

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

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Belo Horizonte

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RODRIGO RODRIGUES CAMBRAIA DE MIRANDA

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

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

Orientadora: Dr.^a Élide Mara Leite Rabelo/UFMG

Co-Orientador: Dr. Rodrigo Redondo/UFMG

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

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Belo Horizonte

2007

As instituições que contribuíram para a realização deste trabalho foram:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo carinho, ajuda e incentivo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

ASP – *Ancylostoma secreted protein*

AcAP – *Ancylostoma caninum anticoagulant protein*

AMOVA – Análise de variância molecular

BH – Belo Horizonte (Estado de Minas Gerais)

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

C+ – controle positivo

C- – controle negativo

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

COI – Citocromo C oxidase subunidade 1

CT – Curitiba (Estado do Paraná)

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo 5' fosfato

ES – produtos de excreção e secreção

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EUA – Estados Unidos da América

FAM – 6-carboxi-fluoresceína

Φ ST – Índice de fixação de alelos (phi ST)

h – diversidade haplotípica

HEX – Hexacloro-6-carboxi-fluoresceína

Indel – “buraco”, espaço

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

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

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

k – Número médio de diferenças nucleotídicas par a par

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

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

PEG – Polietileno glicol

π – Diversidade nucleotídica

PM – Peso molecular

MJ – algoritmo matemático *median-joining*

mtDNA – DNA mitocondrial

RNase - Ribonuclease

RNA – ácido ribonucléico

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

RP – Ribeirão Preto (Estado de São Paulo)

ROX – 6-carboxi-X-rodamina

rY1 – coeficiente de correlação entre distância geográfica e genética

SDS – Duodecil sulfato de sódio

SL – São Luís (Estado do Maranhão)

Taq – *Thermophilus aquaticus*

TBE – Tampão tris-borato EDTA

TET – tetracloro-6-carboxi- fluoresceína

UV – luz ultra violeta

URL – *Uniform Resource Locator*

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE QUADROS E TABELAS

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

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

11. APÊNDICE 3	152
12. APÊNDICE 4	177

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

1 – INTRODUÇÃO

1.1. Morfologia e taxonomia do *Ancylostoma caninum*

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

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

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

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

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

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

(adaptado de CURY & LIMA, 2002)

1.2. Ciclo biológico

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

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

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

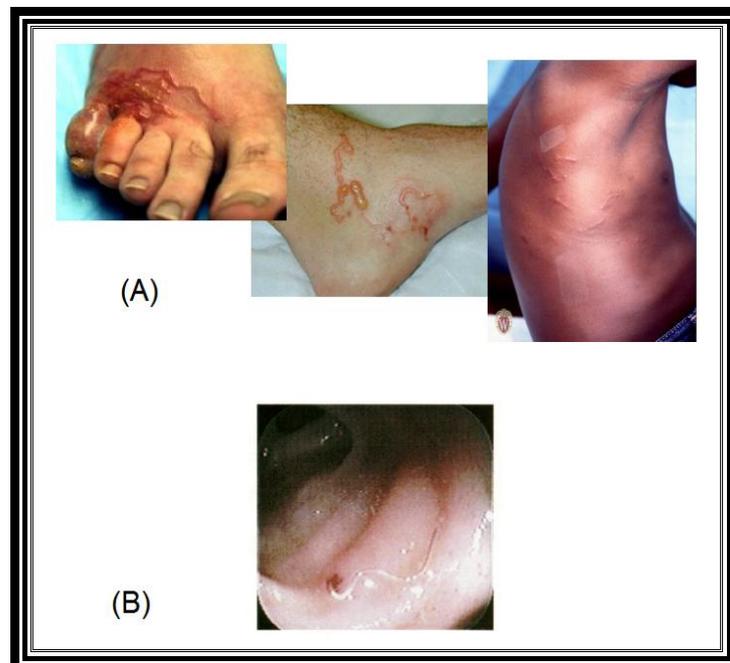
21 As larvas hipobióticas podem ser reativadas para o desenvolvimento,
22 provavelmente por estímulos endógenos e/ou exógenos, levando à formação de
23 vermes adultos no intestino, possivelmente quando as condições ambientais são
24 favoráveis, como por exemplo, em períodos de maior umidade e calor.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

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

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

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

17

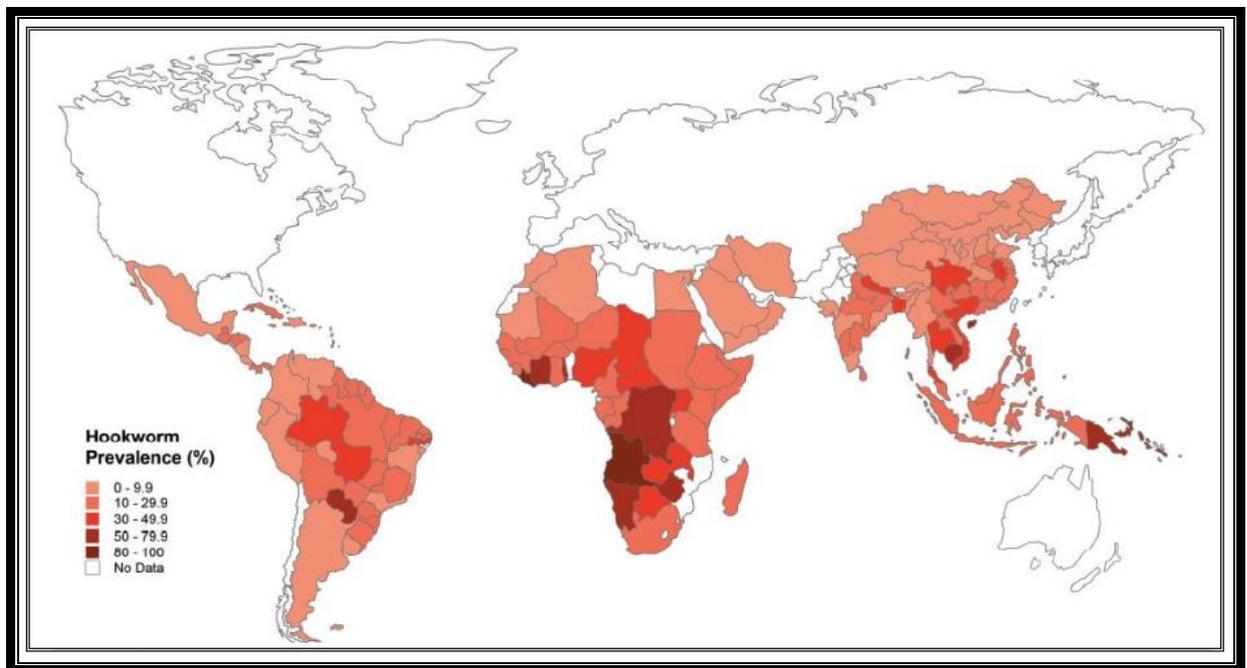


18

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

1.3. Ocorrência e prevalência

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



(HOTEZ et al., 2005)

FIGURA 2: Distribuição mundial das infecções humanas de ancilostomídeos.

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

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

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

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

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

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

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

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

27

1 1.4 Modelo de estudo e filogenia

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

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

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

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

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

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

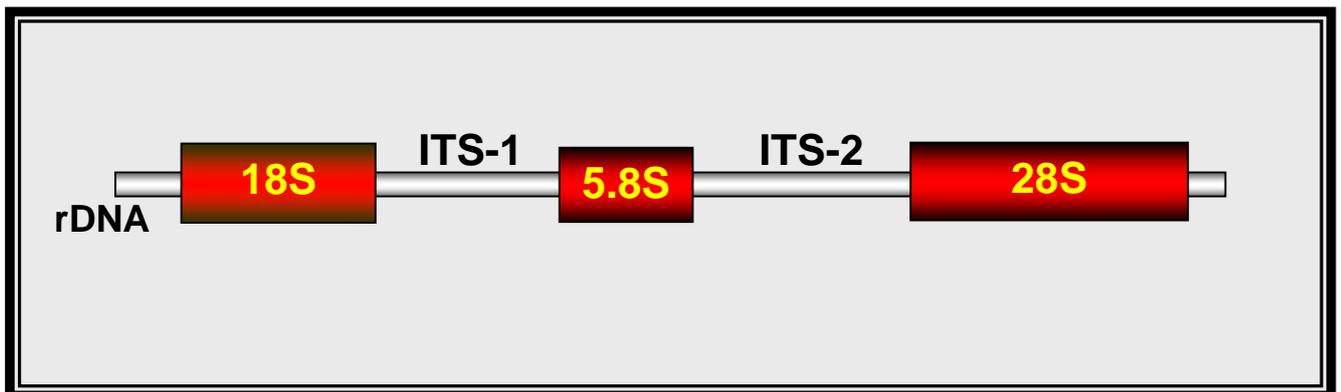
14
15 Existem relativamente poucos genes e marcadores moleculares
16 caracterizados em ancilostomídeos. Estes podem ser agrupados em três categorias
17 principais: (1) genes mitocondriais e marcadores ribossomais utilizados em estudos
18 de filogenia e diversidade genética, (2) genes relacionados com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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

5

6

7

8

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

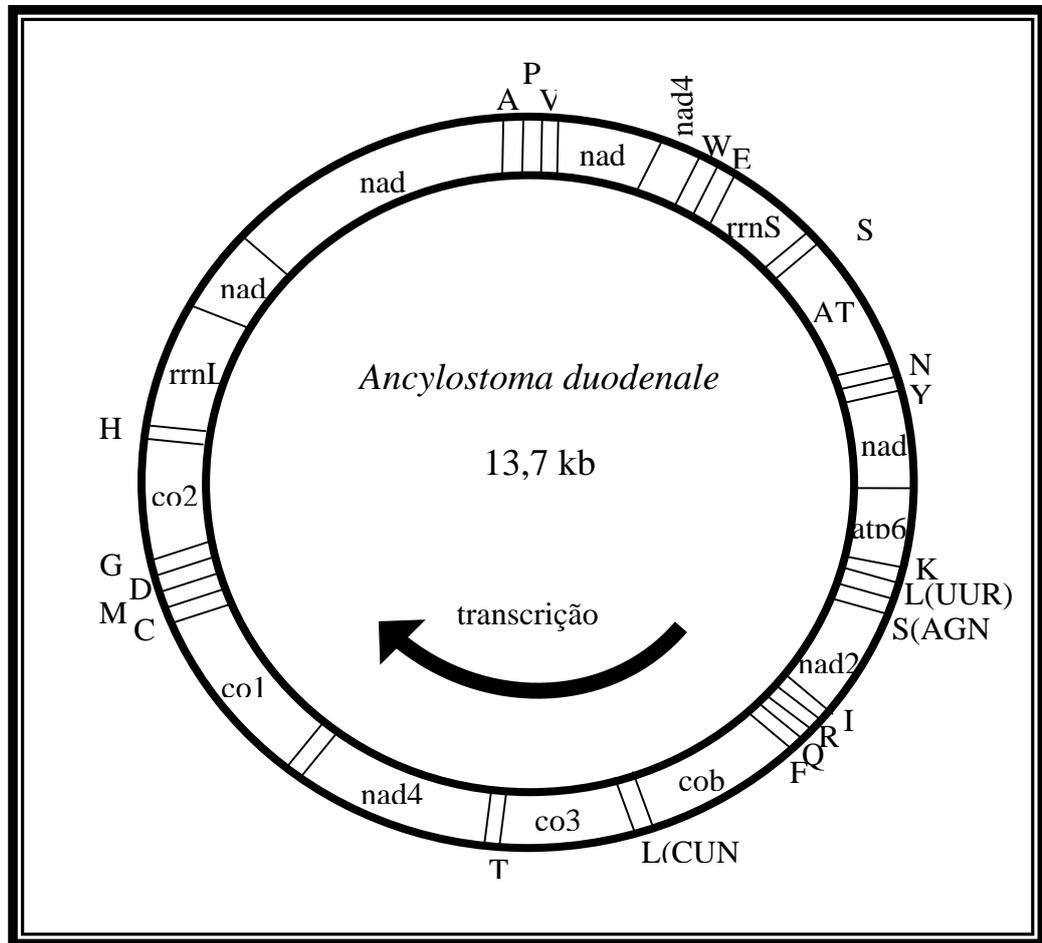
Ordem	Espécie	Seqüência	Tamanho (Kb)	Nº de acesso GeneBank
Ascaridida	<i>Ascaris sum</i>	completo	14.3	X54253
Strongylida	<i>Ancylostoma duodenale</i>	completo	13.7	AJ417718
	<i>Necator americanus</i>	completo	13.6	AJ417719
	<i>Onchocerca volvulus</i>	completo	13.7	AF015193
Spirurida	<i>Brugia malayi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

(adaptado de HU et al., 2004)

3

4

1



(modificado de Hu et al., 2004)

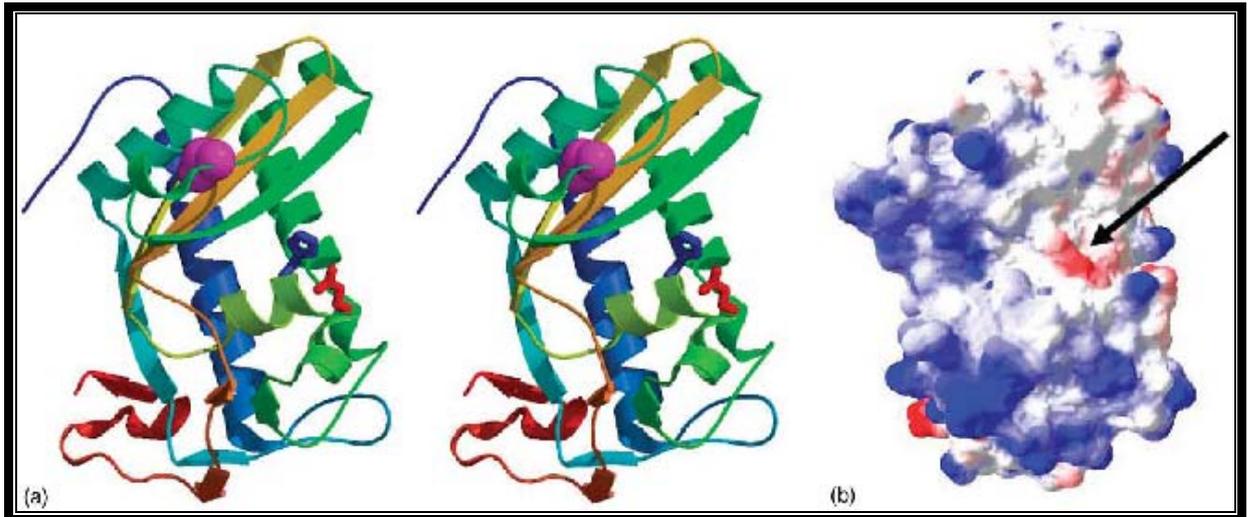
FIGURA 4: Representação esquemática do genoma mitocondrial do *Ancylostoma duodenale*, exemplificando a organização dos 12 genes codificadores de proteínas (atp6, cob, co1-3, nad1-6 e 4L), dois genes ribossomais (rrnS e rrnL), 22 RNAs transportadores (representado pelas diferentes letras), uma região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

1.5.2 Genes relacionados com os processos hematofágico e parasitário

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

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

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



Adaptado de Asojo et al., 2005

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

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

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

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

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

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

3 4 **1.6 VNTRs**

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

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

18 19 20 **1.6.1 Microsatélites**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14

15

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

2 – JUSTIFICATIVA

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

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

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

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

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

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

3 – OBJETIVOS

1 **3.1. Geral**

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

5

6 **3.2. Específicos**

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

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

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

1 **4.1. Populações de estudo**

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

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

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

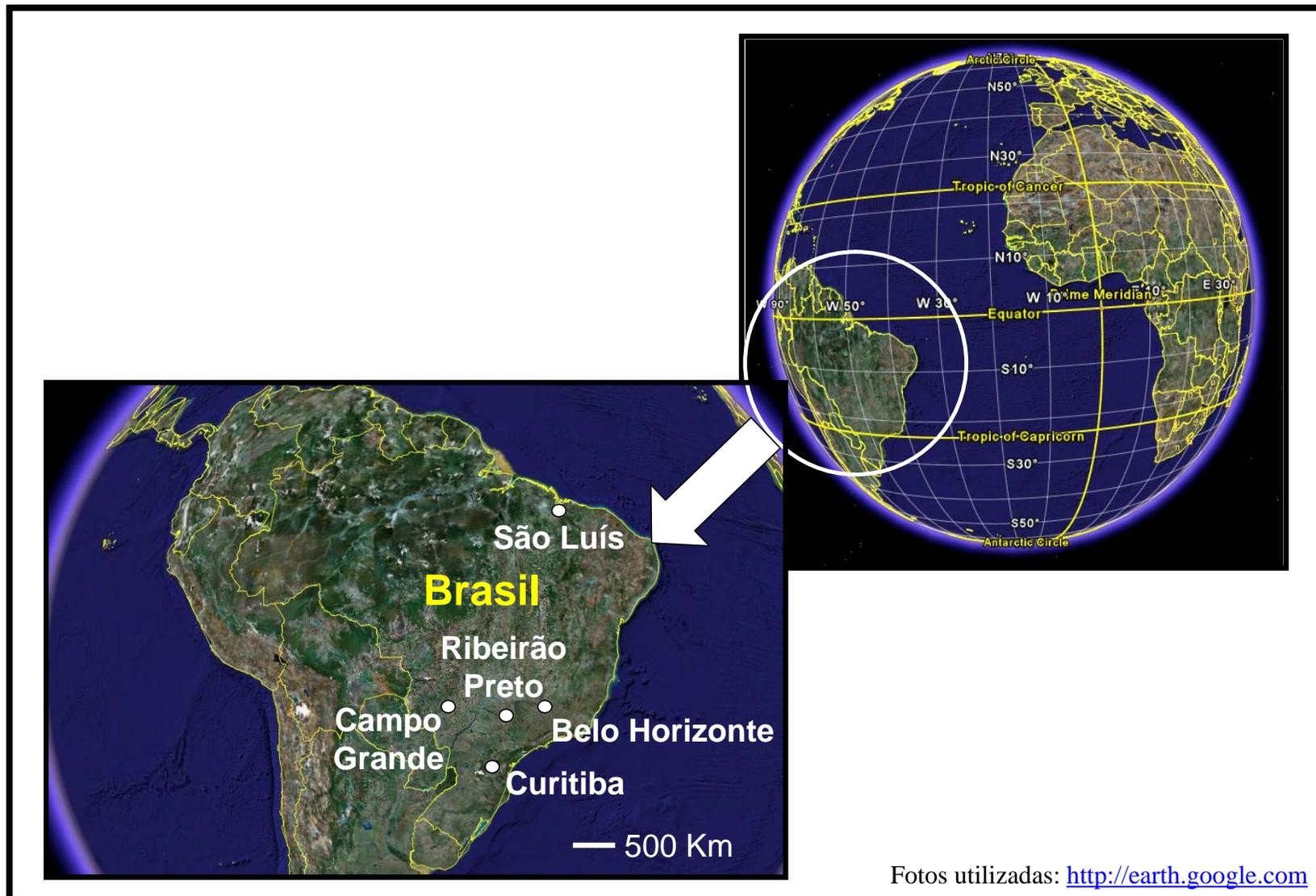


FIGURA 6: Localização das populações brasileiras de *A. caninum* utilizadas neste estudo. **BH** = lat. S 19°55', long. W 43°56'; **CG** = lat. S 20°26', long. W 54°38'; **CT** = lat. S 25°25', long. W 49°14'; **RP** = lat. S 21°12', long. W 47°48'; **SL** = lat. S 2°31', long. W 44°16'.

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

7 8 **4.3. Extração de DNA**

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

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

33

4.4. Marcadores mitocondriais e nucleares

4.4.1 Amplificação, purificação e sequenciamento dos marcadores COI e ITSs

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

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

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

nts = nucleotídeos

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

As reações de amplificação destes marcadores foram realizadas em 50µl contendo 10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton®X-100, 200µM de cada dNTP, 0,6µM de cada par de iniciador e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (PHONEUTRIA, MG, Brasil). As amplificações ocorreram em um termociclador (Mastercycler®-EPPENDORF) obedecendo aos seguintes parâmetros: 95°C por 5 min. para desnaturação inicial da dupla fita de DNA genômico, seguido de 30 ciclos à 95°C por 1 min, temperatura específica de cada

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

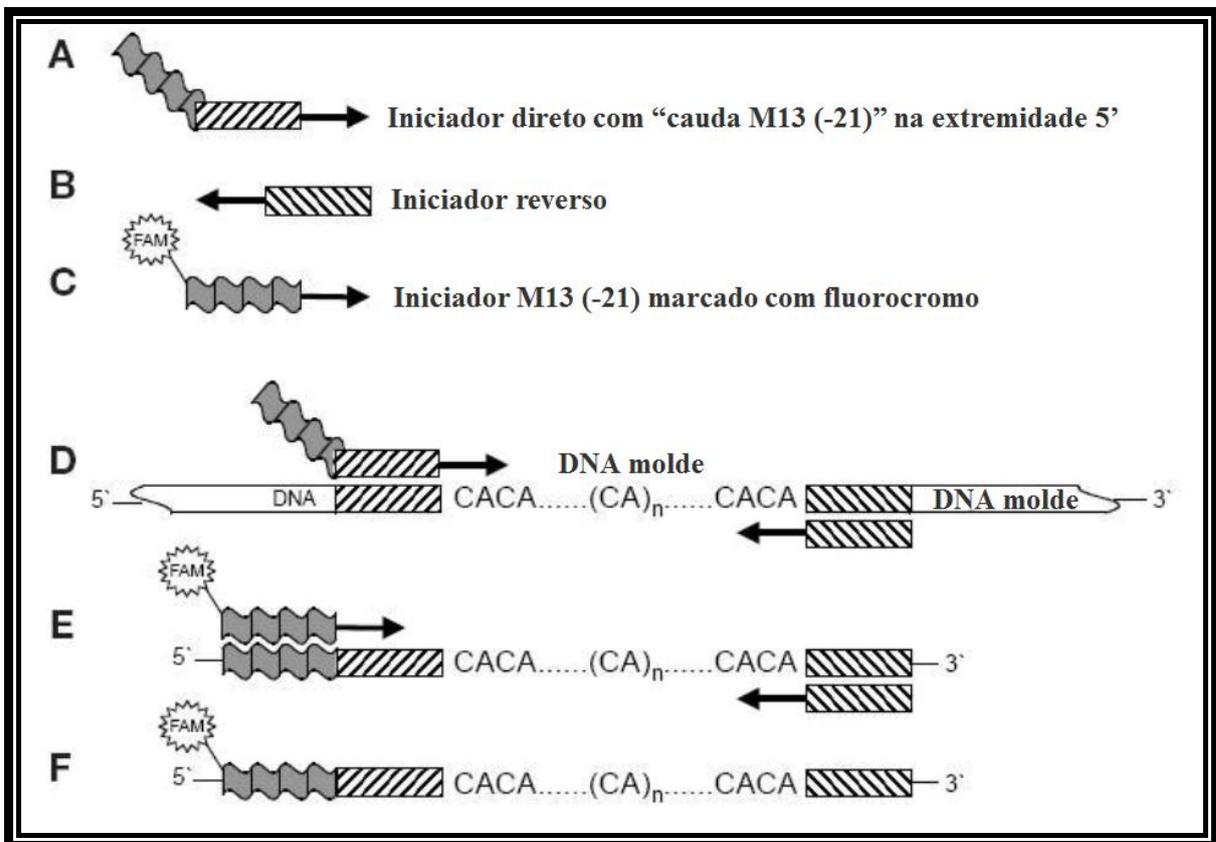
31 As reações de *nested* PCR foram realizadas em 15µl contendo 10mM Tris-
32 HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton®X-100, 200µM de cada dNTP,
33 0,19µM do iniciador direto com "cauda M13", 0,75µM do iniciador reverso,

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

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

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

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

1
2

3

4

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

17

18

19

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

4

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

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

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

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

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

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

4

5

6

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

8

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

13 As reações ocorreram em 15µl contendo 10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM
 14 KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton®X-100, 200µM de cada dNTP, 0,6µM de cada par
 15 de iniciador e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (PROMEGA), em um
 16 termociclador (Mastercycler®-EPPENDORF) obedecendo aos seguintes
 17 parâmetros: 94°C (5 min.), seguido de 35 ciclos à 94°C (1 min.), 60 (1 min.) e
 18 72°C (1 min.), seguido de um passo final com extensão à 72°C por 8 min.

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

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

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

7 **4.5. Análise dos dados**

9 **4.5.1. Seqüências de DNA**

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

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

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

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

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

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

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

30 **4.5.2. Genotipagem**

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

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

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

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

21
22

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

5 – RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção dos vermes e extração de DNA

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

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

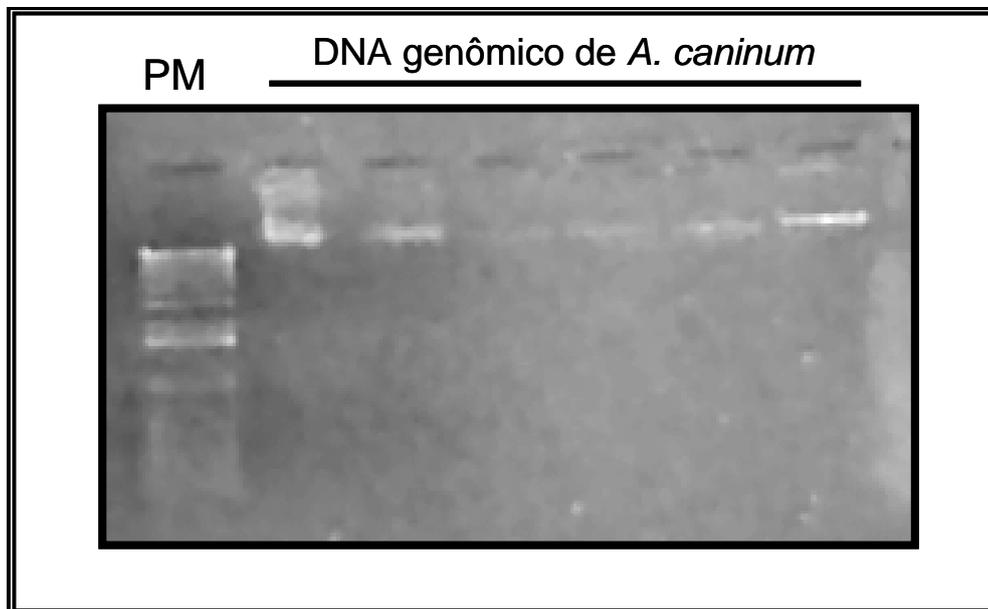


FIGURA 8: Eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a qualidade dos DNAs genômicos obtidos. PM = 1 Kb *Plus DNA Ladder* (INVITROGEN).

5.2. Citocromo C Oxidase Subunidade 1 (COI)

5.2.1. Amplificação e purificação

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

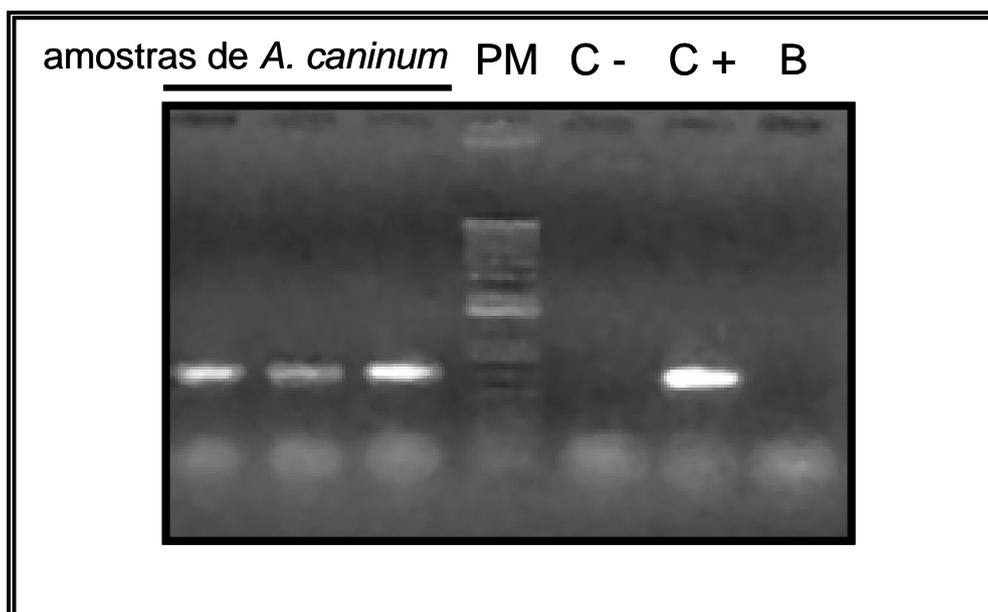


FIGURA 9: Amplificação de *COI* utilizando amostras de DNA genômico de *A. caninum*. PM = 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), C- = controle negativo, C+ = controle positivo e B = branco

5.2.2. Sequenciamento e produção dos consensos

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

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

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

5.2.3. Diversidade genética

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

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

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

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

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

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

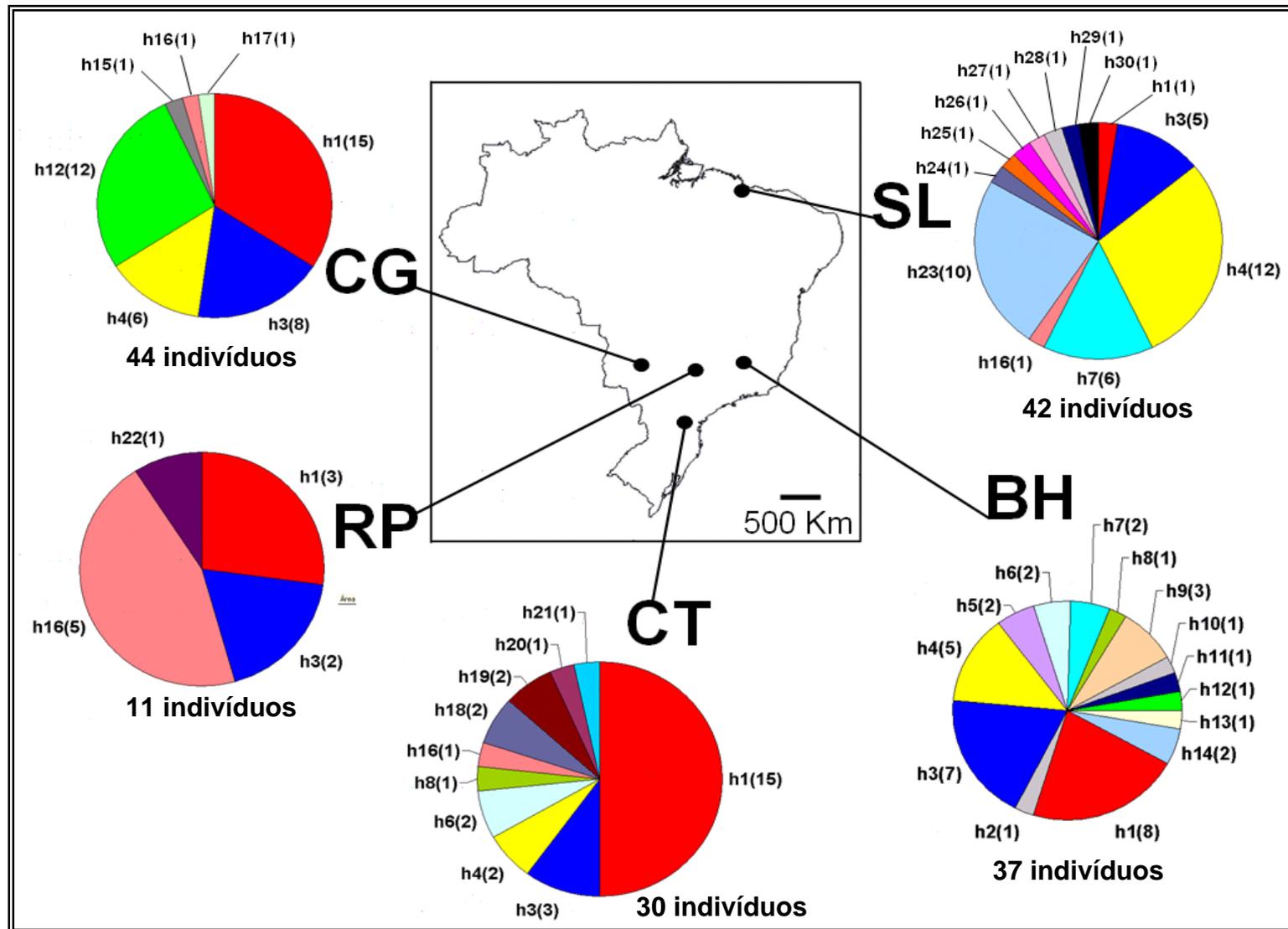


FIGURA 10: Distribuição dos 30 haplótipos de COI encontrados nas populações brasileiras de *A. caninum*. Os haplótipos estão numerados de h1-h30 e suas frequências apresentadas em cada população (números entre parênteses).

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

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

(* não significante $P > 0.10$)

5.2.4. Estrutura genética e geográfica

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

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

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

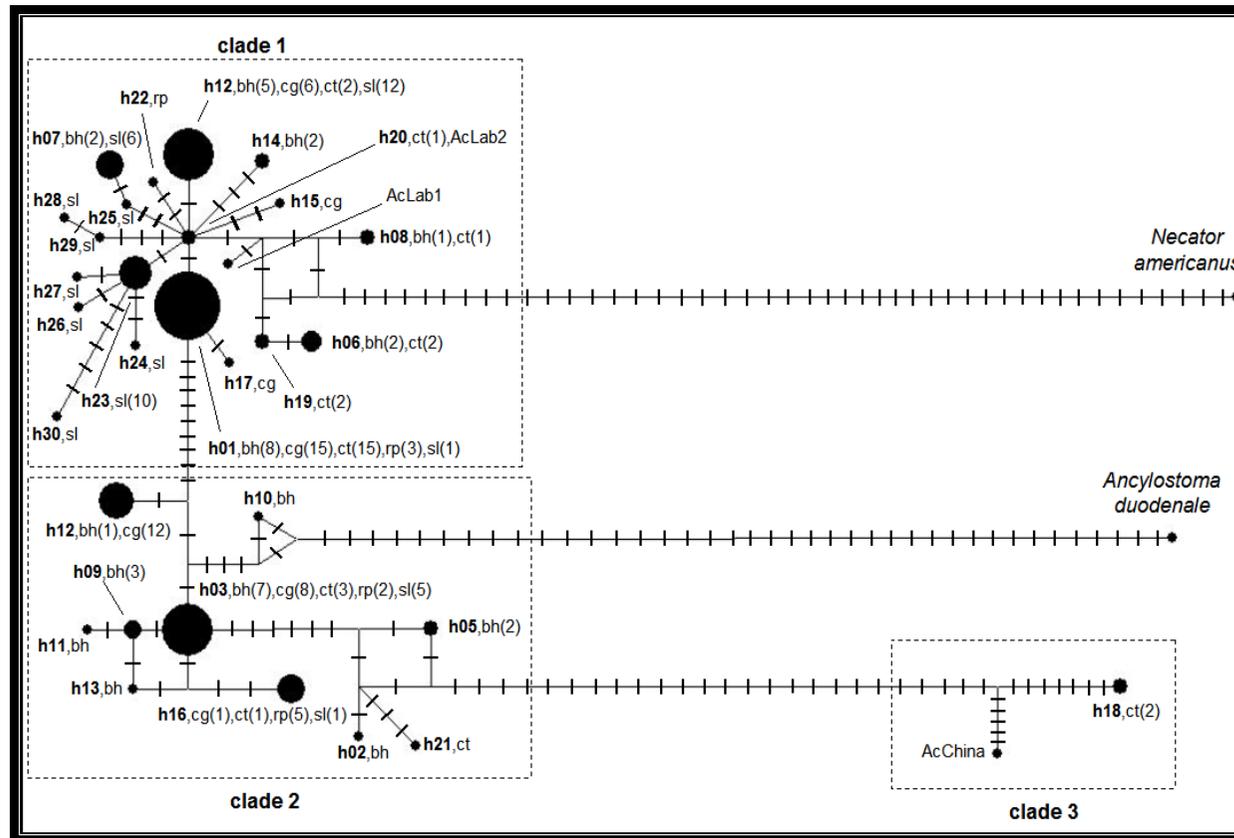


FIGURA 11: Relação filogenética entre os haplótipos brasileiros de COI identificados. Foram incluídos outros haplótipos de *A. caninum* de outras localidades (AcLab1 e AcLab2: EUA e AcChina: China) e haplótipos de *A. duodenale* e *N. americanus*. O número de cópias dos haplótipos estão apresentados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

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

6

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

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

7

8

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

13

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

16

17

18

19

20

21

22

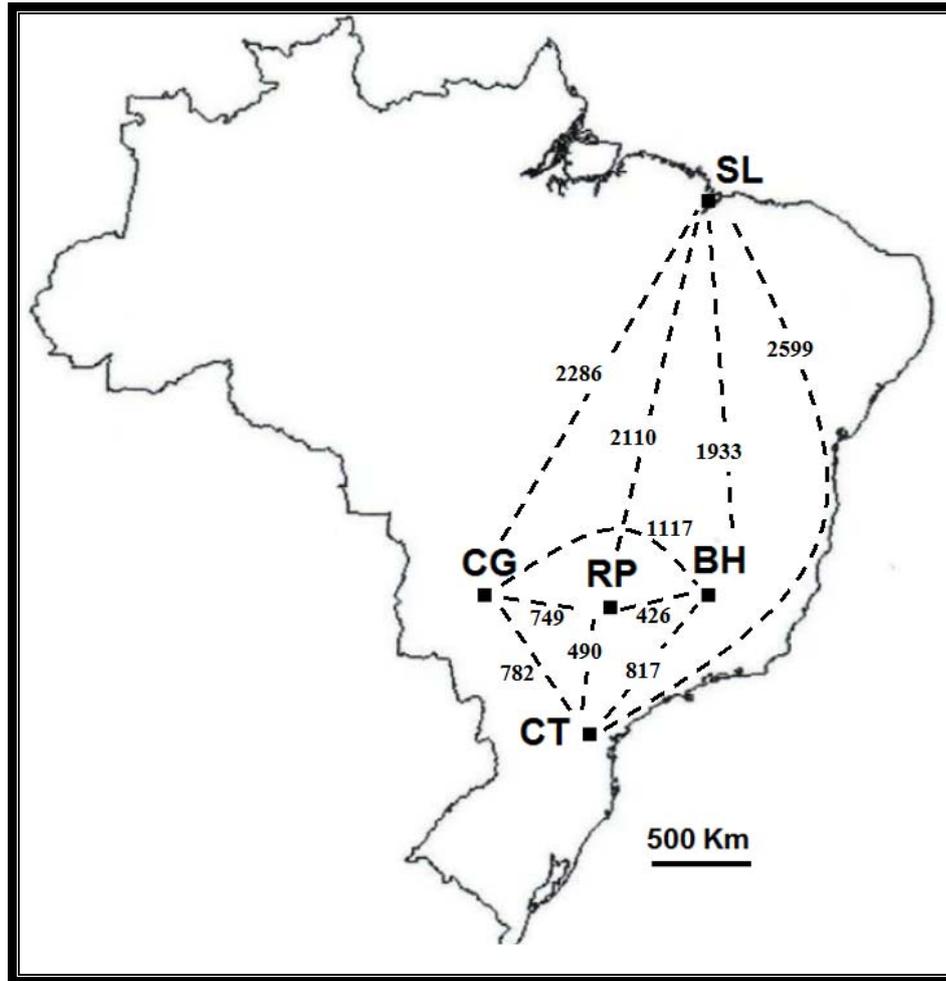
23

24

25

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

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



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

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

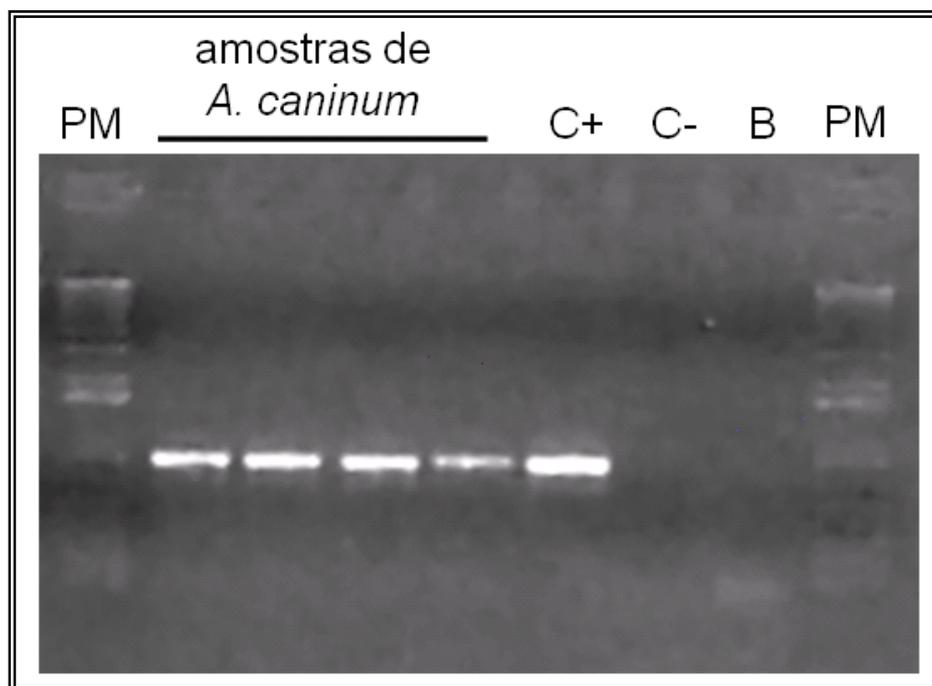
8 9 **5.3. Espaços transcritos internos (ITSs)**

10 11 **5.3.1. Amplificação e purificação**

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

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

9



10

11

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

15

16

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

20

21

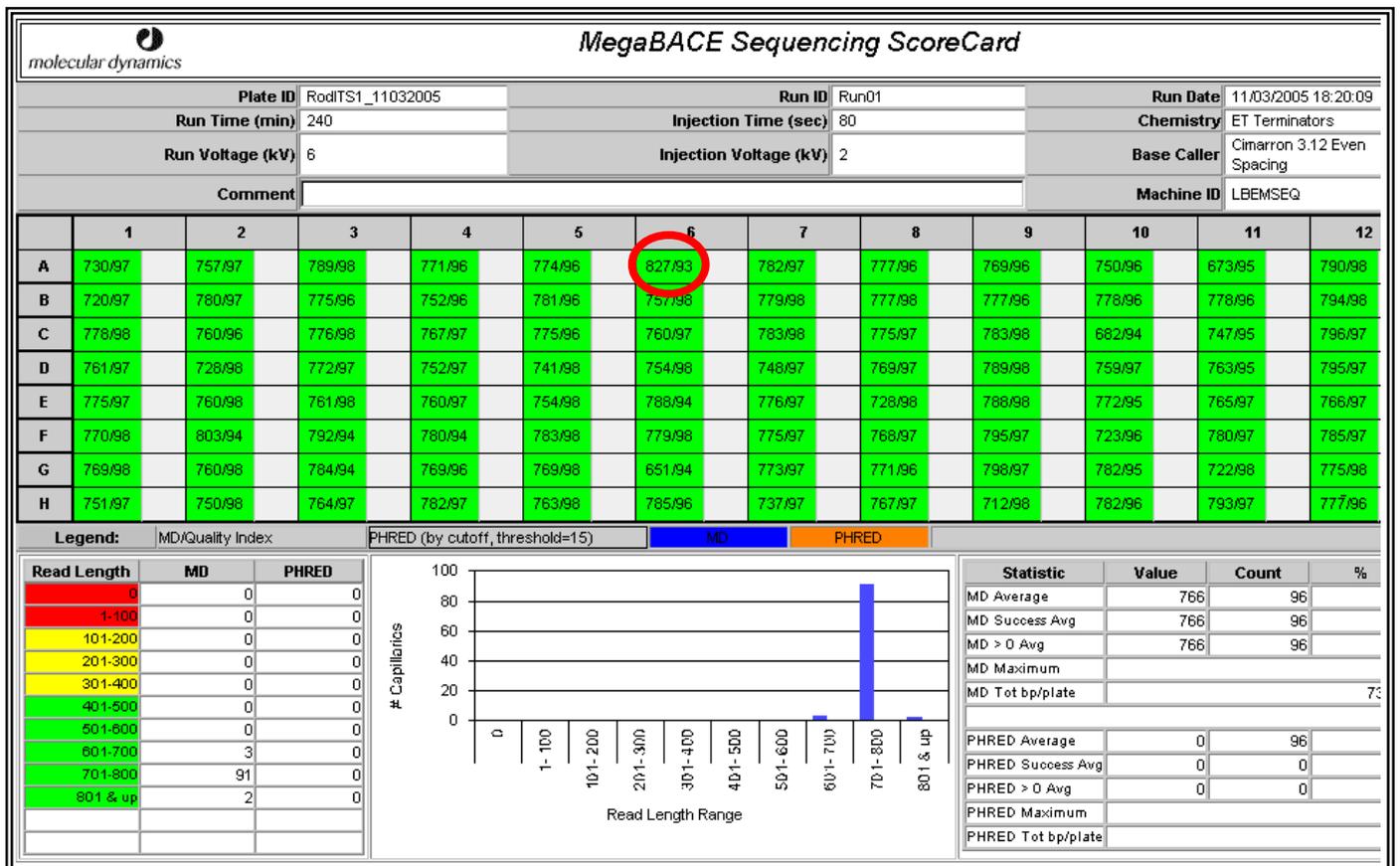
22

1 5.3.2. Sequenciamento e produção dos consensos

2

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

8



9

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

15

16

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

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

6 **5.3.3. Diversidade e estrutura genética**

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

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

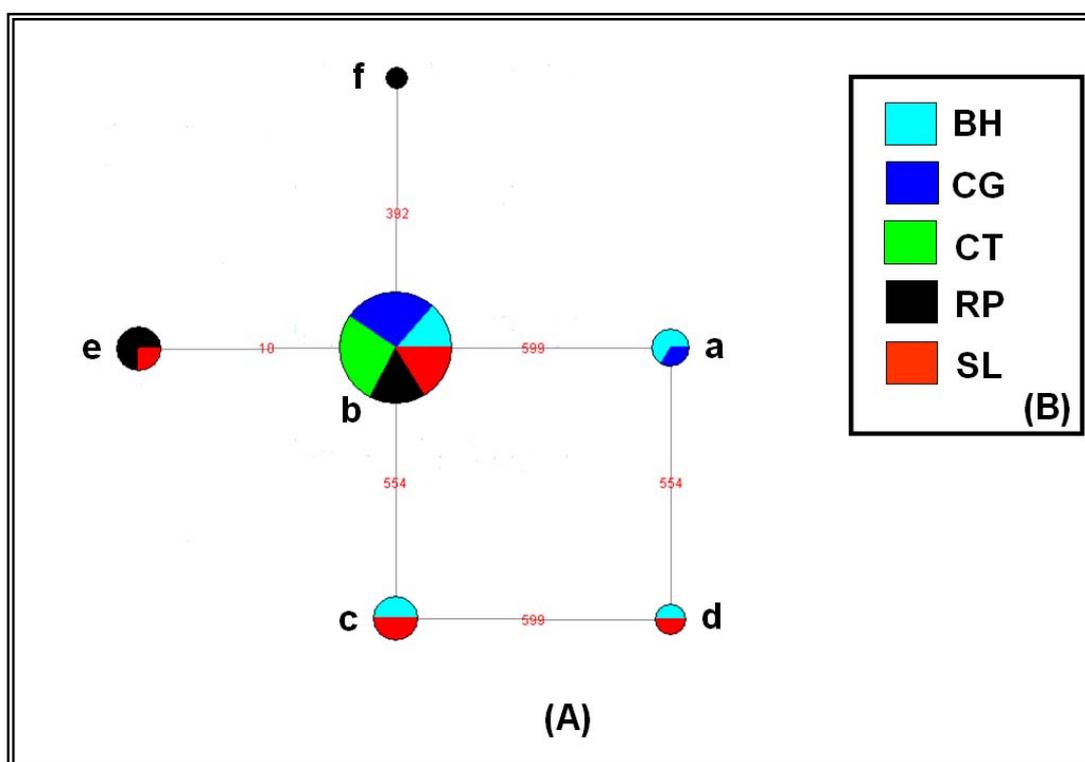
24 Em virtude da pequena diversidade molecular apresentada por estes
25 marcadores ribossomais, apenas a construção da rede filogenética de haplótipos
26 *Median-Joining* foi realizada, desprezando-se a análise de variância molecular
27 (AMOVA) neste marcador intraespecífico conservado.

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

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

1
2
3
4
5
6
7
8

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



9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

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

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

10 11 12 **5.4. Microsatélites de DNA**

13 14 **5.4.1. Identificação e amplificação de *loci* de microsatélites**

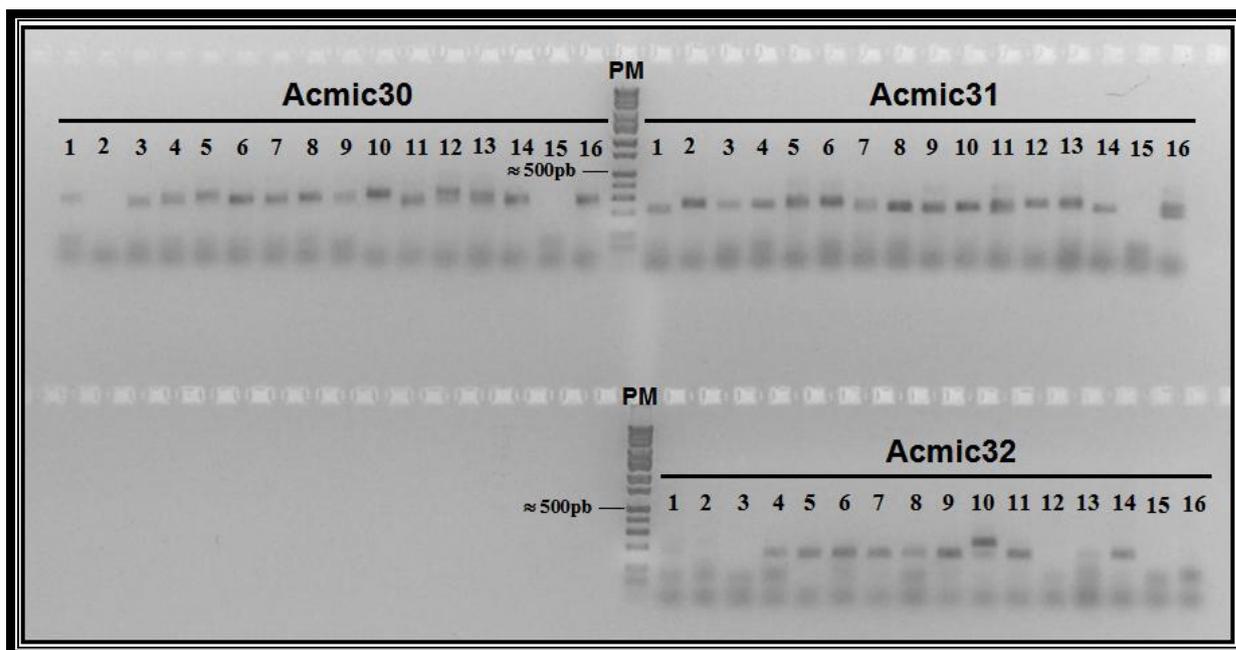
15
16 Diversos *loci* de microsatélites de DNA foram identificados, conforme
17 metodologia apresenta no item 4.4.2. O programa *Tandem Repeats Finder* (TRF)
18 utilizou 104.140 seqüências de DNA de *A. caninum* em busca de *loci* de di, tri e
19 tetranucleotídeos. Foram selecionados 38 *loci* de microsatélites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

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

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

6

7



8

9

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

14

15

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

17

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

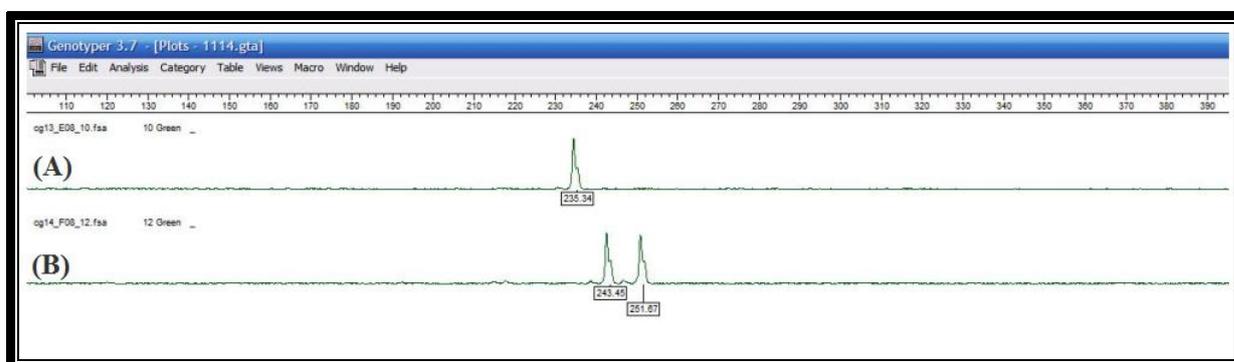
1 **TABELA 8:** *Loci* caracterizados e alelos identificados na genotipagem de populações brasileiras de *A. caninum*.

2

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

3 * As cores representam a fluorescência emitida na genotipagem

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

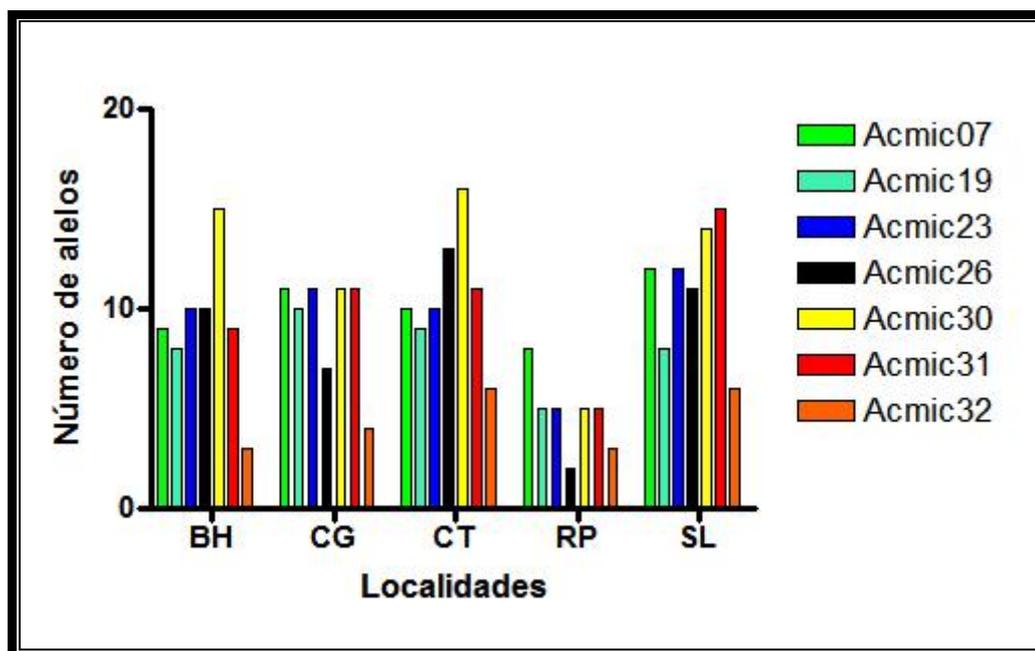


10
11
12 **FIGURA 17:** Identificação (*scoring*) de alelos utilizando o programa *Genotyper 3.7*
13 *NT*. Em (A) e (B) são apresentados dois indivíduos, respectivamente homozigoto e
14 heterozigoto para o *locus* Acmic31.

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

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

1



2

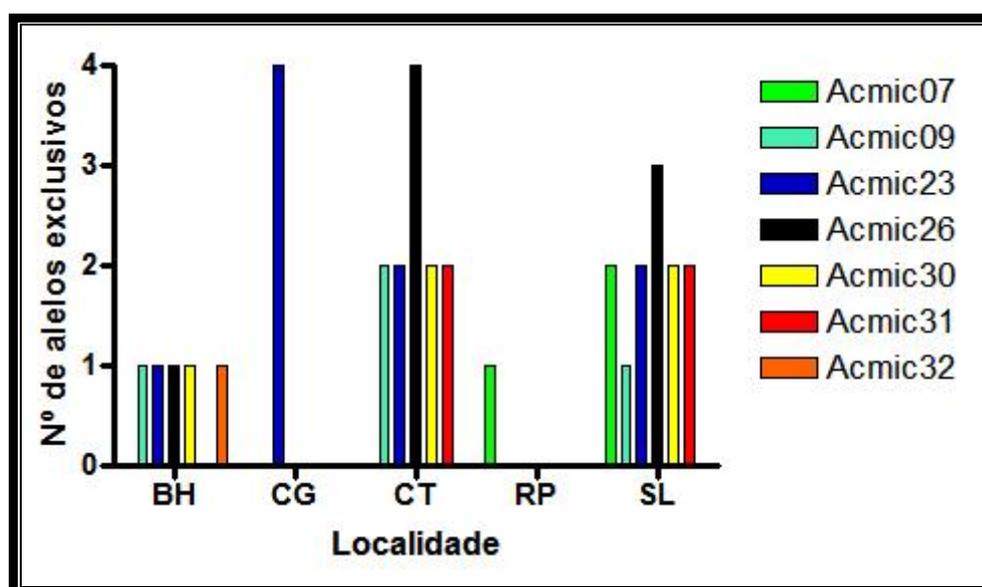
3

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

6

7

8



9

10

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

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

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

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

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

31
32
33

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

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

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

1 N_{IG} = número de indivíduos genotipados; N_{CG} = número de cópias gênicas; A =
2 número de alelos identificados; H_E = heterozigosidade esperada; H_O =
3 heterozigosidade observada; F_{IS} = “índice de estruturação dos indivíduos em uma
4 subpopulação”; G-W = índice de Garza-Williamson.

5

6

7

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

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

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

5

6

7

8

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

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

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

13

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

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

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

5

6

7

8

9

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

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

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

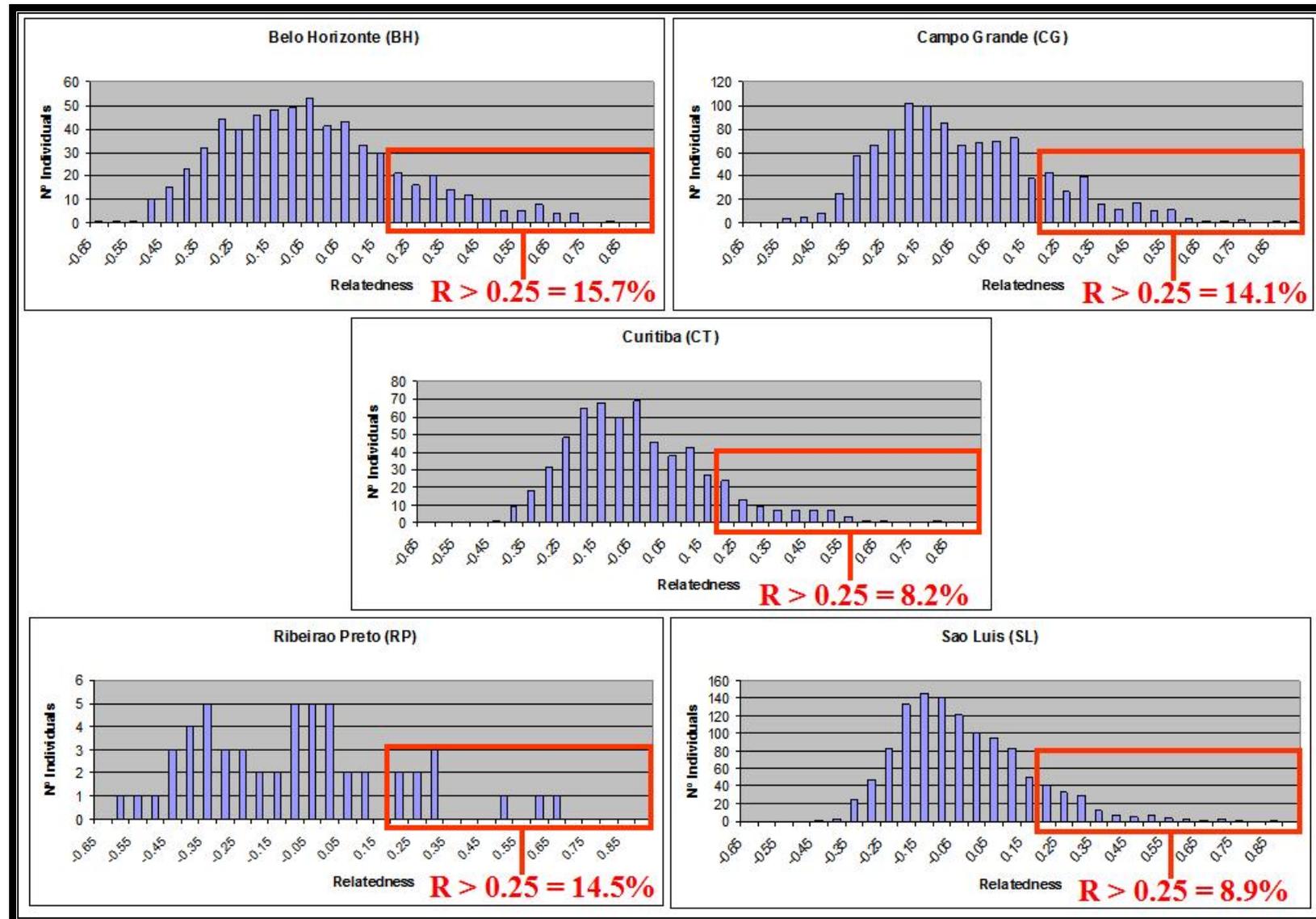
14

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

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

31

32



1

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

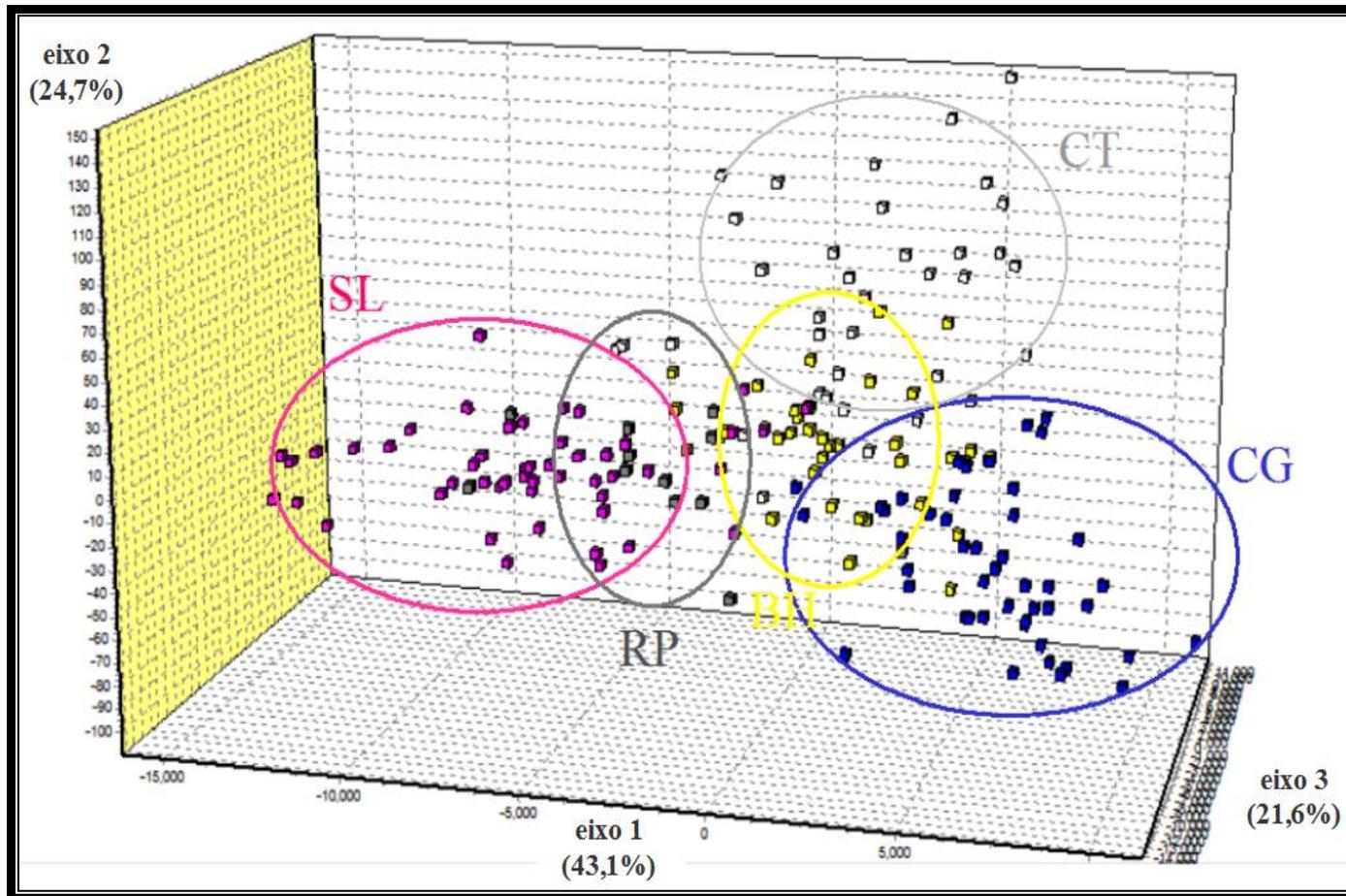
Os valores par a par de F_{ST} e R_{ST} foram calculados entre todas as populações genotipadas, baseando-se nos dados dos sete *loci* de microssatélites (TABELA 14). Assim como observado utilizando-se o marcador mitocondrial, os resultados estatisticamente significativos (especialmente os valores de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

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

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

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

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



1

2

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

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

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

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

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

1 5.5. AcASP-2

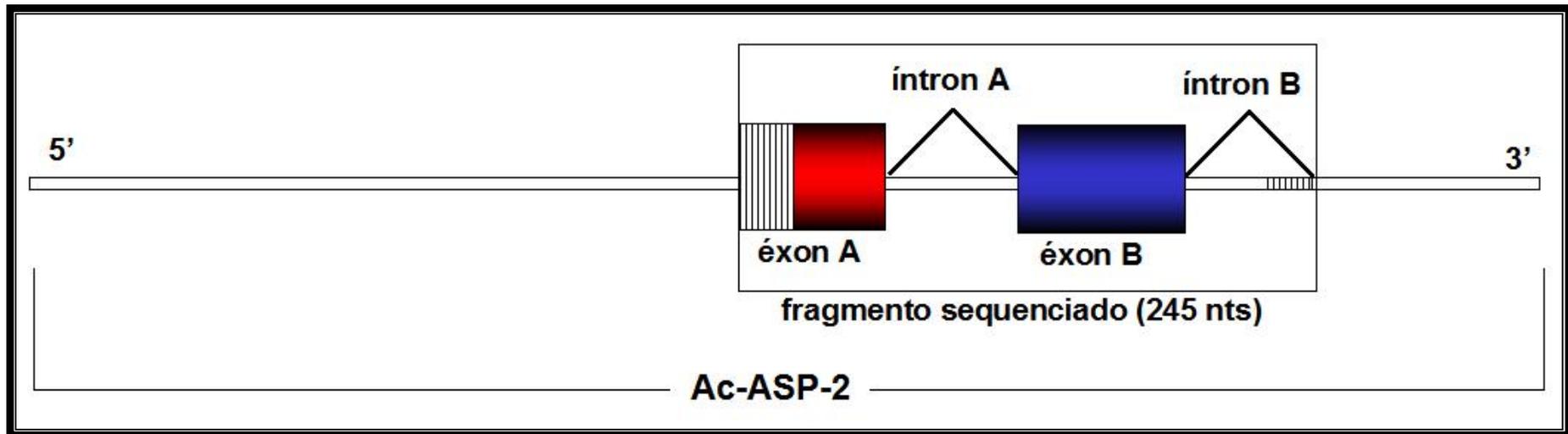
3 5.5.1. Iniciadores, PCR e arquitetura genômica identificada

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

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

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

1
2
3
4



5
6
7
8
9
10
11

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

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

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

2

3

*Posição de anelamento na seqüência AF089728 (mRNA codificante)

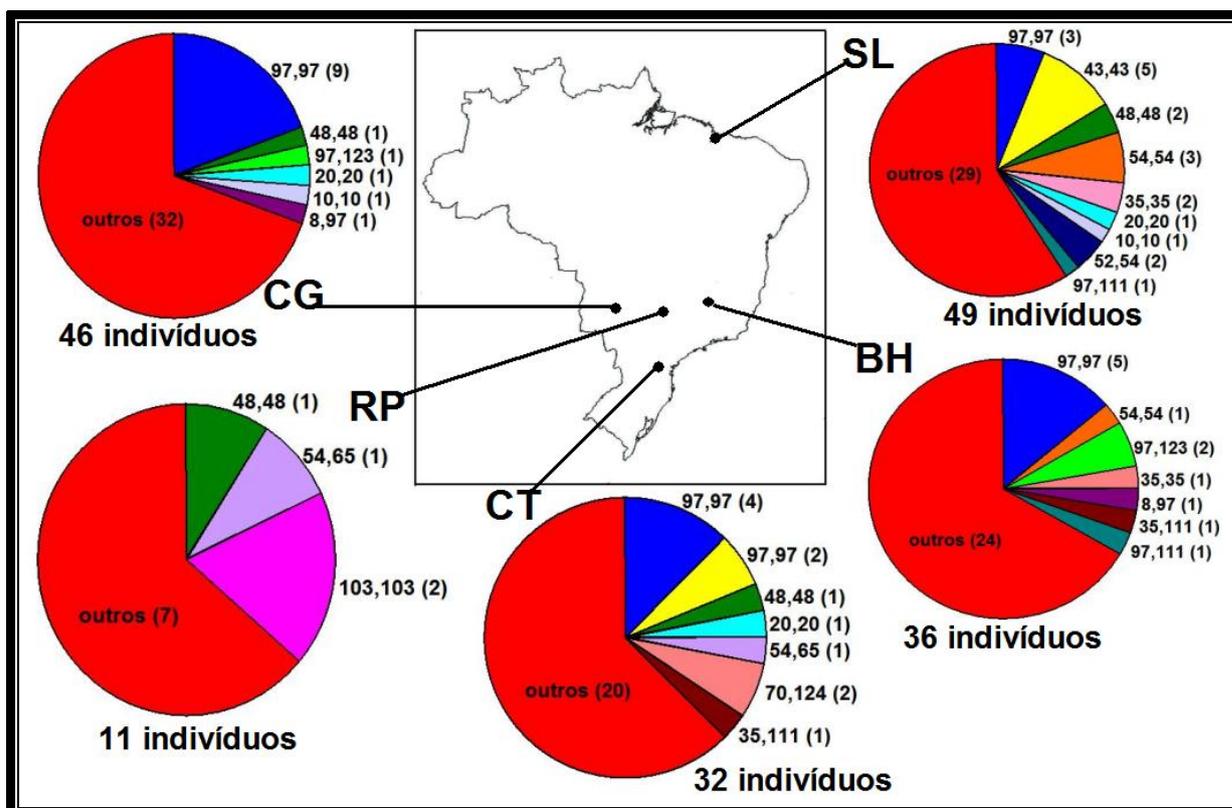
5.5.2. Diversidade genética e aminoacídica

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

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

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

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



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

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

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

3

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

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

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

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

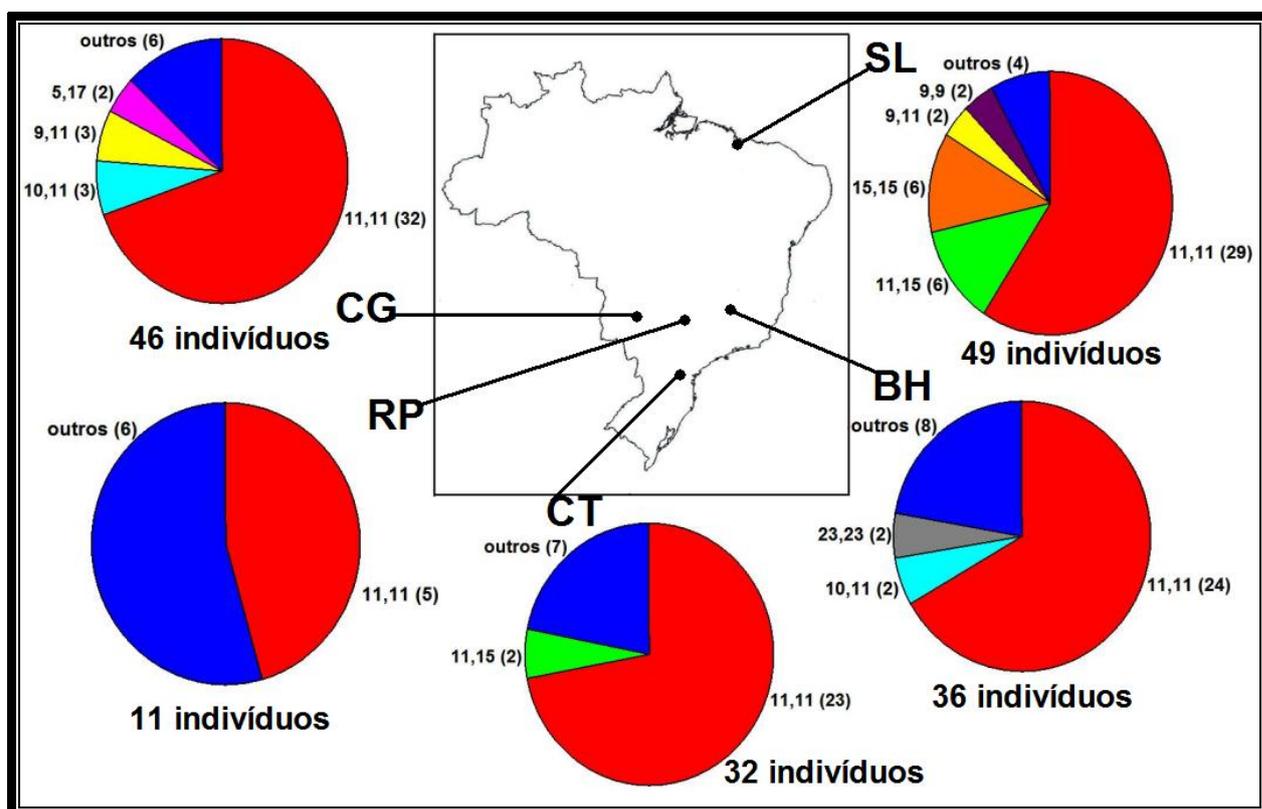
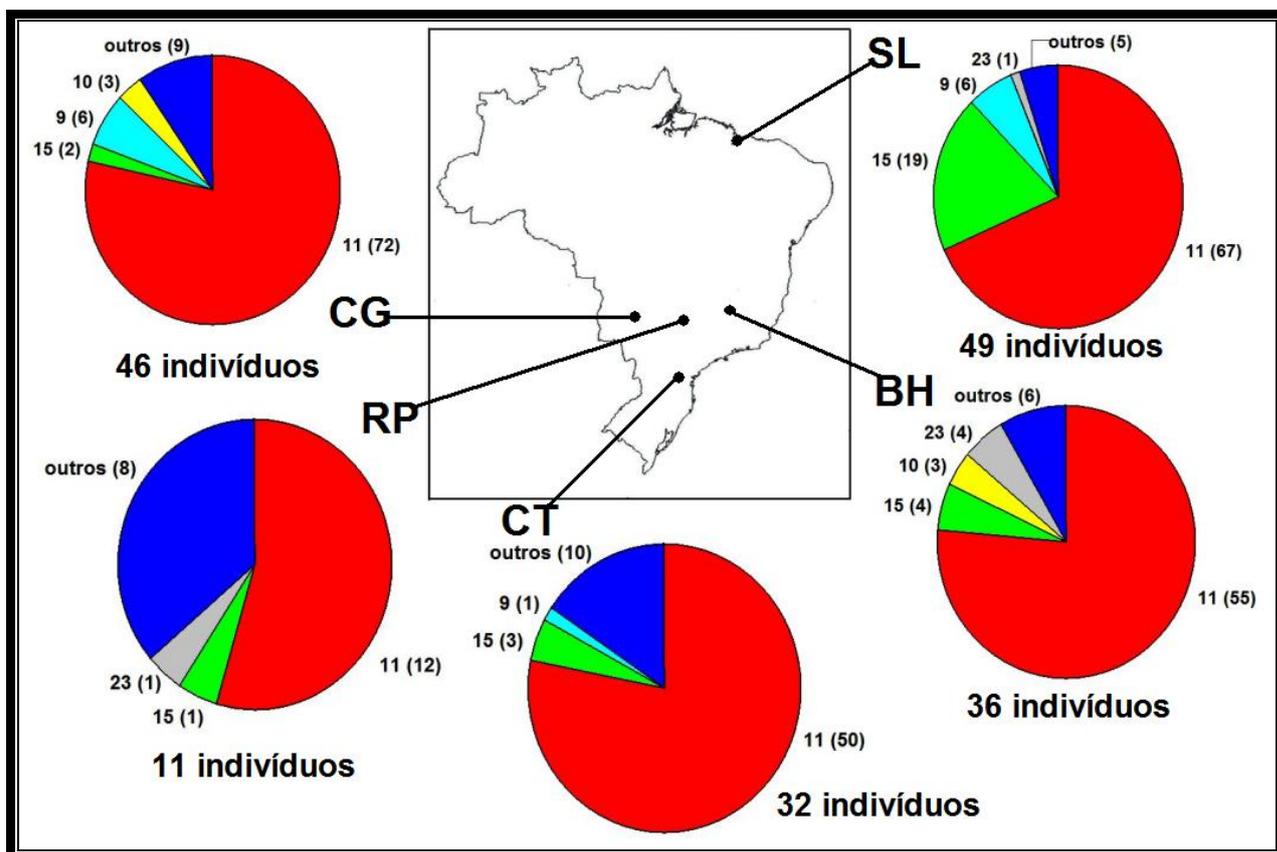


FIGURA 25: Distribuição dos genótipos formados pelos 27 alelos identificados nos 135 nucleotídeos das regiões codificantes (somente os éxons) de Ac-ASP-2 nas populações brasileiras de *A. caninum*. As freqüências absolutas dos genótipos em cada população estão apresentadas entre os parênteses.

1
2
3
4
56
7

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

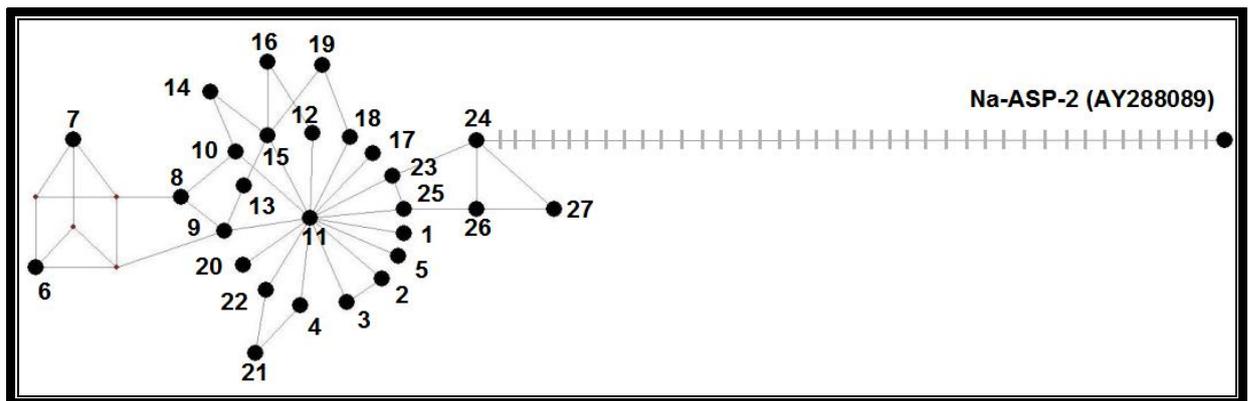
12
13
14

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

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

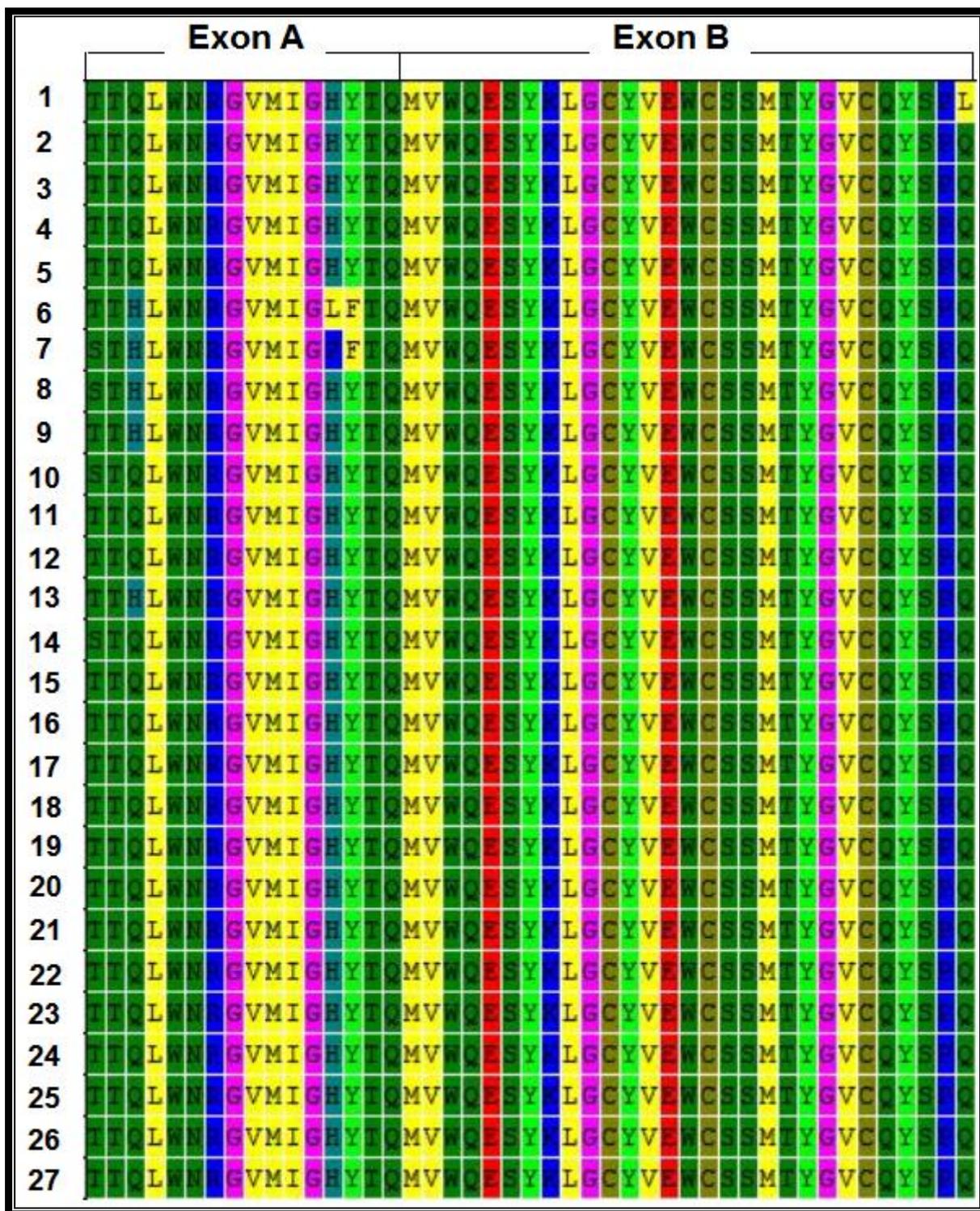
3

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



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

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



1
2
3
4
5
6

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

5.5.3. Estrutura populacional

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

1
2
3
4
5
6
7

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

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

8
9
10
11

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

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

6 – DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

27

28

29

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

7 – CONCLUSÕES

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

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

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

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICE 1

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

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

11
 12
 13 **Legenda:**

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

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

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

23
 24 GAATTCCATCGAGATTCTGCGGAGAAACAAAGATCGTGTA AACAGTTTGGGGATTAACAGA
 25 AGTTGTTTCGAGATATTACGAAAACCTTCTCATATGTATTTTCAGGGTAAGAAATTTCCCAT
 26 TGAATATGATCTCAGAGATTCTTCTTCCCGCAATTGGGAACGCGATGAGAATTTTATCA
 27 AATTTACATTTCCCATCGACCTGCCAAAGGATGTTGAGGCTTAGAGGATTGGA ACTCTGAA

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

11

12

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

14

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

17

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

32

33

3) Acmic3 (amplicon ≈ 195 pb)

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

CTGTGGTGGATTCTTTGTGGCGAGAAGAGGTCACAGATCAGCTGTTCCCTTCGAAAACAGGGT
 CAGGCATGAGAGCTGAGAAAAGTATGTACCCAAGTGTGGATGAGACTTTCTTTAAACTTCGG
 CGCGGGTCGCGACATCCCTAGTGC[→]CGCGTCAA[→]ACTAACGACTCAAAATGGTTAGCATTGAAAT
 GAAACTCATTTCGAGTGAGGTTACAATTGAGTCTTTGGTGACCTTGAGGTGTGTGTGTGTG
 TG
 TGTATTTAACCCATTAGATAAAG[←]CGCCAGTGGATTAATGCGAAGAGTGCTTTTCGTCTGACA
 T

4) Acmic4 (amplicon ≈ 264 pb)

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

GAATTCAACCGTAAGGGTCACCATTTATTACCATGATTTGGGAATCACCGATATCAGGATGA
 TTGTGATCACCCATGTCAGGATCATTCAACGAGCTCACGAAGGAGAAAGGAGACATGAGGAG
 AAATGTGAGAAAAGAATATACAAAATGCTGCAAAAATATCGTCATTTCCACATCAAACGTCTT
 TTTGAACCCTTTCAGCGAGCGCGAAGTTCAA[→]ACTTAACAGCAGTTGCTTTTTCTAACGGCTC
 AATTACACGCAAAATACCTATTAGTAGTTATAGCTCGTTATGTCTCAATGTTGTTAAAG[→]TTC
 AGGAAGAACGGGACTTTTAAACAAAATGCACTTTCTAGAAGAAATTCATGTGTTGAGTGACAT
 GTTTTTTGTGTCACCAAGTTGTGATAGGAACGACTCCTAGAATGAATGAATGAATGAATGA
 ATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGGATGGATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT
 GAATAAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAGCAAGTCC
 GAATCTGATCTGG[←]AGCGCCGGTATCATAATTTGGCAAGCCAGTAATTC[←]CGGGGACACTTTG
 AAACCCAGCACGCTTACGAGTGGGAAAGGTGAAGAAATGCTCCATAGATCCTTGACGAAAAC
 GTTGAGATGCCACGCATGGCTGTGATAATTTCCCTCTCTGTCCGTCTGCCTGAAATCGTCTC
 AGCAGACATTCTCAGGAGCAACTCTGCGCTGAAGCTAACACCCCAGGAAATTAACAAAACCC
 TTGTTTGGCTTCCTTAA

1

2

3 **5) Acmic5 (amplicon ≈ 266 pb)**

4

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

7

8 GAATTCTTCCATAGCGGACAAGAGTGTACACTCGCGGAGCATAGCCTGTGCCACGCCCATTT

9 GTTATAATACGTGTTGTCGGGCTGCTTAGCTGATGTTCTCTGCCGTCCCTGTTGTCCTCAT

10 TAACATTCATCTTTGCGTGTGCTCCCGAAATCAACTCCCTGCAAATTTTTTCGATTAGATAA

11 TTCAGGAAAGGGTGACATATTGCAGTGGAAAATGTAGTCCTTAGTGATATTTTCTAGACTTC

12 CATCAAATCTCTCCTCCCTAACAAAGCTGCAGCAGCTATTGGAGCCCTTTCACAGTCGCTTT

13 CACCCTATTCCACTTTGACTTGCTTAGTCACTGCTGCCGTGTTGCAACCGCGGAGCGGTGTA

14 GTCGCGACGCGGTTCCGTTTGCGAACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC

15 AC

16 TTTGAACCCTAATTGGTTATTGGTTATACCCCATCCGATCTCTGTGATGCGTGTCAGACTAT

17 GTCAGGACAACCGAATCGGCATGTCGAAACTGCGTCGCGGCCGTTATATTTGCGAGGCTTCG

18 AGGCATTGCTAATTGGAGTCATCATCCACGGAAAATTCCACTCCTAGGATCTTGAGCGTTTC

19 GTGCTTCAATCGATTGAGTACTAGTGAGAAAGTTCTCTATCCGAGTGATAACAGTTCATACC

20 GGGTTTCAGCCGAGCCCTGCAAGTCATATATTGTCTGAGCCCCCTACTGTCTTCGTGAAGGG

21 CGAAAAATAACAATACTAAGTCT

22

23

24 **6) Acmic6 (amplicon ≈ 241 pb)**

25

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

28

29 TCTCGCCCTGTGGTGGATTCCAGCCCGCCAGCGCATTTCAGGTAAATAGTACTAATAGGTAGG

30 TATCCCACTCTATATCACCAAACACCTCCATTCCCTAAGATATTTCTTTATAGACGCTTAGC

31 GTGCGTGTAGCGTGATACTTGACACAACAATAGACACAGCTTTTGGATAACACCCTTAGGA

32 GGTTTGAAGAGACGCCTAGCCTACGACGTGGAGGATTCTAAGAGAATAATCCGTGAGCCAT

33 AGATCAGATTTATATATAATTATATAGAGTAAGATAATAAATGGAAGTGTGGAATGTGGAA

8) Acmic8 (amplicon ≈ 393 pb)

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

GAATTCCTTCTCCCACAAACGGCGGTGGCGCCCCTCTGACTTAGTTAGCGACGATTCTTATT
 GTCCTCTCCTAAATCATGCTATCATTCATGTCGCATCGCAACCCACATCCTTGTCATCCTTC
 ATCCGCTCGGCTCGTCCTCCTCCTAACGGCATCGTTCCCACCTCTCCCCTTTTATACGA
 TCTTGCAATCACAGGCCATTCCAAATGTAGATGTAAACAATTTTCGGTCATAATAAGAAATT
 AACACGTCTGTACATGACAAAAGTGCCACGAAACACCTGTAAATTAAACTAAAACCTAAAAT
 TTACCATATAATTCAAAGCACCACCTGAACACGATGGTGTAGGTATCTTCCGTTTTTAATGGC
 TCGT **TGGCTGGTTCTCGTG** CACAGATGAC **CACACACACACACACACACACACACACACACACA**
CACACACACACACACACACACACACACACACACACACACTCACACACACACATGAA
 CTGCCAGTTAATAGATAGTATGATATTTGCCGGCGGTCAGTGGCCTGAAAAACGGGCTGAT
 GCCTGACACCCTTCACATAGCGGGCCAAACCCCGACGGTCATGCATCAACCCAATTGATTCT
 CTGTTTCAGCCTGCGATTGCCCCGATAGGGCGTCTAGCCCGCTAAATGAGTGTTCGCCCCGCT
 GTTAGCCCAGCTACGTGTCTTCGTCCTGTCTGAGTTGTTTCGAATGACGTGGGAATATCGGA
 TCGCT **GAGCTTATACACTGCCCTTT** GAATAGTGTGCTGGCATGGTAGCAATTGTACAAAAAT
 TGTAGAGGGGTTGAAACGGTTTGCCGGACG

9) Acmic9 (amplicon ≈ 220 pb)

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

GATTCACAAACGGAATGGGAAGAGAACACGGATACGAAAGGAAACAATGTACATCTAGGTGA
 CTTAGGTGGGAGGGTCCGCCAAAACAGGACGCGCACCCACACCGTTGGATCCGACTCCAAG
 CGTTTTCTCACATTTGAACGCCGGCGCACCGTTATCACACCGTTGGACCCGACTCCAGGGGT
 TTCCCCACTTTTGGACGCCGGCGCACTCCTACAGCGACAGTGGACCCGTTGCAGAGCA **TTTTT**
CTTCGGTCTAGGC CACGCCCTCGGATTTGTTTT **CACACACACACACACACACACACACACACACAC**
AC
ACAGAGACAC

1 AGGCGTGACAGACTACGCCCTTTATTATAA ← GTCATGATATATGATTACTTTACAGTGTGAGA
 2 GCTCTTCTAGCGGTAAGCATTCT

3

4

5 **10) Acmic10 (amplicon ≈ 172 pb)**

6

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

9

10 GAATTCGTAGTATAC → GTC AATTGTGTTTTTATTTTCGGCCCACATGGTTTCCCCATGTAATAA

11 ATAAT

12 AATAATAATAATAA ← TTGTGAAGAATGAAGCATTCTGAAGAATGAGGGATACAACGATGTGATT

13 TGCTATCCTATCACTGTTATTGTAAACAAGTGTACATTTAAGGCATTGTAAGAGTAGGGTAG

14 CATTCAATTCGCTTGTGCTACTGTGGTTGAGGGTTCTCAATAAAGATCCTTAACCACACTTC

15 TTCTGCACACAAAAGAAGCGGTGCAATCACTTGGGGGCCGAACGCCTCTACCGCCTGGAAGT

16 ACTGCACTCAGTTGCAGTACTAAGGCGTGGACCCTGCCAAGCCGGCAGAGAGTGAAGGAACC

17 TGCGGAGTCAAAAACGTAAGGTTTCTGTTTCAATCCGCATCCTGCGTGGAGGTGACCTCGCC

18 TAATTCGCCTTTCAACAGGATGACGAATAACGACAGTATGGACGACCTCGACCTCGAGCGCC

19 TACTGTTAGATGACCCACGGCGGCGGAGCAGATTGCTACGATGAAAGCTTCGACGGACCGC

20 CTAATCGGGACAGTACAAAAGCTGGCAGAAAACAACGCAGCACAGGTAAATTCAGTTTGC GA

21 GGTCATGAGCAGCAAAATCAAGACTATCCAAACCATACTGACTCGTTCTTAGAAAACCTCAG

22 CCAAGAAGCGCAAAAAGAAGACAGTAGAGCAGCCCTTTTCGGCTCTCGATGCTGAATGCAAGG

23 TCAATGTTACGCGCAAGCTTGCCTAA

24

25

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

27

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

30

31 GATTCATTGTGCAAAACTGGCCGAGTGCAGAGGGATCAATATAAAGGTCTGTCATCCGTCAT

32 CAATATGAAGGCAACTGTCACAGTCTATCAATGAATGGTTTGAAAAGGAAATGGTTTCAGTC

33 AAAATTTGAAGAGGAAGCGGAGGGAGAGGAATCCATGC → GCTGAGTACGAGACCGAAATAG

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

10

11

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

13

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

16

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

28

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

30

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

33

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

14
15

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

17

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

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

1

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

4

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

7

8 GAATTCCAGTGGGAAAATATGTATATGACCCATATGCATGCACATCTGCAAGAGAGAGAGAG
 9 AGAAAGGAAGAGTTGGGCAACA
 10 GAGAACGGAATTTTTATTATATTCTGGTACTTTTTAATTACACTGAGTCGAGTATTCAGAAG
 11 AAAAAGTTGAACAATCGTGCAAAGAAAAGTCGAGCGGAGAGGGATCAGATGTTTCATATACTA
 12 CGTACTCAAATCCCTCCGGACGGAAGATACATGGTTCTGTTGCAAATAACCACGTTTCTAT
 13 TCAACCATCCTGGTGAATTTTGTGTCAGCCATCATGAAAACATTGGCAGAACAACGGTGTAAAC
 14 AAACAATCCAACCTCGGTAGTACACATCCGTACAATTGGGAAACTATGGCCGTTGGTGAAAG
 15 CACACAACAAAACAACAACCTCTCGCGTTGTGCTATCTAGAGTGGCGATCTGGTGATGCTTA
 16 CTCACAATAACAGTACTTGTAAATGTCGTTCACTTTCATGGTCATTCAGCGTCATCCATTCAA
 17 ACTGTCCTTGTACTCGTGCAAGAGTAGTCAGGAGCAGGACAAAAACGACACTCCACTCTCT
 18 CTCTCCATTTCTTGGCATAGTACTCAGGGGTGAAAATAGATAACCACTCTGTAACGAGCAAAA
 19 ATCGAAATGAATTGGGTTACCCAATTCGATAATTTTAG

20

21

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

23

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

26

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

1 ATGGAAAATTTTACCACTCACCCGAGCCGCTGCGATTGGAAAAAAGAAGCAGATCATTGT
2 GATTTCTTTACCAAACCATTACGTGCCTCC

3

4

5 **20) Acmic20 (amplicon ≈ 289 pb)**

6

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

9

10 GAACTTTTGGGAAGCGAACACGTCTTTGCGGCGGCGATCATGTCCATGATTTCTGAATAC
11 GAATATCCCCATTTACATCTTGCAAACCAGTCTTCTTAGAATAATTTTCAGGTAAGGCATGA
12 GCAAGACGTTGAGGACCAGTAAAAACAGATTCCTGCAGCAAAATTTGAATGAATTGATCAAA
13 AGAGTTCGAAAACTCATTAECTGCACCACTCTTATTGCCTACATAGGGCAACTTATATAGA
14 TGCGTGGGTCCAACGCGCGTACGTACATACCATGAACGAGCCAGTCAGAGCCATAGTTCTGA
15 CGCATCTCAGACGCGCGTGAGACGCACGCATTTGCTGCCTCGCGGCGGCCATGTTGCATTTTC
16 CATTTCAGGGTACACGTTCCACTTTGGCTGCTTTTTCACAGAAAATTCCTTGCAAATAGATGCG
17 TGCGTAT **GATGCGCGACTGAC** GCAGATATCTGGTAAGAAATGTCCTTATGCATACGTACATT
18 CCGTTGAAATCAGCATTCTCATTCTCGATCTCTCCTTAGCGAGGTCCGGATCAGTGCAGTCT
19 TCCTTTCTGGCAAGAT **TTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTC**
20 **ATCCATTCATTCATT** GCTAGCTAAGCGAGACGTTAGCAACAATGATATTATACATATGCTTT
21 TATTTCTGCTTCAAACCTATGAAAGCAAA **ACATAAGGTTATTAACGGG** TCCGGGGTGAAAAT
22 TCTACGTTTGTACATTACTTAGATGCGTGCGTTTGATGGCGCCTGCGTTCCATAGGATGAA
23 GGATTAAACTTACATTTGA

24

25

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

27

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

30

31 GAATTCAACCGTAAGGGTCACCATTTATTACCATGATTTGGGAATCACCGATATCAGGATGA
32 TTGTGATCACCCATGTCAGGATCATTCAACGAGCTCACGAAGGAGAAAGGAGACATGAGGAG
33 AAATGTGAGAAAAGAATATACAAAATGCTGCAAAATATCGTCATTTCCACATCAAACGTCTT

1 **23) Acmic23 (amplicon ≈ 348 pb)**

2

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

5

6 GATTCGGGAGGAAGCAAGGCTTCATTTGATTTGAGGACATCGAACCAGGAAGTCCCAGGAAG

7 CCAGGCATTGAAGGGGAGAGGATAGAATCTTTGATTGGT  TGCTGGAAAGCTTCTGGA AAAA

8 ATTCGGATTTTCATTGATGTAAGTGGCAAAAGTAGCAAAGATCGTTGTGCAATTTATTTGTAA

9 TTCCCCTCGTAGTCGATTCTCTTGTGCGGAGTGAACAAGTGAACGAATGAATGAATGAATG

10 AATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGATTGGATGAATGAATGAATAAA

11 TAAATAAATGAATGGGTCAATGAATGAATAGATGAATTAATTAATCAATGAGCGAATGCATG

12 AGTGGGCAAATGAATGAATGATGGAATGAATGGATGAATTCTGAACGTTTCGTTTCACAATC

13  ACATCCGAGCTCACAA AACAGCCATTTTCAAACATCGTTTTGTGACAGCCCCATTTTGGAA

14 AAAAAGTGCAAAACGTATGTGCATAAGATATAACAAAAGAAAATTTTGAAGGAAATAGAACA

15 CAAAAGTAATTCTCTTTTTAATGGGAATTTTCCCAAATGCTTGAATCCATTTGGAAAAATTT

16 TCAGAAGACCAAAAAGTTCCACGACGAATCCGCCGCAGAGCGTGGATTTCGTGCACAATCTT

17 TGCAGTGGATGCACTACGAAATCTTGCAACAAATCGCTGAGCCAGAAACAATAATAATGTTA

18 GGGACATTAGGAAAGCAATGAAGATAAGCAAAAGGGAAAATGGTTACCAAAAAAATCTAGCG

19 AAAGTCCTCATCGAGTATTCCAGAGCCAGATGAATGCCGCGCCGGTGATGGGCCTTCTGTGA

20 AACCTAA

21

22

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

24

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

27

28 GATTCATTGTGCAAACTGGCCGAGTGCAGAGGGATCAATATAAAGGTCTGTCATCCGTCAT

29 CAATATGAAGGCAACTGTCACAGTCTATCAATGAATGGTTTGAAAAGGAAATGGTTTCAGTC

30 AAAATTTGAAGAGGAAGCGGAGGGAGAGGAATCCATGCGCTGAGTACGAGACCGAAATAG

31 AGACGATTTTTATAGATAGAGAACATTCAGACGTT  GAGTTGGGCTCAATCCATGATTTATTT

32 GATTCAATTGTTGAAGTTTAGAATTAGAAATTTTGACATAAGGTCATTTAATTAGTTGGCAC

33 GTGAGTAAGTGAATGAGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT

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

7

8

9 **25) Acmic25 (amplicon ≈ 354 pb)**

10

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

13

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

29

30

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

32

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

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

18

19

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

21

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

24

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

1 TGAATGAATGAGTGAGTGGATGGATGAGTGAAATGACTGACTGACTGAATTATGAATGAATGA
 2 ATGACTGAATGAAACGAATGAGTCACGACAAACGCAACTTCTATGTTCTATGTG

3
 4

5 **28) Acmic28 (amplicon ≈ 327 pb)**

6

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

9

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

24
 25

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

27

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

30

31 CCTGTGGTGGATTCTCTCTTGAGCAATTCCCCGGTCTTCTTGAACAAAAATGTCCTCAAC
 32 ATCCTCGTAGAGGAAGAGTAGCGCTTTTGAATTGTTGCAGAATGATAACAG**ATTGGTGGAGG**
 33 **AAAGCGA**ACAGTAGTAACACAGATAGATTGGCTGCAATTTCAAACGAAT**TGAATGAATGAAT**

1 GAATGAATGAACGAACGAACGAATGAATGAATGAATGAATGAGTGAATGAATGAATGAATGA
 2 ATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGCA CAATCCAATAAAGGGAATATATTAG
 3 TGCATCTTCAACATTTTTTCAAAAACATAGACAGCCCTTTTTTTGAGCACATACTGGGCTCCGT
 4  TTCTGTTTCACTTCTTATATGGCACGCAATAATTAGTTTCCTGATGTATTGCTTACTCTA
 5 AATGATTTATTAGATATCGTTCCTTAGAGAAACAGCTTATGTTTCGGAGAGTATGGGAAAGCA
 6 AAAGAGACTTTATTCTTAGCACTACTAGTTAATAAACTCATAGCAATTATGGTAGTTCGAGA
 7 ACAAGTTGAGGGAATTGGTAATTAAGTCCTGCTCAAGAATTCAGAACACGGGACAATGAACT
 8 CATAACTTATTAATGAATATCAATGAGTAGAAGGAATACACGTGTGCGACCATGACTATCAA
 9 CGTGCGACATAGATAGATAATCAGTAGATGTGATCAGTTAGAGAGTCGTA

10

11

12 **30) Acmic30 (amplicon ≈ 296 pb)**

13

14 >gi|59239868|gb|CZ220024.1|CZ220024 AIAA-aae26e09.b1 Ancylostoma caninum whole
 15 genome shotgun library (AIAAGSS 001) Ancylostoma caninum genomic, DNA sequence

16

17 GACTTTTTTCGGCTTTTTTCCACACGGTGAGAAAAGAGTTAGCAAATTTTCGCTATTATGATAA
 18 CTACCAAATTTTGGAGATACTTGAAAGATTCCACCTAGTAATTTTCAGTCACAGGGCGAAAT
 19 AGCCGGGACACTGAGAGAGGCTGCATATGCCGTATAGTCACCAAATAAAAATGTGCTGAAGT
 20 GCCTCAAAGAACTTGCTATATAATCAATTCAAATAAACCAATGTGATGTCAGCTACCCCTAC
 21 CATCTCTATGGTAGGTTGATTGGCCAAGAAGTTGGACACG TGGAGCATTGCGCAGTGAAGTA
 22 ATGAACAGCGCTTTTAAACATTAGTTGCTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATT
 23 TTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATT
 24 CATTTCATTCATTCATTAGGTTGATGCAAAAGAAATGGCCCTTTTTTCGAGTTGTCTCTATTTT
 25 CTTTCGCATTTTAAATGAACGATATCTTCTTCAAACATAAAGGTAATTAATTAGCAGCGACT
 26 ATTGCT TATCGTATGAGCAGGTCCTGACGCCATACGCCTGCATCTCGTGTAAGAGCGAAGC
 27 CAAGAAAACAAGAACCTCGCATTTCATATCGTCATGTTTGGCGAATTTTTTCTTGTGGAATA
 28 ACAGTTTCTGGAGCCGGGAAAAGCGACAAAATAGGGCAATATCCTTGGATAAATACGATGAC
 29 TTCACAAACGTTTCCCATCTAAGTAAATTGTTAGTGTTCAAGCCAGCTCTCGGGGAGCGAA
 30 ATTTAGGGCC

31

32

33

1

2 **31) Acmic31 (amplicon ≈ 233 pb)**

3

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

6

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

21

22

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

24

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

27

28 GATTCATTTATTTATTTATTTATTTATTTCAAATACACTCCGGGTGTAGCAA'ACTGTAAAACAAAC
29 CAATTGGGACATCAATCACACAAAT'TCCCATT'TCCGTA'TTAATTATGAAGCATTAAGCAA
30 CAGTACCACCCACCTTCTCTCATGTGATCAGAAAGACCCACTGACGAAACCTCAAATCGCTC
31 TCCCCCTATGGAATGAATAAA'TGAATGAATGGATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT
32 GAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAGCTGAA'GATCAGCCACCGAAAGCC
33 CGCAAATTTCTGCGAAGTCATCATCTGCGACAAA'TCGTTGTACAATTGGAGCCGTTCTTGT

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

8
 9
 10

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

12

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

15

16 GAATTCTTGTAATTGCCTAAGGACATTGTAGCGCACGTGGTTTTCTTCCGAACAGAGAACAG
 17 TACCTTGAAGTAGTGAATAAATGAAGGAGAAAGTGAGAAAATGAGAGTGGGTGGGGATAAAA
 18 GATGATTGGCTGGC **CGGGTTGATTGGACAATT**CGAGGAAATGGTGAGAATGAGTAAACGTGA
 19 GGCTTTGAAGAGAACAAAGTGAAAGGCTGTGTTGATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGA
 20 ATGAATGAATGAATGGATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT
 21 GAATGACTGACTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATAAA CGGGTTCACTGGATGAATT
 22 GACGG**ATCGGCTGAATGCACGA**AGGAAAGAAGCCACGAACGACTGAAACAAAATGGATAAT
 23 AAATAAATTAAC

24

25

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

27

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

30

31 GATTTCTGCTCTAGGCCATATGTTAGTTGTCGTCCGAATTATGAATGAATCCTCGTCTGAAGA
 32 TGACAACACACATACTCTGTTTACCCCATTCCTCCTAGAACCAATCGTAACGAAATTAGTGA
 33 ATATTTGTCTGGACTTGCAGCAAATTAGGTTGCACTTTCTATGAGAATCTGAATTAATGTGG

36) Acmic36 (amplicon ≈ 315 pb)

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

GAATTCCGGGGTGGACCATTTCCAGCTGCAGTCAACCCCCACGATTGCTGGAGTAAACACAC
 CTTACAGAAAGCAAGAATCGTTCCGACATTGCAGAAACAAGGAGTCCACCCCATGATCCCA
 CCCGCTCTCAGGGCAGGCACAAGGTCGCGTTTAGTCCGCGATCAGCCCCTTATCCGACACC
 TGTTAACGATCCACGCAGTTCTGCAATTAACCAGCTTCCTTGCCCTGTTTCCAACGTTACAG
 TGTTTGCTAGGGAACGGCATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGA
 ATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGA
 TAAATCATAAATTTCGAACTCAATG
 GGGAGTCAAAGTTAGAAATTCCTTGTGTCGTCAAAGAAGTTTTGCATGGAAAATCAGAAAGTATT
 TTCTTCCCTGCCACATTCTCATATTATCCCGAAAATGTTCCACCAAAGCCTGAAACATAGCAG
 AAAGCGACGGAAAATGACAGAGGATAGAGGAAACATGAATCGAACATAAATCAATGTTATTT
 TTTCCCGTCTCAAACCTATTGAACGCAATTAAGGAGGATTAGCGACGACGGACCCAGATTAA
 CGAAACATTGTGAAATATAGATAATATTTCTGTAATTAGTATCCATTGACAGTAAATTTCCA
 ACTGTTGTGATATATCCCACCAACTTGTGCTGATTGATTCCAACTTGTGTTGATTCAAGA
 ATGGAAAATTTTACCACTCACCCGAGCCGCTGCGATTGGAAAAAAGAAGCAGATCATTGT
 GATTTCTTTCACCAAACCATTACGTGCCTCC

37) Acmic37 (amplicon ≈ 378 pb)

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

GATTCGGTGGACGCGAACAGCTGGATGAGCGACTGGCATTGTCAACGAGCAGAACATCGAC
 ATGATCAAGCGTAACGATGTCGTGAAAAGTGGGTCAAACCTCAACAATCGATGACTGAGCCG
 GATATTGATTGAAATTTGATTTTCAGATCAGTGGTCAAAGTTCGACGATCACCATGATCGT
 ACCATCGGTCTACAGTCTGTTGCTCGTGATGCCGACAAACGTGCTGAGATGGCTAGGAAAGC
 TACGGATGCGCTTGTCAGGAGGTTGGTCAATTTTGGGCGGAGCTTACCCACAGTCCAAGAC
 TTGTCCTTTCATTCATTCACCTCACTAATTTCACTCATTCAATTCGTTCACTCATTTCATT
 CATTTCATTTCATTTCATCCATCCATTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCACCCATTCA

1 CCCATTCACCCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATT
2 CATTTCATTCATTCATTCATTTCGCCCATTCAATTGATTCATTCATTCATTGGATTTTCGTAGTTTTTG
3 GTACCTGTGATAACTAACACCTTGTGGGCAGGGTCTTCTGTCCCTCTAGTTCATAGAAGCG
4 AACATGTGTCGCTTCTGTCCCAGAAATTCACAAGCAGCTGGACAAC[←]TGACACAAATTCAGG
5 TGAAAGAGGTTGCTGACAAGGCAAACAACTTGTGAACAGCACTGGTTCATGAATACGAGAAG
6 AATTGAGAGGAAGGAAGACGGTATCGTCTACTCACCCAGTAATAACGACTACTCGAAAGGGA
7 AAA

10 38) Acmic38 (amplicon ≈ 295 pb)

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

14
15 GATTTGTAAAACAACCTTGCATACGGTAGGGAGGCGGCAGAGGTGCACCTACACATTGTACC
16 TTCTCTTTATGAATACAAAATTATGCAGAGAAATATCTCAGTGCCGCTATACTTTTGAATTG
17 TGGCGAGATTGCTAGAGAACAAAATATCCAAGAGATGTATAAATGGTTAGAAATAGAAATCA
18 CCTGAAGAATGGATGAAACATCTCCCTCAATCGGTGCTGGATCTGTAGGGCGCGTGAGGTGA
19 GCAAAATGGAGATCAAATGCAGTACAACCGGGTAGAGGTACGAGGCGACTGATAGCGTCGAG
20 CTGCACGTGCTGTCAGTCATTTCTGCAAGGACAGATTGTAAAAGTAATGTGAAGATGGGAA
21 GTAGGGAGGAGGGGACGCGAGGACGAAGAGAAATGTTTCTGGAGAGTAAACGAACAAGTGGG
22 TAGAATATCTGTTTCGATTGATTTCGATGGAATTGAATCGAGTTCCAAATGATTTCGATATTCAA
23 GTCAT[→]TCATGACACCGGTTAGGTAAAAAGCTATCATAGAAGTAGCTTAACTGTTCAAAAAA
24 CAGATCTACTTGTGGACAAAGTGAAATTATGGATGAGTTATTGAATAAATGAATGAGTGA
25 ATGGATAAGTGGATGACTCACAGAA[←]TGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAAT
26 GAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAGCCAGATTTCTGAGCAATTACAACGTCGAATG
27 CAGAAATACAGCTGTTTCGCAAATAGGTGCCACTGTCGTTTCGTCGCTCTGATA[←]AGGATTTCTGT
28 GCAAGTACCCCTTTGTAAATAATTTGAACGGAACTTCAATTCGGCAAAGGGCAAATTCA
29 ATCCC

30

31

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

APÊNDICE 2

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

APÊNDICE 3

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

4

5 >h001

6 ATTCTCGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACACCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG
7 CAGACCCCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG
8 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAATTAGGTACTGTTGTTAAACGGCTATGGACG
9 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT

10 >h002

11 ATTCTCGGATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG
12 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG
13 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAATTAGGTACTGTTGTTAAACGGCTATGGACG
14 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT

15 >h003

16 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG
17 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG
18 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG
19 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT

20 >h004

21 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAAGTACATACTGAGGACTGTACTGG
22 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG
23 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAACCTTAAGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGAACG
24 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT

25 >h005

26 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGCCGCAAAAATTACATACTGAGGACTGTACTGG
27 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG
28 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAAGTTAGGTACTGTTGTTAAAGGGCTATGGACG
29 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT

30 >h006

31 ATTCTTGAATTCTCATCTGTGCGAAGTACGTCACAAAAATAACATACTGAGGACTGTACTGG
32 CAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCACATAACATCCGAGTTTGTAGGACTCCTG

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1 CCAGACCATCTGGAGATGTACAACGTTACAATTTAGGTACTGTTTTTAAAGGGCTATGGACG
2 AATATTCTGACCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCACAACCTGCGTTGT
3
4

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

APÊNDICE 4

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

4
5 >h01
6 CAGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA
7 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC
8 AACTGCGTTGT

9 >h02
10 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGAAGAACCATTCCACATAACATCCGA
11 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC
12 AACTGCGTTGT

13 >h03
14 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGACGAACCATTCCACATAACATCCGA
15 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC
16 AACTGCGTTGT

17 >h04
18 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCACTCCACATAACATCCGA
19 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGTAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC
20 AACTGCGTTGT

21 >h05
22 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA
23 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTATAATGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC
24 AACTGCGTTGT

25 >h06
26 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA
27 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGAAAAGTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC
28 AAATGCGTTGT

29 >h07
30 CTGAGGACTGTACTGGCAGACACCATAGGTCATCGATGAACACCATTCCACATAACATCCGA
31 GTTTGTAGGACTCCTGCCAGACCATCTGAGTGAAAAGTTCCTATCATAACTCCCCTGTTCCAC
32 AAATGCGTTGA

33 >h08

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

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

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)