são controversos, o que justifica que mais trabalhos sejam realizados sobre a PgP.

2.5. Fatores de risco de manejo associados à resistência parasitária

Além dos fatores genéticos (como frequência e número de alelos de resistência na população), vários outros fatores podem influenciar nos efeitos de seleção da resistência dentro de uma população, como os fatores operacionais (frequência de aplicação de anti-helmínticos, rotação de produtos químicos e manejo da pastagem) e também os fatores biológicos ou ecológicos (a rotatividade de geração, o número de descendentes por geração e a migração) (MARTIN, 1987).

O uso intensivo de compostos químicos, muitas vezes em subdosagem, tem mostrado ser o fator mais importante que predispõe à rápida seleção de resistência anti-helmíntica (WALLER et al., 1996), resultando em resistência a todas as classes de drogas usadas para controle dos nematoides (CRAIG, 1993).

É comum no Brasil não se fazer a pesagem dos animais para o tratamento, o que possibilita a subdosagem e o desperdício. O conhecimento do peso dos animais para o cálculo correto das doses a serem administradas é essencial para que se tenha eficácia na ação do fármaco contra os nematoides. Entretanto, se não for possível pesar todos os animais antes do tratamento, o ideal é tratar os animais com seu peso mais aproximado. Logo, o grupo mais leve deve receber medicação diferente do grupo mais pesado (MOLENTO, 2004; CRAIG, 2006).

Segundo Molento (2004), foi comprovado que realizar a rotação de vermífugos acelera o processo de resistência genética, além de causar a resistência múltipla. O período ideal mínimo para a rotação de drogas é de um ano para ovinos. Recomenda-se o uso contínuo

(indefinidamente) de determinada droga, com constante monitoramento por OPG, até que seja verificada a redução da eficácia, para que então seja realizada a mudança da base química. Dessa forma a droga seria utilizada até sua exaustão (MOLENTO, 2004).

Tratamentos alternativos para controle dos parasitas, como nível de proteína na dieta, vacinas e uso de raças mais resistentes, não são eficazes sem o amparo dos anti-helmínticos, embora eles reduzam a dependência do uso de produtos químicos e não agridam o meio ambiente (PAPADOPOULOS, 2008).

Segundo Barnes et al. (1995), para adiar a seleção de resistência anti-helmíntica, algumas estratégias são recomendadas: reduzir a frequência de tratamento, evitar a subdosagem e realizar a rotação anual dos grupos de anti-helmínticos e o manejo da pastagem. Sem o gerenciamento da pastagem, a dependência de drogas conduz rapidamente a níveis altos de resistência e morte de cordeiros (BARNES; DOBSON; BARGER, 1995).

Um ponto chave para controlar e retardar o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica é manter parasitas em *refugia* e não expostos a anti-helmínticos, pois, dessa forma, seus genes de suscetibilidade são preservados (PAPADOPOULOS, 2008). A biologia e a epidemiologia do parasita, a dinâmica da relação parasita-hospedeiro, a frequência de tratamento e as estratégias de tratamento que resultam em vários níveis de *refugia* são fatores relevantes que afetam a taxa com a qual a resistência se desenvolve (KAPLAN, 2004).

2.6. Alternativas de controle de parasitoses em ovinos

Algumas práticas auxiliam no controle das parasitoses gastrintestinais, priorizando as medidas alternativas de manejo e não apenas o uso de drogas antiparasitárias. Os vermífugos nunca devem ser utilizados como a única ferramenta de controle, apesar de que o seu bom uso também faz parte das estratégias de controle das verminoses.

Molento (2004) descreve o Sistema Integrado de Controle Parasitário – SICOPA, que foi desenvolvido para as condições do produtor brasileiro. Trata-se de um conjunto de 26 estratégias de manejo para um tratamento rigoroso, com o intuito de preservar a população parasitária suscetível (*refugia*), algo extremamente importante para retardar o desenvolvimento da resistência, além de reduzir os custos de produção e incentivar a redução na utilização de anti-helmínticos. Algumas dessas estratégias também são mencionadas por Sotomaior et al (2009). Dentre as diversas estratégias para o controle parasitário, destacam-se:

- A diminuição da lotação de animais nos pastos, como em áreas mais úmidas da fazenda ou em locais que estão mais contaminados, por exemplo, uma pastagem da qual o lote sempre sai com anemia ou diarreia.
- O confinamento para as categorias mais suscetíveis, como fêmeas em lactação e filhotes em terminação (prática que se baseia na seleção e confinamento de ovinos jovens, machos e/ou fêmeas, com interesse para o abate, num curto espaço de tempo).
- Alimentação e condição sanitária adequada são essenciais para o controle eficiente das parasitoses. O planejamento da alimentação em todas as épocas do ano, a implementação de um calendário de vacinações, assim como o planejamento da higiene e ventilação das instalações são exemplos de medidas a serem adotadas nas propriedades. É preciso pensar que muitas vezes o fato do animal estar magro é a causa da parasitose e não a consequência.
- Usar a dose correta do vermífugo: baseada no peso de cada lote de animal e nas dosagens dos principais princípios ativos recomendadas para ovinos.
- Testar a eficácia das drogas antes de iniciar o tratamento: para situações que se deseja utilizar a rotação lenta de bases, é indicado realizar o exame de OPG antes da substituição, determinando a eficácia da droga que será utilizada.
- Utilização de vermífugos de curto espectro. Uma vez que *Haemonchus* é o principal parasita, sempre que possível, deve ser utilizado um princípio ativo de curto espectro (como o closantel e nitroxinil) que atingem mais especificamente esse parasita. Dessa forma, há diminuição na pressão de seleção para isolados resistentes dos demais parasitas presentes no rebanho.
- O tratamento seletivo consiste em tratar os animais que apresentem algum sinal de anemia, diarreia, queda na produção de carne ou leite, deixando os outros sem tratar. Isso preserva a população em *refugia*, ou seja, aumenta o número de parasitas suscetíveis nas pastagens. O melhor seria conseguir identificar, dentro de um rebanho ou de um lote, quais são os animais que realmente precisam de vermífugos.
- Tratar animais recém-adquiridos: esses animais podem ser fonte de disseminação de ovos/larvas de parasitas resistentes. Se possível obter o histórico de tratamentos anteriores e possíveis problemas relacionados com parasitismo. O controle preventivo se faz por meio do tratamento de todos os animais antes que esses adentrem ao novo lote, respeitando um intervalo de duas semanas para o segundo tratamento.

- Diminuir o número de tratamentos: por motivos econômicos e para retardar o aparecimento da resistência parasitária, recomenda-se prescrever o menor número de tratamentos por ano, quanto menor o número de tratamentos maior será o período de utilização de uma droga, pois isso permitirá a reprodução e a manutenção de parasitas suscetíveis em maior proporção do que os resistentes. Aconselha-se também o uso contínuo (indefinidamente) de determinada droga, com constante monitoramento por OPG, para somente depois de determinada redução da eficácia (abaixo de 80%) realizar a mudança da base química.
- Avaliação terapêutica. O diagnóstico clínico permite identificar o animal que necessita de tratamento imediato, utilizando critérios como: anemia, diarreia, edema submandibular (papeira) e estado corporal. O método Famacha, desenvolvido na África do Sul, é um sistema de avaliação terapêutica simples e eficiente para controlar o *Haemonchus contortus*. Esse método correlaciona diferentes tons da coloração da conjuntiva dos animais com valores de volume globular, selecionando individualmente os animais que devem ou não receber tratamento.

3. OBJETIVO GERAL

Identificar marcador molecular para a resistência múltipla a anti-helmínticos em *Haemonchus contortus* e desenvolver uma ferramenta que auxilie na tomada de decisão para o controle da resistência parasitária.

3.1. Objetivos específicos

1. Identificar polimorfismos no gene da glicoproteína-P (PgP) em isolados de *Haemonchus contortus* suscetíveis e com resistência múltipla a anti-helmínticos;
2. Validar um polimorfismo no gene da PgP como marcador molecular de resistência múltipla a anti-helmínticos em *Haemonchus contortus*;
3. Comparar as sequências do fragmento do gene da glicoproteína-P geradas ao genoma de *Haemonchus contortus* para identificar diferenças entre os isolados;
4. Desenvolver uma ferramenta (programa computacional) que auxilie os produtores de ovinos na identificação dos fatores de risco de manejo nas propriedades e na tomada de decisão para o controle da resistência parasitária.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Experimento I: Identificação de SNPs no gene da glicoproteína-P em *Haemonchus contortus* e associação ao estado de resistência parasitária

Para a prospecção de SNPs no gene da glicoproteína-P em *Haemonchus contortus*, foram utilizados vermes adultos obtidos após infecção experimental de dois ovinos com isolado suscetível ou com isolado com resistência múltipla a anti-helmínticos e colheita dos parasitas do abomaso após o abate dos animais. A utilização de vermes adultos foi estipulada já que a quantidade de DNA recuperada de uma larva é muito pequena para viabilizar os procedimentos de identificação de um novo polimorfismo gênico. Dessa maneira, foram sequenciados os produtos de amplificação do gene da glicoproteína-P de 13 vermes adultos do isolado suscetível e de 13 do isolado resistente.

Para a associação dos SNPs no gene da PgP ao estado de resistência parasitária, foi aumentado o número amostral do isolado resistente por meio da genotipagem de 13 larvas, totalizando 26 amostras. Não conseguimos aumentar o número amostral do isolado suscetível, uma vez que não obtivemos larvas frescas, que percebemos ser um fator fundamental para o sucesso das reações de PCR. A partir desses dados foram determinadas as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos, a associação das frequências alélicas e genótípicas ao estado de resistência a anti-helmínticos, o desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs e a associação dos haplótipos dos SNPs em LD ao estado de resistência.

Experimento II: Validação dos SNPs no gene da glicoproteína-P em *Haemonchus contortus* como marcadores moleculares de resistência

A estratégia mais comumente utilizada para a avaliação de marcadores moleculares associados à resistência a anti-helmínticos em parasitas consiste na avaliação do mesmo isolado antes e após a indução experimental da resistência. Entretanto, esse procedimento só resulta em resistência após várias gerações e só permite avaliar a resistência a um anti-helmíntico por vez. Assim, com o objetivo de avaliar a associação de polimorfismos à resistência múltipla (a mais de um anti-helmíntico simultaneamente) e de ocorrência natural, neste trabalho foi utilizada a genotipagem de isolados com estados extremos de resistência a anti-helmínticos (um isolado suscetível e um isolado resistente). A desvantagem de tal abordagem foi que o isolado suscetível utilizado, o McMaster, é de origem geográfica

(Austrália) distinta do isolado resistente (Brasil). Por esse motivo, torna-se necessário verificar se os polimorfismos gênicos distintos entre os dois isolados devem-se ao estado de resistência ou são marcadores de isolamento geográfico.

Para tanto, larvas de outros dois isolados brasileiros (n = 7 da Bahia; n = 9 de Pernambuco), com estado de resistência não determinado, foram avaliadas e comparadas aos resultados obtidos no Experimento I. A partir desses dados foi feito o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os SNPs nos quatro isolados, a comparação das frequências alélicas dos SNPs entre os isolados e a associação das frequências alélicas dos SNPs ao estado de resistência parasitária a anti-helmínticos.

Experimento III: Estudo *in silico* de fragmento do gene da glicoproteína-P em *Haemonchus contortus*

Visando melhor compreender o gene em estudo e identificar outros possíveis polimorfismos, as 55 sequências geradas do fragmento do gene PgP dos quatro isolados foram alinhadas e comparadas às sequências dos dois genomas publicados de *H. contortus*.

Experimento IV: Desenvolvimento de software para identificação dos fatores de risco de manejo nas propriedades e na tomada de decisão para o controle da resistência parasitária em ovinos

A princípio, o intuito era avaliar polimorfismos no gene da glicoproteína-P (PgP) nas amostras obtidas, em projeto anterior, de 34 propriedades criadoras de ovinos de 16 regiões do Estado de São Paulo (VERÍSSIMO et al., 2012). A seguir, pretendia-se validar esse polimorfismo como marcador molecular para o diagnóstico precoce da resistência múltipla a anti-helmínticos e associá-lo aos fatores de risco de manejo, visando ao desenvolvimento de uma ferramenta que pudesse orientar os produtores de ovinos a respeito das estratégias de controle da resistência parasitária.

Entretanto, a amplificação por PCR do gene PgP a partir do DNA já extraído dessas amostras não foi bem sucedida. Então, foram utilizados os dados de genotipagem do polimorfismo no resíduo 200 do isotipo 1 do gene da β -tubulina (NICIURA et al., 2012), que confere resistência ao benzimidazol, para o desenvolvimento do *software*. Vale mencionar que as informações contidas no *software*, baseadas em estudo anterior, mantêm-se relevantes, pois foram encontradas na literatura as mesmas orientações sobre práticas de manejo que podem retardar o desenvolvimento da resistência aos anti-helmínticos. Pretende-se, em estudos futuros, complementar o *software*, com os dados obtidos para o gene PgP.

4.2. Infecção experimental

Foram utilizados dois ovinos da raça Santa Inês, com peso vivo ao redor de 30 kg, do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste. Os animais foram mantidos em baias limpas e alimentados com silagem à vontade e 400 g de milho/dia. Eles foram vermifugados com levamisole fosfato (Ripercol F®, Fort Dodge) e albendazol (Valbazen®, Pfizer) em dose dobrada à da prescrição a cada 24h durante 3 dias consecutivos para remover a infecção natural por nematoides (AMARANTE et al., 2004). Após sete dias de tratamento, amostras fecais foram coletadas diretamente do reto dos animais para realização do exame de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (UENO; GONÇALVES, 1998) e confirmação do status de animais livres de nematoides gastrintestinais (GINs). Após 28 dias, cada animal foi infectado com 4.000 L3 de *H. contortus*, obtidas por coprocultura, do isolado multirresistente Embrapa2010 (CHAGAS et al., 2013) e do isolado suscetível McMaster (GILL et al., 1998) (um animal recebeu larvas de cada isolado). Ambos os isolados foram mantidos em doadores na Embrapa Pecuária Sudeste e estão registrados no CARS (*Consortium on Anthelmintic Resistance SNPs – Parasite Isolate Database*). O isolado McMaster não possui histórico de exposição a anti-helmínticos; ele foi isolado na Austrália antes do lançamento dos antiparasitários de amplo espectro e tem sido utilizado rotineiramente como isolado suscetível de referência em estudos de resistência (GILL et al., 1998) e genômica (SCHWARZ et al., 2013). O isolado Embrapa2010 foi caracterizado após abate e contagem dos parasitas adultos via programa RESO como resistente aos benzimidazóis (eficácia de 20% para o albendazol) e às lactonas macrocíclicas (eficácia de 52% para a ivermectina e de 85% para a moxidectina), mas suscetível aos imidazotiazóis (eficácia de 93% para o levamisol) (CHAGAS et al., 2010). Após 28 dias, foi realizado novo OPG para constatação do estabelecimento da infecção e abate dos ovinos para colheita de *H. contortus* adultos do abomaso.

4.3. Colheita de vermes adultos

Os dois ovinos submetidos à infecção experimental com isolados de helmintos suscetíveis e multirresistentes foram abatidos para a recuperação de vermes adultos. Para a necropsia parasitológica seguiu-se o protocolo descrito por Molento et al. (2011). Brevemente, a cavidade abdominal do ovino foi aberta com cuidado, evitando ruptura e perda de material. Após a identificação do abomaso, o órgão foi retirado, acondicionado em saco plástico e enviado ao laboratório para processamento imediato. O abomaso foi aberto na sua

curvatura maior, e o conteúdo disposto em um recipiente (balde) graduado. O órgão foi lavado em água corrente com baixa pressão para melhor colheita do conteúdo, que foi decantado em bandeja com água morna para a recuperação dos espécimes com auxílio de pinça ou espátula.

4.4. Extração de DNA

Vinte e seis parasitas (13 suscetíveis e 13 resistentes) adultos de *Haemonchus contortus* foram destinados, individualmente, à extração de DNA, à amplificação por PCR de fragmento do gene da glicoproteína-p (PgP) e ao sequenciamento capilar. A extração de DNA, após a remoção da cutícula dos parasitas, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Niciura (2011). Brevemente, os vermes adultos foram depositados em placa de Petri contendo 4 mL de água Milli-Q, à qual foram acrescentados 180 µL de hipoclorito de sódio (em solução aquosa com 3,5% de cloro ativo), seguido por descanso por 5 min. A seguir, os parasitas foram transferidos para outra placa de Petri com água, coletados individualmente e pulverizados em nitrogênio líquido. Para a extração do DNA, o conteúdo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, ressuspendido em 250 µL de água e armazenado a -20°C. A seguir, a cada microtubo acrescentou-se 1 mL de tampão de digestão (10 mM de Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de EDTA pH 8,0, 50 mM de NaCl e 2% de SDS), seguido por homogeneização e centrifugação a 14.000 xg por 5 min. O sobrenadante foi retirado de maneira a deixar cerca de 50 µL do tampão. Posteriormente, adicionou-se 0,5 mL do tampão de digestão contendo 40 mM de DTT e 0,4 mg/mL de proteinase K, e a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a 56°C *overnight*. Após esse período, foi acrescentado 0,5 mL de solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), seguido por vórtex por 15 seg e centrifugação a 14.000 xg por 5 min. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo microtubo, ao qual foram acrescentados 600 µL de isopropanol 100%. Após homogeneização por 50 vezes e centrifugação a 14.000 xg por 15 min, o sobrenadante foi removido, e ao pellet adicionou-se 1 mL de etanol 70%. Após centrifugação a 14.000 xg por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet, seco ao ar. A seguir, o DNA foi ressuspendido com 20 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA), incubado a 37°C por 1 h e armazenado a -20°C para posterior utilização.

4.5. Desenho de *primers*

Uma vez que, no início dos experimentos deste trabalho, a sequência completa do genoma de *H. contortus* não estava publicada, a sequência de mRNA do gene da PgP (GenBank AF003908.1) foi alinhada com os contigs de *H. contortus* da base de dados (27/01/06) do Wellcome Trust Sanger Institute, obtido a partir de <http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/helminths/haemonchus-contortus.html>. Isso resultou na identificação do contig 004690, que foi alinhado com a sequência de mRNA para deduzir a localização de íntrons e éxons do fragmento do gene da PgP em estudo.

A partir dessa sequência foram desenhados *primers* no software *Primer 3 Plus* (UNTERGASSER et al., 2007; PRIMER3PLUS, 2013). Os *primers* desenhados foram avaliados quanto às temperaturas de anelamento e à presença de estruturas secundárias, como *hairpins* e dímeros pelo NetPrimer (NETPRIMER, 2013). Para a verificação da especificidade de cada *primer* foram utilizados dois *softwares*, BLAST (MOUNT, 2007; BLAST, 2013) e Primer BLAST (YE et al., 2012; PRIMERBLAST, 2013).

4.6. Amplificação por PCR do gene da glicoproteína-P (PgP)

A amplificação de um fragmento de aproximadamente 1.110 pb do gene da PgP foi realizada por PCR com os *primers* RF4f2 (5'-GATCAGATTTTCGTTTTTC-3'; desenhado neste estudo) e MX-D (5'-AGACAAAGACATTCAGAG-3'; BLACKHALL et al., 2008). A PCR foi constituída por 1X de tampão, 0,25 µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA polimerase de alta fidelidade e 1 µL de DNA, em volume final de 20 µL. A termociclagem consistiu de um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 min, seguido pela amplificação em 40 ciclos, com desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 51,2°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, e ciclo final de extensão a 72°C por 10 min. Após a PCR, o tamanho do fragmento da amplificação foi confirmado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para tanto, 8 µL do produto de PCR foram misturados com 2 µL de *loading buffer* (30% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol). A seguir, as amostras e o padrão de tamanho (*ladder* de 100 bp) foram aplicados no gel, que foi submetido à eletroforese (100V, 90mA e 5W por 1 h e 30 min) em tampão TBE 1X (8,9 mM de Tris, 8,9 mM de ácido bórico e 2,8 mM de EDTA), à observação em transiluminador UV e à fotodocumentação.

4.7. Sequenciamento e identificação de polimorfismos gênicos

O produto de amplificação do fragmento do gene PgP foi destinado ao sequenciamento, em duplicata (uma reação com o *primer forward* e outra com o *primer reverse*) totalizando 52 reações de sequenciamento de 13 parasitas do isolado suscetível e 13 do resistente. Inicialmente, os produtos de PCR foram purificados com a enzima ExoSAP-IT por meio da mistura de 5 µL de produto de PCR com 2 µL de ExoSAP-IT seguida de incubação a 37°C por 15 min e inativação a 80°C por 15 min. A reação de sequenciamento consistiu de 0,5X de tampão de sequenciamento, 0,5X de BigDye Terminator v3.1, 0,4 µM de *primer* (uma reação para cada *primer*) e 1 µL de DNA purificado, em volume final de 10 µL. A termociclagem consistiu de um ciclo de 94°C por 2 min, 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 seg, anelamento a 51,2°C por 10 seg e extensão a 60°C por 4 min. O produto de sequenciamento foi precipitado uma vez com isopropanol 65% e duas vezes com etanol 60%. Após secagem, as amostras foram submetidas à desnaturação com formamida a 95°C por 5 min e destinadas ao sequenciamento em capilar no ABI 3100 Avant (Applied Biosystems), com capilar de 50 cm e polímero POP6. Os eletroferogramas gerados no sequenciamento foram submetidos ao programa de *base calling* Phred, que reconhece dados de cromatogramas e identifica a sequência de DNA gerada, atribuindo um valor de qualidade a cada nucleotídeo identificado. Em seguida, as sequências foram submetidas ao programa de montagem Phrap (*Phragment Assembly Program*), no qual são agrupadas e organizadas em contigs. A visualização das sequências geradas foi realizada no programa Consed para a identificação de polimorfismos em indivíduos heterozigotos, e o programa BioEdit (HALL, 1999), através da utilização do algoritmo ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), foi usado para identificar os polimorfismos entre homozigotos para diferentes alelos de um SNP.

4.8. Validação de polimorfismo no gene da PgP como marcador molecular de resistência múltipla a anti-helmínticos em larvas de *Haemonchus contortus*

O polimorfismo no gene PgP, identificado por sequenciamento no item anterior, foi avaliado em larvas de *Haemonchus contortus* obtidas de rebanhos ovinos de duas propriedades, localizadas na Bahia (n=7) e em Pernambuco (n=8), para que fosse possível validar os marcadores SNP identificados como relacionados à resistência múltipla a anti-helmíntico e não ao isolamento geográfico.

4.8.1 Extração de DNA de larvas

Larvas obtidas após coprocultura de cada propriedade foram destinadas à extração de DNA com o protocolo descrito por Silvestre e Humbert (2000) e modificado por Coles et al. (2006) e Gromboni et al. (2009).

Antes da extração de DNA, as larvas foram submetidas à remoção da cutícula. Para tanto, 4 mL de suspensão de larvas foram coletados e depositados em uma placa de Petri, na qual foram acrescentados 180 µL de hipoclorito de sódio (em solução aquosa com 3,5% de cloro ativo), seguido por descanso por 5 minutos. A seguir, transferiram-se as larvas para uma placa de Petri com água, que foi colocada sob microscópio óptico invertido para que as larvas fossem coletadas individualmente em volume de 2 µL e depositadas em microtubos de 0,2 mL ou em placas de PCR. As larvas foram mantidas a -20°C por, no mínimo, 20 min ou até os procedimentos de extração de DNA.

Para a extração de DNA, as larvas foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em temperatura ambiente por 5 vezes. Em seguida, foram incubadas em 10 µL de tampão de digestão (10 mM de Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de EDTA pH 8,0, 50 mM de NaCl, 2% de SDS, 40 mM de DTT e 0,4 mg/mL de proteinase K) a 56°C *overnight*.

A seguir, adicionaram-se 10 µL de solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), seguido por vórtex por 15 seg e centrifugação a 14.000 xg por 5 min. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo, ao qual foram acrescentados 6 µL de isopropanol 100%. Após homogeneização por 50 vezes e centrifugação a 14.000 xg por 15 min, removeu-se o sobrenadante, e ao *pellet* foram adicionados 10 µL de etanol 70%. Após centrifugação a 14.000 xg por 5 min, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi seco ao ar. A seguir, o DNA foi ressuspendido com 10 µL de água a 37°C por 1 h e, posteriormente, armazenado a 20°C. As amostras de DNA foram destinadas à amplificação por PCR.

4.8.2. Nested-PCR para identificação de polimorfismos no gene PgP em *Haemonchus contortus*

Na primeira reação da nested-PCR, foram utilizados os *primers* RF4f2 e MX-D, conforme reação descrita anteriormente, mas com 2 µL de DNA (larva individual).

Para a segunda reação da nested-PCR, foram utilizados os *primers* PGP2S (5'-GAAATGACTCAAGCACAAG-3'; BLACKHALL et al., 2008) e PGP884R (5'-CGTAGTTTTGTACATCAT-3'; desenhado neste estudo). A reação de PCR foi composta por 1X tampão de PCR, 0,25 µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂,

1 U de Taq DNA polimerase e 1 μL de DNA da primeira reação de nested-PCR, em volume final de 20 μL . A termociclagem consistiu de um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 min, seguido pela amplificação em 40 ciclos, com desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 53,5°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, e ciclo final de extensão a 72°C por 10 min.

4.8.3. Eletroforese em gel de agarose para confirmação da amplificação do gene

A confirmação da amplificação do gene foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2,5%. Para tanto, 8 μL do produto da nested-PCR foram misturados com 2 μL de *loading buffer*. A seguir, as amostras e o padrão de tamanho (*ladder* de 100 bp) foram aplicados no gel, que foi submetido à eletroforese (90 V, 70 mA e 5 W por 1 h e 30 min) em tampão TBE 1X e à observação em transiluminador UV.

4.8.4. Sequenciamento e identificação de polimorfismos gênicos

Os produtos de amplificação do fragmento do gene PgP das larvas de *Haemonchus contortus* foram destinados ao sequenciamento, do mesmo modo que descrito anteriormente.

4.9. Desequilíbrio de ligação (LD)

O software FASTPHASE (SCHEET; STEPHENS, 2006) foi usado para reconstruir os haplótipos, e o HAPLOVIEW (BARRETT et al., 2004) para estimar o desequilíbrio de ligação (LD) entre os pares de SNPs. Esse cálculo baseia-se no quadrado do coeficiente de correlação (r^2), que indica quanto da informação de um locus é explicado pelo outro. Além disso, o r^2 leva em consideração as diferenças nas frequências alélicas dos marcadores.

4.10. Análises estatísticas

As diferenças nas frequências alélicas e genotípicas entre as populações foram estudadas por meio do teste exato de Fisher, utilizando o pacote *genetics* (WARNES, 2013), disponível no *software* R (R CORE TEAM, 2013). As frequências genotípicas de cada população também foram testadas para o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste de χ^2 (Qui-Quadrado).

A relação entre a variação genética e o estado de resistência a anti-helmínticos foi verificada individualmente para cada SNP usando a análise de associação padrão caso/

controle no software Plink (PURCELL et al., 2007). A correção para múltiplos testes foi realizada através do teste de Bonferroni, também implementado no Plink. A associação foi considerada significativa quando, após a correção, o P-valor foi $P < 0,01$.

Os SNPs significativos nas análises individuais e que apresentaram alto desequilíbrio de ligação (100% no isolado suscetível e 65% no isolado resistente) foram utilizados na análise de haplótipos. A análise de associação dos haplótipos à resistência a anti-helmínticos seguiu os mesmos critérios descritos previamente.

4.11. Alinhamento de sequências

As sequências geradas neste trabalho ($n = 55$) foram alinhadas com os dois genomas publicados de *Haemonchus contortus* (LAING et al., 2013; SCHWARZ et al., 2013) utilizando-se o programa de alinhamento múltiplo MultAlin (CORPET, 1988). Esse tipo de análise consiste no processo de comparar sequências de nucleotídeos de forma a se observar seu nível de similaridade. Após o alinhamento podem-se localizar trechos conservados que são regiões em que todas as sequências apresentam a mesma base em uma determinada posição.

4.12. Desenvolvimento de uma ferramenta de tomada de decisão para o controle da resistência parasitária

A exemplo de *softwares* desenvolvidos em outros países (LEARMOUNT et al., 2006; VAN WYK; REYNECKE, 2011), está em andamento o desenvolvimento do *software* para Análise de Risco de Desenvolvimento de Resistência Parasitária a Anti-Helmínticos em Ovinos (SARA), com o objetivo de auxiliar técnicos e produtores na identificação dos fatores de risco de manejo nas propriedades e na tomada de decisão para o controle da resistência dos nematoides gastrintestinais de ovinos aos anti-helmínticos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Identificação de SNPs no gene da glicoproteína-P em *Haemonchus contortus* e associação ao estado de resistência parasitária

Compreender o desenvolvimento da resistência é fundamental para prolongar a eficácia de anti-helmínticos existentes, para fornecer informações para o desenvolvimento de

novos produtos químicos, alvos de drogas e vacinas; como também desenvolver marcadores para monitorar o aparecimento de resistência às drogas (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009; KAMINSKY et al., 2013). Além desses aspectos, os marcadores moleculares podem ser correlacionados com fatores de risco para a gestão dos rebanhos ovinos, para que o diagnóstico de resistência, juntamente com práticas adequadas de manejo possam melhorar o controle e atrasar o desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos (NICIURA et al., 2012). Assim, os avanços no estudo da resistência a anti-helmínticos têm sido feitos com o rápido desenvolvimento de tecnologias moleculares (PAPADOPOULOS; GALLIDIS; PTOCHOS, 2012).

Como um gene candidato relacionado à resistência múltipla a anti-helmínticos, destaca-se a glicoproteína-P (PgP). As proteínas de transporte PgP localizam-se nas membranas das células, têm ampla especificidade para substratos e possuem um papel protetor contra xenobióticos potencialmente tóxicos (SCHWAB et al., 2003). Relacionadas aos anti-helmínticos, alterações no gene que codifica a PgP têm sido associadas à resistência por afetarem o transporte de levamisol e da maioria de lactonas macrocíclicas (incluindo moxidectina) e, em menor medida, o transporte de ivermectina e benzimidazóis (KERBOEUF; GUÉGNARD, 2011). Estudos de expressão gênica em isolado de *H. contortus* altamente resistente ao benzimidazol, ao levamisol e à ivermectina revelou aumento da expressão dos genes PgP-2 e PgP-9 (WILLIAMSON et al., 2011) associada à resistência. A relação entre PgP e resistência também foi demonstrada por meio da utilização de inibidores da PgP, como Valspodar, Verapamil, Quercetina, Cetoconazol e Pluronic P85, capazes de melhorar e restabelecer a sensibilidade à ivermectina em *T. circumcineta* e *H. contortus* (BARTLEY et al., 2009).

No presente estudo, utilizando a abordagem de comparação entre um um isolado suscetível e um isolado multirresistente de *H. contortus* foram prospectados SNPs no gene PgP. A princípio testamos a amplificação de um fragmento de aproximadamente 870 bp do gene da PgP (GenBank: AF003908.1), segundo o protocolo descrito por Blackhall et al. (2008) por PCR com os *primers* PGP2S (5'-GAAATGACTCAAGCACAAG-3') e MX-D (5'-AGACAAAGACATTCAGAG-3'). Devido às dificuldades em amplificar o fragmento desejado, várias modificações nas condições de PCR foram tentadas. Entretanto, quando uma reação funcionava, parava de funcionar na repetição seguinte, ou só ocorria amplificação de algumas amostras ou havia presença de fragmentos inespecíficos. Mesmo com essas dificuldades, algumas amostras que amplificaram foram destinadas ao sequenciamento, mas a qualidade foi ruim, provavelmente devido à ocorrência de fragmentos inespecíficos. Assim,

novos *primers* foram desenhados e testados. Como só a sequência do mRNA, e não do DNA, do gene da PgP em *H. contortus* estava disponível, resolvemos alinhá-la ao gene da PgP em *C. elegans* para buscar identificar possíveis junções éxon-éxon. Isso foi feito já que se os *primers* se alinharem em éxons diferentes e existirem íntrons muito grandes entre eles ou se alinharem em junções éxon-éxon, as amplificações poderiam não acontecer. Assim novos pares de *primers* foram desenhados e várias modificações nas condições de PCR foram testadas. Mesmo assim, apesar de funcionar em poucas amostras não houve amplificação para a maioria do DNA extraído. Quando tivemos conhecimento da base de dados do Wellcome Trust Sanger Institute que continha contigs de *H. contortus*, conseguimos desenhar *primers* nos íntrons.

O sucesso de amplificação por PCR do fragmento do gene PgP em *H. contortus* adultos foi obtido com um *primer* descrito na literatura (MX-D; BLACKHALL et al., 2008) combinado a um *primer* desenhado por nós (RF4f2). Após o sequenciamento do produto de amplificação do DNA de *Haemonchus contortus* adultos, seis SNPs foram identificados no fragmento do gene da PgP (Figura 1).

Figura 1. Fragmento amplificado do gene da glicoproteína-P, com destaque aos íntrons (nucleotídeos sublinhados) e éxons, em *Haemonchus contortus* e posições e tipo de cada SNP identificado (nucleotídeos destacados em cores).

```
>contig004690
GATCATCAAGACCCCTCGCATACTGCTGCTCGATGAAGCCACCAGTGCTCTAGACACAGAAGCGGAATCAATC
GTGCAAGAGGCTCTGGAGAAGGTATGCTTATTGATTGACCGAGCCTTTTCAAAGTGTAAAATCAGGTCTCATGG
GAAGTATTTTCATCTTTGAAAGAATGTTTTAGGCTCAAAAAGGGGAGAACAACCGTCATTGTAGCGCATCGTCTG
TCTACTATCAGAAACGTGGATCAGATTTTCGTTTTCAAGGTTAATAATCTGTCATGCAAGTCCGTTTATACTTGT
TTTGCGCGACACATTTCCGAGCAAAAATGCATTCAATACGTCGTTCTGATGTGATTTCTCCCAACTCCGAATA
CCTTGCGCTTTCTTGAGTGTTTTAGCTTTTCGATTTTCAGAACGGAACGATCGTTGAGCAGGGCACTCATGCCGA
GTTGATGAACAAACGTGGAGTATTCTTTGAAATGACTCAAGCACAAGTCCTCCGACAAGAGAAGGAAGAGGA
AGTTTTAGGTCAGACCAGTTCGTTTTTCATCTAAACGTACCCGTAGTGCGTAGTCAGAGCCTAAGTTTCATAG
TGAAGACCTCCTTGATGTTTTTGATTGCGAATCGGACGCTCATAATCGCAGAGGTCAACCAACTCGGCGACT
TCAACCAATCCAGCGCCATTGATTGACGCAAAAGCGTCGAGCGCTAAGCGTCGGCCGGCAAGCGGCGTCAATC
AGTGCGCTGTGCTCACTTGAGAGCGCCGCTCGTCGATCCATAACCACATGAGTCTGTGTTTGATACTTTTCCGA
TTTGATTATTTGGCGTAGAGTCAGTTAGTTTTGATATATGGACTTGTTTTTTTCTATTTTGACTACTGAGGTATG
ATGTGACAAAACACTACGCTATTATGAAAAGCTCTGAGGAGCTCTGTTAAAAATAACGTATCAGCTTTGGCGCA
GACGGTACCTTGCGGTACAAGTGACGCTATCGCGTCGAAGACGCTTGACGCTGTACTCTGAAAGCGCCCACTC
GTGTTTATACCATCAGTACTGCAATCAGATCCAGGTGAATGCTGTTCTTAATAGAATAGAAAGTAGTTTCGAAG
ATATTCCTATTAATCAATCGATGTGAACGAGTCAATGTTTCAATTTAGCCAACCTGCCTTCGACATGAAGTGGAGA
ATAAGATTTTTTAGAAAATACGGAACCAGTAGCGAAGTGTCAGAGGTATCCCTTCCTGCTCCTGATGCTACTA
```

TTTTGACTCCCCATGAGGAACAACCCGAGCTACCTAGCCCGCCGGGTCGGTTAGAAAATACAAAGCAACATGAGCATCTCTGAATGTCTTTGTCTGAGGTGATGCCTGTGTGCTGTAAGACATTGCATGACCCTCGATTCCATTTCAGTTATCTCAGCATTATGAGTTGAATTCGTTTGCATGGTGCATGTCGAAAGGGCTGGAAAACGCCCGGCGGTACCTCCATGATGATTGACATTACAGATAGCGATGCGGAATCCGATGTCGTGTCACCGGATATTGCATTACCCCATCTTAGTTCACTTCGATCCCTTAAGTGAATCCACAAGAAGCGCTATATACGCGGTCCTCAGCGTT

Posição na sequência	Sequência	SNP
508	AGAGAAGGAAG	A/G
580	AGAGCCTGAAGTTTC	G/A
601	AAGACCTGCCTTGTA	G/C
800	TGTGTTTGATACTTTTC	G/A
845	AGTTTTGATATAT	G/T
878	TTGACTAGTGAGGTAT	G/C

Fonte: Arquivo pessoal

O SNP 508 está localizado em um éxon e resulta numa mutação A>G que conduz a uma substituição não-sinônima de lisina para arginina. Neste estudo, somente um dos SNPs identificados está localizado em éxon, os outros cinco SNPs estão localizado no mesmo íntron: os SNPs 580 e 800 resultam em mutação G>A, o SNP 848 em uma mutação G>T e e os SNPs 601 e 878 resultam em uma mutação G>C (Figura 1).

Para a amplificação de DNA extraído de larvas em quantidade suficiente para o sequenciamento, foram feitas duas etapas de amplificação, por meio de nested-PCR com a primeira reação igual à usada em adultos e a segunda reação com um *primer* descrito na literatura (PGP2S; BLACKHALL et al., 2008) combinado a um *primer* desenhado por nós (PGP884R). As frequências alélicas e genótípicas para os SNPs no gene PgP identificados em 55 parasitas adultos e larvas de *Haemonchus contortus* dos isolados resistentes e suscetíveis e os resultados do teste de Fisher são apresentados na Tabela 1. Vale ressaltar que não foi possível atribuir os genótipos de todos os 6 SNPs para todas as amostras.

Os testes estatísticos indicaram diferenças significativas ($P < 0,05$) para as frequências alélicas e genótípicas observada nos SNPs 508, 580, 601, 845 e 878 entre os isolados resistente e suscetível (Tabela 1). A resistência foi associada ($P < 0,05$) ao aumento da frequência do alelo A e do genótipo AA para o SNP 508; do alelo A e dos genótipos AA e AG para o SNP 580; do alelo C e do genótipo CC para o SNP 601; do alelo T e do genótipo TT para o SNP 845; e do alelo C e do genótipo CC para o SNP 878 (Tabela 1). Dos seis SNPs identificados, somente o SNP 800 não apresentou diferença de frequências ($P > 0,05$) entre os isolados.

Trata-se da primeira descrição de polimorfismos do tipo SNP no gene PgP em *Haemonchus contortus* possivelmente associados à resistência múltipla, pois o isolado resistente apresentava resistência ao benzimidazol, à ivermectina e à moxidectina. Em estudos prévios a resistência a ivermectina, moxidectina e benzimidazol em *H. contortus* foi associada a polimorfismos do tipo RFLP (polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição) no gene PgP (BLACKHALL et al., 1998; 2008).

Tabela 1. Frequências alélicas e genóticas e análises de associação de polimorfismos no gene da glicoproteína-p em larvas suscetíveis e resistentes de *Haemonchus contortus*.

ID	Ale/Gen	Resistente ¹	Sensível ¹	P _F	P _{AU}	P _{AC}
SNP508	A	1	0,77	0,0014	0,00067*	0,00400*
	G	0	0,23			
	AA	1	0,77	0,04		
	AG	0	0			
	GG	0	0,23			
SNP580	A	0,42	0,04	0,0003	0,00057*	0,00343*
	G	0,58	0,96			
	AA	0,29	0	0,0178		
	AG	0,25	0,08			
	GG	0,46	0,92			
SNP601	C	0,79	0,31	0,00011	0,00004*	0,00025*
	G	0,21	0,69			
	CC	0,75	0,62	0,00558		
	CG	0,08	0,15			
	GG	0,17	0,23			
SNP800	G	0,82	0,83	1	0,8878	1
	A	0,18	0,17			
	GG	0,76	0,83	0,6756		
	GA	0,12	0			
	AA	0,12	0,17			
SNP845	G	0,64	1	0,0004	0,00051*	0,00308*
	T	0,36	0			
	GG	0,62	1	0,0424		
	GT	0,05	0			
	TT	0,33	0			
SNP878	C	0,82	0,32	0,0001	0,00006*	0,00035*
	G	0,18	0,68			
	CC	0,82	0,27	0,0072		
	CG	0	0,09			
	GG	0,18	0,64			

¹Frequência alélica e genotípica em cada classe.

P_F : p-valor não corrigido para Teste exato de Fisher.

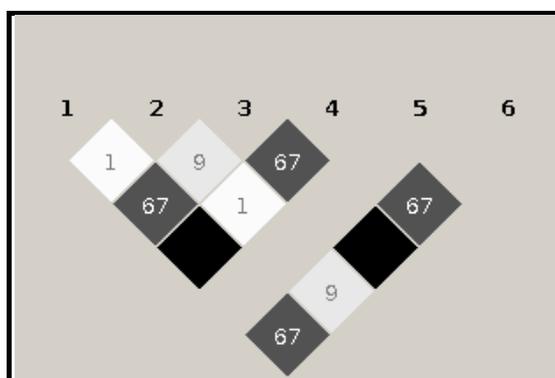
P_{AU} : p-valor não corrigido para análise de associação padrão.

P_{AC} : p-valor com correção de Bonferroni para análise de associação padrão.

A ocorrência de alelos combinados de forma não aleatória em locos diferentes, levando consigo combinações conservadas de SNPs, é chamado de desequilíbrio de ligação (LD) (PATNALA; CLEMENTS; BATRA, 2013). É importante saber a extensão de LD entre marcadores para determinar o número de marcadores necessários para estudos de associação e seleção genômica (ESPIGOLAN et al., 2013). O LD afeta e é afetado por muitos fatores (seleção, tamanho e estrutura da população), tendo assim importância na biologia evolutiva e genética. A história da seleção natural, a conversão de gene, a mutação e outras forças refletem o LD em cada região genômica (SLATKIN, 2008).

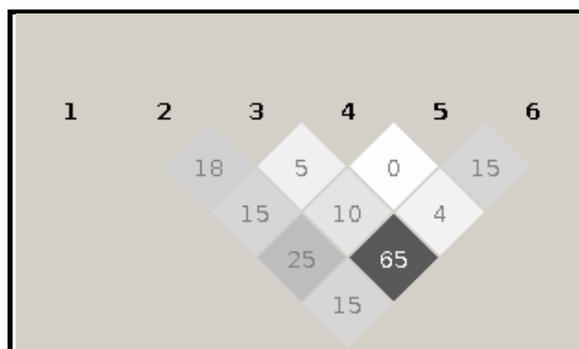
Os resultados das análises de LD para os 6 SNPs no gene da PgP em *H. contortus* para os isolados suscetível e resistentes estão apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

Figura 2. Desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs do gene PgP para o isolado suscetível de *H. contortus*. O LD entre os SNPs foi mensurado pela estatística r^2 (em %). A cor branca representa $r^2 = 0$ (ausência de LD), a preta, $r^2 = 1$ (ou 100% - completo LD) e as cores intermediárias, valores intermediários. Os SNPs 508, 580, 601, 800, 845 e 878 estão numerados de 1 a 6, respectivamente.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3. Desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs do gene PgP para o isolado resistente de *H. contortus*. O LD entre os SNPs foi mensurado pela estatística r^2 (em %). A cor branca representa $r^2 = 0$ (ausência de LD), a preta, $r^2 = 1$ (ou 100% - completo LD) e as cores intermediárias, valores intermediários. Os SNPs 508, 580, 601, 800, 845 e 878 estão numerados de 1 a 6, respectivamente.



Fonte: Arquivo pessoal

As análises para o isolado suscetível indicaram forte LD entre os SNPs 508 e 601; 508 e 800; 508 e 878; 601 e 800; 601 e 878; 800 e 878 (Figura 2). No isolado resistente, só foi observado forte LD entre os SNPs 601 e 878 (Figura 3). Assim, os SNPs 601 e 878 apresentaram alto LD tanto no isolado resistente quanto no isolado suscetível (Figuras 2 e 3). Por essa razão, eles podem ser ou estar em LD com a mutação causal, ou um dos SNPs é mutação causal e o outro está em desequilíbrio e se comporta como um marcador indireto.

O alto LD observado evidencia recombinações que ocorreram no passado, por um período de tempo expressivo antes da exposição aos anti-helmínticos, alelos pré-existentes acumulam mutações e recombinações e geram um conjunto de haplótipos que contém a mutação de resistência. Esses haplótipos, qualquer que seja a base de sua origem, serão então selecionados e irão aumentar em frequência quando a exposição ao anti-helmínticos ocorrer (GILLEARD; BEECH 2007). Isso explica a razão pela qual o isolado suscetível (Austrália) apesar de não possui histórico de exposição a anti-helmínticos apresenta os SNPs que foram identificados no isolado resistente.

Segmentos de DNA evolutivamente conservados que são herdados em conjunto podem ser definidos como haplótipos. Como foi detectado LD entre os SNPs 601 e 878 nos dois isolados, foi realizada a análise de haplótipos para esses dois SNPs, e os resultados estão apresentados na Tabela 2. A análise de haplótipos foi significativa ($P < 0,01$): o haplótipo GG para os SNPs 601 e 878 da PgP pode estar associado à suscetibilidade, e o haplótipo CC à resistência anti-helmíntica (Tabela 2).

O uso de haplótipos para selecionar os SNPs mais informativos aumenta a possibilidade de detectar a associação da região com o SNP correto, pois a formação de haplótipos considera o LD entre SNPs adjacentes, e a genotipagem de um SNP de um locus (*tag SNP*) pode determinar o efeito em muitos outros SNPs (PATNALA; CLEMENTS; BATRA, 2013). Assim, em comparação com marcadores mais distantes, os marcadores que

estão fisicamente próximos ao loco causando resistência permanecerão associados à resistência durante longos períodos de tempo (GILLEARD; BEECH, 2007).

Tabela 2. Associação com base em haplótipos para os SNPs 601 e 878 do gene da glicoproteína-P em isolados suscetíveis e resistentes de *Haemonchus contortus*.

Haplótipo	Suscetível ¹	Resistente ¹	P-valor
OMNIBUS ²			0,000293*
GG	0,6818	0,1818	0,00005*
GC	0	0,02273	0,4761
CC	0,3182	0,7955	0,000145*

*P<0,01

¹Frequência de haplótipos em cada classe.

²Teste estimando em conjunto todos os efeitos de haplótipos.

Experimento II: Validação dos SNPs no gene da glicoproteína-P em *Haemonchus contortus* como marcadores moleculares de resistência

Em *Haemonchus contortus*, há poucas barreiras ao fluxo gênico em escalas locais, enquanto há considerável diferenciação genética entre áreas continentais e tendo fortes barreiras ao fluxo gênico em escala global (TROELL et al., 2006). A justificativa evidente para essa subdivisão genética é a baixa capacidade que o parasita tem para dispersar através de fortes barreiras geográficas, além das chances muito limitadas para o deslocamento do hospedeiro entre as localizações geográficas. Assim, não há nenhum ou há baixo nível de diferenciação genética entre as populações de *H. contortus* do mesmo continente, e níveis significativamente mais elevados de diferenciação genética entre aqueles indivíduos de diferentes continentes (YIN et al., 2013).

Devido ao fato de termos utilizado isolados de diferentes continentes foi preciso verificar se os marcadores eram realmente associados à resistência ou ao isolamento geográfico. Para tanto, as frequências alélicas para os SNPs no gene PgP nos isolados resistente e suscetível foram comparados às frequências alélicas observadas nos outros dois isolados brasileiros de *Haemonchus contortus* (Tabela 3).

Consideramos que para os SNPs refletirem somente o isolamento geográfico entre os isolados, as frequências alélicas entre os três isolados brasileiros (resistente, Bahia e Pernambuco) deveriam ser semelhantes entre si e diferentes do isolado oriundo da Austrália (suscetível). Essa premissa foi observada para os SNPs 580 e 845 (Tabela 3), tornando-os possíveis marcadores moleculares de isolamento geográfico. Para os demais SNPs, exceto o

SNP 800 que não apresentou diferenças ($P > 0,05$) entre nenhum isolado, pelo menos um dos isolados brasileiros apresentou frequências alélicas semelhantes ($P > 0,05$) ao isolado australiano (suscetível) (Tabela 3), inviabilizando tais SNPs como marcadores moleculares de isolamento geográfico. Assim, dos seis SNPs identificados no gene PgP em *Haemonchus contortus*, três SNPs (508, 601 e 878) são possíveis marcadores moleculares de resistência a anti-helmínticos. Além disso, o haplótipo formado por dois (601 e 878) desses três SNPs foi associado ao estado de resistência (Tabela 2), fortalecendo seu potencial como marcadores moleculares, como apresentam alto LD, a probabilidade de *crossing-over* é bem menor, então se espera que eles sejam transmitidos juntos, possibilitando que as diferenças entre os haplótipos sejam observadas. Outra evidência que fortalece essa hipótese é a que o SNP 878 está localizado num local de reconhecimento da enzima de restrição *DdeI* (C[^]TNAG) utilizada por Blackhall et al. (1998) para a identificação dos polimorfismos RFLP associados à resistência múltipla em *H. contortus*.

Tabela 3. Comparação das frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos no gene da glicoproteína-p em *Haemonchus contortus* entre os isolados brasileiros (resistente, Bahia e Pernambuco) e australiano (suscetível).

ID	Ale/Gen	Bahia				Pernambuco				Pernambuco			
		Resistente ¹	P _F	Sensível ¹	P _F	Resistente ¹	P _F	Sensível ¹	P _F	Resistente ¹	P _F	Sensível ¹	P _F
SNP508	A	0,75	1	0,0602	0,75	0,77	1	1	1	-	1	0,77	0,2975
	G	0,25	0		0,25	0,23		0	0		0	0,23	
	AA	0,75	1	0,1481	0,75	0,77	1	1	1	-	1	0,77	0,5412
	AG	0	0		0	0		0	0		0	0	
	GG	0,25	0		0,25	0,23		0	0		0	0,23	
SNP580	A	0,4	0,42	1	0,4	0,04	0,0152	0,71	0,42	0,06985	0,71	0,04	0,00001
	G	0,6	0,58		0,6	0,96		0,29	0,58		0,29	0,96	
	AA	0,4	0,29	0,669	0,4	0	0,0654	0,57	0,29	0,3089	0,57	0	0,00051
	AG	0	0,25		0	0,08		0,29	0,25		0,29	0,08	
	GG	0,6	0,46		0,6	0,92		0,14	0,46		0,14	0,92	
SNP601	C	0,2	0,79	0,0007	0,2	0,31	0,6895	0,76	0,79	0,3137	0,76	0,31	0,00356
	G	0,8	0,21		0,8	0,69		0,24	0,21		0,24	0,69	
	CC	0,2	0,75	0,026	0,2	0,62	1	0,75	0,75	1	0,75	0,62	0,04149
	CG	0	0,08		0	0,15		0,13	0,08		0,13	0,15	
	GG	0,8	0,17		0,8	0,23		0,13	0,17		0,13	0,23	
SNP800	G	1	0,82	0,1851	1	0,83	0,2784	0,94	0,82	0,4295	0,94	0,83	0,6309

	A	0	0,18		0	0,17		0,06	0,18		0,06	0,17	
	GG	1	0,76	1	1	0,83	0,5294	0	0,76	0,801	0	0,83	0,3018
	GA	0	0,12		0	0		0,13	0,12		0,13	0	
	AA	0	0,12		0	0,17		0,88	0,12		0,88	0,17	
SNP845	G	0,67	0,64	1	0,67	1	0,0084	0,23	0,64	0,07534	0,23	1	0,00001
	T	0,33	0,36		0,33	0		0,77	0,36		0,77	0	
	GG	0,67	0,62	1	0,67	1	0,098	0,2	0,62	0,1976	0,2	1	0,0021
	GT	0	0,05		0	0		0,2	0,05		0,2	0	
	TT	0,33	0,33		0,33	0		0,6	0,33		0,6	0	
SNP878	C	0,5	0,82	0,0539	0,5	0,32	0,4618	0,8	0,82	1	0,8	0,32	0,02089
	G	0,5	0,18		0,5	0,68		0,2	0,18		0,2	0,68	
	CC	0,5	0,82	0,1443	0,5	0,27	0,7455	0,8	0,82	1	0,8	0,27	0,1699
	CG	0	0		0	0,09		0	0		0	0,09	
	GG	0,5	0,18		0,5	0,64		0,2	0,18		0,2	0,64	

* P<0,05

P_F: p-valor para teste de Fisher

Os resultados do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os seis SNPs nos quatro isolados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos (SNP) encontrados no gene da glicoproteína-p (PgP) em *Haemonchus contortus*.

SNP	Resistente <i>p-valor</i>	Suscetível <i>p-valor</i>	Bahia <i>p-valor</i>	Pernambuco <i>p-valor</i>
508	-	0,0034*	0,2484	-
580	0,0327*	1	0,1034	1
601	0,0021*	0,0522	0,1934	-
800	0,0091*	0,0174*	-	1
845	0,00001*	-	0,0709	0,2521
878	0,00004*	0,008*	0,1018	0,2002

* $P < 0,05$.

Todos os SNPs no isolado resistente e três SNPs no isolado suscetível não se encontraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$), enquanto todos os SNPs para os isolados da Bahia e de Pernambuco se apresentaram de acordo com as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) (Tabela 4).

Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados nos isolados resistente e suscetível com redução da frequência esperada de heterozigotos podem refletir a endogamia nos isolados mantidos em laboratório. Análises filogenéticas de isolados mantidos em laboratório por várias décadas perdem a variabilidade genética ao longo do tempo, não podendo mais ser consideradas amostras representativas, uma vez que deixam de refletir a população original (TROELL et al., 2006).

Experimento III: Estudo *in silico* de fragmento do gene da glicoproteína-P em *Haemonchus contortus*

Com a recente publicação do genoma do *H. contortus* de dois isolados diferentes (LAING et al., 2013; SCHWARZ et al., 2013), buscamos aumentar a compreensão e as informações a respeito da sequência do gene PgP em estudo. Assim, foi feito o alinhamento das 55 sequências do fragmento do gene PgP dos quatro isolados geradas neste estudo aos dois genomas de referência de *H. contortus*. Cada genoma publicado foi obtido a partir de um indivíduo adulto oriundo de dois isolados suscetíveis diferentes: um do isolado McMaster (SCHWARZ et al., 2013), o mesmo isolado suscetível utilizado neste estudo; e um do isolado MHco3 (ISE).N1 (LAING et al.,

	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
McMaster	ATGTTTTTGGATTGGGARTCGGAGGCTCATATCGGAGGCTCAACCACTCGGGGACTTCACCCATCCAGCGCCATTGATTGACGCCAARAAGCGTCGAGCGCTARGCGTCGGCCGGCAGCGGCGTCAAT													
MHco3 (ISE) .N1													
R2													
S36													
R4													
R23													
R8													
R13													
396													
R14													
S11													
S20													
S23													
S24													
S28													
R21													
R10													
S15													
S16													
S13													
R5													
R15													
R9													
R20													
S25													
S4A.....													
S8													
10													
R24													
1													
R18													
R7													
R11													
R26													
R25													
R30													
R32													
R29													
4													
23													
R16													
25													
27													
21													
6													
R6													
26													
R34													
5													
29													
R27													
22													
R33													
2													
24	TC...GACCTC.....T.AT..GCG..CG.T....ATCAAA...AT..AA..GAGG.CTTCA.T..GA.A-----..T.G..TCTGA.TA...A...C.G..A---.TTT..A--T.AA..A													
210	TC...GACCTC.....T.AT..GCG..CG.T....ATCAAA...AT..AA..GAGG.CTTCA.T..GA.A-----..T.G..TCTGA.TA...A...C.G..A---.TTT..A--T.AA..A													
3													
Consensus	atgtttttgattgcaatcg..cgc..at.a.....gaggtc...ca..tc..cgac.tcaac.a..cc.g.gccattga..g.c..aaaag.gt..ag.g...a.c..cggc..gca..cggc.tc..t													

	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
McMaster	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
MHco3 (ISE) .N1	CAGTCGCCGCTGTGCTCAGCTTGAGAGCGCCGCTCGTCGATCGATACCACATGAGTCTGTGTTTGATACCTTTCCGATTGGATTATTGGCCTAGAGTCAGTTAGTTTTGATATATGGACTTGTTTTTTCT													
R2													
S36													
R4													
R23A.....													
R8													
R13													
S9S													
R14													
S11													
S20													
S23													
S24													
S28													
R21													
R10													
S15													
S16													
S13													
R5													
R15													
R9													
R20													
S25													
S4													
S8													
10													
R24													
1													
R18													
R7													
R11													
R26													
R25													
R30													
R32													
R29													
4													
Z3													
R16													
25													
27													
21													
6													
R6													
26													
R34													
5													
29													
R27													
22													
R33													
2													
2	----AA...GT..G..C.A.A.CTT..T...CT..TC.TGTCGGA.GACT...C...GT.A..													
210	----AA...GT..G..C.A.A.CTT..T...CT..TC.TGTCGGA.GACT...C...GT.A...													
3													
Consensus	.agtg.....agtc...t..g.ta.t...cgatttgattatttggcgtagagtcagtttagttttgatatatggacttgttttttt													

	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
McMaster	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
MHco3 (ISE) .N1	GTGAGTCGTGTTTGATACTTTTCCGATTTGATTATTTGGCGTAGAGTCAGTTAGTTTTGATATATGGACTTGTTTTTCTATTTTGACTAGTCAGGTATGATGTCACAAACTACGCTATTATGAAA													
R2													
S36													
R4C.....													
R23C.....													
R8C.....													
R13C.....													
39S													
R14C.....													
S11C.....													
S20C.....													
S23C.....													
S24													
S28													
R21C.....													
R10													
S15													
S16													
S13													
R5C.....													
R15C.....													
R9													
R20													
S25													
S4C.....													
S8													
10													
R24													
1C.....													
R18C.....													
R7C.....													
R11C.....													
R26C.....													
R25C.....													
R30C.....													
R32C.....													
R29C.....													
4													
23													
R16C.....													
25C.....													
27C.....													
21C.....													
6													
R6													
26													
R34C.....													
5													
29													
R27													
22													
R33													
2	AATTT													
24													
210													
3													
Consensus	.ctatTTtgacta.tgaggTatgatgtgacaaaacta.....													

	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	
McMaster	AGCTCTGAGGAGCTCTGTTAAATATACGTATCAGCTTTGGCGCAGACGGTACCTTGGCCTACAACTGACGCTATCGCGTCGAGAGCGTTGACGCTGACT														
MHco3(ISE) .N1														
R2CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
S36CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
R4A.....										T.....G.....CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT		
R23CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
R8A.....										T.....G.....CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT		
R13CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
S95CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
R14CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
S11A.....										T.....G.....CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT		
S20A.....										T.....G.....CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT		
S23A.....										T.....G.....CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT		
S24CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
S28CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
R21CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
R10CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
S15CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
S16CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
S13CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
R5CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
R15CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
R9CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
R20CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
S25CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
S4CTGAAGCGCCCACTCGTGTTTATACCAT														
S8														
10														
R24														
1														
R18														
R7														
R11														
R26														
R25														
R30														
R32														
R29														
4														
23														
R16														
25														
27														
21														
6														
R6														
26														
R34														
5														
29														
R27														
22														
R33														
2														
24														
210														
3														
Consensus														

781 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910

McMaster
MHco3 (ISE) - N1

R2 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S36 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R4 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R23 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R8 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R13 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
395 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R14 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S11 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S20 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S23 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S24 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S28 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R21 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R10 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S15 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S16 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S13 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R5 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R15 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R9 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
R20 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S25 CAGTACTGCARATCCAGTCCAGCTGARTGCTGTTCTTATAGARATGAACTACTTTCCAGATATTCCTATTAACTCAATCCATGTCGACCGACTCAATGTTTCATTTAGCCACCTGCCTTCGRATGAACT
S4
S8
S8
10
R24
1
R18
R7
R11
R26
R25
R30
R32
R29
4
23
R16
25
27
21
6
6
R6
26
R34
5
29
R27
22
R33
2
24
210
3
Consensus

```

          911   920   930   940   948
          |-----|-----|-----|-----|
McMaster
MHco3(ISE).N1
R2  GGAGATAGATTTTGTAGAA
S36 GGAGATAGATTTTGTAG
R4  GGAGATAGATTTTGTAGAA
R23 GGAGATAGATTTTGTAGAAATACGGACCCAGTAC
R8  GGAGATAGATTTTGTAG
R13 GGAGATAGATTTTGTAGAAATACGGAA
395 GGAGATAGATTTTGTAGAAAT
R14 GGAGATAGATTTTGTAGAAA
S11 GGAGATAGATTTTGTAGAAA
S20 GGAGATAGATTTTGTAGAAATACGGACCCAGTAC
S23 GGAGATAGATTTTGTAGAAATACGGACCCAGTAC
S24 GGAGATAGATTTTGTAGAAATACGGACCCAGTAC
S28 GGAGATAGATTTTGTAGAAATACGGACCCAGTAC
R21 GGAGATAGATTTTGTAGAA
R10 GGAGATAGATTTTGTAGAAATA
S15 GGAGATAGATTTTGTAGAAATACGG
S16 GGAGATAGATTTTGTAGAAATACGGACCCAGTAC
S13 GGAGAA
R5  GGAGATA
R15 GGAGATAAG
R9  GGAGAT
R20 GGAGATAAG
S25 GGAGATAAG
S4
S8
10
R24
1
R18
R7
R11
R26
R25
R30
R32
R29
4
23
R16
25
27
21
6
R6
26
R34
5
29
R27
22
R33
2
24
210
3
Consensus

```

Fonte: Arquivo pessoal

O alinhamento múltiplo entre os isolados e os genomas de referência permitiu verificar regiões gênicas com elevada conservação, como as regiões entre os nucleotídeos 66 a 136 e do 255 a 452 (Figura 4).

De maneira oposta, também foram identificadas regiões pouco conservadas, como a sequência de bases do nucleotídeo 519 a 600 (81pb) no isolado McMaster que não é encontrada em mais nenhum dos outros isolados, nem mesmo no MHco3(ISE).N1 (Figura 4), podendo refletir um polimorfismo do tipo inserção/deleção (indel). Barrère et al. (2014) encontraram uma inserção/deleção (indel) de 63pb, a ausência do indel 63pb foi demonstrado ser estatisticamente ligado ao fenótipo de resistência nas amostras isoladas. Com base nos dados, a presença da sequência 63pb é significativamente mais frequente em indivíduos susceptíveis comparados com indivíduos resistentes. Uma correlação também foi demonstrada entre a ausência do indel e a expressão do transcrito Hcoacr-8b, que acreditam ser o primeiro relato de um suposto marcador de DNA para detecção de resistência ao levamisol. Indels de alguns nucleotídeos até vários kb e alto

nível de sequências polimórficas são comuns em *H. contortus*, o que, inclusive, dificulta a montagem do genoma (GILLEARD, 2013). Em média, duas sequências de DNA de diferentes haplótipos de *H. contortus* individuais diferem tipicamente em cerca de 20-30 posições de nucleotídeos por kb (GILLEARD; BEECH 2007). Dessa maneira, a existência de indels explica a razão pela qual tivemos problemas no desenho de *primers* e amplificação do gene por PCR, conforme relatado anteriormente.

A região entre os nucleotídeos 752 a 948 (196pb), observada em algumas de nossas sequências, não foi identificada nos dois genomas de referência (Figura 4), pois deve estar fora dos contigs utilizados no alinhamento.

Os SNPs 508, 580, 601, 800, 845 e 878, previamente identificados neste estudo, também foram identificados nos dois genomas de referência nas posições 158, 234, 254, 453, 498 e 613 do alinhamento (Figura 4), e os dois isolados de referência (que são suscetíveis) apresentam os mesmos alelos para todos esses SNPs.

Para os SNPs 580, 601, 845 e 878, os alelos com frequências aumentadas associadas à resistência (A, C, T e C, respectivamente) não foram observados nos genomas suscetíveis de referência. Entretanto, para o SNP 508, o alelo A associado à resistência neste estudo também foi o alelo reportado nos genomas de referência. Além dos SNPs relatados neste estudo, a avaliação dos alinhamentos das sequências permitiu a identificação de outros possíveis SNPs, nas posições 138 (C>A), 141 (G>A), 144 (T>C), 150 (G>A), 660 (G>A), 703 (C>T) e 713 (A>G) (Figura 4). A maior parte das novas mutações não são favoráveis ou podem resultar em um custo de adaptação e serem perdidas na população. Uma mutação favorável que por exemplo conduza a resistência, será vantajosa no momento em que uma droga for utilizada. Assim, uma mutação sob seleção não será perdida, tendo um maior efeito na população (GILLEARD; BEECH 2007).

O alinhamento dos dois genomas de referência às sequências obtidas das 55 amostras de *H. contortus* deste trabalho demonstra a confiabilidade do sequenciamento, já que observamos os mesmos alelos mais frequentes em cada SNP com as nossas amostras suscetíveis. Considerando os outros dois isolados brasileiros utilizados para validação dos marcadores moleculares de resistência, é possível inferir que talvez tenhamos amostrado aleatoriamente vermes resistentes devido aos alelos associados à resistência (para todos os SNPs) estarem com maior frequência na população de Pernambuco. Já na Bahia, é difícil fazer a mesma dedução, uma vez que os alelos estão segregando tanto aqueles associados à suscetibilidade quanto à resistência.

Ainda não é bem compreendida a base genética da resistência anti-helmíntica, pois as pesquisas têm se concentrado na investigação de possíveis associações entre o fenótipo de resistência e os polimorfismos em genes candidatos (REDMAN et al., 2012). As grandes limitações na identificação de novos ou inesperados mecanismos de resistência devem-se ao fato do estudo de genes candidatos serem fundamentados em suposições prévias (GILLEARD, 2013). Assim, a recente publicação do genoma do *H. contortus* de dois isolados diferentes, realizadas por dois laboratórios (LAING et al., 2013; SCHWARZ et al., 2013), irá contribuir para o avanço do conhecimento sobre a resistência parasitária em estudos futuros.

Experimento IV: Desenvolvimento de *software* para identificação dos fatores de risco de manejo nas propriedades e na tomada de decisão para o controle da resistência parasitária em ovinos

Com relação ao *software* para Análise de Risco de Desenvolvimento de Resistência Parasitária a Anti-Helmínticos em Ovinos (SARA), em desenvolvimento, foram utilizados dados obtidos por questionário (ANEXO 1) sobre o manejo de rebanhos ovinos e fatores de risco para o estabelecimento da resistência parasitária (NICIURA et al., 2012; VERÍSSIMO et al., 2012). Essa ferramenta tem como objetivo auxiliar os técnicos e os produtores de ovinos na identificação dos fatores de risco de manejo nas propriedades e na tomada de decisão para o controle da resistência parasitária com a implementação de estratégias de controle de parasitas, de maneira a aperfeiçoar a utilização de anti-helmínticos e retardar o desenvolvimento da resistência.

No SARA inicialmente o usuário fará um breve cadastro e a seguir será disponibilizado um questionário para resposta *on-line*. As informações coletadas nos questionários serão utilizadas para finalidades de pesquisa e, ao final do preenchimento do questionário, será gerado um relatório com recomendações de manejo para a propriedade visando ao controle da resistência parasitária. Na Figura 5 estão apresentados alguns dos layouts de tela do *software*.

Figura 5. Layout do software Análise de Risco de Desenvolvimento de Resistência Parasitária a Anti-Helmínticos em Ovinos (SARA). Em A, mostra a tela inicial, em B é um exemplo das informações do software e C representa o modo como são apresentadas as questões a serem respondidas.

A



B

Introdução ✕

Os ovinos, em qualquer faixa etária, são parasitados por helmintos, também chamados de vermes ou nematoides gastrintestinais, cuja ação resulta em atraso no desenvolvimento corporal dos cordeiros e afeta a produção e a qualidade da carne e da lã. Dentre os parasitas gastrintestinais de ovinos, o *Haemonchus contortus*, um verme hematófago, ou seja, que se alimenta de sangue é o parasito mais patogênico e prevalente em regiões tropicais e subtropicais. A parasitose por *Haemonchus contortus* pode resultar em anemia, perdas na produção e até na morte dos animais, o que leva a grandes perdas econômicas em rebanhos de pequenos ruminantes em todo o mundo. Com o uso frequente e inapropriado de anti-helmínticos, ou vermífugos, ocorre aumento na resistência parasitária, pois os tratamentos selecionam os vermes resistentes que irão dar origem à próxima geração de vermes. Em todo o mundo, existe grande quantidade de parasitas com resistência a múltiplos e diferentes anti-helmínticos, e já não é incomum encontrar fazendas nas quais os vermes são resistentes a todos os produtos anti-helmínticos disponíveis no mercado. Dessa maneira, torna-se cada vez mais necessário o conhecimento do estado de resistência parasitária dos rebanhos e das estratégias de manejo que podem auxiliar na redução do estabelecimento da resistência parasitária. Assim, o software SARA (software para análise de risco de resistência parasitária) pretende fornecer informações que possam contribuir para o controle da resistência parasitária nas propriedades.

C

I - Informações sobre a propriedade e o rebanho

1. Área total da propriedade em hectares: *
2. Área total de pastagem em hectares: *
3. Anos de atividade na criação de ovinos: *
4. Tipo de exploração
- a) Carne
 - b) Leite
 - c) Lã
 - d) Venda de reprodutores, sêmen ou embriões
5. Tipo de criação
- a) Intensiva (confinamento: alimentação no cocho o ano)
 - b) Semi-intensiva (a pasto com suplementação em determinadas épocas do ano e/ou para determinadas categorias animais)
 - c) Extensiva (totalmente a pasto o ano todo, sem suplementação)
6. A ovinocultura é a sua principal fonte de renda?
- a) Sim
 - b) Não
7. Cria outros animais além de ovinos? Deixe em branco em caso negativo.
- a) Caprinos
 - b) Bovinos
 - c) Equídeos
 - d) Suínos
 - e) Aves
 - f) Peixes

Fonte: Arquivo pessoal

O *software* será capaz de levar o conhecimento básico sobre questões de manejo que são fundamentais para a produção de ovinos e que, muitas vezes, são desconhecidas pelos próprios produtores.

7. CONCLUSÕES

Nossos dados nos permitem presumir que os SNPs 508, 601 e 878 no gene da glicoproteína-p são os melhores candidatos à associação com resistência anti-helmíntica múltipla em *Haemonchus contortus*, assim como, os SNPs 580 e 845 parecem ser marcadores de isolamento geográfico.

Com o alinhamento múltiplo entre os isolados e os genomas de referência pudemos identificar regiões gênicas com elevada conservação, detectamos variabilidade entre as sequências em regiões pouco conservadas. Além dos SNPs relatados neste estudo, a avaliação dos alinhamentos das sequências permitiu a identificação de outros sete possíveis SNPs.

O *software* para Análise de Risco de Desenvolvimento de Resistência Parasitária a Anti-Helmínticos em Ovinos (SARA) fornecerá informações que poderão orientar a utilização racional de anti-helmínticos. Ele fornecerá estratégias para o controle da parasitose ovina de forma menos dependente do uso de anti-helmínticos e para o prolongamento da vida útil dos fármacos atualmente utilizados, o que pode ser uma alternativa viável para a preservação da suscetibilidade dos parasitas, em populações nas quais os alelos de resistência não possuem alta prevalência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALMEIDA, M. A. O.; AYRES, M. C. C. Considerações gerais sobre os antihelmínticos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 401-406.
- AMARANTE, A. F. T. et al. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 91-106, 2004.
- BARNES, E. H.; DOBSON, R. J.; BARGER, I. A. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. **Parasitology Today**, v. 11, p. 56-63, 1995.
- BARRÈRE, V. et al. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. **Parasitology International**, v. 62, p. 464-70, 2013.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, p. 263-265, 2004.
- BARTLEY, D. J. et al. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 136, p.1081- 1088, 2009.
- BEECH, R. N. Understanding genetic linkage in the selection of anthelmintic resistance. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. **Anais...** 2008. p. 74-78. Disponível em <http://www.cbpv.org.br/congressos/anais-palestras_e_resumos-xv_cbpv_issn_1981-1977.pdf>. Acesso em: 27 de jan. 2010.
- BEECH, R. N.; PRICHARD, R. K.; SCOTT, M. E. Genetic variability of the β -tubulin genes in benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Haemonchus contortus*. **Genetics**, v. 139, p. 103-110, 1994.
- BLACKHALL, W. J. et al. Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 95, p. 193-201, 1998.
- BLACKHALL, W. J.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 101-107, 2008.
- BLAST. **Assembled RefSeq Genomes**. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 20 de jan. 2013.
- CEZAR, A. S. et al. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 157-160, 2010.

CHAGAS, A. C. S. et al. Caracterização do grau de resistência anti-helmíntica do isolado de *Haemonchus contortus* do rebanho ovino Santa Inês da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRASITOLOGIA VETERINÁRIA, 16., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: CBPV, 2010. v. 16. p. HE45.

CHAGAS, A. C. S. et al. *Haemonchus contortus*: a multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**, v. 62, p. 1-6, 2013.

CHARLES, T. P. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes of goats in Pernambuco State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 30, p. 335-343, 1989.

CHATURVEDI, P. et al. Influence of ABCB1 genetic variants in breast cancer treatment outcomes. **Cancer Epidemiology**, v. 37, p. 754-761, 2013.

COLES, G. C. Anthelmintic resistance – looking to the future: a UK perspective. **Research Veterinary Science**, v. 78, p. 99-108, 2005.

COLES, G. C. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 167-185, 2006.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 10881-10890, 1988.

CRAIG, T. M. Anthelmintic resistance and alternative control programs. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, p. 567-581, 2006.

CRAIG, T. M. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 46, p. 121-131, 1993.

DA CRUZ, D. G. et al. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 340-343, 2010.

ESPIGOLAN, R. et al. Study of whole genome linkage disequilibrium in Nellore cattle. **BMC Genomics**, v. 14, p. 1-8, 2013.

GARRETSON, P. D. **Role of p-glycoprotein in *haemonchus contortus* anthelmintic resistance**. 2007. 105 p. Dissertação (Parasitologia Veterinária) - Universidade Texas A&M, College Station, 2007.

GASSER, R. B. et al. Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock – bionomic and biotechnological implications. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 325-334, 2008.

GILL, J. H. et al. Evidence of multiple mechanisms of avermectin resistance in *Haemonchus contortus*: comparison of selection protocols. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 783-789, 1998.

GILLEARD, J. S. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. **Parasitology**, v. 140, p. 1506-1522, 2013.

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

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 48-58, 2002.

GROMBONI, J. G. G. et al. Identificação molecular do helminto *Haemonchus contortus* e de polimorfismo no gene da beta-tubulina In: JORNADA CIENTÍFICA – EMBRAPA SÃO CARLOS, 1., 2009, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste e Embrapa Informática Agropecuária, 2009. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/PPPSE-2010/18919/1/PROCISCMN2009.00277.pdf>>. Acesso em: 9 de set. 2011.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HOWELL, S. B. et al. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, p. 1913-1919, 2008.

JAMES, C. E.; HUDSON, A. L.; DAVEY, M. W. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 328-335, 2009.

KAMINSKY, R. et al. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, v. 453, p. 176-180, 2008.

KAMINSKY, R. L. et al. Worms – a “license to kill”. **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 286-291, 2013.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 477-481, 2004.

KERBOEUF, D. et al. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 3, p. 332-346, 2003.

KERBOEUF, D.; GUÉGNARD, F. Anthelmintics are substrates and activators of nematode P-glycoprotein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 2224-2232, 2011.

KOHEK Jr, I. **Guia de controle de parasitas internos em animais domésticos**. São Paulo: Nobel, 1998. 111p.

KWA, M.; VEENSTRA, J.; ROOS, M. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β tubulin isotype I. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 63, p. 299-303, 1994.

LAING, R. et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. **Genome Biology**, v. 14, 2013.

LEARMOUNT, J. et al. A computer model to simulate control of parasitic gastroenteritis in sheep on UK farms. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 312-329, 2006.

LESPINE, A. et al. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 58-75, 2012.

MARTIN, P. J. Development and control of resistance to anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, v. 17, p. 493-501, 1987.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 82-87, 2004.

MOLENTO, M. B.; NICIURA, S. C. M.; CHAGAS, A. C. S. Protocolos básicos de laboratório para a realização de metodologias fenotípicas e genotípicas. In: CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. (Ed.). **Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 130-135.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). **Parasitology Research**, v. 85, p. 1007-1011, 1999.

MOUNT, D. W. Using basic local alignment search tool (BLAST). **Cold Spring Harbor Protocols**, 2007.

NETPRIMER. **Free Primer Analysis Software**. Disponível em: <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>>. Acesso em 20 de jan. 2013.

NICIURA, S. C. et al. F200Y polymorphism in the Beta-tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 608-612, 2012.

NICIURA, S. C. M. Protocolos genotípicos para nematóides gastrintestinais de ruminantes. In: CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. (Ed.). **Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 59-70.

PAPADOPOULOS, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Small Ruminant Researcher**, v. 76, p. 99-103, 2008.

PAPADOPOULOS, E.; GALLIDIS, E.; PTOCHOS, S. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 85-88, 2012.

PATNALA, R.; CLEMENTS, J.; BATRA, J. Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. **BMC Genetics**, v. 14, p. 39-50, 2013.

PINHEIRO, A. C. Aspectos da verminose dos ovinos. In: JORNADA DE PRODUÇÃO OVINA NO RS. 1., 1979, Bagé. **Anais...** Bagé: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1979. p. 139-48.

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. **International Journal for Parasitology**, v. 20, p. 515-523, 1990.

PRICHARD, R. K. et al. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, p. 239-251, 1980.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 445-452, 2001.

PRICHARD, R. K. Mechanisms of anthelmintic resistance: implications for the future of parasite control. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. **Anais...** 2008. p. 62-68. Disponível em: <http://www.cbpv.org.br/congressos/anais-palestras_e_resumos-xv_cbpv_issn_1981-1977.pdf>. Acesso em: 27 de jan 2010.

PRICHARD, R. K.; GEARY, T. G. Fresh hope to can the worms. **Nature**, v. 452, p. 157-158, 2008.

PRIMER3PLUS. **Primer3Plus**. Disponível em: <<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>>. Acesso em: 20 de jan. 2013.

PRIMERBLAST: finding primers specific to your PCR template. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>. Acesso em: 20 de jan. 2013.

PURCELL, S. et al. PLINK: A set for whole tool -genome association and population-based linkage analyses. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, p. 559-575, 2007.

R CORE TEAM. **R: language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>. Acesso em: 23 de jan. 2014.

RAO, V. T. et al. A dopamine-gated ion channel (HcGGR3*) from *Haemonchus contortus* is expressed in the cervical papillae and is associated with macrocyclic lactone resistance. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 166, p. 54-61, 2009.

REDMAN, E. et al. Genetics of mating and sex determination in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Genetics**, v. 180, p. 1877-1887, 2008.

REDMAN, E. et al. Introgression of ivermectin resistance genes into a susceptible *Haemonchus contortus* strain by multiple backcrossing. **PLoS Pathogen**, v. 8, p. e1002534, 2012.

RIOU, M. et al. Modulation of the multidrug resistance (MDR) system in the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: effects on resistance to anthelmintics. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 180-187, 2003.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 89-109, 2001.

SARGISON, N. D. et al. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the southeast of Scotland. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 65-76, 2007.

SARGISON, N. D. Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep—future of anthelmintic drugs. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p.79-84, 2012.

SCHEET, P.; STEPHENS, M. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. **American Journal of Human Genetics**, v. 78, p. 629-644, 2006.

SCHWAB, D. et al. Comparison of in vitro P-glycoprotein screening assays: recommendations for their use in drug discovery. **Journal Medical Chemical**, v. 46, p. 1716-1725, 2003.

SCHWARZ, E. M. et al. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. **Genome Biology**, v. 14, 2013.

SCOTT, I. et al. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 166-171, 2013.

SILVESTRE, A.; HUMBERT, J. F. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 271-276, 2000.

SLATKIN, M. Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. **Nature Reviews: Genetics**, v. 9, p. 477-485, 2008.

SOTOMAIOR, C. S. et al. **Parasitoses gastrintestinais dos ovinos e caprinos: alternativas de controle**. Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. Curitiba: EMATER, 2009.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L; WALL, R. L. **Parasitologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 768 p.

THOMPSON, J. D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TROELL, K. et al. Global patterns reveal strong population structure in *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of domesticated ruminants. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p.1305-1316, 2006.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1994. 166 p.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W71-W74, 2007.

VAN WYK, J. A.; REYNECKE, D. P. Blueprint for an automated specific decision support system for countering anthelmintic resistance in *Haemonchus* spp. at farm level. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 212-223, 2011.

VERÍSSIMO, C. J. et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 209-216, 2012.

WALLER, P.J. et al. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 181-187, 1996.

WARNES, G. **Genetics**: Population Genetics. R package version 1.3.8.1. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=genetics>>. Acesso em 10 de jan de 2014.

WHITE, G. P.; MEEUSEN, E. N. T.; NEWTON, S. E. A single-chain variable region immunoglobulin library from the abomasal lymph node of sheep infected with the gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 78, p. 117-129, 2001.

WILLIAMSON, S. M. et al. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphism in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.180, p. 99-105, 2011.

WILLIAMSON, S. M.; WOLSTENHOLME A. J. P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies. **Journal of Helminthology**, v. 86, p. 202-208, 2012.

YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reactions. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 134, 2012.

YIN, F. et al. Genetic variability within and among *Haemonchus contortus* isolates from goats and sheep in China. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 279-287, 2013.

ANEXO



**SITUAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE HELMINTOS DE PEQUENOS RUMINANTES
A ANTI-HELMÍNTICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO - QUESTIONÁRIO**

Região Apta (1 a 16) em que se situa a propriedade: _____

Nome da Propriedade:

Código da propriedade (a ser fornecido pelo pesquisador): _____

Município:

Altitude:

Latitude:

Longitude:

Responsável pelas informações (proprietário (P), administrador (A) ou técnico (T):

Nome, endereço completo ou telefone ou e-mail do responsável pelas informações para contato:

I - Informações sobre a propriedade e o rebanho

1. Área total da propriedade:
2. Área de Pastagem:
3. Há quanto tempo na atividade? Anos
4. Tipo de Exploração: a) () carne; b) () leite; c) () lã; d) () venda de reprodutores/sêmen/embriões
5. Criação: a) () intensiva; b) () semi-intensiva; c) () extensiva
6. A ovinocultura ou caprinocultura é a principal fonte de renda? a) () Sim; b) () Não
7. Cria outros animais além de ovinos e/ou caprinos? a) () Sim; b) () Não
- 7a. Se a resposta foi positiva, quais espécies? a) () bovinos; b) () eqüídeos;
c) () suínos; d) () aves; e) () outros:

8) Quais são as raças ovinas e/ou caprinas da propriedade? Qual é o número de fêmeas, machos e cordeiros de cada raça? (preencha a tabela abaixo)

RAÇA	Número de Fêmeas	Número de Machos	Número de Cordeiros	TOTAL
TOTAL				

9. Possui aprisco ou galpão: a) () Ripado; b) () Chão batido ou cimentado com ou sem cama; c) () não possui galpão para abrigar os animais

10. Faz rodízio de pastagem? a) Sim; b) Não
11. Existem áreas de várzea, mangue ou alagadas na pastagem que os animais têm acesso?
a) Sim; b) Não
12. As pastagens são utilizadas somente por ovinos ou caprinos? a) Sim b) Não . Qual espécie compartilha os pastos com os ovinos ou caprinos? _____
13. Forrageira(s) predominante nas pastagens: a) *Braquiaria*; b) *Panicum* (Aruana, Tanzânia, Áries, Colômbia, etc); c) *Cynodon* (coast-cross, tifton, estrela, etc);
d) outro (nome popular ou científico): _____
14. Região de procedência do rebanho:
a) Sudeste; b) Nordeste; c) Sul; d) Centro-Oeste; e) Norte
15. Existe muita entrada de animais de fora do rebanho? a) Sim; b) Não
16. O que faz com os animais recém-adquiridos? a) Quarentena; b) São imediatamente incorporados ao rebanho
17. Faz escrituração zootécnica? a) Sim; b) Não
18. Qual o índice de mortalidade de cordeiros e animais jovens na propriedade?
a) Baixo; b) Alto; c) Não sei
19. Qual o índice de mortalidade de ovelhas adultas na propriedade?
a) Baixo; b) Alto; c) Não sei
20. Sistema de criação?
a) totalmente a pasto o ano todo sem suplementação; b) pastagem no verão e suplementação no inverno (seca); c) alimentação no cocho o ano todo

II – Informações sobre a medicação antiparasitária

1. Qual a frequência de aplicação de vermífugos utilizada? a) Mensal; b) Bimensal;
c) Trimestral; d) A cada 4 meses; e) Semestral; f) Anual; g) Sempre que necessário, de acordo com o método Famacha®; h) Em animais com sintomas de verminose; i) Estratégica (ex: ovelhas no periparto, cordeiros no desmame, borregas em crescimento, lotes em cobertura); j) De acordo com o resultado do OPG;
k) Não utilizo vermífugo; l) Outra (mencionar): _____
2. Quando o vermífugo é aplicado: a) a todos os animais do rebanho na mesma ocasião; b) somente a alguns animais ou lotes
3. Após o tratamento dos animais com o vermífugo, muda os animais de pastagem?
a) Sim; b) Não
4. Quando troca de vermífugo?
a) a cada vermifugação; b) de acordo com teste de eficácia do vermífugo; c) quando o produto não faz mais efeito; d) sem critério
5. Como escolhe o medicamento antiparasitário? a) Indicação do técnico (Veterinário, Zootecnista, Agrônomo, técnico agrícola); b) Balconista de agropecuária ou Cooperativa; c) Pelo melhor preço; d) Vendedor na fazenda; e) Propaganda (revista, TV, folder, etc); f) Outros (mencionar): _____
6. Como é feita a estimativa do peso dos animais para cálculo da dosagem do medicamento?
a) pesagem; b) estimativa visual
7. A que grupo pertencia o vermífugo utilizado na ÚLTIMA (1), PENÚLTIMA (2) e ANTEPENÚLTIMA (3) aplicação? (o entrevistador terá que saber a que grupo químico pertencem os medicamentos que estão no mercado):
Nome comercial: 1) _____; 2) _____; 3) _____
a) Benzimidazóis (albendazole/ ricobendazole/ febendazole/ oxfendazole);
b) Imidítiazol (levamisol);
c) Lactonas macrocíclicas (ivermectina/ abamectina/ doramectina/ moxidectina);

- d) () Salicilanilidas e substitutos fenólicos (closantel/ disofenol/ nitroxinil)
 e) () Organofosforado (triclorfon);
 f) () Mistura de grupos químicos;
 g) () Não lembro

8. Com que frequência realiza o exame de fezes (OPG)?

- a) () Sempre que necessário; b) () A cada _____ meses; c) () Utilizo somente para testar a eficácia do vermífugo; d) () Não realizo exame de OPG; e) () nunca ouvi falar neste exame

9. Já utilizou a combinação de drogas para tratar os animais (duas ou mais drogas ministradas ao mesmo tempo)? a) () Sim; b) () Não. Quais drogas utilizou (mencionar o nome comercial) ?

III - Informação sobre o conhecimento do produtor em resistência anti-helmíntica

1. Possui assistência técnica? a) () Sim, freqüente; b) () Sim, esporádica; c) () Não

2. Aonde aprende novas informações? a) () programas de rádio ou TV; b) () internet; c) () livros e revistas; d) () feiras e exposições; e) () cursos e palestras

3. Está informado sobre o problema da resistência dos vermes aos vermífugos?

- a) () Sim b) () Não

4. Conhece o método Famacha® ? a) () Sim, conheço e aplico; b) () Sim, conheço, mas não aplico; c) () Nunca ouvi falar

5. Já fez algum teste de eficácia de vermífugo na propriedade? () Sim; () Não.

Em caso de resposta afirmativa, que produtos deram BAIXA (1) ou ALTA EFICÁCIA (2) no último teste de eficácia realizado?

Baixa Eficácia (nome comercial): _____

Alta eficácia (nome comercial): _____

(citar e anotar o nome comercial e o pesquisador enquadrará nos grupos químicos de vermífugos abaixo, conforme as opções, 1 e 2)

- a) () Benzimidazóis (albendazole/ ricobendazole/ febendazole/ oxfendazole);
 b) () Imiditiazol (levamisol);
 c) () Lactonas macrocíclicas (ivermectina/ abamectina/ doramectina/ moxidectina);
 d) () Salicilanilidas e substitutos fenólicos (closantel/ disofenol/ nitroxinil)
 e) () Organofosforado (triclorfon);
 f) () Mistura de grupos químicos
 g) () Não lembro

5.1 Há quanto tempo realizou o último teste de eficácia? _____ MESES

Data: ___/___/200_

Pesquisador responsável: _____ Unidade de Pesquisa: _____