

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA BANA ISHII

**DISTRIBUIÇÃO DO CÓDON 167 DA ISOFORMA 1 DO GENE DA BETA-
TUBULINA EM CIATOSTOMÍNEOS DE EQUINOS**

CURITIBA
2015

JULIANA BANA ISHII

**DISTRIBUIÇÃO DO CÓDON 167 DA ISOFORMA 1 DO GENE DA BETA-
TUBULINA EM CIATOSTOMÍNEOS DE EQUINOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento
Co-orientador: Amilcar Arenal Cruz

CURITIBA

2015

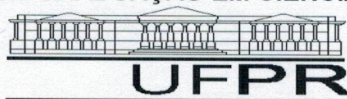
179 Ishii, Juliana Bana.
Distribuição do códon 167 da isoforma 1 do gene da beta-tubulina em ciatostomíneos de equinos. / Juliana Bana Ishii. – Curitiba : 2015.
80 f. il.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

1. Equinos – Anti-helmínticos. 2. Parasitologia veterinária.
I. Molento, Marcelo Beltrão. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 636.1:619.699

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “DISTRIBUIÇÃO DA ISOFORMA 1 DO GENE DA BETA-TUBULINA EM CIATOSTOMÍNEOS DE EQUINOS” apresentada pela Mestranda JULIANA BANA ISHII declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 27 de Julho de 2015

Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento
(Orientador/Presidente)

Professor Dr. Pedro Michelotto Junior
(Membro)

Dra. Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri
(Membro)

Ao meu esposo, o meu melhor amigo,
o meu maior incentivador, o meu grande amor, Fabiano.

Ao meu filho, a minha maior alegria, Estevão.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Marcelo Beltrão Molento, por todo o incentivo, por toda a compreensão e por todo o apoio oferecido durante o mestrado. Agradeço pelos conselhos, pelas conversas e pelas repreensões, sempre pertinentes e construtivas, os quais me fizeram prosseguir e dar o melhor de mim para que o nosso projeto se concretizasse.

Ao meu co-orientador, professor e amigo, Amilcar Arenal Cruz, por toda generosidade em compartilhar seu conhecimento, por toda a ajuda e ensino que gentilmente me ofereceu, por todo o incentivo. O seu companheirismo e amizade fizeram com que essa jornada se tornasse mais leve.

A todos os meus amigos de laboratório, pela ajuda, pelas risadas, pelas boas conversas e por fazerem do nosso laboratório um ambiente tão gostoso e agradável. Reconheço a fundamental participação de vocês nesse trabalho.

Ao meu esposo Fabiano, por me compreender, por me incentivar, por me consolar, por acreditar em mim. Agradeço por ter sido tão presente em todos os momentos, o seu amor e companheirismo me ajudaram a enfrentar os desafios.

Ao meu filho Estevão, por me fazer mais feliz, mais humana, mais completa, e por acrescentar mais emoção a essa caminhada.

A todos os professores, funcionários e alunos do programa de pós-graduação em ciências veterinárias da UFPR, que de alguma forma contribuíram com este projeto.

Ao CNPq e CAPES, pelo incentivo ao programa de pós-graduação e a pesquisa, e apoio financeiro.

Ao meu Senhor Jesus, por sempre me abençoar, e permitir que esse sonho se tornasse real.

Dá instrução ao sábio, e ele se fará mais sábio; ensina o justo, e ele crescerá em entendimento.

Provérbios de Salomão

RESUMO

Ciatostomíneos (Nematoda, Strongylida), conhecidos como pequenos estrôngilos, possuem ciclo de vida direto e são o grupo mais comum e patogênico de nematóides intestinais que infectam cavalos em todo o mundo. A presença de grande quantidade de vermes adultos pode provocar letargia, debilidade, diarreia e perda de peso no hospedeiro, porém a situação mais grave ocorre quando grande quantidade de larvas, no quarto estágio larval (L4), emerge simultaneamente da parede intestinal, provocando uma condição conhecida como ciatostomíase larval. Considerando os crescentes níveis de resistência anti-helmíntica, que tem tornado o controle da infecção por esses nematóides um grande desafio, o objetivo deste trabalho foi utilizar ensaios moleculares para detectar esses parasitos e fornecer um diagnóstico da resistência aos benzimidazóis (BZ) em um tempo reduzido, permitindo o monitoramento da eficácia dos anti-helmínticos e possíveis tomadas de decisões. Para isso, foram realizados testes moleculares, procedendo com a extração de DNA em parasitas adultos e de larvas de terceiro estágio (L3), reação em cadeia de polimerase (PCR), sequenciamento e análises de bioinformática. As larvas foram obtidas através de coprocultura de amostras de fezes de cavalos naturalmente infectados de três propriedades no Paraná, Santa Catarina e São Paulo. Os resultados da extração de DNA de ciatostomíneos adultos mostram que a técnica obteve boa quantidade de DNA, com boa qualidade, além de ser mais rápida e econômica que as relatadas. Os testes com L3 mostraram que a presença do alelo de resistência no códon 167 da beta-tubulina isotipo 1 está amplamente difundida nas propriedades, identificando 61,2; 38,5 e 31,5%, (média de 45%) de amostras heterozigotas resistentes (TTC/TAC) nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, respectivamente. O monitoramento e a detecção da resistência são importantes ferramentas para um correto manejo do controle parasitário. Os dados com a árvore filogenética revelaram que larvas com ou sem a mutação ficaram agrupadas em áreas separadas, indicando claro mecanismo de seleção pelo fragmento estudado. A correlação entre o manejo e os resultados moleculares permitirá incrementar as abordagens sobre estratégias de diagnóstico e o controle dos ciatostomíneos em equinos.

Palavras-chave: Equinos, Ciatostomíneos, Resistência anti-helmíntica, PCR.

ABSTRACT

Cyathostomes (Nematoda, Strongylida) known as small strongyles, have a direct lifecycle and are presently considered the most common and pathogenic group of intestinal nematodes infecting horses worldwide. Large numbers of adult worms may cause clinical symptoms such as lethargy, debilitation, diarrhea and sudden weight loss in the host, but when a large number of larvae at the fourth larval stage (L4), emerge simultaneously from the intestinal wall, there is a condition known as larval cyathostominosis which can result in a high fatality rate. Considering the increasing levels of anthelmintic resistance, which has become the control of infection with these nematodes challenging, the objective was to meet the growing need for the use of molecular assays to detect these parasites and provide an accurate diagnosis of resistance to benzimidazole (BZ) in a short time, allowing monitoring of the effectiveness of anthelmintics and possible decision making. For this, molecular tests were performed, proceeding with DNA extraction from adult parasites and third stage larvae (L3), polymerase chain reaction (PCR) and sequencing, and bioinformatics analysis. L3 were obtained from fecal culture of stool samples from horses with naturally infections from 3 properties: in Parana, Santa Catarina and São Paulo. Adult extraction obtained good DNA quality, as well as being faster and more economically than those reported. The L3 tests showed that the presence of resistance allele at codon 167 of beta-tubulin isotype 1 is widespread in all the three properties. Were identified 61.2 ; 38.5 and 31.5% (average 45%) of heterozygous resistant samples (TTC/TAC) on the properties of Paraná, Santa Catarina and São Paulo states, respectively. The monitoring and detection of resistance are important tools for correct parasite control management, and this study showed important information that may assist in diagnosis and correct resistance management. The data in the phylogenetic tree showed that larvae with or without mutation were clustered into separate areas, indicating the obvious selection mechanism to the fragment studied. The correlation between management and the results from molecular approaches would improve the diagnostic and control of cyathostomins.

Keywords: Horse, Cyathostomins, Anthelmintic resistance, PCR.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Larva L3 de ciatostomíneo recuperada por coprocultura.....18
- FIGURA 2 – Ciclo biológico dos ciatostomíneos.....19
- FIGURA 3 – Agarose gel electrophoresis of codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 polymerase gene amplified with primer pair horse 167 F and horse 167 R by pcr assay, from individual L3 samples. m: quantitative ladder. Lanes 1-5: samples with ~ 120bp..... 52
- FIGURA 4 – Chromatogram showing the double peak present at codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 gene in a heterozygous resistant sample, TTC/TAC (a). Chromatogram showing the single peak present at codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 gene in a homozygous susceptible sample, TTC/TTC (b).....56
- FIGURA 5 – Phylogenetic trees reconstructed with random samples of cyathostomin L3. **(a)** Six random samples from the state of Paraná and the sequence obtained from the GenBank database (GenBank: AY666162.1). **(b)** Six random samples from the state of Santa Catarina and the sequence obtained from the GenBank database (GenBank: AY666162.1). **(c)** Six random samples from the state of São Paulo and the sequence obtained from the GenBank database (GenBank: AY666162.1). All the phylogenetic trees were reconstructed with three samples with the homozygous susceptible genotype (HZ), and three with the heterozygous resistant genotype (HT).....58
- FIGURA 6 – Multiple species/isolate alignment of nucleotide sequence for encoding codons 151-175. Consensus sequences were generated from the following sequences: São Paulo heterozygous resistant samples (n= 5), São Paulo homozygous susceptible samples (n= 5), Paraná heterozygous resistant samples (n= 5), Paraná homozygous susceptible samples (n= 5), Santa Catarina heterozygous resistant samples (n= 5), Santa Catarina homozygous susceptible samples (n= 5). Genotypes are represented as follows:HZ homozygous susceptible and HT heterozygous resistant. States are represented as follow: PR Paraná, SP São Paulo, SC Santa Catarina. Relevant nucleotid

code: W=A/T. The mark shows the codon 167. The consensus sequence is shown at the bottom of the alignment.....58

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Yield of genomic DNA material extracted from 10 *Cyathostomin* adult parasites..... 43
- TABELA 2 – Primers pairs used in the polymerase chain reaction to identify the codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 polymerase gene of *cyathostomin*..... 53
- TABELA 3 – Alignment of partial 18 samples studied *cyathostomin* sequences, from nine homozygous susceptible genotype (HZ) and nine heterozygous resistant genotype samples (HT), with a partial sequence deposited in the GenBank database (AY666161.2)..... 55
- TABELA 4 – Genotypic distribution of *cyathostomin* L3 according to the origin of the samples..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
cm	Centímetro
g	Gramma
°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
M	Molar
A	Adenina
a.C	Antes de Cristo
BZ	Benzimidazóis
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FECRT	Faecal egg count reduction test
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HCl	Cloreto de hidrogênio
IVM	Ivermectina
L1	Larva de primeiro estágio
L3	Larva de terceiro estágio
L4	Larva de quarto estágio
L5	Larva de quinto estágio
LMs	Lactonas Macrocíclicas
MLs	Macrocyclic lactones
MOX	Moxidectina
NaCl	Cloreto de sódio

OPG	Contagem de ovos por grama de fezes
PBS	Phosphate buffered saline
P-gp	P-glicoproteína
PR	Paraná
PRO	Período de reaparecimento dos ovos
SC	Santa Catarina
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SP	São Paulo
T	Thymine
TBZ	Tiabendazol
TRCOF	Contagem de ovos por gramas de fezes
UFPR	Universidade Federal do Paraná
WAAVP	Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária
χ^2	Qui – quadrado

SUMÁRIO

1 CAP. 1 – REVISÃO DE LITERATURA : CIATOSTOMÍNEOS	17
1.1 INTRODUÇÃO	17
1.2 MORFOLOGIA, CICLO EVOLUTIVO, EPIDEMIOLOGIA E SAZONALIDADE	17
1.3 PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES	19
1.4 PATOGENIA	20
1.5 TRATAMENTO	21
1.6 CONTROLE DE CIATOSTOMÍNEOS	22
1.6.1 Antiparasitários:Histórico	22
1.6.2 Formas de controle dos helmintos	26
1.7 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA	27
1.7.1 Desenvolvimento da resistência anti-helmíntica	28
1.7.2 Refugia	29
1.7.3 Implicações da resistência anti-helmíntica	30
1.7.4 Diagnóstico da resistência anti-helmíntica em cavalos	30
1.7.5 Estratégias de controle parasitário que visam desacelerar o surgimento da resistência anti – helmíntica	31
1.8 PERSPECTIVAS	32
1.9 HIPÓTESE	33
1.10 OBJETIVO GERAL	33
1.11 OBJETIVO ESPECÍFICO	33
REFERÊNCIAS	34
CAP. 2 – Simplified Method for Isolation of Genomic DNA from Cyathostomin Adult Parasites	41
REFERENCES	45
CAP. 3 – Molecular diagnostic assay of beta-tubulin isotype 1 codon167 from 173 individual third–stage larvae of cyathostomin from horses with naturally acquired infections	46
3.1 ABSTRACT	46
3.2 RESUMO	47
3.3 INTRODUCTION.	49
3.4 MATERIAL AND METHODS	51
3.4.1 Origin of samples.....	51

3.4.2 DNA extraction.....	51
3.4.3 Isolation of genomic DNA from individual L3.....	52
3.4.4 Polymerase chain reaction (PCR).....	52
3.4.5 Sequencing.....	53
3.4.4 Bioinformatics: Alignment of the sequences and phylogenetic analysis	53
3.4.6 Consensus sequence	54
3.5 RESULTS	54
3.6 DISCUSSION	59
3.7 CONCLUSION	61
3.8 Acknowledgements.....	62
REFERENCES	63
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
5 CONCLUSÕES GERAIS	68
6 APÊNDICES	69

1. REVISÃO DE LITERATURA: CIATOSTOMÍNEOS (CYATHOSTOMUM SP.)

1.1 Introdução

As infecções parasitárias geram grandes perdas econômicas na criação de equídeos, esta situação causa muita preocupação para a maioria dos proprietários de cavalos. Os prejuízos podem ocorrer pelo desenvolvimento da doença de forma clínica, ou por perda na condição física e desempenho devido à infecção (BARRET *et al.*, 2004). Tal preocupação, aliada à falta de informação e à disponibilidade de antiparasitários baratos e acessíveis, tem levado o uso excessivo destas drogas, resultando no aumento da prevalência da resistência anti-helmíntica em nematóides de cavalos (KAPLAN, 2002). As formas de criação dos equídeos favorecem a grande incidência de infecções parasitárias já nas primeiras semanas de vida (MOLENTO, 2005; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2012). A fauna parasitária é vasta e compreendem várias famílias e/ou gêneros distintos, sendo os estrôngilos os principais parasitas patogênicos de equinos (TAYLOR, 2007). Existem mais de 50 espécies de ciatostomíneos reconhecidas, sendo que 10 espécies são mais prevalentes (CORNING *et al.*, 2009). O controle da parasitose é fundamental, sendo necessário um urgente desenvolvimento de abordagens não químicas e ensaios moleculares capazes de detectar parasitas resistentes (KAPLAN, 2004).

1.2 Morfologia, ciclo evolutivo, epidemiologia e sazonalidade

Os estrôngilos compreendem aproximadamente a metade dos mais de 100 parasitas internos dos equinos (KRECEK *et al.*, 1987). Vivem a fase adulta do ciclo de vida no lúmen intestinal e são comumente categorizados em pequenos e grandes estrôngilos (LYONS *et al.*, 1999). Os grandes estrôngilos compreendem os gêneros *Strongylus*, *Craterostomum*, *Oesophagodontus*, *Triodontophorus* e *Bidentostomum* (Lichtenfels *et al.*, 1998), dentre os quais, os mais patogênicos são do gênero *Strongylus*, especialmente *S. vulgaris*, com grande potencial de causar

lesões durante a fase de migração em seu ciclo de vida, principalmente em vasos mesentéricos, o que causa graves alterações e resultam em cólicas e dor aguda. Os parasitos adultos apresentam dimorfismo sexual, possuem tamanho de 4 a 26 mm, os ovos possuem tamanho médio de 50x90 µm e as larvas infectantes possuem oito células intestinais com formato triangular (FIGURA 1) (LICHTENFELS *et al.*, 1998).



FIGURA 1 - CÍATOSTOMINEO L3 RECUPERADO POR MEIO DE COPROCULTURA.

FONTE: Arquivo Daisy W. Santos (com permissão).

Os ciatostomíneos são conhecidos como pequenos estrôngilos, pois geralmente possuem menos de 2,5 cm de comprimento. Como muitos outros nematóides, os ciatostomíneos possuem um ciclo de vida direto, sem um hospedeiro intermediário (FIGURA 2). Os animais se infectam após a ingestão de larva de terceiro estágio (L3), que passa por um período de desenvolvimento larval no ceco e cólon, com capacidade de encistar na mucosa e submucosa intestinal, onde pode ficar até por dois anos, dependendo do clima. A larva costuma encistar em meses mais frios do ano, e emerge em massa quando a temperatura começa a subir. Uma vez ingerida pelo cavalo, a larva continua o seu desenvolvimento e evolui para larva de quarto estágio (L4) e quinto estágio (L5), emergindo para o lúmen intestinal, passando pelas fases de jovem imaturo, e chegando a fase adulta. Assim, novos ovos serão eliminados pelas fezes e contaminarão a pastagem dentro de cinco a seis semanas após a infecção. No ambiente, o ovo morulado desenvolve a larva de primeiro

estágio (L1), que vai eclodir do ovo e evoluir até L3 no ambiente, essa taxa de desenvolvimento é diretamente influenciada pela temperatura. Em temperaturas acima de 18°C o ovo pode eclodir em 3 dias e produzir a L3, este período aumenta em temperaturas mais baixas. A L3 pode sobreviver em condições frias, podendo permanecer no ambiente por longos períodos (CORNING, 2009). Em condições de clima tropical, como na região sudeste do Brasil, foi observado a sobrevivência de L3 por períodos de até 15 semanas nas fezes e 12 semanas na gramínea durante o período seco. Já no período chuvoso, a sobrevivência de L3 foi de nove semanas nas fezes e oito semanas no pasto (COUTO *et al.*, 2009). Os pequenos estrôngilos têm a capacidade de sobreviver por longos períodos, tanto no pasto quanto no hospedeiro, e uma gestão eficaz de programas de tratamento precisa levar em consideração as condições climáticas e do ciclo de vida, que são importantes fatores de risco epidemiológicos para a infecção com ciatostomíneos (PROUDMAN; MATTHEWS, 2000).

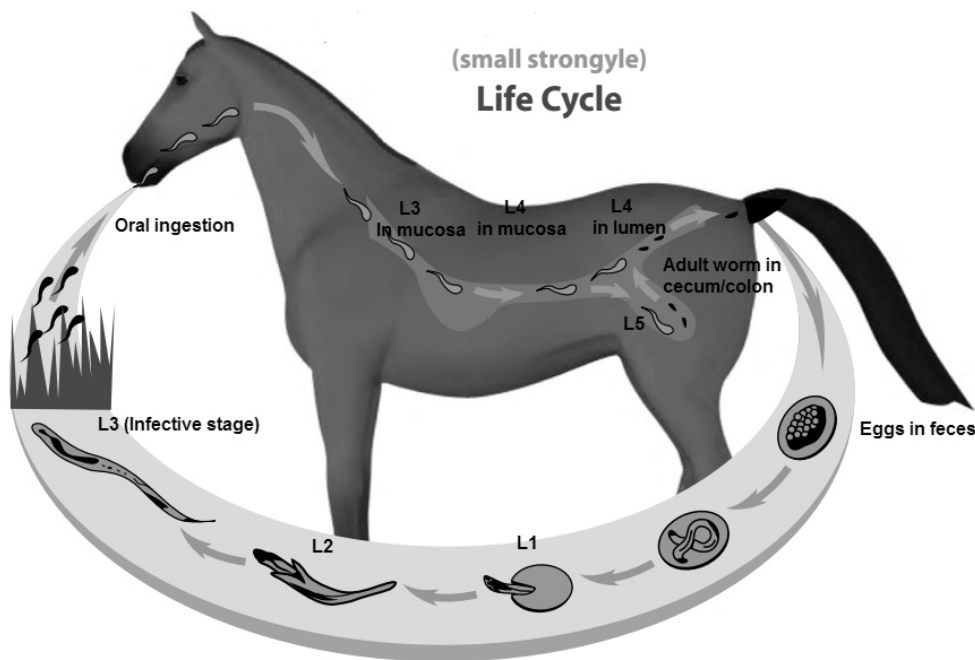


FIGURA 2 – CICLO BIOLÓGICO DOS CIATOSTOMÍNEOS
FONTE: Modificado pelo autor (2015)

1.3 Prevalência das espécies

A classificação das espécies de pequenos estrôngilos ainda tem sido muito

discutida, porém sabe-se que mais de 50 espécies podem estar envolvidas no parasitismo de cavalos, estando distribuídas em 13 grupos: *Cyathostomum*, *Coronocylus*, *Cylicodontophorus*, *Cylicocyclos*, *Cylicostephanus*, *Skrjabinodentus*, *Tridentoinfudinbulum*, *Petrovinema*, *Poteriostomum*, *Parapoteriostomum*, *Hsiungia*, *Cylindropharynx* e *Caballonema* (LICHTENFELS *et al.*, 1998). Nos cavalos parasitados, 10 espécies são mais comumente encontradas, sendo elas: *Cylicostephanus longibursatus*, *Cyathostomum catinatum*, *Cylicostephanus goldi*, *Cylicocyclos nassatus*, *Cyathostomum Coronatum*, *Cylicostephanus calicatus*, *Cylicostephanus minutus*, *Cylicocyclos leptostomus*, *Cyathostomum pateratum* e *Cylicocyclos insigne* (Reinemeyer *et al.*, 1984; Lyons *et al.* 1996). A identificação das espécies geralmente é realizada em adultos, porém, ensaios moleculares permitem a identificação das espécies em estágios larvais (HODGKINSON *et al.*, 2003).

Os ciatostomíneos estão presentes na maioria dos cavalos, com múltiplas espécies presentes em animais individuais. A temperatura ambiente não parece ter influência na distribuição das espécies, portanto, geralmente encontra-se similaridade nas espécies predominantes, independente da localização (COLES; MOLENTO, 2009).

1.4 Patogenia

A infecção com ciatostomíneos pode ocorrer em animais de qualquer idade e os sinais clínicos associados a infecções são inespecíficos e semelhantes a outras afecções. Tal fator dificulta o diagnóstico, que muitas vezes se dá apenas no *post-mortem*. Em infecções leves, os animais parasitados podem não apresentar sinais clínicos, convivendo com uma baixa carga parasitária, porém grande número de parasitas adultos pode causar um ou mais dos seguintes sinais clínicos: diarreia crônica, edema, apatia, anorexia e perda de peso (PEREGRINE *et al.*, 2006; CORNING, 2009). O dano mais severo ocorre quando milhares de larvas encistadas emergem para o lúmen intestinal simultaneamente. Esta condição é conhecida como síndrome de migração larval, que pode ser fatal em muitos casos. Exame clínico dos animais acometidos geralmente apontam neutrofilia, hipoalbuminemia e

hiperglobulinemia. Já na necropsia, pode-se observar a inflamação do ceco e/ou cólon, e numerosas larvas de pequenos estrôngilos podem ser observadas na mucosa do intestino. Na histopatologia, uma resposta celular inflamatória pode ser vista, incluindo populações mistas de células mononucleares, eosinófilos e células epiteliais (PEREGRINE *et al.*, 2005; COBB; BOECKH, 2009).

1.5 Tratamento

O impacto dos helmintos na saúde equina gera grande preocupação nos criadores de cavalos, e esta preocupação geralmente resulta em um pensamento de controle total, conhecido como estado não parasitado, no qual o objetivo é tratar frequentemente os animais para manter a carga parasitária e a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) próximo de zero (KAPLAN, 2002). A forma de controle adotado na maioria das propriedades é exclusivamente o uso de compostos antiparasitários (KAPLAN; NIELSEN, 2010), que pode ser feita de forma supressiva, estratégica ou curativa. Na forma supressiva, o uso de compostos antiparasitários se faz em intervalos curtos entre tratamentos; já na forma estratégica, faz-se o tratamento regulado com a época do ano e o aumento do número de parasitas no animal, e na forma curativa, trata-se o animal que apresenta alta contagem de ovos nas fezes ou sinais clínicos (SANGSTER *et al.*, 2002).

Atualmente, os medicamentos mais comumente usados para controlar infecções por ciatostomíneos pertencem a três classes de anti-helmínticos: os benzimidazóis (fenbendazole e oxiabendazol), o tetrahidropirimidina (pamoato de pirantel), e as lactonas macrocíclicas (ivermectina, abamectina, e moxidectina). Esta estratégia de controle impõe uma pressão de seleção e está associada com o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica (TRAVERSA, 2008).

Essas drogas, logo que introduzidas no mercado, apresentavam boa eficácia contra os ciatostomíneos, porém, atualmente já existem relatos de identificação de ciatostomíneos resistentes a esses antiparasitários no mundo todo (KAPLAN, 2002). A disseminação de populações de nematóides resistentes aos parasiticidas tornou-se uma séria ameaça para a saúde e produção animal em vários países. Muitos nematóides de importância veterinária têm características genéticas que favorecem

o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica (HODGKINSON *et al*, 2008).

A taxa de desenvolvimento de resistência é determinada pela pressão de seleção. O tratamento antiparasitário suprime os organismos susceptíveis, mas não altera a população de resistentes, e a característica de resistência é herdada pelas próximas gerações, promovendo uma mudança no perfil genético da população de parasitas (MOLENTO, 2005). Com a continuação da seleção e reprodução dos parasitas, a frequência de genes de resistência na população aumenta até o ponto em que o tratamento falhará por completo (SANGSTER, 1999). Assim, há uma forte necessidade de desenvolver formas de diagnóstico mais precoces e novas abordagens para o controle de parasitas, com o objetivo de retardar o desenvolvimento de resistência e melhorar a qualidade de vida dos animais (KAPLAN, 2004).

1.6 Controle de ciatostomíneos

O controle desses parasitas é muito difícil de ser feito e as práticas de controle devem ser adaptadas para cada propriedade individual. As medidas de controle inevitavelmente envolvem o uso de anti-helmínticos, no entanto, a crescente prevalência de resistência acrescenta outro nível de dificuldade para a elaboração de programas de controle adequados.

1.6.1 Antiparasitários: Histórico

O uso da infusão da casca de romeira, *Punica granatum*, para o tratamento do *helto*, helmintose comum no antigo Egito foi a primeira citação sobre a utilização de um anti-helmíntico, identificado no papiro de Ebers e datado, provavelmente, de 1550 a.C.. As substâncias naturais como o óleo de chenopodium, santonina e papaína foram utilizadas no tratamento de helmintoses antes do desenvolvimento de compostos orgânicos sintéticos. Um dos primeiros anti-helmínticos utilizados foi o sulfato de cobre, em 1881, e mais tarde, em 1926, o tetracloreto de carbono, para o tratamento de *Fasciola hepatica* (ALMEIDA; AYRES, 2002).

Os primeiros relatos do uso de anti-helmínticos se deram no início do século XX. Nesta época, era recomendado o óleo de *Chenopodium* para o tratamento de verminoses em equinos (HALL, 1918). Hall *et al.* (1918) relataram a excelente atividade do óleo de *Chenopodium* na remoção de strongilídeos de equinos. Este óleo foi destilado a partir de sementes ou parte de folhas de *Chenopodium anthelminticum*, comumente chamado de carvalho de Jerusalém (HALL; FOSTER, 1918), porém foi relatado que a droga causava graves efeitos colaterais, como perda de peso, anorexia e adipsia durante três ou quatro dias após o tratamento. O dissulfeto de carbono foi usado por Hall (1917) em um teste chamado mais tarde de teste crítico (HALL *et al.* 1918, 1919, HALL; FOSTER, 1918), e foi altamente eficaz contra larvas de *Gasterophilus sp.*, pela avaliação de testes críticos.

Até a década de 90, cerca de 25 produtos tornaram-se comercialmente disponíveis para o controle de parasitas internos de equinos (DRUDGE *et al.*, 1981; LYONS *et al.*, 1990) pertencentes a somente seis classes de compostos. Depois do dissulfeto de carbono que foi comercializado no início do século passado para controle de larvas de *Gasterophilus sp.* e ascarídeos, nenhum novo composto antiparasitário esteve disponível comercialmente até os anos 40. Começando com os fenotiazínicos na década de 40 até a década de 80, novas classes de antiparasitários foram lançadas no mercado a cada 10 anos em média, incluindo as piperazinas em 1950, benzimidazóis nas décadas de 60 e 70, os organofosforados em 1960 (triclorfon) e 1970 (dichlorvos), levamisole e pirantel na década de 70 e as lactonas macrocíclicas nas décadas de 80 (ivermectina) e 90 (moxidectina).

Entre 1940 e 1960, a fenotiazina foi a droga mais utilizada para o controle de strongilídeos em equinos (HABERMANN *et al.* 1941; GIBSON, 1953). Uma das formas de tratamento utilizado foi a administração da droga em baixo nível na alimentação, sendo que este esquema foi utilizado por cerca de 10 anos, entre 1940 e 1950 (DIMOCK, 1949, TODD *et al.*, 1950). A fenotiazina era administrada junto com a ração diariamente nos primeiros 21 dias de cada mês. Animais jovens e desmamados recebiam 1 g/dia e os cavalos adultos 2 g/dia. Entretanto, o sistema de baixo nível diário não removia as infecções de causadas pelos strongilídeos, mas afetava a reprodução destes nematódeos.

Os primeiros compostos eficazes contra diferentes grupos de nematoides foram as piperazinas, que apresentaram atividade contra ascarídeos, strongilídeos e *Oxyuris equi*. Entretanto, apesar da remoção de pequenos strongilídeos ser

excelente, a atividade em grandes strongilídeos era baixa. Geralmente, as piperazinas eram utilizadas em uma mistura com outros compostos de maior espectro de ação. Uma mistura de piperazina e dissulfeto de carbono foi o primeiro composto parasiticida de amplo espectro para cavalos, fornecendo assim, atividade contra larvas de *Gasterophilus sp.*, ascarídeos, strongilídeos e *O. equi* (LYONS *et al.*, 1999). Mais tarde, a fenotiazina foi adicionada à mistura para aumentar a atividade contra strongilídeos, principalmente grandes strongilos. Esta mistura permitiu reduzir a dose dos fenotiazínicos e, portanto, reduzir o risco de intoxicação, proporcionando excelente remoção de pequenos strongilídeos resistentes a fenotiazina (DRUDGE, 1962).

O triclorfon foi o primeiro organofosforado comercializado, com atividade sobre *Gasterophilus sp.*, ascarídeos e *O. equi*, mas não contra strongilídeos. Para aumentar o seu espectro de ação, eram feitas misturas com fenotiazínicos, piperazina, mebendazol, oxfendazol, e tiabendazol. Dichlorvós foi o segundo organofosforado, usado em equinos na forma peletizada, e a sua formulação foi altamente ativa contra pequenos strongilídeos, incluindo as espécies resistentes ao benzimidazol, como *Gasterophilus sp.*, ascarídeos, grandes strongylus e *Oxyuris* (LYONS *et al.* 1999).

No início da década 60, o tiabendazol foi o primeiro anti-helmíntico da classe dos benzimidazóis a ser desenvolvido (DRUDGE *et al.*, 1963). Mais tarde, outros, incluindo cambendazol, fenbendazol, mebendazol, oxfendazol e oxibendazol, foram introduzidos no mercado. Na época, esses foram os compostos com maior atividade sobre nematóides disponíveis em um único produto. Além da excelente remoção dos principais nematóides, o tiabendazol foi desejado por causa da baixa dosagem, baixa toxicidade, e adaptabilidade para diferentes formulações e métodos de administração (LYONS *et al.*, 1999). Os benzimidazóis ligam-se à tubulina do parasito, o que resulta na sua despolimerização e, conseqüentemente, alterações dos microtúbulos, interrompendo processos vitais para a função celular, como a divisão mitótica, transporte de nutrientes e alterações na forma da célula. Além disso, atuam inibindo a enzima fumarato-redutase nas reações mitocondriais, interferindo no metabolismo energético do parasito (AYRES; ALMEIDA, 2002).

As tetraidropirimidinas foram comercializadas a partir de 1966 para o tratamento de nematódeos de ovinos e posteriormente em outras espécies animais. Três sais de Pirantel (cloridrato, pamoato, tartarato), mostraram experimentalmente

ser ativos contra nematóides de equinos. Tartarato de Pirantel foi relatado em 1968, para ser ativo contra ascarídeos, *S. vulgaris*, pequenos strongilídeos e *O. equi*, porém teve baixa eficácia contra *S. edentatus* (CORNWELL; JONES, 1968). O tartarato de pirantel foi utilizado em baixas doses diárias formulado na ração, e foi possível uma redução na contagem de OPG de strongilídeos em potros e cavalos jovens (HERD; MAJEWSKI, 1994). Neste modo, tartarato de pirantel era ativo contra larvas infectantes recém-ingeridas de terceiro estágio de nematódeos, grandes strongylus adultos, ciatostomíneos, ascarídeos e *O. equi* (VALDEZ *et al.*, 1995). As tetraidropirimidinas são agonistas colinérgicos, e seu mecanismo de ação promove uma despolarização excessiva da membrana pós-sináptica e, como consequência, hiperexcitabilidade e paralisia espástica dos parasitos (ALMEIDA; AYRES, 2002).

A ivermectina (IVM), primeiro composto da classe das lactonas macrocíclicas (LM) a ser usado em equinos, foi lançada no mercado em 1981 como um anti-helmíntico com maior espectro de ação comercializado até então (SCRÖDER; SWAN, 1982; CAMPBELL, 1989). A IVM é a droga mais utilizada em equinos até hoje e ainda mantém bons níveis de eficácia, embora alguns relatos de resistência tenham sido descritos nos últimos anos (MOLENTO *et al.*, 2008; TRAVERSA *et al.*, 2009, CANEVER *et al.*, 2013). A IVM se manteve como a única droga desta classe usada em equinos até a introdução da moxidectina (MOX) na década de 90. As LMs apresentam baixa toxicidade, atividade sobre artrópodes e nematoides, e podem ser administradas em dose muito baixa. A IVM foi o primeiro composto, na dose terapêutica, a ser eficaz contra estágios parenterais de grandes strongilídeos. É altamente ativa na fase luminal de pequenos strongilídeos, mas essencialmente ineficaz, mesmo em dose cinco vezes maior, contra fases encistadas destes parasitas (KLEI *et al.*, 1993; LYONS *et al.*, 1994).

A MOX é uma LM de segunda geração e possui atividade altamente eficaz sobre artrópodes, nematoides e sobre as fases encistadas de pequenos strongilídeos (MONAHAN *et al.*, 1996). Após o tratamento com a MOX, a contagem de OPG de strongilídeos pode permanecer baixa por um longo período, podendo chegar de 12 até 22 semanas com OPG negativo. Isto se deve à eliminação dos nematódeos adultos e das larvas encistadas na mucosa (DEMEULENAERE *et al.*, 1997; DIPIETRO *et al.*, 1997). Martin-Downum *et al.* (2001) comparou o efeito de MOX com o da IVM sobre o período de reaparecimento de ovos (PRO) nas fezes. A contagem de OPG pós-moxidectina permaneceu baixa por 112 dias, enquanto a

contagem de OPG pós-ivermectina apresentou resultado positivo logo após o 56º dia após o tratamento.

As LMs potencializam a ação inibidora neuronal no cordão nervoso ventral dos parasitos que é mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), e sobre os canais de cloro, estimulam a liberação pré-sináptica deste neurotransmissor, pelo aumento de sua ligação aos receptores pós-sinápticos. Deste modo, o canal de cloro é aberto, aumentando a condução intracelular do neurotransmissor, hiperpolarizando o neurônio e resultando na paralisia motora do tipo flácida, eliminando o parasito (AYRES; ALMEIDA, 2002).

1.6.2 Formas de Controle dos helmintos

É somente com uma estratégia eficaz que o desafio de combater esses invasores altamente patogênicos pode ser alcançado, tanto em equinos como em outras espécies de animais de produção. É aconselhável utilizar um anti-helmíntico com elevada eficácia, que auxilie na redução da contaminação de larvas nas pastagens e que seja eficaz contra larvas encistadas. Dentre as três classes de antiparasitários disponíveis para cavalos, a classe das LMs tem sido a mais utilizada, devido a sua potência, espectro de ação, segurança e por ter ainda poucos relatos de resistência. Programas de controle eficazes devem abordar medidas que reduzam o número de larvas infectantes nas pastagens e a necessidade de repetidos tratamentos com antiparasitários.

Em 1966, uma abordagem epidemiológica para controle de parasitos em conjunto com a disponibilidade de anti-helmínticos modernos, conduziram a recomendações para tratamento de cavalos a cada 6-8 semanas (DRUDGE; LYONS, 1966). Os benzimidazóis (BZ) haviam entrado recentemente no mercado, e com estas drogas modernas, seguras e de amplo-espectro, uma nova abordagem poderia ser tomada. O sistema foi projetado principalmente para controlar *Strongylus sp.*, especialmente *S. vulgaris* devido a sua alta patogenicidade, com base no conhecimento sobre ciclo de vida e PRO, determinando assim o intervalo de tratamento. Drudge e Lyons (1966) utilizaram as melhores evidências científicas disponíveis no momento de sugerir um protocolo que envolvesse o tratamento de

todos os animais a cada dois meses ao longo do ano. Assim, esta estratégia foi considerada uma sólida abordagem para o tratamento de todos os cavalos em períodos fixos durante todo o ano, por suprimir a eliminação de ovos e reduzir a transmissão do parasita ao mínimo.

Esses autores também sugeriram a rotação entre as classes de medicamentos para garantir que todos os grupos de parasitas fossem alvos do tratamento. Este programa tornou-se amplamente adotado e foi extremamente bem sucedido na redução da morbidade e mortalidade por doenças parasitárias (KAPLAN, 2002). Veterinários de equinos que conviveram com a transição para a era moderna da eficácia dos compostos anti-helmínticos perceberam uma drástica redução de casos clínicos de cólica, uma vez que a cólica verminótica tornou-se um evento raro (DRUDGE; LYONS, 1977). No início dos anos 80, foi reconhecido que *S. vulgaris* se tornava cada vez mais raro, enquanto os ciatostomíneos representavam praticamente 100% da produção de ovos de parasitas de equinos em pastejo (HERD *et al.*, 1981).

Com o advento de novas classes de medicamentos, como pirimidinas (Pirantel) na década de 70 e avermectina/milbemicinas (IVM e MOX) na década de 80 e 90, mais classes de anti-helmíntico estavam disponíveis e foram incorporados ao sistema de tratamento e rotação. As drogas disponíveis possuíam amplo espectro, de modo que o efeito da rotação não foi mais para garantir um direcionamento a todos os grupos de parasitas, mas para prevenir o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica (UHLINGER; KRISTULA, 1992).

1.7 Resistência anti-helmíntica

A resistência é a capacidade de alguns parasitos de uma determinada população sobreviverem aos tratamentos que são geralmente eficazes contra as mesmas espécies e estágios de infecção, ou seja, alguns indivíduos de uma população parasitária possuem genes que codificam para a resistência contra determinada droga mesmo no momento de sua introdução. Portanto, a resistência é herdada e o seu desenvolvimento exige que os genes de resistência estejam presentes, e que a expressão destes genes aumente na população por seleção

genética (HODGKINSON *et al.*, 2008). A taxa de desenvolvimento de resistência é determinada pela pressão de seleção e o avanço da resistência ocorre quando estes indivíduos sobrevivem aos tratamentos e passam seus genes para as próximas gerações. (MOLENTO, 2005). Parasitas que possuem alelos de resistência, mesmo que em número reduzido, possuem grande vantagem seletiva uma vez que a droga é reintroduzida, portanto, a reversão da susceptibilidade não ocorre, fazendo com que a resistência seja um fenômeno fixo.

1.7.1 Desenvolvimento da resistência anti-helmíntica

O desenvolvimento da resistência anti-helmíntica é um processo altamente complexo que é influenciado pelo hospedeiro, parasita e fatores ambientais (NIELSEN *et al.*, 2014). Os primeiros relatos de resistência anti-helmíntica foram para a droga fenotiazina no final dos anos 50 e início dos 60, primeiro em *Haemonchus contortus*, parasita de ovinos (DRUDGE, 1957) e, em seguida, ciatostomíneos de equinos (POYNTER; HUGHES, 1958; GIBSON, 1960; DRUDGE; ELAM, 1961). A rápida aceitação e uso generalizado de tiabendazol e outros anti-helmínticos do grupo BZ marcou o início da agressão química moderna sobre os helmintos. No entanto, dentro de poucos anos, a resistência ao tiabendazol (TBZ) foi relatada em *H. contortus* (CONWAY, 1964; DRUDGE, 1964) e depois em ciatostomíneos (DRUDGE; LYONS, 1965).

Ensaio clínico realizado durante 1960 e 1961 em uma propriedade no Kentucky, EUA, demonstraram que indivíduos TBZ-resistentes já estavam presentes nesta população de ciatostomíneos quando o TBZ foi usado pela primeira vez nesta fazenda (DRUDGE *et al.*, 1990). Esta observação foi confirmada quando, após apenas um ano de uso, a eficácia do TBZ nesta fazenda havia diminuído de 95% para aproximadamente 35%. Uma vez que uma grande parte da população de ciatostomíneos já era resistente à fenotiazina devido ao longo uso desta droga, suspeitou-se que a fenotiazina pré-selecionou a resistência aos BZs. Essa suspeita foi apoiada por evidências bioquímicas, que sugeriram que os mecanismos de ação da fenotiazina sobre helmintos ocorre por inibição dos microtúbulos, o mesmo mecanismo descrito para o grupo BZ (REW; FETTERER, 1986).

Em seguida surgiram relatos de resistência aos BZs em outros nematóides de ovinos, *Ostertagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis*. Estes relatos levaram a estudos que investigaram a prevalência da resistência, que constatou, em meados de 1970, várias espécies de nematóides resistentes aos BZs em ovinos e equinos em todo o mundo. Esse mesmo padrão se repetiu em 1970 e 1980 na sequência da introdução das novas classes anti-helmínticas: imidazotiazol, tetrahidropirimidina, avermectinas e milbemicinas. No início da década de 80, foram relatados parasitos com resistência a múltiplas drogas (PRICHARD *et al.*, 1980; WALLER; PRICHARD, 1986).

Chapman *et al.* (1996) relataram pela primeira vez a ocorrência da resistência de ciatostomíneos frente ao BZ, a piperazina e ao pamoato de pirantel. Young e colaboradores (1999) também determinaram a redução da eficácia do fenbendazole (32%), do pirantel (93%) e a alta eficácia da IVM (>99%) contra ciatostomíneos. Somente nos últimos anos a resistência à IVM foi descrita em equinos (MOLENTO *et al.*, 2008; TRAVERSA *et al.*, 2009), após quase três décadas de uso generalizado desta droga. Um dos principais motivos pela demora no desenvolvimento da resistência neste composto pode ser explicado pelo fato de que não possui ação sobre as larvas de quarto estágio encistadas na mucosa intestinal, sendo considerada uma grande população de refugia (KAPLAN, 2002). A MOX ainda possui alta eficácia contra pequenos estrôngilos, porém, recentemente, foi relatada uma redução da eficácia e possível resistência (MOLENTO *et al.*, 2008). O mecanismo de resistência ligado a LMs parece estar associado a mudanças genéticas na P-gp, que é responsável pelo efluxo celular, prevenindo o acúmulo celular e o efeito citotóxico da célula (MOTTIER; PRICHARD, 2008). Mottier e Prichard (2008) demonstraram em *H. contortus* e *Onchocerca volvulus* que também pode ocorrer uma mutação nos códons 167 e 200 da beta-tubulina (fenilalanina para tirosina) em parasitas resistentes a LMs, estas mudanças são conhecidas por causar resistência aos BZs.

1.7.2 Refugia

O termo refugia tornou-se altamente aceito na parasitologia animal, e refere-se a uma subpopulação de parasitas que não é exposta ao anti-helmíntico no

momento do tratamento. A subpopulação deixada em refugia representa um reservatório de genes não selecionados, que inclui os alelos que conferem susceptibilidade anti-helmíntica. A refugia garante que parasitas sensíveis estão disponíveis para acasalar com parasitas resistentes que sobreviveram ao tratamento. Quando o número de parasitas em refugia aumenta, a taxa de desenvolvimento da resistência na população de parasitas reduz. Portanto, a subpopulação de parasitas refugia é altamente benéfica no controle da resistência parasitária em equinos (NIELSEN *et al.*, 2007; MATTHEWS, 2008; KAPLAN; NIELSEN, 2010).

1.7.3 Implicações da resistência anti-helmíntica

O grave problema da resistência anti-helmíntica está difundido em diversas propriedades de criação de cavalos, mesmo que a cada década, uma nova classe de anti-helmíntico tenha sido introduzida no mercado. Iniciou-se o uso dos fenotiazínicos na década de 50, seguido pelos BZs na década de 60, as tetraidropirimidinas na década de 70 e as LMs na década de 80. Estas drogas eram eficazes e relativamente baratas, e por isso levaram as recomendações para controle de parasitas a serem baseadas quase que exclusivamente no uso frequente de anti-helmínticos. Esta abordagem, aparentemente bem sucedida, tornou-se insustentável, uma vez que novas classes de anti-helmínticos não foram introduzidas no mercado. Durante o período pós-ivermectina, os esforços para o desenvolvimento de novas classes anti-helmínticas foi reduzido, e é muito pouco provável que sejam desenvolvidas novas drogas para manter o controle parasitário (MATTHEWS, 2014).

1.7.4 Diagnóstico da resistência anti-helmíntica em cavalos

O teste que oferece o mais alto nível de precisão para detectar parasitas resistentes em cavalos é o teste crítico, no entanto, é necessária a necropsia dos

animais para a sua realização (DRUDGE; LYONS, 1977), o que restringe esse teste apenas para pesquisas industriais, não sendo utilizado frequentemente. Testes *in vitro* e moleculares para diagnóstico de resistência anti-helmíntica avançaram muito nos últimos anos, mas ainda não são uma realidade para levantamento da resistência no campo (MATTHEWS *et al.*, 2012). Esforços para o desenvolvimento e o aprimoramento de ensaios moleculares deve ser um objetivo futuro, uma vez que eles permitem a detecção rápida e precisa da resistência antes da falha terapêutica. Devido às deficiências das demais abordagens, o teste de redução na contagem de ovos por gramas de fezes (TRCOF) tornou-se amplamente utilizado para avaliar o percentual de eficácia dos produtos comerciais. A Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária - WAAVP, através do Comitê de Orientação de Parasitas de Equinos, define o TRCOF como um teste prático e padrão ouro para definição de resistência no campo. Mesmo que o teste não quantifique a resistência e apenas demonstre a uma forte suspeita da sua presença. Usando este método, um nível de redução de 95% fixado para BZ e LM e 90% para pirantel já seria indicativo de resistência (KAPLAN; NIELSEN, 2010).

1.7.5 Estratégias de controle parasitário que visam desacelerar o surgimento da resistência anti-helmíntica

Programas de controle parasitário que confiam exclusivamente no uso de anti-helmínticos e não levam em consideração a interação parasito – hospedeiro – ambiente, tem levado ao aumento dos níveis de resistência antiparasitária. Medidas inovadoras de controle parasitário precisam ser instituídas para que a resistência anti-helmíntica seja desacelerada, e as drogas que ainda possuem eficácia sejam preservadas por um período prolongado. Estratégias sustentáveis de controle devem ser aplicadas de maneira racional, e a participação de médicos veterinários no controle parasitário é de extrema importância, levando conhecimentos epidemiológicos e de controle parasitário até os produtores, visando reduzir a dependência e o uso de anti-helmínticos no controle parasitário. A melhor estratégia sustentável para o controle de nematóides leva em consideração abordagens não

químicas, isto diminui a necessidade de tratamentos e a eficácia dos anti-helmínticos é estendida. (WALLER, 1997).

Existem estratégias que podem ser utilizadas com o objetivo de reduzir o ritmo do surgimento dessa resistência. Inicialmente pode-se incrementar os diagnósticos rápidos para a resistência para cada classe de drogas anti-helmíntica (KAPLAN, 2002), assim como, desenvolver métodos de diagnóstico para determinar se as infecções por ciatostomíneos exercem impacto na saúde do animal (MATTEWS, 2011). É possível identificar limiares na contagem de OPG associados à contaminação ambiental significativo e doença em outros cavalos, e assim, justificar o tratamento (MOLENTO *et al.*, 2012). Seria interessante identificar os fatores de risco de desenvolvimento de resistência anti-helmíntico (intervalo entre tratamento, época do ano) e promover a manutenção da susceptibilidade de anti-helmínticos em parasitas equinos e realizar estudos epidemiológicos em fazendas, a fim de verificar o impacto que a resistência antiparasitária exerce na saúde dos animais.

1.8 Perspectivas

As medidas que objetivam preservar a eficácia das poucas drogas que ainda possuem efeito sobre os parasitas devem ser comprovadas e implantadas nas propriedades, e os anti-helmínticos devem ser considerados um recurso valioso e de uso limitado. Programas de controle parasitário devem focar em práticas de gestão ambiental aliadas à implementação de estratégias de tratamento seletivo, sem investir unicamente no controle com o uso de anti-helmínticos (PEREGRINE *et al.*, 2014). Estudos devem ser realizados para suprir a necessidade urgente de desenvolver métodos moleculares capazes de detectar a resistência anti-helmíntica enquanto as frequências alélicas ainda estão baixas, para permitir mudanças nas estratégias de controle parasitário, e conseqüentemente preservar a eficácia das drogas (KAPLAN, 2004; MATTHEW, 2014). O uso dos antiparasitários é a abordagem mais eficaz, e ainda será necessário para terapias de salvamento,

principalmente quando outras medidas de controle falharem (COLES; MOLENTO, 2009).

1.9 HIPÓTESE

A eficácia dos BZs vem reduzindo ao longo do tempo devido ao seu uso frequente. Um dos fatores que contribui para redução dessa eficácia é o aumento da frequência de mutações na posição 167 do gene da beta-tubulina em ciatostomíneos de equinos. Testes moleculares podem determinar a frequência destas mutações em cada rebanho.

1.10 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência do gene da beta-tubulina na população de ciatostomíneos em equinos, correlacionando com a mudança na distribuição populacional, entre parasitos susceptíveis e resistentes.

1.10 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a frequência de ciatostomíneos em equinos.

- b) Padronizar e simplificar a técnica de extração de DNA de parasitos para que elas sejam adotadas na rotina dos laboratórios, para avaliação molecular da resistência aos BZs.

- c) Avaliar molecularmente, através do teste de PCR, a presença de mutação na posição 167 do gene da beta-tubulina isotipo 1 em L3 de diferentes fazendas de criação de equinos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.A.O.; AYRES, M.C.C. Considerações gerais sobre os anti-helmínticos. In: Spinosa, H.S.; Górnaiak, S.L.; Bernardi, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., cap.43, p. 459-466, 2002.

AYRES, M.C.C.; ALMEIDA, M.A.O. Agentes antinematódeos. In: Spinosa, H.S.; Górnaiak, S.L.; Bernardi, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., cap.45, p. 475-489, 2002.

BARRET, E.J.; FARLAM, J.; PROUDMAN, C.J. Field trial of the efficacy of a combination of ivermectin and praziquantel in horses infected with roundworms and tapeworms. **Veterinary Record**. 184: 323-325, 2004.

CAMPBELL, W.C. Ivermectin and Abamectin, **Springer**, New York, 1989.

CANEVER, R. J.; BRAGA, P. R.C.; BOECKH, A.; GRYCAJUCK, M.; BIER, D.; MOLENTO, M.B. Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**. 194, 35-39. 2013.

CHAPMAN, M.R.; FRENCH, D.D.; MONAHAN, C.M.; KLEI, T.R. Identification and characterization of a pirantel pamoate resistant cyathostome population. **Veterinary Parasitology**. 66: 205-212, 1996.

COBB, R.; BOECKH, A. Moxidectin: A review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. **Parasites & Vectors**. Suppl. 2: S5 doi: 10.1186/1756-3305-2-S2-S5, 2009.

COLES, G.; MOLENTO, M.B.. How do we slow the development of ML resistance in cyathostomins? **Proceeding International Equine Parasite Drug Resistance Workshop**. 1, 19, 2009.

CONWAY, D.P. Variance in effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. **American Journal of Veterinary Research**. Res. 25, 844-845, 1964.

CORNING, S. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. **Parasites Vectors** 2 (Suppl. 2), S1, 2009.

CORNWELL, R.L.; JONES, R.M. Field trials in horses with pyrantel tartrate. **Veterinary Record**. 82, 586-587, 1968.

COUTO, M.C.M.; QUINELATO, S.; SOUZA, T.M.; SANTOS, C.N. BEVILAQUA,

C.M.L.; ANJOS, D.H.S.; SAMPAIO, I.B.M.; RODRIGUES, M.L.A. Desenvolvimento e migração de larvas infectantes de ciatostomíneos (Nematoda: Cyathostominae) em gramínea coast cross (*Cynodon dactylon*) em clima tropical, na Baixada Fluminense, RJ, **Brasil. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. 18, 31-37, 2009.

DEMEULENAERE, D.; VERCRUYSSSE, J.; DORNY, P.; CLAEREBOUT, E. Comparative studies of ivermectin and moxidectin in the control of naturally acquired cyathostome infections in horses. **Veterinary Records**. 141,383-386, 1997

DIMOCK, W.W.. The two-gram daily dose of phenothiazine for strongylosis of the horse. **Journal of Veterinary Medicine**. 44, 99-102, 1949.

DIPIETRO, J.A.; HUTCHENS, D.E.; LOCK, T.F. Clinical trial of moxidectin oral gel in horses. **Veterinary Parasitology**. 72,167-177, 1997.

DRUDGE, J.H. Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine: II. Studies on pure infections of *Haemonchus contortus*. **American Journal of Veterinary Research**. 18, 317-325, 1957.

DRUDGE, J.H.; ELAM, G. Preliminary observations on the resistance of horse strongyles to phenothiazine. **International Journal for Parasitology**. 47, 38-39, 1961.

DRUDGE, J.H. Horse parasites and their control. **Southwest. Vet**. 16, 31-35, 1962.

DRUDGE J.H.; SZANTO J.; WYANT Z.N.; ELAM G. Critical tests of thiabendazole as an anthelmintic in the horse. **American Journal of Veterinary Research**. 24,1217-1222, 1963.

DRUDGE, J.H. Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**. 25, 1512-1518, 1964.

DRUDGE J.H.; LYONS E.T. Newer developments in helminth control and *Strongylus vulgaris* research. **Proc. 11 th Ann. Mtg. AAEP, Miami Beach, FL**, p. 381-389, 1965.

DRUDGE J.H.; LYONS E.T. Control of Internal Parasites of the Horse, **Journal of the American Veterinary Medical Association**.148, 378-383, 1966.

DRUDGE J.H.; LYONS E.T. Methods in the evaluation of antiparasitic drugs in the horse, **American Journal of Veterinary Research**. 38, 1581-1586, 1977.

DRUDGE, J.H.; LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C. Parasite control in horses: a summary of contemporary drugs. **Vet. Med. Sm. Anim. Clin**. 76, 1479-1489, 1981.

DRUDGE J.H.; LYONS E.T.; TOLLIVER S.C.; FALLON E.H. Phenothiazine in the origin of benzimidazole resistance in population-B equine strongyles, **Veterinary**

Parasitology. 35, 117-130, 1990.

GIBSON, T.E. The effect of repeated anthelmintic treatment with phenothiazine on the faecal egg counts of housed horses, with some observations on the life cycle of *Trichonema* spp. in the horse. **Journal of Helminthology.** 27, 29-40, 1953.

GIBSON, T.E. Some experiences with small daily doses of phenothiazine as a means of control of strongylid worms in the horse. **Veterinary Record.** 72, 37-41, 1960.

HABERMANN, R.T., HARWOOD, P.D., HUNT, W.H. Critical tests with phenothiazine as an anthelmintic in horses. **North American Veterinary.** 22, 85-92, 1941.

HALL, M.C. Notes in regard to bots, *Gastrophilus* spp. **American Journal of Veterinary Research.** Med. Assoc. 52, 177-184, 1917.

HALL, M.C.; FOSTER, W.D. Efficacy of some anthelmintics. **Journal of Agricultural Research.** 12, 397-447, 1918.

HALL, M.C.; WILSON, R.H.; WIGDOR, M. The anthelmintic treatment of equine intestinal strongylidosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** 54 (new series 7), 47-55, 1918.

HALL, M.C.; SMEAD, M.J.; WOLF, C.F. Studies on anthelmintics. II. The anthelmintic and insecticidal value of carbon bisulphide against gastro-intestinal parasites of the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** 55 (new series 8), 543-549, 1919.

HERD R.P.; MILLER T.B.; GABEL A.A. A field evaluation of pro-benzimidazole, benzimidazole, and non-benzimidazole anthelmintics in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** 179, 686-691, 1981.

HERD, R.P.; MAJEWSKI, G.A. Comparison of daily and monthly pyrantel treatment in yearling thoroughbreds and protective effect of strategic medication of mares on their foals. **Veterinary Parasitology.** 55, 93-104, 1994.

HODGKINSON J.E.; LICHTENFELS J. R.; MAIR T. S.; CRIPPS P.; FREEMAN K. L.; RAMSEY Y. H.; LOVE S.; MATTHEWS J. B. A PCR-ELISA for the identification of cyathostomin fourth-stage larvae from clinical cases of larval cyathostomiasis. **International Journal for Parasitology.** 33, 1427-1437, 2003.

HODGKINSON J.E.; CLARK H.J.; KAPLAN R.M.; LAKE S.L.; MATTHEWS J.B. The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. **International Journal for Parasitology.** 38, 1149-1160, 2008.

KAPLAN, R. M. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. **Veterinary Research.** 33, 491-507, 2002.

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

KAPLAN, R.M., NIELSEN, M.K. An evidence-based approach to equine parasite control: it ain't the 60s anymore. **Equine Veterinary Education**. 22,306-316, 2010.

KLEI, T.R.; CHAPMAN, M.R.; FRENCH, D.D.; TAYLOR, H.W. Evaluation of ivermectin at an elevated dose against encysted equine cyathostome larvae. **Veterinary Parasitology**. 47, 99-106, 1993.

KRECEK, R.C.; MALAN, F.S.; REINECKE, R.K.; DE VOS, V. Nematode parasites from Burchell's zebras in South Africa. **Journal of Wildlife Diseases**. 23, 404-411, 1987.

LICHTENFELS, J.R.; KHARCHENKO, V.A.; KRECEK, R.C.; GIBBONS, L.M. An annotated checklist, by genus and species, of 93 species level names for 51 recognized species of small strongyles (Nematoda: Strongyloidea: Cyathostomina) of horses, asses and zebras of the world. **Veterinary Parasitology**. 79, 65-79, 1998.

LOVE, S.; MURPHY, D.; MELLOR, D. Pathogenicity of cyathostome infection. **Veterinary Parasitology**. 31, 113-122, 1999.

LYONS, E.T.; DRUDGE, J.H.; TOLLIVER, S.C.; GRANSTROM, D.E. Anthelmintic resistance in equids. Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs Round Table. **Vllth Int. Cong. Parasitol.**, Paris, 1990, MSD Agvet, Rahway, NJ. 67-80, 1990.

LYONS, E.T.; SWERCZEK, T.W.; TOLLIVER, S.C.; DRUDGE, J.H.; STAMPER, S.; GRANSTROM, D.E.; HOLLAND, R.E. A study of natural infections of encysted small strongyles in a horse herd in Kentucky. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 89, 1146-1149; 1152-1155, 1994.

LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., DRUDGE, J.H., STAMPER, S., SWERCZEK, T.W., GRANSTROM, D.E. A study (1977-1992) of population dynamics of endoparasites featuring benzimidazole resistant small strongyles (Population S) in Shetland ponies. **Veterinary Parasitology**. 66, 75-86, 1996.

LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., DRUDGE, J.H. Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. **Veterinary Parasitology**. 85, 97- 112, 1999.

MARTIN-DOWNUM K.; YAZWINSKI T.; TUCKER C.; FINCHER M.; RALPH J.; HAMILTON J. Cyathostome fecal egg count trends in horses treated with moxidectin, ivermectin or fenbendazole. **Veterinary Parasitology**. 101, 75-79, 2001.

MATTHEWS, J.B. An update on cyathostomins: anthelmintic resistance and worm control. **Equine Veterinary Education**. 20, 552-560, 2008.

MATTHEWS, J.B. Facing the threat of equine parasitic disease. **Equine Veterinary**

Journal. 43, 126–132, 2011.

MATTHEWS, J.B.; McARTHUR, C.; ROBINSON, A.; JACKSON, F. The in vitro diagnosis of anthelmintic resistance in cyathostomins. **Veterinary Parasitology.** 185, 25-31, 2012.

MATTHEWS, J. B. Anthelmintic resistance in equine nematodes. **International Journal for Parasitology.** 4, 310-315, 2014.

MOLENTO M. B. Resistência parasitária em helmintos de equinos e propostas de manejo. **Ciência Rural.** 35, 1469-1477, 2005.

MOLENTO M.B.; ANTUNES J.; BENTES R.N. COLES G.C. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. **Veterinary Record.** 162(12):384-5, 2008.

MOLENTO, M.B.; NIELSEN, M.K.; KAPLAN, R.M. Resistance to avermectin/milbemycin anthelmintics in equine cyathostomins-Current situation. **Veterinary Parasitology.** 185, 16-24, 2012.

MONAHAN, C.M.; CHAPMAN, M.R.; TAYLOR, H.W.; FRENCH, D.D.; KLEI, T.R. Comparison of moxidectin oral gel and ivermectin oral paste against a spectrum of internal parasites of ponies with special attention to encysted cyathostome larvae. **Veterinary Parasitology.** 63, 225-235, 1996.

MOTTIER, M.L.; PRICHARD, R.K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenet Genomics.** 18, 129-140, 2008.

NIELSEN, M.K., KAPLAN, R.M., THAMSBORG, S.M., MONRAD, J., OLSEN, S.N. Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. **Veterinary Journal.** 174, 23-32, 2007.

NIELSEN, M. K.; REINEMEYER, C. R.; DONECKER, J. M.; LEATHWICK, D. M.; MARCHIONDO, A. A.; KAPLAN, K. M. Anthelmintic resistance in equine parasites-Current evidence and knowledge gaps. **Veterinary Parasitology.** (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.030>

PEREGRINE, A. S.; MOLENTO, M.B., KAPLAN, R. M., NIELSEN, M. K. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter? **Veterinary Parasitology.** (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.004>

PEREGRINE, A.S.; MCEWEN, B.; BIENZLE, D.; KOCH, T.G.; WEESE, J.S. Larval cyathostomiasis in horses in Ontario: An emerging disease? **Canadian Journal of Veterinary.** 46, 80-82, 2005.

PEREGRINE A.S.; MCEVAN B.; BIENZLE D.; KOCH T.G.; WEESE J.S. Larval cyathostomiasis in horses in Ontario: An emerging disease? **Canadian Journal of Veterinary**. 47, 80-82, 2006.

POYNTER, D.; HUGHES, D.L. Phenothiazine and piperazine, an efficient anthelmintic mixture for horses. **Veterinary Record**. 70, 1183-188, 1958.

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

PROUDMAN, C.J.; MATTHEWS, J.B. Control of intestinal parasites in horses. **In Practice**. 22, 90-97, 2000.

REINEMEYER, C.R.; SMITH, S.A.; GABEL, A.A.; HERD, R.P. The prevalence and intensity of internal parasites in horses in the U.S.A. **Veterinary Parasitology**. 15, 75-83, 1984.

REW R.S.; FETTERER R.H. Mode of action of antinematodal drugs. In: Campbell RC, Rew RS (eds) **Chemotherapy of parasitic diseases**. Plenum, New York, pp 321–337, 1986.

SANGSTER, N.C. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? **Veterinary Parasitology**. 85, 189-204, 1999.

SANGSTER, N.; BATTERHAM, H.; CHAPMAN, D.; DURAISINGH, M.; LE JAMBRE, L.; SHIRLEY, M.; UPCROFT, J.; UPCROFT P. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. **International Journal for Parasitology**. 32, 637-653, 2002.

SCHRÖDER, J.; SWAN, G.E. Ivermectin as an antiparasitic agent in horses. **Journal of the South African Veterinary Association**. 53, 127-128, 1982.

TAYLOR, M. A., COOP, R. L., WALL, R. L. **Veterinary Parasitology**. Third edition: Blackwell Publishing Editorial. 2007.

TODD, A.C.; HANSEN, M.F.; WYANT, Z.N.; KELLEY, G.W.; CROWDUS, D.H. Continuous low-level versus periodic phenothiazine therapy for thoroughbred yearlings, **Ky. Agr. Exp. Sta. Bul.** 545, 8, 1950.

TRAVERSA, D. The little-known scenario of anthelmintic resistance in equine cyathostomes in Italy. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*: **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1149, 167-169, 2008.

TRAVERSA D.; SAMSON-HIMMELSTJERNA G.V.; JANINA D.; PIERMARINO M.; SCHÜRMAN S.; BARNES H.; OTRANTO D.; PERRUCCI S.; REGALBONO A.F.; PAOLA B.; BOECKH A.; COBB R. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. **Parasites &**

Vectors. Suppl 2: S2, 2009.

UHLINGER C.A.; KRISTULA M. Effects of alternation of drug classes on the development of oxibendazole resistance in a herd of horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** 201,51-55, 1992.

VALDEZ, R.A.; DIPIETRO, J.A.; PAUL, A.J.; LOCK, T.F.; HUNGERFORD, L.L.; TODD, K.S. Controlled efficacy study of the bioequivalence of Strongid® C and generic pyrantel tartrate in horses. **Veterinary Parasitology.** 60, 83-102, 1995.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Anthelmintic resistance in equine parasites – detection, potential clinical relevance and implications for control. **Veterinary Parasitology.** 185, 2-8, 2012.

WALLER, P. Nematode parasite control of livestock in the tropics/subtropics: the need for novel approaches. **International Journal for Parasitology.** 27, 1193-1201, 1997.

WALLER, P.J.; PRICHARD, R.K. Drug resistance in nematodes. **In Chemotherapy of Parasitic Diseases** (Campbell, W.C. and Rew, R.S.eds), 339-362, 1986.

YOUNG, K.E., GARZA, V., SNOWDEN, K., DOBSON, R., POWELL, D., CRAIG, T.M. Parasite diversity and anthelmintic resistance in two herds of horses. **Veterinary Parasitology.** 85, 205-214, 1999.

2. Simplified Method for Isolation of Genomic DNA from Cyathostomin Adult Parasites

Artigo submetido à Revista *Molecular and Biochemical Parasitology*

Short Communication:

Simplified Method for Isolation of Genomic DNA from Cyathostomin Adult Parasites

Juliana B. Ishii^{1*}, Amilcar A. Cruz², Marcelo B. Molento^{1,3}

1. Laboratory of Parasitic Diseases, Federal University of Parana. Curitiba, PR, Brazil

2. Laboratory of Biochemistry, University of Camaguey, Camaguey, Cuba

3. National Institute of Science and Technology, INCT-Pecuaria. Belo Horizonte, MG. Brazil

*Corresponding author: *Laboratory of Parasitic Diseases, UFPR. Rua dos Funcionários, 1540. CEP: 80.050-035. Curitiba, Brazil. E-mail: julianabana@yahoo.com.br*

Received xx; Revised xx; Accepted xx

Keywords: Nematoda/Strongylida; Horse; Genomic material

Cyathostomins (Strongylida), known as small strongyles, are the most common and important group of large intestinal nematodes (1,2) infecting horses worldwide, with virtually 100% of the animals infected with at least some species of cyathostomins (3).

Infection with adults can cause intermittent diarrhea, weight loss, lethargy, loss of appetite and peripheral edema (4) but the most pathogenic life stage is the larvae, especially as a result of a mass emergence of the fourth stage (L4) from the

Abbreviations: L4, fourth stage larvae. MLs, macrocyclic lactones.

*Corresponding author: +55-41-33505618; fax: +55-41-33505623; email: julianabana@yahoo.com.br

intestinal wall. This potentially fatal condition is known as larval cyathostomiasis and can result in severe colitis, blood loss, enteropathy, acute diarrhea, and subcutaneous edema (5).

The control of infections generally relies on the regular anthelmintic treatment. Presently, the most common drugs used to control cyathostome infections belong to three anthelmintic classes: the benzimidazoles (e.g. fenbendazole and oxbendazole), the tetrahydropyrimidine (pyrantel pamoate), and the macrocyclic lactones (MLs, ivermectin, abamectin, and moxidectin). Although the MLs are long-acting drugs they are used within short intervals (6). This control strategy imposes a high selection pressure to the population and is associated with the development of anthelmintic resistance (6,7).

Anthelmintic resistance has been reported worldwide and is emerging as one of the most serious problems to cyathostome control, creating a challenge to equine health programs (7). In Brazil, multidrug resistant cyathostomes are highly prevalent (8) and the lack of alternative treatments will make accurate diagnosis of anthelmintic resistance increasingly important (9).

Therefore, experiments with this family of parasites have become progressively important to provide their monitoring and control strategies, as well as, to better understand their epidemiology.

The aim of the present study was to develop a faster and more economic assay for isolation of genomic DNA from the adult stage of Cyathostomin parasites than reported (10) to skip steps and still be effective for DNA extraction.

Ten adult parasites were collected from a single horse from a farm in São José dos Pinhais, PR, Brazil. All worms were immediately washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and stored in Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at -20° C. Genomic DNA was isolated from each adult parasite using a modified phenol-chloroform extraction method as follows.

Adult parasites were placed in a microcentrifuge tube where 500 µl of extraction buffer containing 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M EDTA (pH 8.0), 5 M NaCl, 20% SDS, 1 M DTT, and 20 mg/ml Proteinase K were added. The tube was placed in an incubator at 56° C for 2 h, mixing at every 30 minutes. The sample was treated with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and homogenized. After centrifugation at 1300 xg for 5 min, the surface, which contained the DNA material was transferred to another microtube. We then added 1 ml of

absolute ethanol at 8°C and the solution was mixed for 30 min. After another centrifugation at 1300 *xg* for 10 min at 5°C, the supernatant was discarded and 1 ml of 70% ethanol at 8°C was added to the sample. After the third centrifugation at 1300 *xg* for 2 min at 5°C, the supernatant was discarded and the microcentrifuge tube was inverted on a paper filter for 3 h to dry the DNA pellet. The pellet was resuspended in 50 µl of ultrapure water. The DNA concentration was measured (Table 1), and the quality and integrity of the isolated DNA was tested in a 0.8% agarose gel electrophoresis.

Table 1

Yield of genomic DNA material extracted from 10 *Cyathostomin* adult parasites.

Cyathostomin adult parasites	Genomic material concentration (ng/ml)
1	2.4×10^4
2	1.1×10^4
3	9.8×10^3
4	4.3×10^4
5	1.0×10^4
6	3.8×10^4
7	2.6×10^4
8	1.9×10^4
9	7.3×10^3
10	2.7×10^4

Quite a few protocols for the isolation of genomic DNA from *Cyathostomin* adult parasites have been reported and almost all of them include freezing with nitrogen (11). The DNA isolation procedure that eliminates the requirement of the liquid nitrogen step was accurate and economical, and can be used mainly in areas where obtaining liquid nitrogen is a limitation. All the other protocols are laborious and time-consuming, making them limited in their application. In this report, a very simple, fast, reproducible and effective procedure was developed.

We got a good DNA quality with this standardized procedure developed to reduce the number of steps and manipulations, using smaller quantities of reagents. This is especially convenient if several samples are going to be prepared in parallel.

As a result of this analysis, we propose a modified method, which will contribute to assays that require DNA extracted from adult worms, like the determination of genomic DNA sequences from species of cyathostomin, or species-specific identification of equine small strongyles (12). Also, it could represent a basic step toward the development of a rapid and simple molecular test for the early detection of drug resistant genotypes of horse strongyle species.

References

1. Love S, Murphy D, Mellor D: **Pathogenicity of cyathostome infection.** *Vet. Parasitol.* 1999, **85**:113-122.
2. Kaplan R M: **Anthelmintic resistance in nematodes of horses.** *Vet. Res.* 2002, **33**:491-507.
3. Molento MB, Nielsen MK, Kaplan RM: **Resistance to avermectin/milbemycin anthelmintics in equine cyathostomins-Current situation.** *Vet. Parasitol.* 2012, **185**, 16-24
4. Matthews AG, Morris JR: **Cyathostomiasis in horses.** *Vet. Rec.* 1995, **136**, 52.
5. Lyons ET, Tolliver SC, Drudge JH: **Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs.** *Vet. Parasitol.* 1999, **85**, 97-112.
6. Canever RJ, Braga PRC, Boeckh A, Grycajuck M, Bier D, Molento MB: **Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil.** *Vet. Parasitol.* 2013, **194**: 35-39.
7. Peregrine AS, Molento MB, Kaplan RM, Nielsen MK: **Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter?** *Vet. Parasitol.* 2014.
8. Molento MB, Antunes J, Bentes RN, Coles GC: **Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses.** *Vet. Rec.* 2008, **162**:384-385.
9. Kaplan RM, Vidyashankar AN: **An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance.** *Vet. Parasitol.* 2012, **186**: 70-78.
10. Hodgkinson JE, Lichtenfels JR, Mair TS, Cripps P, Freeman KL, Ramsey YH, Love SE, Matthews JB: **A PCR-ELISA for the identification of cyathostomin fourth-stage larvae from clinical cases of larval cyathostominosis.** *Int. J. Parasitol.* 2003, **33**:1427-35.
11. Zhu H, Qu F, Zhu LH: **Isolation of genomic DNAs.** *Nucleic Acids Researches* 1993, **21**, 5279 – 5280.
12. Traversa D, Iorio R, Klei TR, Kharchenko VA, Gawor J, Otranto D, Sparagano OEA: **New Method for Simultaneous Species-Specific Identification of Equine strongyles (Nematoda, Strongylida) by Reverse Line Blot Hybridization.** *Journal of Clinical Microbiology* 2007, **45**: 2937–2942. (12)

3. Molecular diagnostic assay of resistance allele in beta-tubulin isotype 1 codon 167 from 173 individual third-stage larvae of cyathostomin from horses with naturally acquired infections

Artigo a ser submetido à Revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Qualis CAPES-A2

Molecular diagnostic assay of resistance allele in beta-tubulin isotype 1 codon 167 from 173 individual third-stage larvae of cyathostomin from horses with naturally acquired infections¹

Juliana Bana Ishii², Aline Felix², Úrsula Yoshitani², Amilcar Arenal Cruz³, Marcelo Beltrão Molento^{2,4*}

ABSTRACT.- Ishii J.B., Felix A., Yoshitani U., Cruz A.A., & Molento M.B. 2014. **[Molecular diagnostic assay of resistance allele in Beta-tubulin isotype I codon 167 from 173 individual third-stage larvae of cyathostomins from horses with naturally acquires infections.]**- Diagnóstico molecular de alelos resistentes no códon 167 do gene da Beta-tubulina em 173 larvas individuais de terceiro estágio de ciatostomíneos provenientes de cavalos naturalmente infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil. E-mail: molento@ufpr.br

The cyathostomins, also called small strongyles, are considered the most prevalent and pathogenic parasites of horses, causing the larval cyathostominosis syndrome. Parasite control is made by the use of large spectrum anthelmintics in short intervals. Anthelmintic resistance is a serious problem for the control of equine gastrointestinal nematodes, particularly in the cyathostomins, and there is a need to find means for the diagnostic and control of these parasites. Studies of benzimidazole (BZ) resistant nematodes have indicated that anthelmintic resistance is conferred by the T/A polymorphism; encoding a phenylalanine to tyrosine substitution, in the isotype 1 of the Beta-tubulin, present at codons 167 and 200. In the present survey, 173 third stage larvae of cyathostomins were investigated from three different locations for the presence of the resistant genotype at codon 167, as it is the most prevalent mutation. The larvae from the state of Paraná, São Paulo and

Santa Catarina, showed 61.2; 31.5 and 38.5% of the heterozygous (HT) resistant genotype TTC/TAC, respectively. The phylogenetic tree revealed that these two populations were separated in distinct clusters, facilitating the alignment interpretation. The present results showed that due to the high prevalence of the resistant gene by PCR technique in cyathostomins, this could be used as a routine diagnostic tool in reference laboratories for the determination of the possible reduction of efficacy to the BZs.

INDEX TERMS: parasite control, equine, small strongyles, benzimidazole.

RESUMO.- Os ciatostomíneos, chamados de pequenos estrôngilos, são considerados os parasitos mais prevalentes e patogênicos em equinos, causando a síndrome clínica de ciatostomíase larval. O controle desses parasitos é feito com o uso de medicamentos de largo espectro em curtos intervalos. A resistência aos anti-helmínticos é um sério problema em nematóides gastrintestinais de equinos, particularmente nos ciatostomíneos, existindo a necessidade de encontrar meios para o diagnóstico e controle eficaz. Estudos em nematoides resistentes ao benzimidazol (BZ) tem mostrado que a resistência é devido ao polimorfismo T/A, que substitui o aminoácido fenilalanina para tirosina, no isotipo 1 da beta-tubulina, presente nos códons 167 e 200. No presente estudo, 173 larvas de terceiro estágio de ciatostomíneos foram avaliadas de três locais diferentes para identificar a mutação no códon 167, por ser a mais prevalente. Das larvas provenientes do estado do Paraná, São Paulo e Santa Catarina, 61,2; 31,5 e 38,5% apresentaram o genótipo heterozigoto resistente TTC/TAC, respectivamente. As árvores filogenéticas revelaram que as duas populações foram separadas em grupos distintos, facilitando a interpretação dos alinhamentos. Os achados demonstram que devido a alta ocorrência do gene da resistência pela técnica de PCR em ciatostomíneos, a mesma possa ser utilizada como diagnóstico de rotina em laboratórios de referência para determinar a possível redução da eficácia dos BZs.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: controle parasitário, equino, pequenos estrôngilos, benzimidazol.

1 Recebido em

Aceito para publicação em

2 Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, UFPR, R: dos Funcionários 1540, Curitiba, PR, CEP: 80035-050, Brazil. *Autor para correspondência: molento@ufpr.br

3 Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz". Circunvalación Norte. Camagüey. Cuba.

4 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Pecuária, Belo Horizonte, MG.

INTRODUCTION

Cyathostomins (*Nematoda, Strongylida*), commonly known as small strongyles, are the commonest and pathogenically significant group of intestinal nematodes affecting horses worldwide (Corning *et al.* 2009; Lichtenfels *et al.* 2001). Although there are more than 50 species of cyathostomins involved in parasitism of horses, some 10 species were reported to be the most prevalent (Lyons *et al.* 1999). Like many other nematodes, cyathostomins have a direct lifecycle with no intermediate host (Corning *et al.* 2009). The eggs of this group of parasites passed through the faeces onto pasture, where they develop to the infective third larval stage (L3). The L3s change to fourth stage (L4) in the intestinal wall, emerging into the intestinal lumen, where continues its development to the adult stage (Murphy & Love 2000).

The development of a low number of larvae does not have a significant impact on horse health, but the larval cyathostomins encyst in the large intestinal mucosa and their synchronous emergence from the colon and caecum wall cause a life threatening syndrome known as larval cyathostominosis. Such disease is characterized by protein-losing enteropathy, chronic diarrhea, important weight loss, edema, severe colitis and may be fatal (Peregrine *et al.* 2006). Usually young animals of one year old have higher rates of clinical signs and parasite load (Love *et al.* 1999).

The control of these parasites is a challenge by the presence of multiple species, the ability of larvae to undergo hypobiosis in the large intestinal mucosa, as well as by their ability to develop resistance to anthelmintic agents. (Lake *et al.* 2009). Cyathostomins infections have traditionally been controlled with anthelmintics, but frequent anthelmintic treatments combined with their inadequate continued use over time have resulted in considerable selection pressure for resistance (Molento 2005). The anthelmintic treatment suppresses susceptible organisms by eliminating them, causing a slow shift to the parasite population. Thus, only the individuals that harbor the resistance trait will be able to pass or inherited as a future generation. Therefore, the genetic profile of the parasite population may end up with a specific reduction in the susceptible alleles revealing the lack of anthelmintic efficacy (Dargatz *et al.* 2000; Molento 2005). In recent years, in which anthelmintic resistance

has grown, parasites resistant to multiple drugs are prevalent in many parts of the world, threatening the animal's health (Molento *et al.* 2008, Kaplan & Vidyashankar 2012, Canever *et al.* 2013). As cyathostomes have become more prominent, and as resistance limits parasite control, the detection of anthelmintic resistance in cyathostomes has become an important issue.

The BZs are used for the cyathostome control for over 40 years, and genetic resistance against BZ anthelmintics is widespread in cyathostomins. Aguayo-Ortiz *et al.* (2013) in a molecular studies of the BZ target molecule, beta-tubulin isotype 1, have revealed a single nucleotide polymorphism (SNP) an A to T transversion, resulting in a phenylalanine (Phe) to tyrosine (Tyr) substitution at codon 167 in BZ resistant parasite. The authors' suggested that this substitution may be the primary and the main mechanism of BZ resistance (Silvestre & Cabaret 2002). Another phenylalanine-to-tyrosine substitution (TTC to TAC) believed to cause resistance to BZs is found at codon 200 of beta-tubulin isotype 1 (Drogemuller *et al.* 2004), and a third polymorphic site associated with BZ resistance, a mutation of a glutamic acid to alanine, has been identified at codon 198, which is less frequent (Blackhall 2011).

The beta-tubulin is a globular protein which is polymerized into microtubules. The Bz inhibit the microtubule polymerization mechanism through binding selectively to the beta-tubulin subunit in which mutations have been identified that lead to drug resistance, and inhibit the assembly of all cellular microtubules and block all microtubule functions (Clark *et al.* 2005; Lubega & Prichard 1990). Blackhall and von Samson-Himmelstjerna (2011) evaluated the beta-tubulin 1 and 2 genotypes in six species of cyathostomins from horses in Ukraine, and they suggested that a polymorphism at codon 167 appears to be more common than the codon 200 polymorphism. These findings further support the predominant association of beta-tubulin isotype 1 in codon 167 with BZ resistance in cyathostomins.

Although the faecal egg count reduction test (FECRT) is suitable for assist in monitoring the resistance nematodes (Von Samson-Himmelstjerna 2012), there is a growing need to use molecular assays to detect resistant parasites (Kaplan 2004, Nielsen *et al.* 2013). This work had the objective to develop a rapid and accurate molecular diagnosis for the detection of BZ resistant genotypes of horse strongyle

species, and to determine the distance in between susceptible and resistant populations.

MATERIAL AND METHODS

Origin of samples

Cyathostomes adult parasites were collected from a single horse from a farm in São Jose dos Pinhais, PR, Brazil. The L3s were harvested through faecal culture technic performed with horse faeces sent to the Parasitic Diseases Laboratory, Department of Veterinary Medicine of the Universidade Federal do Paraná. The 173 samples came from three distinct properties: the city of Tijucas do Sul, in the state of Paraná (n= 67), Quadra, in São Paulo (n= 54), and Campo Alegre, in the state of Santa Catarina (n= 52).

DNA extraction

The extraction of DNA from cyathostomes adult parasites for the preparation of the positive control was carried out in order to verify the occurrence of polymerase chain reaction. Adult parasites were placed in a microcentrifuge tube where 500 µl of extraction buffer containing 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M EDTA (pH 8.0), 5 M NaCl, 20% SDS, 1 M DTT, and 20 mg/ml Proteinase K were added. The tube was placed in an incubator at 56° C for 2 h, mixing at every 30 minutes. The sample was treated with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and homogenized. After centrifugation at 1300 *xg* for 5 min, the surface, which contained the DNA material, was transferred to another microtube. We then added 1 ml of absolute ethanol at 8°C and the solution was mixed for 30 min. After another centrifugation at 1300 *xg* for 10 min at 5°C, the supernatant was discarded and 1 ml of 70% ethanol at 8°C was added to the sample. After the third centrifugation at 1300 *xg* for 2 min at 5°C, the supernatant was discarded and the microcentrifuge tube was inverted on a paper filter for 3 h to dry the DNA pellet. The pellet was resuspended in 50 µl of ultrapure water.

Isolation of genomic DNA from individual L3

Cyathostomin L3s were exsheathed in 0.05% sodium hypochlorite solution for 10 min. Then, washed twice in PBS 1 X and centrifuged at 1000 g for 2 min. Individual larvae were then transferred to 0.2 ml centrifuge tubes containing lysis buffer (50mM KCl, 10 mM Tris pH 8.4, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% Tween-20 and 100 μ g/ml Proteinase K), frozen at -20°C for 20 min then incubated for 3 h at 60°C. Proteinase K was inactivated following lysis by heating to 94°C for 15 min.

Polymerase chain reaction (PCR)

For the amplification of the codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 gene of cyathostomin larvae, the primers Horse167F and Horse167R were used (Table 1) resulting in a fragment of 120 bp. Each reaction was carried out with 12.5 μ l of product from isolation of genomic DNA from individual L3, 0.2 pmol/ml of each primer, 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ l of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen™Life Technologies, EUA), 0.2 mM of dNTP and sterile ultrapure water to a final volume of 50 μ l.

Amplification was performed under the following conditions of time and temperature: a step of 5 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 30 seconds at 95 °C, 30 seconds at 53 °C, 30 seconds at 72 °C, and a final step of 5 min at 72 °C. 10 μ l of PCR product were resolved by agarose gel electrophoresis 2% with SYBR® Safe DNA Gel Stain, in TBE pH 8.4 under constant voltage (90 V) for 35 min. The gel was visualized through UV light (Figure 1).

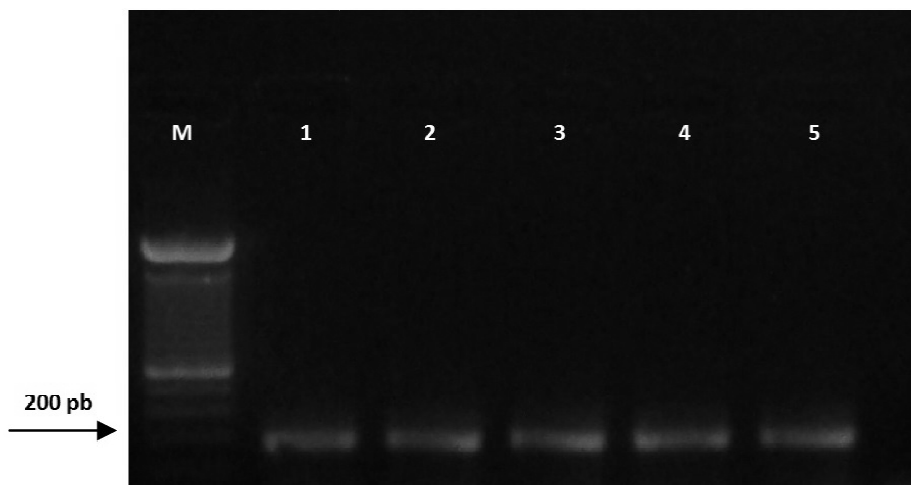


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 polymerase gene amplified with primer pair Horse 167 F and Horse 167 R by PCR assay, from individual L3 samples. M: Quantitative ladder. Lanes 1-5: Samples with ~ 120bp.

Sequencing

PCR products were purified using the commercial kit comercial PureLink[®] Quick Gel Extraction (Invitrogen) and subsequently sent to the Myleus Biotechnology Company, in Belo Horizonte city, MG, for sequencing with the forward and reverse primers in Table 1.

Table 1. Primers pairs used in the polymerase chain reaction to identify the codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 polymerase gene of cyathostomin.

Primer ^a	Sequence
Horse 167 F	5'-GCTAACTCACTCACTTGGAGGA-3'
Horse 167 R	5'-CTTTGGTGAGGGAACAACG-3'

^a Blackhall et al. 2011.

Bioinformatics: Alignment of the sequences and phylogenetic analysis

The quality of the sequences was evaluated with the *software* Vector NTI Suite 7 and the products were blasted and aligned with the GenBank database

published sequence AY666162.1. (NCBI/PUBMED, National Institute of Health, Bethesda, EUA) published by Clark *et al.* (2005). The alignment of the nucleotide sequences was performed using the *software* BioEdit 7.0.5. Although the sequencing obtained 120 bp, the total length of the alignment was 17 amino acids, in order to focus on the region 167 codon region. The genotype frequencies were analyzed statistically by the χ^2 test.

Molecular phylogenetics tree were generated by using Vector NTI Suite 7 software, using samples susceptible homozygous (HZ) genotype, TTC/TTC, and HT resistant genotype, TTC/TAC, from each property.

Consensus sequence

A consensus sequence for the region encoding 167 was generated from L3 sequences isolate, and was produced from 15 HT resistant samples, 15 HZ susceptible samples and the standard sequence (GenBank: AY666162.1). The sequence degeneracy identified, even if present in only one individual, was accepted and subsequently represented in the consensus sequence. Consensus sequence and alignments were generated using the *software* Vector NTI Suite 7.

RESULTS

The amplification of 120 bp segment expected size to codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 gene was obtained in 173 larvae and adult sample. Table 2 shows the alignment of 18 samples with the standard sequence (GenBank: AY666162.1), three susceptible HZ TTC/TTC, and three HT resistant TAC/TTC chosen randomly from each property. The frequency and the distribution of the genotypes from all the different farms is shown in table 3. The samples from the state of Paraná, 41 showed the HT resistant genotype, TTC/TAC, and 26 showed HZ susceptible genotype, TTC/TTC.

Table 2. Alignment of 18 samples of cyathostomin sequences from nine homozygous susceptible genotype (HZ) and nine heterozygous resistant genotype samples (HT), compared with a sequence* deposited in the GenBank database.

Samples	Partial Sequences
Beta-tubulin Isotype 1 (AY666162.1*)	ATGTCCTCG(TAC/TAC)TCCGTTGTCC
HT PR 01	ATGTCCTCG(TTC/TAC)TCCGT- GTTCC
HT PR 02	ATGACCTCG(TTC/TAC)TCCGTAGTCC
HT PR 03	ATGTCCTCG(TTC/TAC)TCCGTTGTGCC
HT SC 01	ATGTCCTCG(TTC/TAC)TCCGTTGAACCA
HT SC 02	ATGTCCTCG(TTC/TAC)TCCGTTGTCC
HT SC 03	ATGTCCTCA(TTC/TAC)TCCGTTGTCC
HT SP 01	ATGTCCTCG(TTC/TAC)TCCGTTGTCC
HT SP 02	ATGTCCTCA(TTC/TAC)TCCGTTGTCC
HT SP 03	ATGTCCTCG(TTC/TAC)TCCGTAGAACCC
HZ PR 01	ATGTCCTCG(TTC/TTC)TCCGTAGTCC
HZ PR 02	ATGTCCTCG(TTC/TTC)TCCGAAGTCC
HZ PR 03	ATGTCCTCA(TTC/TTC)TCCGTAGTCC
HZ SC 01	ATGTCCTCG(TTC/TTC)TCCGTAGTACC
HZ SC 02	ATGTCCTCG(TTC/TTC)TCCCTAGTCC
HZ SC 03	ATGTCCTCG(TTC/TTC)TCAAAAGTCC
HZ SP 01	ATGTCCTCG(TTC/TTC)TCAAAAGTCC
HZ SP 02	ATGTCCTCG(TTC/TTC)TCCGTAGATCC
HZ SP 03	ATGTCCTCG(TTC/TTC)TCCGTAGTGCC

Table 3. Genotypic distribution of cyathostomin L3 according to the origin of the samples.

Local	Genotype			Total
	Homozygous susceptible (TTC/TTC)	Heterozygous resistant (TTC/TAC)	Homozygous resistant (TAC/TAC)	
Paraná	26 (38.8%)	41 (61.2%)	0 (0%)	67
São Paulo	37 (68.5%)	17 (31.5%)	0 (0%)	54
Santa Catarina	32 (61.5%)	20 (38.5%)	0 (0%)	52
Total	95 (55%)	78 (45%)	0 (0%)	173

In São Paulo, 17 samples had a double peak under the expression nucleotide in codon 167, TTC/TAC (Figure 2), and 37 expressed HZ susceptible genotype, TTC/TTC. The samples from Santa Catarina property, 20 showed the HT resistant genotype, TTC/TAC, and 32 HZ susceptible genotype, TTC/TTC. In any sample was observed HZ resistant genotype, TAC/TAC (Table 3). The figures 3a, 3b and 3c show that, in general, resistant samples are separated into different cluster of susceptible samples, representing the moment of isolation of the strains. Consensus sequence showed that the region 167 is relatively conserved in L3 cyathostomin species, with minimal degeneracy (Figure 4).

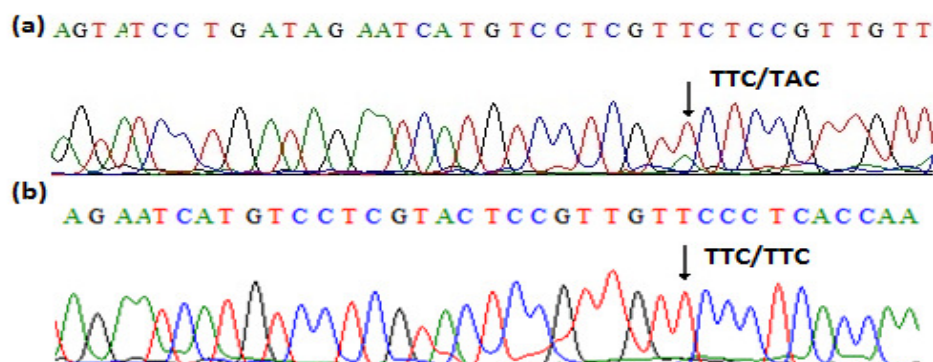
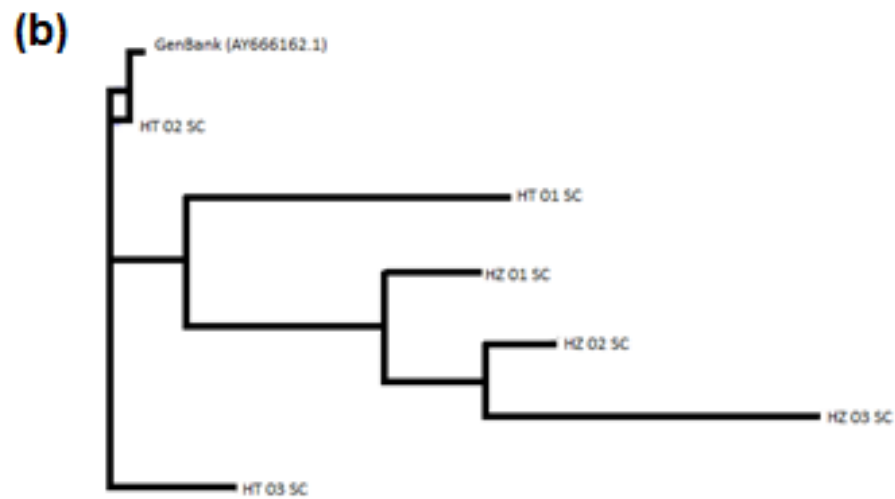
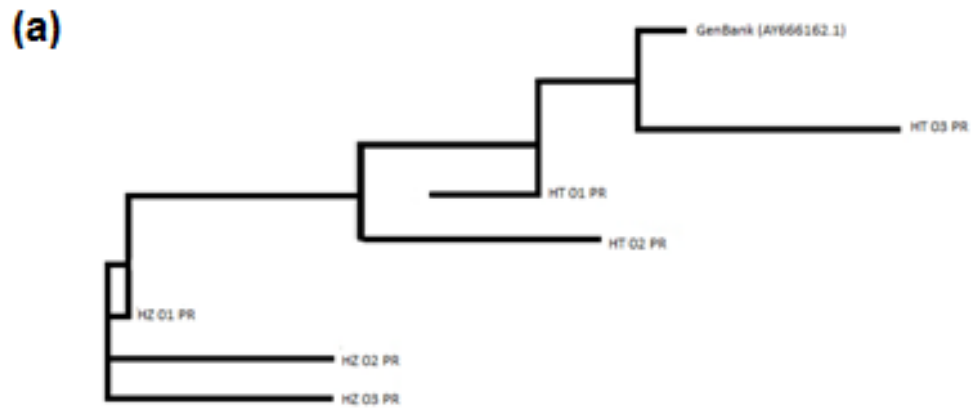


Fig.2. Chromatogram showing the double peak present at codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 gene in a heterozygous resistant sample, TTC/TAC (a). Chromatogram showing the

single peak present at codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 gene in a homozygous susceptible sample, TTC/TTC (b).



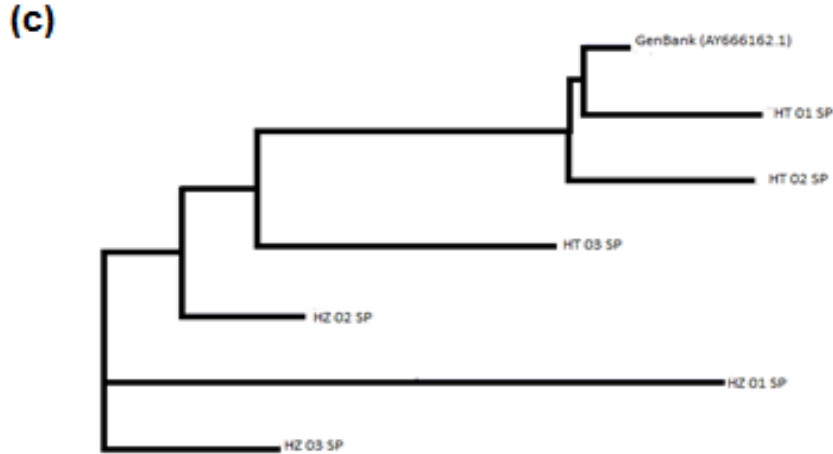


Fig.3. Phylogenetic trees reconstructed with random samples of cyathostomin L3. (a) Six random samples from the state of Paraná and the sequence obtained from the GenBank database (GenBank: AY666162.1). (b) Six random samples from the state of Santa Catarina and the sequence obtained from the GenBank database (GenBank: AY666162.1). (c) Six random samples from the state of São Paulo and the sequence obtained from the GenBank database (GenBank: AY666162.1). All the phylogenetic trees were reconstructed with three samples with the homozygous susceptible genotype (HZ), and three with the heterozygous resistant genotype (HT).

Betabulbina Isotipo	TCCTCATCTCCAAAATTTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTAC-TCC-GTTGTTCCC-TCACCAAAGT
HT PR a	TC-TCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGATTAGAATCCATGTCC-TCCGTWC-TCCGTGTTCCC-TCACCAAAGA
HT PR b	TCCTCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCC-GTTGTTCCC-TCACCAA-GA
HT PR c	TCCTCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCC-GTTGTTCCC-TCACCAAAGIT
HT PR d	TCCTCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCC-GTTGTTCCC-TCACCAA-GA
HT PR e	TCCTCATCTC--AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCA-GAAGTTCCC-TCACCAA-GA
HT SC a	---TCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCC-GA-GTTCCC-TCACCAA-GA
HT SC b	---TCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCC-GAAGTTCCC-TCACCAA-GA
HT SC c	TCCTCATCTC--AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCA-GAAGTTCCC-TCACCAA-GA
HT SC d	-C-TCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCC-GTTGTTCCC-TCACCAAAGG-
HT SC e	TCCTCATCTC--AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCA-GAAGTTCCC-TCACCAA-GA
HT SP a	TCCTCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCC-GA-GTTCCC-TCACCAA-GA
HT SP b	TCCTCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCC-GTAGTTCCC-TCACCAA-GA
HT SP c	TCCTCATCTC--AAATTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCA-GAAGTTCCC-TCACCAA-GA
HT SP d	TCCTCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC---TAGAGTTCCC-TCACCAA-GA
HT SP e	TCCTCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTWC-TCC-GTTGTTCCC-TCACCAA-GA
HZ PR a	TCCTCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATCCATGTCCCTCCGTTCCCTCCCGTTGTTCCC-TCACCAA-GA
HZ PR b	TCCTCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCGT-IGTTCCC-TCACCAA-GA
HZ PR c	TCCTCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCCGTTGTTCCC-TCACCAA-GA
HZ PR d	TCCTCATCTC--AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCC-GTTGTTCCC-TCACCAA-GA
HZ PR e	TATCTATCTC--AA-TTCGG-GAG-AGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCG---TGTACCC-TCACCAA-GA
HZ SC a	TCCTCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCGTGTGTGCCCATCACCAA-GA
HZ SC b	---TCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCGTGTGTCCC-TCACCAA-GA
HZ SC c	TCCTCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCGT-TCCACCAATCACCAA-GA
HZ SC d	TCCTCATCTCCAAA-TTCGGGTGAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCGT-IGTTCCC-TCACCAA-GA
HZ SC e	TCCTCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCGT-IGTTCCC-TCACCAA-GA
HZ SP a	---TCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC---TGGAGGGGCC-TCACCA-----
HZ SP b	---TCATCTCCAAA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCGT-IGTTCCC-TCACCAA-GA
HZ SP c	TCCTCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCGTGTGTGCCCATCACCAA-GA
HZ SP d	---TCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCGT-TGTCC---GCACCAA-GA
HZ SP e	TCCTCATCTCC-AA-TTCGG-GAGGAGTATCCTGAT-AGAATC-ATGTCC-TC-GTTC-TCCCGTTGTTCCC-TCACCAA-GA
Consensus	TCCTCATCTCC AA TTCGG GAGGAGTATCCTGAT AGAATC ATGTCC TC GTWC TCC G IGTTCCC TCACCAA GA

Fig.4. Multiple species/isolate alignment of nucleotide sequence for encoding codons 151-175. Consensus sequences were generated from the following sequences: São Paulo heterozygous

resistant samples (n= 5), São Paulo homozygous susceptible samples (n= 5), Paraná heterozygous resistant samples (n= 5), Paraná homozygous susceptible samples (n= 5), Santa Catarina heterozygous resistant samples (n= 5), Santa Catarina homozygous susceptible samples (n= 5). Genotypes are represented as follows: HZ homozygous susceptible and HT heterozygous resistant. States are represented as follow: PR Paraná, SP São Paulo, SC Santa Catarina. Relevant nucleotid code: W=A/T. The mark shows the codon 167. The consensus sequence is shown at the bottom of the alignment.

Appendix 1 to 3 show the evolutionary relationships represented in the form of phylogenetic trees, and describe the relationships between the sequences according to the transmission of the resistant gene from a common ancestor to their descendants, in the three different locations. Appendix 4 shows that sequences from different location mingled with each other, this was probably because the region 167 has minimal degeneracy between the species. The Appendix 5 shows more polymorphisms among samples when compared to the appendix 6; this result is due to the specific selection of resistance genes.

DISCUSSION

The result of genotype polymorphism analysis in the beta-tubulin gene, performed in this study, showed that it is essential that the effectiveness of antiparasitic be monitored by molecular assays, in order to obtain an effective parasite control (Pook *et al.* 2002) and a rapid and early diagnostic test to detect resistance alleles from DNA samples isolated from parasites (Von Samson-Himmelstjerna & Blackhall 2005). The results by PCR demonstrated that, due to the high occurrence of resistance gene in cyathostomins, this test can be used as routine diagnostic in reference laboratories to determine the possible reduction in the efficiency of the BZs.

Previous studies on the molecular basis of BZ-resistance in cyathostomins that used the DNA derived from adult parasites are limited in their application, as they were usually recovered at necropsy (Hodgkinson *et al* 2008), and to a better understanding of the role of these mutations, it is essential to genotype large numbers of parasites. The present study highlights by reporting 173 genomic DNA

sequence from the beta-tubulin isotype 1 gene from three different isolates of cyathostomins, that the genetic assay developed here allows the analysis of changes in allele frequency in large populations of L3s under a direct selection pressure with the drug. Consequently this could clear the way for new analyzes that demonstrate the association of individual species with resistance (Hodgkinson *et al* 2008).

The determination of genotypes at codon 167 performed in this study, identified 78 HT resistant samples TTC/TAC (Table 3). Thus, the use of single-nucleotide polymorphisms (SNP) markers conferring the genotypic characteristic of resistant parasites provides a method for the detection of resistance to BZs in cyathostome populations in horses (Treversa *et al* 2008). Hodgkinson *et al.* (2008) and Lake *et al.* (2009) described the polymorphism, which involves a substitution of a phenylalanine with tyrosine (TTC to TAC) found at codon 167 of beta-tubulin isotype 1 in BZ resistant cyathostomins, as the main resistance-associated SNP, and it can be used as diagnostic studies in populations of individuals.

This research reported the presence of high percentages of L3 HT resistant (Figure 4), especially in the state of Paraná, showing that the presence of resistant cyathostomin populations is widespread in the evaluated properties. Previous studies have reported the presence of BZ-resistant cyathostomins in Brasil. Molento *et al.* (2008) and Canaver *et al.* (2013), using the FECRT, reported a reduction in the effectiveness of the febendazol against cyathostomin, and BZ-resistance in all the properties evaluated in the study, respectively. The data from these previous surveys, with the molecular results of this study, further support the increased concern about the anthelmintic resistance in cyathostomin, and provide more information in the direction of drug selection and alerts for more caution actions regarding parasite control strategies.

Lake *et al.* (2009) found HZ resistant samples TAC/TAC in the different evaluated properties, and showed a decrease in the HT TTC/TAC genotype post-BZ treatment, with a coincident increase in the frequency of the resistant allele in the samples. This study found no samples with the HZ genotype resistant TAC/TAC, but the resistant allele in HT contributes to increase levels of anthelmintic resistance as well as those of the HZ resistant genotype.

No sample was found with the resistant genotype possibly due to the fact that the parasites were not selected to phenotypic resistance characteristic with previous treatments for describing the mechanism of BZ-resistance in cyathostomins. Therefore, the evaluated properties had pasture containing infective larvae with the gene for resistance, but also a large population of larvae in refugia with HZ genes.

Molecular phylogenetic studies were performed in order to recover the order of evolutionary events, and represent them in evolutionary trees that graphically depict the phylogeny. Resistant samples are separated, in generally, into different cluster of susceptible samples, in the moment of isolation of the strains, indicating that the mutation promoted evolutionary change. Molecular comparison between resistant and susceptible samples identified, suggested the involvement of two variants and different ancestry between resistant and susceptible (Appendix 1-6).

In order to develop a robust diagnostic test to detect SNPs at Phe167Tyr in populations of cyathostomins L3 of unknown species, it was necessary to generate beta-tubulin isotype 1 sequence data from multiples isolates from distinct geographical locations. To this end, a consensus sequence for the region encoding 167 was generated from L3 sequences isolate. The 167 region consensus sequences obtained can be used to design primers for PCR and pyrosequencing. In this format, the assay to detect Phe167Tyr increase the success rate.

CONCLUSION

The experiment conducted to determine cyathostome L3 genotypes with mutation at codon 167 of the beta-tubulin isotype 1 gene facilitates the study of large population sizes under the direct selection pressure of BZs, either *in vivo* or *in vitro*. The data reported here supports the need to generate a molecular diagnostic assay for monitoring BZ resistance in field samples, detecting changes in the genetic trait of parasitic populations.

Although the development of anthelmintic resistance is a highly complex process of a set of variables, some strategies may be taken to identify risk factors for

development of anthelmintic resistance, and to the maintenance of anthelmintic susceptibility, in equine parasites. The implementation of selective treatment strategies, a regular monitoring of anthelmintic effectiveness and management practices that give priority to the parasite refugia population are actions that favor the parasite control and reduce the selection of resistant parasites.

Acknowledgements. – To the Brazilian Institutes CNPq, CAPES and Fundação Araucária for financial support.

REFERENCES

- Aguayo-Ortiz R., Méndez-Lucio O., Romo-Mancillas A., Castillo R., Yépez-Mulia L., Medina-Franco J. L., Hernández Campos A. 2013. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel-tubulinbinding site model. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 45, 26-37.
- Blackhall W.J., Drogemuller M., Schnieder T., Von Samson-Himmelstjerna G. 2006. Expression of recombinant β -tubulin alleles from *Cylicocyclus nassatus* (Cyathostominae). *Parasitology Research*. 99, 687-693.
- Blackhall W.J., Kuzmina T., Von Samson-Himmelstjerna. 2011. β -tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naïve Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. *Parasitology Research*. 109,1199-1203.
- Canever R. J., Braga P. R. C., Boeckh A., Grycajuck M., Bier D., Molento M. B. 2013. Lack of *Cyathostomum* sp. Reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 194, 35-39.
- Clark H. J., Kaplan R.M., Matthews J.B., Hodgkinson J.E. 2005. Isolation and characterisation of a beta tubulin isotype 2 gene from two species of cyathostomin. *International Journal for Parasitology*. 35, 349-358.
- Corning, S. 2009. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites Vectors* 2 (Suppl. 2), S1.
- Dargatz D.A., Traub-Dargatz J.L., Sangster N.C. 2000. Antimicrobial and anthelmintic resistance. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 16,515-36.
- Drogemuller M., Schnieder T., von Samson-Himmelstjerna G. 2004. Beta-tubulin complementary DNA sequence variations observed between cyathostomins from benzimidazole-susceptible and-resistant populations. *Journal for Parasitology*. 90, 868-870.

- Gordon H.M., Whitlock H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council of Science and Industry Research in Australia*. 12, 50-52.
- Hodgkinson J.E., Clark H.J., Kaplan R.M., Lake S.L., Matthews J.B. 2008. The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *International Journal for Parasitology*. 38,1149-1160.
- Kaplan R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* 20, 477-481.
- Kaplan R. M., Vidyashankar A. N. 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*. 186, 70-78.
- Larsen M. L., Ritz C., Petersen S. L., Nielsen M. 2011. Determination of ivermectin efficacy against cyathostomins and *Parascaris equorum* on horse farms using selective therapy. *The Veterinary Journal*. 188, 47-48.
- Lake S. L., Matthews J. B., Kaplan R. M., Hodgkinson J. E. 2009. Determination of genomic DNA sequences for beta-tubulin isotype 1 from multiple species of cyathostomin and detection of resistance alleles in third-stage larvae from horses with naturally acquired infections. 2(Suppl 2):S6 doi:10.1186/1756-3305-2-S2-S6.
- Lichtenfels J.R., McDonnell A., Love S., Matthews J.B. 2001. Nematodes of the tribe cyathostominae (Strongylidae) collected from horses in Scotland. *Comparative Parasitology*. 68, 265-269.
- Love S., Murphy D., Mellor D. 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*. 31, .85, 113-122.
- Lubega G.W., Pritchard R.K. 1990. Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high-affinity binding and benzimidazole resistance in *H. contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 38, 221-232.
- Lyons T., Tolliver C., Drudge H. 1999. Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. *Veterinary Parasitology*. 85-97.

- Molento M. B. 2005. Resistência parasitária em helmintos de eqüinos e propostas de manejo. *Ciência Rural*. 35, 1469-1477.
- Molento M.B., Antunes J., Bentes R.N., Coles G.C. 2008. Anthelmintic resistance in nematodes in Brazilian horses. *Veterinary Record*. 168, 384-385.
- Murphy D., Love S. 2000. The pathogenic effects of experimental cyathostome infections in ponies. *Veterinary Parasitology*. 70, 99-110.
- Nielsen M. K, Reist M., Kaplan R. M., Pfister K., van Doorn D. C. K., Becher A. 2013. Equine parasite control under prescription-only conditions in Denmark—Awareness, knowledge, perception, and strategies applied. *Veterinary Parasitology*. 204, 64-72.
- Peregrine A.S., MCewen B., Bienzle D., Koch T.G., Weese J.S. 2006. Larval cyathostominosis in horses in Ontario: an emerging disease? *Canadian Journal of Veterinary*. 47, 80-82.
- Pook J. F., POWER M. L., Sangster N.C., Hodgson J. L., Hodgson D. R. 2002. Evaluation of tests for anthelmintic resistance in cyathostomes. *Veterinary Parasitology*. 106, 331-343.
- Silvestre A., Cabaret J. 2002. Mutation in position 167 of isotype 1beta-tubulin gene of trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Molecular and Biochemical Parasitology*. 120, 297-300.
- Traversa, D. 2008. The little-known scenario of anthelmintic resistance in equine cyathostomes in Italy. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. New York Academy of Sciences*. 1149,167-169.
- Von Samson-Himmelstjerna G., Witzendorff C., Sievers G., Schnieder T. 2002. Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. *Veterinary Parasitology*. 108, 227-235.
- Von Samson-Himmelstjerna G., Blackhall W.J. 2005. Will technology provide solutions for drug resistance in veterinary helminths? *Veterinary Parasitology*. 132, 223-239.

Von Samson-Himmelstjerna G. 2012. Anthelmintic resistance in equine parasites – detection, potential clinical relevance and implications for control. *Veterinary Parasitology*. 185, 2-8.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nos ciatostomíneos, o mais comum e amplamente disseminado tipo de resistência é aos benzimidazóis. Embora menos comum, a resistência aos sais de pirantel também tem sido observada em propriedades do mundo todo. Em contraste com os benzimidazóis e os sais de pirantel, existem ainda poucos relatos que acusam a resistência a lactonas macrocíclicas em ciatostomíneos.
- Com as modificações realizadas na técnica molecular para a extração de DNA de Ciatostomíneos adultos foi possível reduzir significativamente o tempo e o custo da técnica, facilitando os demais experimentos que utilizam esse DNA.
- Foi determinada alta frequência (45%) de alelos para resistência, o que pode significar uma baixa eficácia dos produtos à base de BZs.
- Os resultados apresentados demonstram que os testes moleculares para diagnóstico de resistência parasitária são promissores para o uso na rotina laboratorial, pela rapidez e precisão para a detecção precoce de alelos de resistência.
- A avaliação das árvores filogenéticas sugere que, de acordo com a homologia apresentada entre as espécies resistentes, e a homologia apresentada entre as espécies suscetíveis, esses dois grupos possuem uma ancestralidade diferente. E deixa claro que existe uma herdabilidade da mutação, a qual exerceu uma mudança evolucionária.
- Os resultados deste trabalho confirmam a necessidade da otimização de um derivado de BZ, a fim de criar moléculas mais potentes e seletivas para o tratamento de doenças parasitárias.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Além de estabelecer diagnósticos de resistência parasitária, é preciso ressaltar a fundamental necessidade de mudanças na forma de controle de nematóides, implementando programas de controle que focam em práticas de gestão ambiental e utilizam os antiparasitários de forma mais orientada (tratamento seletivo), visando preservar a eficácia destes.

Deve-se considerar a quantidade mínima de amostras para se fazer o diagnóstico molecular de resistência parasitária em rotina de laboratórios, e assim evitar análises com amostras muito pequenas, a fim de limitar a ocorrência do erro amostral, e amostras desnecessariamente grandes, que geram custos e trabalhos excessivos.

6. APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Árvore filogenética construída a partir das sequências de 67 amostras de L3 provenientes da propriedade do Paraná e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).

APÊNDICE 2 - Árvore filogenética construída a partir das sequências de 54 amostras de L3 provenientes da propriedade de São Paulo e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).

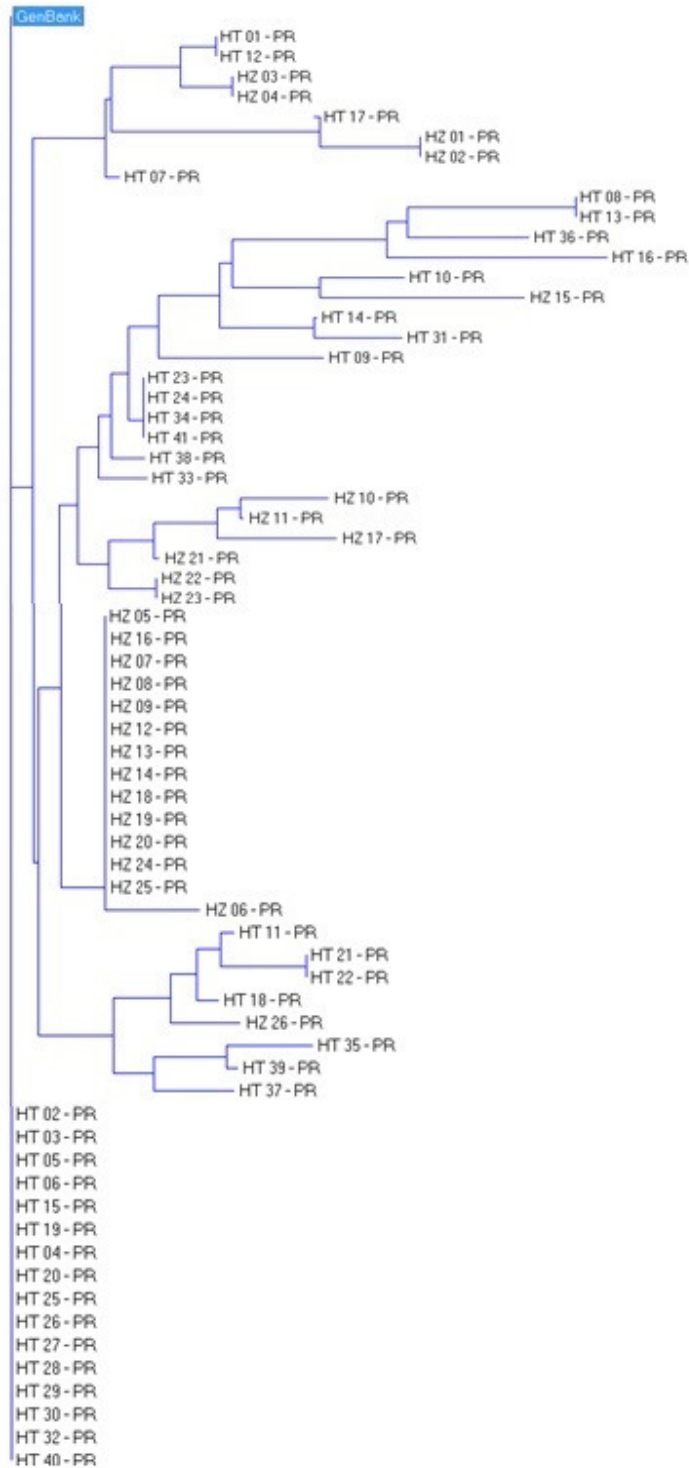
APÊNDICE 3 - Árvore filogenética construída a partir das sequências de 52 amostras de L3 provenientes da propriedade de Santa Catarina e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).

APÊNDICE 4 - Árvore filogenética construída a partir das sequências das 173 amostras de L3 provenientes das três propriedades analisadas, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).

APÊNDICE 5 - Árvore filogenética construída a partir de todas as sequências das amostras de L3 homozigotas suscetíveis provenientes das três propriedades analisadas, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).

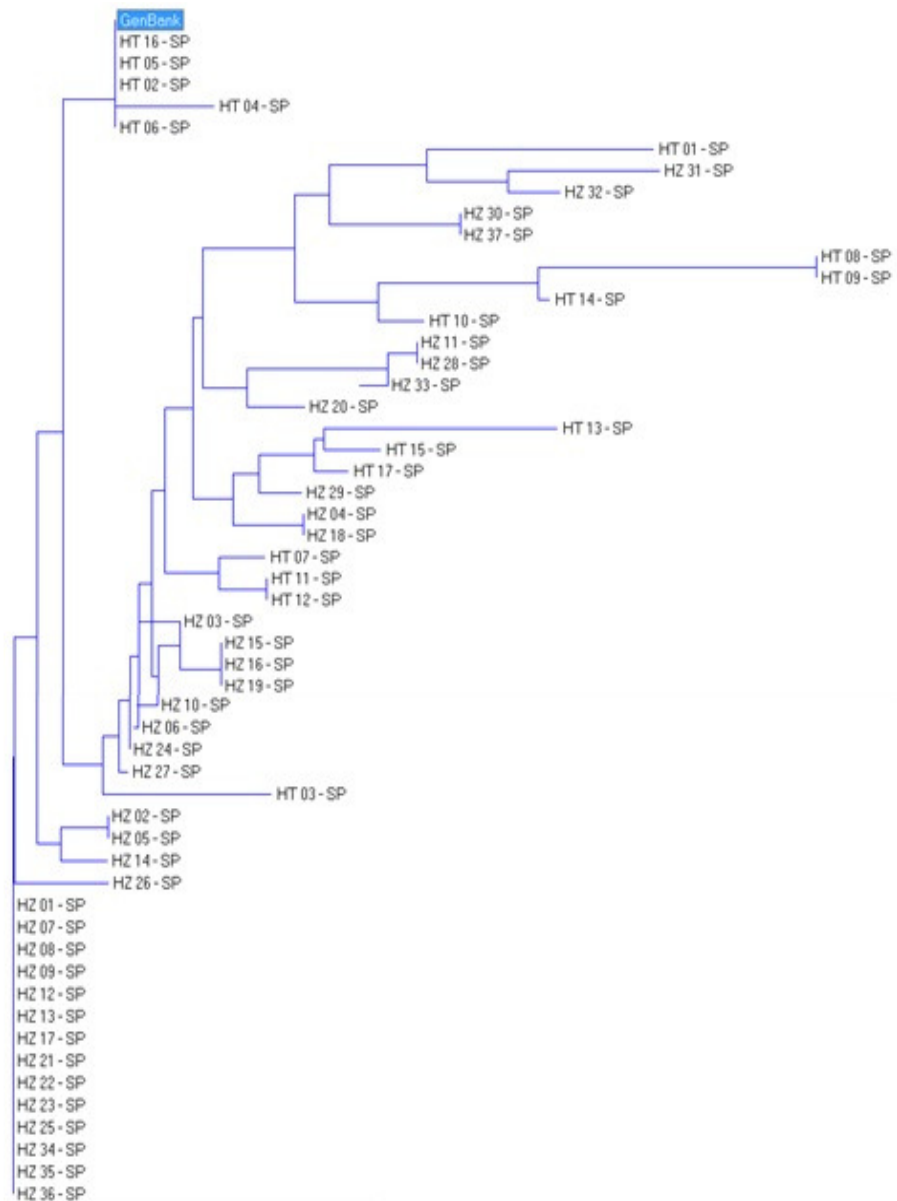
APÊNDICE 6 - Árvore filogenética construída a partir de todas as sequências das amostras de L3 heterozigotas resistentes provenientes das três propriedades analisadas, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).

APÊNDICE 1 – Árvore filogenética construída a partir das sequências de 67 amostras de L3 provenientes da propriedade do Paraná e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).



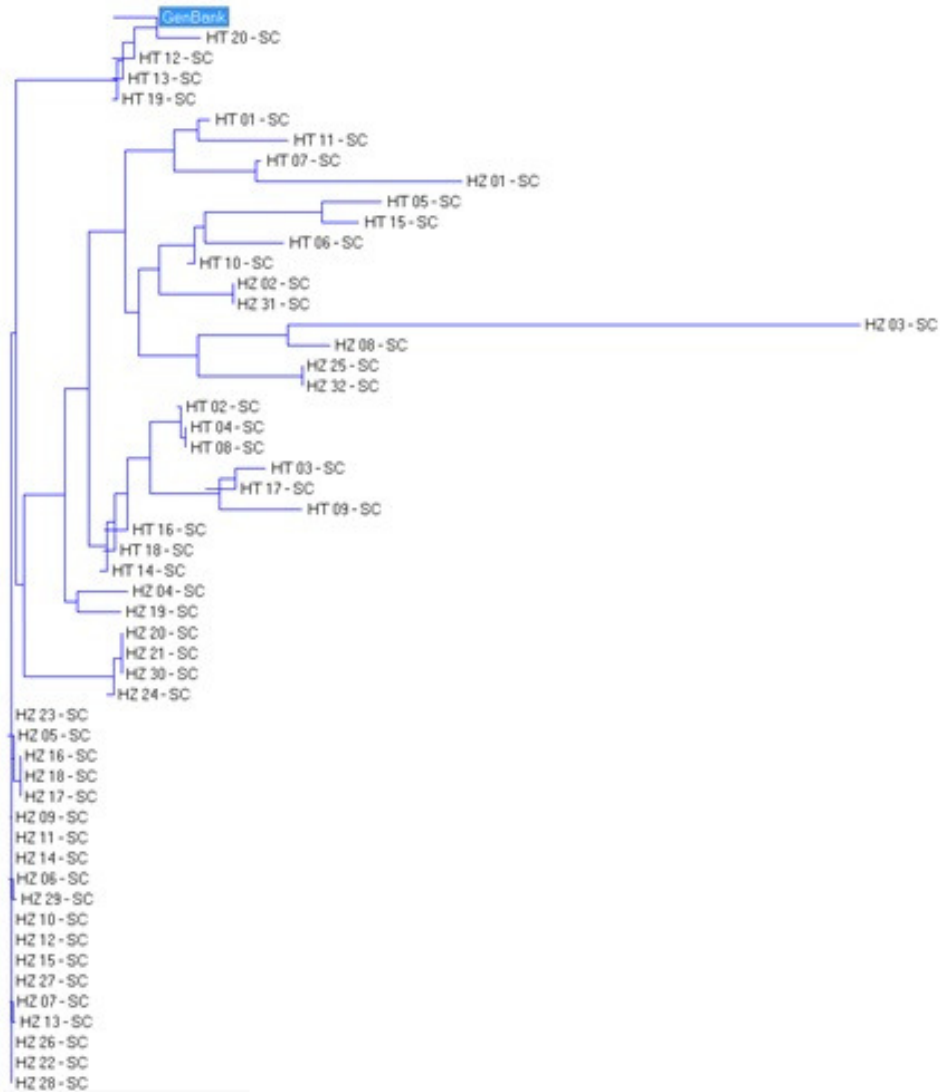
Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE 2 - Árvore filogenética construída a partir das sequências de 54 amostras de L3 provenientes da propriedade de São Paulo e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).



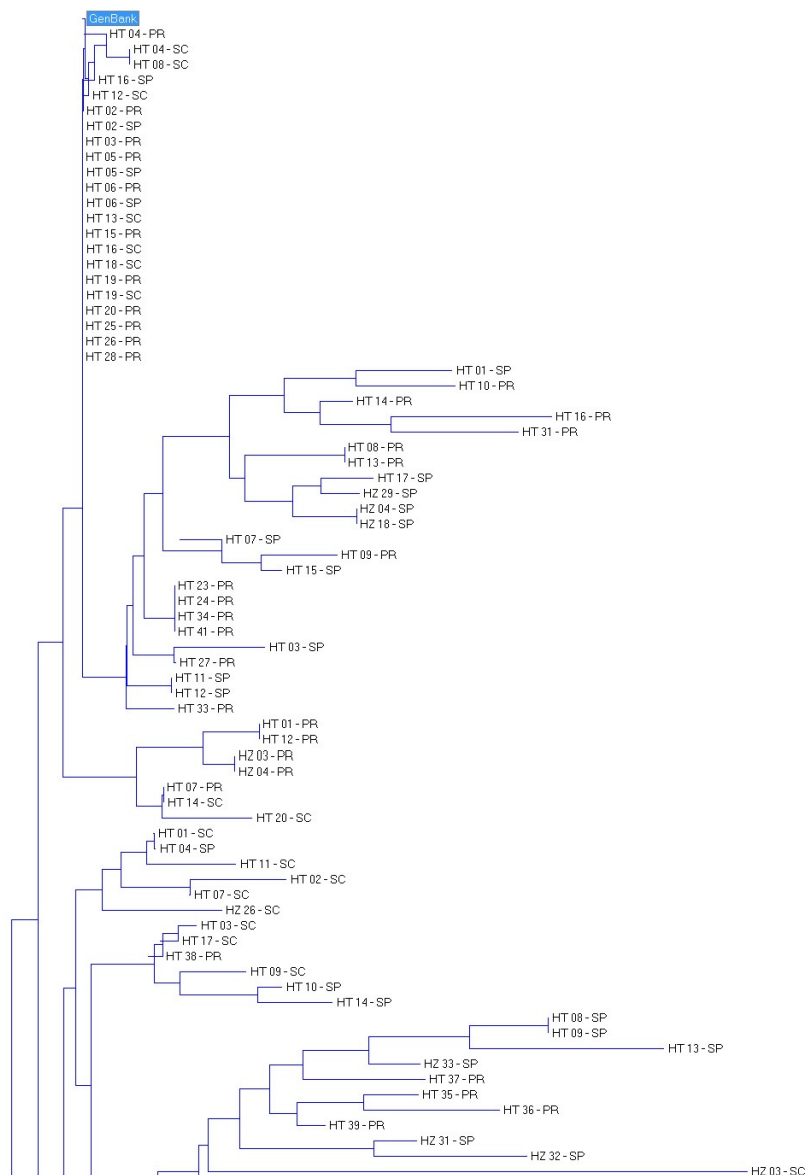
Fonte: Elaborado pelo autor

APÊNDICE 3 - Árvore filogenética construída a partir das sequências de 52 amostras de L3 provenientes da propriedade de Santa Catarina e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).



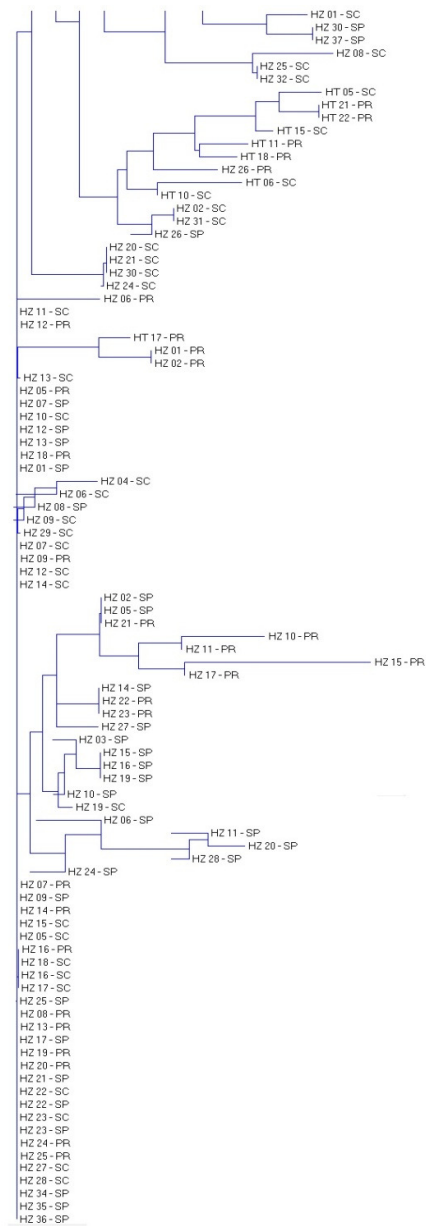
Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE 4 - Árvore filogenética construída a partir das sequências das 173 amostras de L3 provenientes das três propriedades analisadas, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).



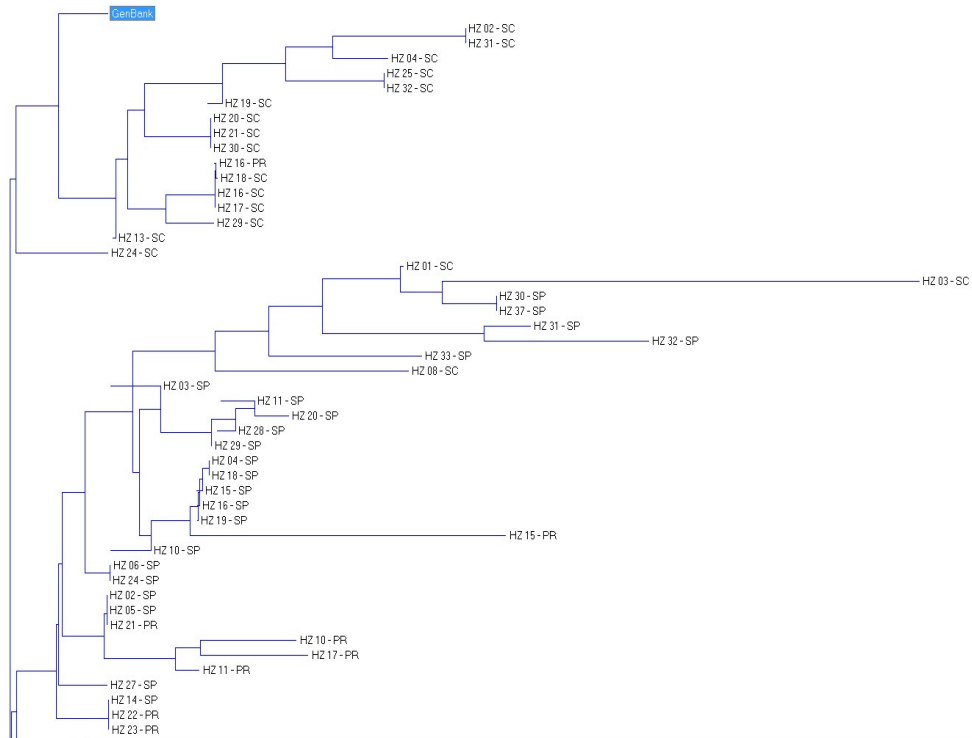
Fonte: Elaborado pelo autor.

(Continuação)



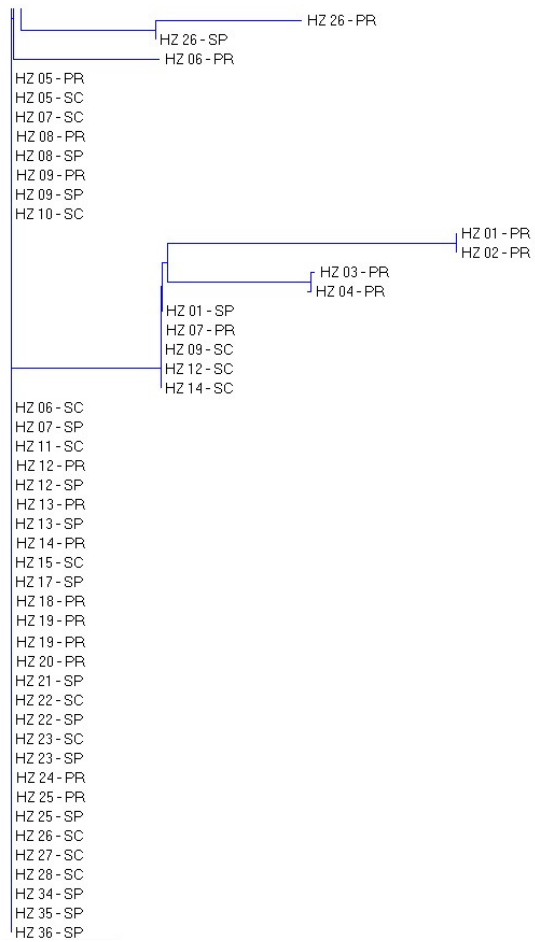
Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE 5 - Árvore filogenética construída a partir de todas as sequências das amostras de L3 homocigotas suscetíveis provenientes das três propriedades analisadas, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).



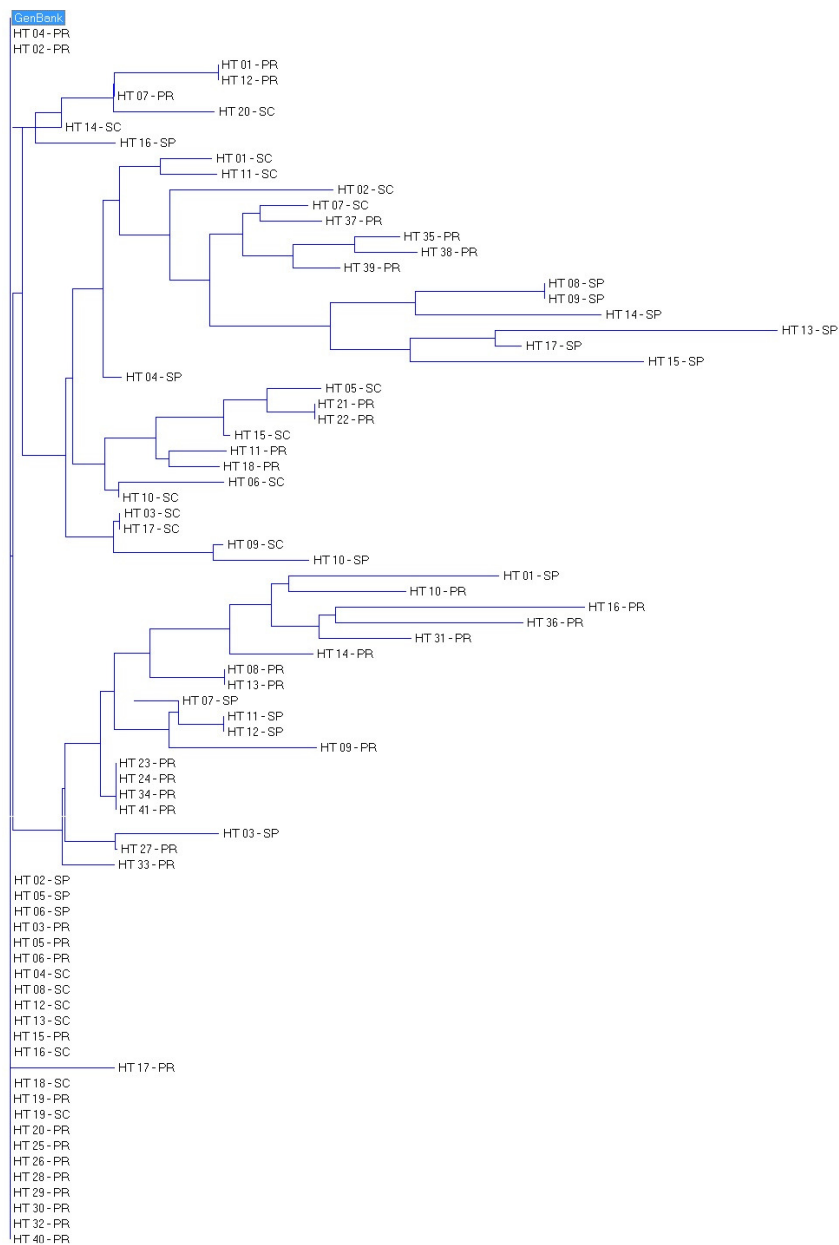
Fonte: Elaborado pelo autor.

(Continuação)



Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE 6 - Árvore filogenética construída a partir de todas as sequências das amostras de L3 heterozigotas resistentes provenientes das três propriedades analisadas, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, e a sequência obtida a partir do banco de dados Genbank (AY666162.1).



Fonte: Elaborado pelo autor.