

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO NOS
TROPICOS - MESTRADO

VANESSA ISABEL LEAL SALVADOR BIZINOTTO CARQUEIJEIRO BASTOS

AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA E GENÉTICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA
DE *Ancylostoma caninum* À DIFERENTES BASES ANTIPARASITÁRIAS EM CÃES
DA RAÇA BORDER COLLIE

UBERABA – MG

2025

VANESSA ISABEL LEAL SALVADOR BIZINOTTO CARQUEIJEIRO BASTOS

**AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA E GENÉTICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA
DE *Ancylostoma caninum* À DIFERENTES BASES ANTIPARASITÁRIAS EM CÃES
DA RAÇA BORDER COLLIE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

Orientadora: Prof. Dra. Joely F. Figueiredo Bittar

Coorientador: Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar

UBERABA – MG

2025

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

B297a Bastos, Vanessa Isabel Salvador Bizinotto Carqueijeiro.
Avaliação parasitológica e genética do perfil de resistência de *Ancylostoma caninum* à diferentes bases antiparasitárias em cães da raça Border Collie. / Vanessa Isabel Leal Salvador Bizinotto Carqueijeiro Bastos. – Uberaba (MG), 2025.

72 f. : il., color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

Orientadora: Profa. Dra. Joely F. Figueiredo Bittar.

Coorientador: Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar.

1. Cães – Raças. 2. Helmintos. 3. Nematoda. 4. Drogas – Resistência em micro-organismos. I. Bittar, Joely F. Figueiredo. II. Bittar, Eustáquio Resende. III. Universidade de Uberaba. Programa de Pós -Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. IV. Título.

CDD 636.71

Tatiane da Silva Viana – Bibliotecária – CRB-6/3171

—
—

VANESSA ISABEL LEAL SALVADOR BIZINOTTO CARQUEJEIRO BASTOS

AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA E GENÉTICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE
Ancylostoma caninum À DIFERENTES BASES ANTIPARASITÁRIAS EM CÃES DA RAÇA
BORDER COLLIE

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.


Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 30/05/2025

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. João Pereira Figueiredo Bittar
Universidade de Uberaba

Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves
Universidade de Uberaba

 Documento assinado digitalmente
AUTENTICIDADE GARANTIDA POR
Tudo o que precisa é um QR Code
Indique em QR Code o link do arquivo

Prof. Dr. Alessandra Aparecida Medeiros - Ronchi
Universidade Federal de Uberlândia

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora de Fátima e São Francisco de Assis, por me guardarem, iluminarem e abençoarem em cada passo dessa caminhada.

Aos meus pais Maria Angélica e José Boanérges, e meu irmão, Vítor Guilherme, que me incentivaram e apoiaram em toda carreira profissional. Essa conquista também é de vocês!

Ao meu marido, Rodrigo Carqueijeiro, que não mediu esforços para me apoiar incondicionalmente durante os anos de estudo e pesquisa.

Às minhas madrinhas Nahana, Beatriz, Maria Cristina, Ana Maria, Maria Carmen e Juliana Conti, padrinhos Jorge, Rui e Luíz, e ao avô Mário Salvador, por incentivarem cada passo profissional, e estarem presentes à cada conquista.

As amigas Paola Amaral, Paula Bassi e Izabela Pandolfi, por compartilharem comigo o amor pela Medicina Veterinária e me apoiarem em todos os meus objetivos.

Aos amigos Júlia Bernardes, Yan Odin, , Carolina Almeida, Júnia Barcelos, Júlia Barcelos, Carolina Isabel, Marília Conti, Daniel Higa, Rui Augusto Conti, Bárbara Marra, Állan César, Tuísa Salvador, Luis Mário Caetano, João Pedro Chiappa e Christian Vilanova, por tornarem essa jornada mais leve.

À Mirella, Clara, Ravi, Hansi, Nina, Laura, Maria Alice, Maria Clara Rebecca e Amanda, por sempre me lembrarem porquê segui esse caminho.

À Teca (*in memoriam*), Apolo e Theobaldo, que sempre foram e sempre serão minhas maiores motivações para ser uma boa profissional.

À médica veterinária Raquel Carneiro, pela disponibilidade, carinho e conselhos. Esse trabalho sem dúvidas não seria desenvolvido sem você!

Aos alunos que tive o prazer de acompanhar, aprender e ensinar; em especial, aos alunos Ana Luísa, Marcílio e Rogério, que me auxiliaram no experimento como alunos de iniciação científica.

Aos professores Isabel Rosado, Endrigo Gabellini, Rodrigo Supranzetti, Guilherme Venturini, Cleibiane Borges, Guilherme Caetano e Raul Nolasco, e aos colegas Priscilla Elias, Giovanna

Goulart, Gabriel Henrique e Lanamara Batista, expresse minha profunda gratidão pelo incentivo constante, pela parceria ao longo da jornada e por serem fontes de inspiração no desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade de Uberaba, ao Grupo de Imunologia Celular e Molecular - Fiocruz Minas e ao Laboratório de biotecnologia molecular – Grupo de pesquisa: Biologia Sintética e Modelagem de Sistemas Biológicos, pelo auxílio e condução dos experimentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido, peça fundamental para conclusão do mestrado.

Aos professores Joely Bittar e Eustáquio Bittar, pela orientação durante o experimento. Obrigada pelos ensinamentos.

RESUMO

A infecção por *Ancylostoma caninum* representa um desafio significativo na medicina veterinária devido à sua alta prevalência em cães e à crescente resistência aos antiparasitários disponíveis no mercado. O presente estudo objetivou avaliar a infecção por *A. caninum* em cães da raça Border Collie naturalmente infectados e investigar o perfil de resistência do parasito frente a diferentes classes de vermífugos disponíveis no mercado. Foram testadas as bases anti-helmínticas benzimidazóis (albendazol e febantel), lactonas macrocíclicas (ivermectina), tetrahidropirimidinas (pamoato de pirantel) e prazinoisoquinolinas (praziquantel), isoladas ou em associação. A pesquisa envolveu a coleta de amostras fecais para pesquisa parasitológica pelos métodos direto, Willis e Rietch, cultivo larval pelo método de Harada-Mori e extração de DNA parasitário para análises moleculares. Os resultados demonstraram taxa de positividade para *A. caninum* (69,7%) nos cães avaliados, com persistência da infecção após a administração de antiparasitários (resistência anti-helmíntica). A redução da carga parasitária variou entre os grupos experimentais (16,7 a 66,7%), sendo a maior redução associada ao tratamento com albendazol. A presença da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1 revelou a presença de helmintos resistentes aos benzimidazóis e reforça a necessidade de investigações adicionais sobre outros mecanismos genéticos e ambientais que possam estar envolvidos na resistência do parasito. Além disso, a ocorrência de infecção em um filhote recém-nascido que não havia mamado colostro e de um dia de vida, sugere a transmissão transplacentária do helminto. A persistência da infecção após o tratamento reforça a preocupação com a resistência múltipla aos antiparasitários e destaca a importância da revisão dos protocolos terapêuticos utilizados na rotina clínica. O estudo contribui para o avanço do conhecimento sobre a epidemiologia e resistência de *A. caninum*, destacando a necessidade de novas investigações para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes. A continuidade das pesquisas na área permitirá uma melhor compreensão dos fatores envolvidos na resistência antiparasitária e possibilitará a formulação de diretrizes mais precisas para o controle da ancilostomíase canina, minimizando os impactos na saúde animal e na saúde pública.

Palavras-chave: Canino; Nematoda; Resistência a múltiplas drogas; Parasitoses gastrintestinais.

ABSTRACT

Ancylostoma caninum infection represents a significant challenge in veterinary medicine due to its high prevalence in dogs and the increasing occurrence of anthelmintic resistance to commercially available drugs. This study aimed to evaluate *A. caninum* infection in naturally infected Border Collie dogs and to investigate the parasite resistance profile against different classes of commercially available anthelmintics. The anthelmintic compounds tested included benzimidazoles, represented by albendazole and febantel; macrocyclic lactones, represented by ivermectin; tetrahydropyrimidines, represented by pyrantel pamoate; and prazinoisoquinolines, represented by praziquantel, administered either alone or in combination. Fecal samples were collected for parasitological examination using direct smear, Willis flotation, and Ritchie sedimentation techniques. Larval cultures were performed using the Harada-Mori method, followed by parasite DNA extraction for molecular analysis. The results showed a positivity rate of 69.7% for *A. caninum* among the evaluated dogs, with persistence of infection after anthelmintic administration, indicating anthelmintic resistance. The reduction in parasite burden varied among experimental groups, ranging from 16.7% to 66.7%, with the highest reduction observed after albendazole treatment. The detection of a mutation at codon 200 of the β -tubulin isotype 1 gene demonstrated the presence of benzimidazole-resistant helminths and reinforces the need for further investigations into additional genetic and environmental mechanisms involved in parasite resistance. Furthermore, the occurrence of infection in a one-day-old newborn puppy that had not ingested colostrum suggests possible transplacental transmission of the helminth. The persistence of infection after treatment raises concern regarding multidrug resistance to anthelmintics and highlights the importance of reviewing therapeutic protocols used in routine clinical practice. This study contributes to the understanding of the epidemiology and resistance profile of *A. caninum*, emphasizing the need for further research aimed at developing more effective therapeutic strategies. Continued investigations in this field may allow a better understanding of the factors involved in anthelmintic resistance and support the formulation of more precise guidelines for the control of canine hookworm disease, thereby reducing its impact on animal and public health.

Keywords: Canine; Nematoda; Multidrug resistance; Gastrointestinal parasitoses.

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Esquemática de ancilostomatídeos.	19
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Ancylostoma caninum</i>	21

CAPÍTULO II

Figura 1: Instalações do canil de cães da raça Border Collie localizado nas proximidades de Uberaba-MG.	43
Figura 2: Relatório genético de sensibilidade medicamentosa.....	44
Figura 3: Método coproparasitológico direto para visualização de ovos de <i>Ancylostoma caninum</i> em fezes de cão Border Collie pertencente a canil da região de Uberaba-MG.....	46
Figura 4: Método coproparasitológico de Willis Mollay	46
Figura 5: Método coproparasitológico de Ritchie.	47
Tabela 1: Distribuição dos animais, medicamentos e posologia dos grupos experimentais....	48
Quadro 1: Iniciadores empregados, suas correspondentes temperaturas de anelamento e locais das possíveis substituições (quando aplicável).	50
Quadro 2: Combinação dos iniciadores empregados com os respectivos tamanhos dos fragmentos em pares de base (pb) e o significado das ampliações.....	51
Figura 6: Frequência de ovos de <i>Ancylostoma caninum</i> nas fezes de cães Border Collie, e correlação entre idade e positividade	53
Figura 7: Frequência de ovos de <i>Ancylostoma caninum</i> nas fezes de cães Border Collie antes e após o tratamento anti-helmíntico e redução de positividade em diferentes grupos de tratamento.	55
Figura 8: Intestino delgado de filhote, conteúdo fecal coletado e ovo de <i>A. caninum</i>	58
Figura 9: Eletroforese evidenciando produtos de PCR amplificados de <i>A. caninum</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. caninum</i>	<i>Ancylostoma caninum</i>
Ac-MTP-1	Metaloprotease semelhante à astacina
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ATP's	Adenosina trifosfato
BZs	Benzimidazóis
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos
FBZ	Febantel
GABA	Gama-aminobutírico
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
G4	Grupo 4
L1	Larvas em primeiro estágio
L2	Larvas em segundo estágio
L3	Larvas em terceiro estágio
L4	Larvas em quarto estágio
L5	Larvas em quinto estágio
g	Gramas
min	Minuto
mL	Mililitro
m/v	Relação massa/volume
µL	Microlitro
ng	Nanograma
LMS	Lactonas macrocíclicas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHQs	Prazinoisoquinolinas
RMF	Resistência a múltiplos fármacos

rpm	Rotações por minuto
spp.	Espécies
THPs	Tetrahidropirimidina
Th2	Linfócito T <i>helper 2</i>
TRCO	Teste de redução na contagem de ovos
µm	Micrômetro
V8	Vacina polivalente para imunização ativa em cães
Xa	Forma ativa do fator X da cascata de coagulação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO I	
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Agente etiológico.....	19
3.2 Ciclo evolutivo	20
3.3 Distribuição geográfica e epidemiologia.....	22
3.4 Sinais clínicos e patogenia	23
3.5 Importância do <i>Ancylostoma caninum</i> na saúde pública.....	24
3.6 Diagnóstico da ancilostomíase em cães	24
3.7 Tratamento	25
3.8 Mecanismos biológicos e adquiridos de resistência anti-helmíntica.....	27
3.9 Métodos para prevenção e controle helmíntico.....	30
3.10 Considerações finais	31
REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO II	
INTRODUÇÃO.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Comitê de ética e experimentação animal.....	43
4.2 Caracterização do canil.....	43
4.3 Coleta de amostras biológicas	45
4.4 Exames coproparasitológicos	45
4.4.1 Método direto	45
4.4.2 Método Willis-Molay.....	46
4.4.3 Método de Ritchie.....	47
4.5 Avaliação da resistência	47
4.5.1 Resistência parasitária múltipla a fármacos – RMF (anti-helmínticos).....	47
4.5.2 Avaliação genética de resistência aos benzimidazóis	48

4.5.2.1 Obtenção das larvas para extração de DNA	48
4.5.2.2 Extração de DNA das larvas obtidas	49
4.5.2.3 Iniciadores utilizados para avaliação da presença do códon 200 do gene da β - tubulina.....	49
4.5.2.4 PCR em termociclador de gradiente e combinações de primers	50
4.6 Análise estatística	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO I - Aprovação do comitê de ética	72

1 INTRODUÇÃO

Ancylostoma caninum é um nematódeo intestinal comumente conhecido como ancilostomídeo. Essa espécie de parasita pertence à família Ancylostomatidae, e seus hospedeiros definitivos primários são canídeos, mas ocasionalmente pode infectar gatos e outros animais domésticos (Aziz, Ramphul, 2023). O ciclo de vida do *Ancylostoma caninum* inclui estágios larvais no ambiente, que podem penetrar ativamente na pele dos hospedeiros através do contato direto, ou pela via oral, através da ingestão de larvas contaminadas presentes no solo ou em alimentos (Aziz, Ramphul, 2023). No intestino delgado do hospedeiro, os ancilostomídeos adultos se fixam às vilosidades intestinais, onde se alimentam de sangue e podem causar danos significativos ao hospedeiro (Monteiro, 2016).

Os canídeos são parasitados principalmente pela espécie *A. caninum* e dentre os sinais clínicos observados destacam-se apatia, hiporexia, vômito, diarreia e perda de peso. Nos exames laboratoriais, é possível constatar a presença de processos anêmicos e eosinofilia, além da visualização dos ovos do parasita nas fezes (Aziz, Ramphul, 2023; Balk *et al*, 2023). Os cães acometidos também podem apresentar abortos, desnutrição, retardo de desenvolvimento e, em casos graves, morte (Li *et al*, 2023).

O diagnóstico da ancilostomíase, em cães é feito por exames parasitológicos de fezes, como o exame direto e/ou pela técnica Willis-Molay, a qual possui maior sensibilidade diagnóstica pela capacidade de concentração dos ovos do parasito (Foreyt, 2001). Há também confirmação da infecção por análise molecular de amostras de fezes parasitadas (PCR) (Balk *et al*, 2023).

O tratamento dos cães é baseado no tratamento sintomático (correção de processos anêmicos, desidratação, vômito, processos diarreicos etc.), mas, principalmente, na eliminação do parasito do organismo do animal, por meio de terapias antiparasitárias (Castro *et al*, 2022). As principais classes medicamentosas utilizadas para o tratamento de infecções por esse nematódeo são praziquantel, pamoato de pirantel e febantel, os quais podem ser associados com ivermectina, febendazol e albendazol (Altreuther *et al*, 2009; Castro *et al*, 2022; Balk *et al*, 2023).

É importante reavaliar o exame de fezes após a terapia antiparasitária, visto que já existem relatos de *Ancylostoma* spp. multirresistente às drogas comumente utilizadas para o tratamento de ancilostomíase (Castro *et al*, 2022; Balk *et al*, 2023; Leutenegger *et al*, 2023; Nezami *et al*, 2023; Venkatesan *et al*, 2023).

Há registros de resistência a anti-helmínticos em *Ancylostoma caninum* no Brasil

e o estudo conduzido pela Universidade Federal de Minas Gerais constatou essa premissa. Na ocasião, os autores identificaram, embora em baixa frequência (0,8%), uma mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1, associada à resistência aos benzimidazóis, em populações de *A. caninum* de amostras de fezes coletadas de cães em Belo Horizonte, Minas Gerais e Teresina - Pi (Furtado, 2014).

Neste contexto, o presente trabalho realizou a pesquisa de *Ancylostoma* spp. em amostras fecais de cães da raça Border Collie com histórico prévio de diarreia de difícil controle e observação de infecção pelo parasito *A. caninum*. Posteriormente, realizou-se tratamento com antiparasitários disponíveis no mercado para observação de resistência através da reavaliação de análises coproparasitológicas e avaliação de resistência múltipla a fármacos por análise genética do nematoda.

Para melhor entendimento, o estudo foi dividido em dois capítulos distintos. No primeiro, será apresentada a revisão de literatura sobre ancilostomíase canina, enquanto no segundo capítulo com os resultados das avaliações parasitológica e genética do perfil de resistência de *Ancylostoma caninum* à diferentes bases antiparasitárias em cães da raça Border Collie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de prevalência e de resistência de *Ancylostoma caninum* à diferentes bases antiparasitárias em cães da raça Border Collie e por análise genética.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de ovos e *A. caninum* por meio de exames coproparasitológico em cães da raça Border Collie provenientes de canil com histórico de ancilostomíase.
- Realizar o tratamento antiparasitário dos cães da raça Border Collie com quatro bases disponíveis no mercado e avaliar a eficiência do tratamento.
- Reavaliar os exames coproparasitológicos dos animais tratados para verificação de eficácia dos antiparasitários.
- Coletar amostras de fezes para obtenção de larvas para estudo genético de resistência.
- Avaliar a presença de genes de resistência aos benzimidazóis por análise molecular.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA:

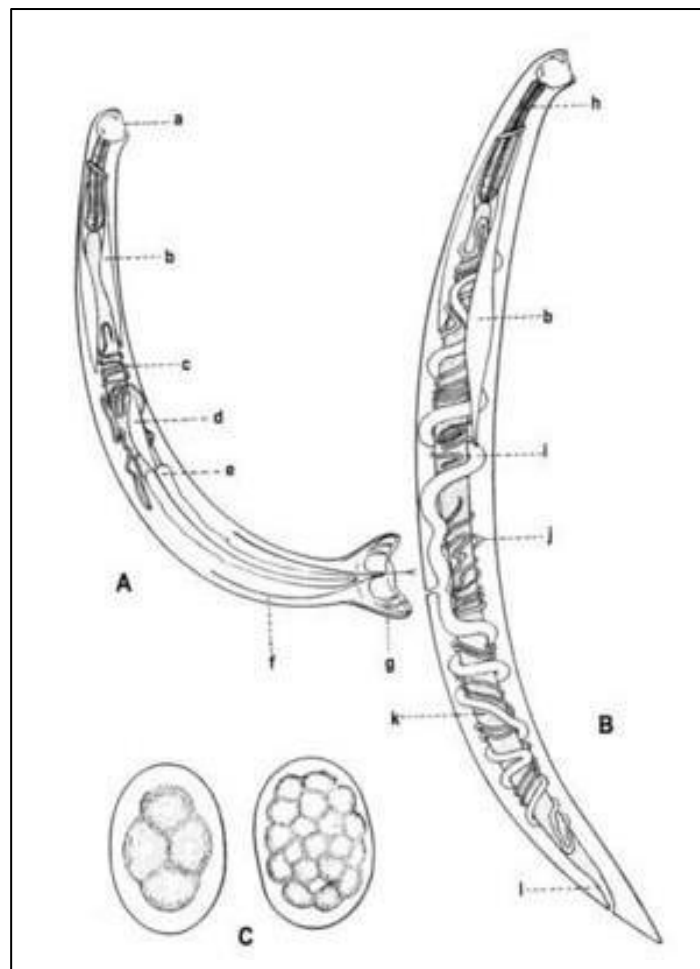
Ancylostoma caninum

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agente etiológico

Ancylostoma caninum é um nematoide causador da ancilostomíase animal e inflamação cutânea no homem. Pertence à classe Nematoda e família Ancylostomatidae e é caracterizado pelo formato cilíndrico do corpo, afilamento em formato de gancho na extremidade e cápsula bucal subglobosa com três pares de dentes. É um parasita dioico (apresentam sexos distintos e com dimorfismo sexual), com tamanho variado (machos: 9 a 13 mm; fêmeas: 14 a 20 mm de comprimento), seus ovos possuem formato de barril e casca fina, nos quais alojam-se dois a oito blastômeros, e medem 55 a 77 μm x 34 a 47 μm (Figura 1) (Oliveira *et al*, 2008).

Figura 1: Esquemática de ancilostomatídeos. **A** -Macho; **B** - Fêmea; **C** - Ovos contendo blastômeros. Localização dos órgãos nos vermes adultos: **a** - cápsula bucal, **b** - glândulas cefálicas, **c** - testículos, **d** - vesícula seminal, **e** - canal ejaculador, **f** - espículos, **g** - bolsa copuladora, **h** - faringe, **i** - útero, **j** - ovário, **k** - intestino, **l** - reto e ânus.



Fonte: Adaptado de Rey, 2010.

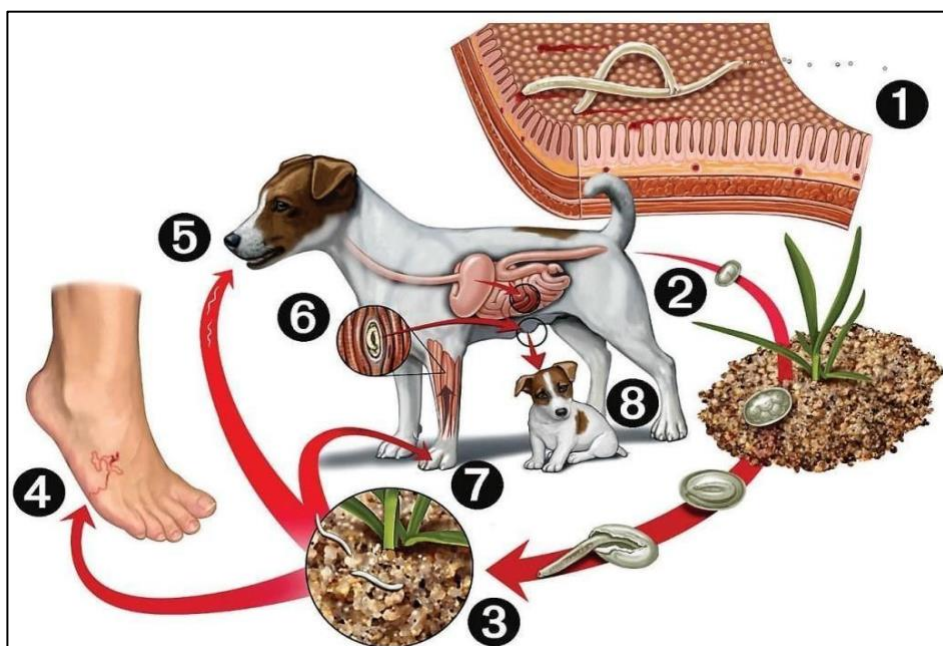
3.2 Ciclo evolutivo

O ciclo biológico do *A. caninum* é considerado direto, visto que independe de hospedeiros intermediários, e inicia no ambiente, onde o ovo morulado do parasito, eliminado por canídeos infectados, passa por um processo de desenvolvimento e maturação (Neves, 2005; CAPC, 2025). Sob condições ambientais ideais (temperatura entre 23°C e 30°C, e umidade aproximada de 70%), os ovos embrionados eliminados nas fezes eclodem e dão origem à larvas em primeiro estágio (L1), as quais se desenvolvem no ambiente e tornam-se larvas em segundo estágio (L2) e evoluem para larvas em terceiro estágio (L3) após aproximadamente 10 dias de ovipostura. Entre os desenvolvimentos larvais L1 e verme adulto, ocorre a ecdise (Neves, 2005; Nezami *et al.*, 2023; CAPC, 2025).

As larvas L3 possuem capacidade infectante percutânea por penetração ativa, por meio da ingestão oral, e/ou ainda pela via transmamária, a fim de atingir o intestino delgado e desenvolver-se em vermes adultos em aproximadamente 15 dias. O período pré-patente varia entre 14 e 21 dias e os ovos liberados nas fezes podem ser viáveis por semanas por até meses no ambiente (Figura 2) (Monteiro, 2016). Ressalta-se que larvas de ancilostomídeos podem sobreviver por alguns meses no solo até esgotamento de reservas metabólicas, porém não mantêm viabilidade larval por mais de um ano, e são mortas em temperaturas não ideais para sua manutenção (CACP, 2025).

A L3 é capaz de se alojar em tecidos musculares e gordurosos, onde entram em estado hipobiótico e interrompem o ciclo evolutivo, sendo esse um dos principais mecanismos biológicos anti-helmínticos descrito, visto que há pouca biodisponibilidade farmacológica dos antiparasitários nesses tecidos (Nezami *et al.*, 2023). Após o tratamento anti-helmíntico, as larvas encistadas podem retornar ao seu estado ativo e migrarem para o intestino delgado, onde se transformam em vermes adultos e dão continuidade ao ciclo do parasito; esse período é variável entre dias e meses, com tempo médio de 2 semanas, podendo se estender até 6 semanas, o que justifica a repetição da aplicação de bases anti-helmínticas (Balk *et al.*, 2023).

Figura 2: Ciclo de vida do *Ancylostoma caninum*. Acasalamento de vermes adultos no intestino delgado do hospedeiro definitivo (1) e liberação dos ovos embrionados nas fezes (2). Ecloração do ovo e desenvolvimento ao estágio L3 entre 5 e 10 dias (3). Penetração da L3 na pele do hospedeiro acidental (humano) (4) ou hospedeiro definitivo (7); ou ingestão pelo hospedeiro definitivo (5). Algumas L3 podem entrar em estado de hipobiose (6). Larvas (L3) migram para o intestino delgado e reiniciam o ciclo ou podem ser eliminadas via leite - transmissão lactogênica (8).



Fonte: Adaptado de Nezami *et al.*, 2023.

No hospedeiro definitivo, a forma L3 migra através dos tecidos e alcança os brônquios e pulmões, onde se desenvolvem para larvas de 4º estágio (L4) e que, por deglutição, alcançam o intestino delgado, onde evoluem para as larvas de 5º estágio (L5). Posteriormente, passam por diferenciação morfológica para forma adulta, e se fixam na mucosa intestinal por meio do aparelho bucal em formato de gancho (Monteiro, 2016).

Uma peculiaridade da biologia do *A. caninum* é o fenômeno conhecido como vazamento larval, no qual larvas infecciosas migram para tecidos somáticos, se encistam e permanecem dormentes por períodos prolongados. Em determinado momento, ainda pouco compreendido, essas larvas retomam a migração em direção ao intestino delgado, onde continuam seu desenvolvimento até a fase adulta (Jimenez Castro *et al.*, 2019).

A forma adulta do *A. caninum* secreta enzimas proteolíticas, como a metaloprotease semelhante à astacina (Ac-MTP-1), capaz de degradar a matriz extracelular da parede intestinal, permitindo assim sua fixação. Além disso, esse parasito é capaz de inibir o fator Xa (forma ativa do fator X da cascata de coagulação - via comum da cascata de coagulação, responsável por

converter protrombina em trombina, permitindo formação de fibrina e estabilização do coágulo) por meio da liberação de peptídeos anticoagulantes, prevenindo assim a formação de coágulos no local de fixação bucal e facilitando a hematofagia (Williamson *et al.*, 2006).

Os vermes adultos são ovíparos prolíferos, tornando um hospedeiro definitivo capaz de eliminar milhares de ovos (morulados ou não) durante semanas. Os vermes adultos podem sobreviver entre 4 e 24 meses no intestino delgado de cães (Monteiro, 2016; CAPC, 2025).

3.3 Distribuição geográfica e epidemiologia

A ancilostomíase acomete entre 576 e 740 milhões de humanos no mundo, principalmente em países em desenvolvimento e de clima tropical (Ásia, África e Américas) (Petri Jr, 2022). Em cães, a infecção por parasitos da espécie *A. caninum* tem prevalência estimada de 73,7% (Labruna *et al.*, 2006). Há descrição que entre 2012 e 2018, houve um aumento estimado de 47% na incidência anual de infecções por *A. caninum* em cães nos Estados Unidos, dados os quais corroboram com a necessidade de diagnóstico e tratamento em tempo oportuno com vistas à prevenção e controle da ancilostomíase (Balk *et al.*, 2023; Venkatesan *et al.*, 2023).

Em estudo feito na cidade de Niterói – RJ, estimou-se que a infecção por *A. caninum* era a mais prevalente (39% - 124/318 animais) (Ugalde *et al.*, 2023). Já em estudo feito em Marília - SP, 66,6% das amostras analisadas (50/79 animais) apresentaram ovos de *A. caninum* nos exames parasitológicos de fezes animais (Youssef *et al.*, 2020). Rondônia possui relato de prevalência de ovos do mesmo parasito em 73,7% de amostras fecais de cães (Labruna *et al.*, 2006), e o município de Andradina – São Paulo identificou *A. caninum* em 63,6% das amostras fecais de cães (Coelho *et al.*, 2011).

Uma investigação realizada no município de Lavras - MG, identificou uma expressiva ocorrência de larvas do gênero *Ancylostoma* em áreas urbanas, sobretudo em locais públicos com grande circulação de cães e crianças. Nas praças analisadas, 69,6% das amostras de solo apresentaram contaminação por ovos e larvas desse parasita, configurando-se como os pontos de maior risco para transmissão. Já nas instituições de ensino infantil, como escolas e creches, foram detectados ovos em 22,2% das amostras e larvas em 11,1%, de forma isolada. Complementarmente, a análise de 174 amostras fecais de cães revelou presença de ovos de *Ancylostoma sp.* em 58% dos casos, o que evidencia o potencial de disseminação zoonótica desse helminto na região. (Guimarães *et al.*, 2005).

3.4 Sinais clínicos e patogenia

Tendo em vista seu caráter hematófago, a infecção por *Ancylostoma caninum* pode resultar em anemia como uma das principais manifestações clínicas, cuja gravidade está diretamente relacionada à carga parasitária. Inicialmente, observa-se um quadro de anemia normocítica normocrômica, decorrente da perda sanguínea provocada pela alimentação do parasito; com a progressão e esgotamento das reservas de ferro, evolui-se para anemia microcítica hipocrômica. Outros achados laboratoriais frequentes incluem eosinofilia e hipoalbuminemia. Clinicamente, a ancilostomíase canina pode provocar palidez de mucosas, enterites, diarreia, hematoquezia, retardo no crescimento, perda ponderal e redução na absorção de nutrientes no trato gastrointestinal. (Nezami *et al.*, 2023; CAPC, 2025).

A anemia é desencadeada tanto pela hematofagia do parasito na mucosa intestinal, quanto pelas lesões causadas por ele no tecido afetado e pela ruptura de microcapilares, causada pela ação química de enzimas hidrolíticas, o que justifica hematoquezia e o melena (Castro *et al.*, 2020). Ressalta-se que filhotes jovens tendem a desenvolver sinais clínicos agudos em decorrência da menor capacidade de defesa imunológica e infecções mais intensas, devido as rotas transmamária e ambiental conjuntas (CAPC, 2025).

Quando a L3 é encistada em regiões pulmonares ou musculares, pode-se causar, bloqueio da passagem de ar e lesões musculares, respectivamente, bem como disposição a outras doenças por alterações orgânicas no hospedeiro (Moorhead, 2019). Apesar de pouco comum, a penetração percutânea da larva L3 na pele do hospedeiro definitivo pode gerar quadro de dermatites eritematosas e pruriginosas, com formação de pápulas, principalmente em regiões interdigitais (Nezami *et al.*, 2023; CAPC, 2025).

A ancilostomíase canina pode se manifestar em diferentes formas clínicas, dependendo principalmente da intensidade da infestação e da via de infecção. Nos casos hiperagudos, geralmente associados à transmissão transmamária com alta carga parasitária, o desfecho pode ser fatal em até sete dias, especialmente em neonatos. Já nos quadros agudos, é comum o desenvolvimento de anemia arregenerativa severa, inicialmente normocítica normocrômica, podendo evoluir para microcítica hipocrômica à medida que se instala deficiência de ferro e de outros cofatores hematopoiéticos. Os achados hematológicos incluem eosinofilia, leucocitose, alterações na contagem de linfócitos (com linfopenia ou linfocitose) e elevação da proteína C reativa em resposta ao processo inflamatório. Clinicamente, os animais acometidos apresentam apatia, diarreia com presença de muco ou sangue (hematoquezia), mucosas hipocoradas e, em estágios mais avançados, efusão abdominal decorrente de hipoalbuminemia. Nos casos

crônicos, quando há um equilíbrio na relação parasita/hospedeiro, a infecção pode se manter subclínica, mas com contínua eliminação de ovos de *Ancylostoma caninum* nas fezes, contribuindo para a perpetuação do ciclo parasitário (Petri Jr, 2022).

3.5 Importância do *Ancylostoma caninum* na saúde pública

Os ancilóstomos destacam-se como parasitas extremamente eficazes, graças à sua habilidade de infectar hospedeiros por diversas vias. A transmissão de *Ancylostoma caninum* pode ocorrer pela via transmamária em filhotes recém-nascidos, através da penetração percutânea, por via oral ou ainda pela ingestão de hospedeiros paratênicos, como roedores e insetos, incluindo baratas (Nezami *et al.*, 2024).

Ancylostoma possui caráter zoonótico, no qual hospedeiros erráticos (humanos) são infectados pela via percutânea e ocasionam lesões dérmicas papulares pruriginosas, conhecidas como larva migrans cutânea (Petri Jr, 2022).

A enterocolite eosinofílica por ancilostomíase pode ocorrer quando larvas L3 migram para o intestino ao invés de realizarem migração para pele; a infecção tende a ser assintomática, visto que em hospedeiros erráticos não há amadurecimento do parasito à fase adulta, sendo os principais sinais clínicos observados a abdominalgia aguda e eosinofilia (Petri Jr, 2022).

A migração de inúmeras larvas L3 aos pulmões pode ocasionar uma síndrome denominada “síndrome de Löffler”, na qual há ocorre uma pneumonia eosinofílica, o que gera tosse seca, dispneia, sibilos, hemoptise e processos febris, e, em casos graves, desconfortos abdominais e diarreias em humanos (Petri Jr, 2022).

É importante ressaltar que parasitos *A. caninum*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* infectam mais de um bilhão de pessoas em regiões de climas tropicais, podendo causar além das afecções já citadas, desnutrição, principalmente em mulheres em idade fértil e em crianças (Nezami *et al.*, 2023). Além disso, sua disseminação está associada à precariedade de saneamento e higiene pessoal básicas, aos métodos de controle e prevenção da infecção nos animais domiciliados e ao correto descarte das fezes dos animais mantidos em ambiente doméstico (Melo *et al.*, 2021).

A ancilostomíase em humanos não possui predileção por sexo ou idade, entretanto, indivíduos imunossuprimidos e crianças com acesso à locais contaminados apresentam maiores taxas de infecção (Melo *et al.*, 2021).

3.6 Diagnóstico da ancilostomíase em cães

Atualmente, o diagnóstico da ancilostomíase em cães é baseado na correlação de sinais

clínicos e históricos do paciente, bem como exames laboratoriais, os quais podem acusar processos anêmicos, eosinofilia, hipoalbuminemia, além da possibilidade da observação de ovos do parasito nas fezes, por meio de exames coproparasitológicos (Nezami *et al.*, 2023).

A testagem de filhotes para parasitas intestinais deve ser realizada com maior frequência em comparação aos cães adultos; recomenda-se que esses sejam testados ao menos quatro vezes durante o primeiro ano de vida, e para cães adultos a periodicidade sugerida é de no mínimo duas vezes ao ano, levando em consideração o estado de saúde do animal e aspectos relacionados ao seu estilo de vida (CAPC, 2025).

No que se refere à rotina laboratorial, são realizados os métodos de identificação coproparasitológica, principalmente pelo método direto Willis-Molay e Ritchie os quais objetivam-se em encontrar ovos de parasitos nas fezes dos animais (Alves *et al.*, 2014; CAPC, 2025). Ressalta-se a importância da realização de exames parasitológicos de fezes, visto que frequentemente, animais parasitados são portadores assintomáticos, o que contribui para a disseminação das endoparasitoses (Youssef *et al.*, 2020). Em estudo realizado no sul da Itália, evidenciou-se que cães domiciliados e errantes considerados assintomáticos apresentaram exame coproparasitológico positivo para *Ancylostoma caninum*, constatando que podem atuar como importantes fontes de contaminação ambiental, especialmente em áreas urbanas com presença de crianças e outros animais suscetíveis (Illiano *et al.*, 2023).

Além disso, recomenda-se que cães sejam testados quanto à presença de parasitos gastrointestinais pelo menos uma vez a cada três meses para monitorar a eficácia dos tratamentos e o comprometimento do tutor com o programa de controle. Também se sugere que o diagnóstico de infecções parasitárias gastrointestinais pode ser complexo devido à ausência ou eliminação intermitente de oocistos, ovos e/ou larvas nas fezes, mesmo em casos sintomáticos, e que testar três ou mais amostras, em dias alternados, pode aumentar a probabilidade de encontrar formas parasitárias nas fezes (CCAP, 2019).

Os métodos de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) são necessários para identificação da espécie do parasito, bem como possíveis mutações causadoras de mecanismos de resistência múltipla a fármacos. Exames como o PCR também podem ser úteis para identificação do *A. caninum* em hospedeiros definitivos infectados com poucos vermes adultos, exames coproparasitológicos negativos, em infecções por vermes em fases ainda larvais e em infecções por verme adulto de único sexo (Balk *et al.*, 2023; CAPC, 2025).

3.7 Tratamento

A resposta imunológica contra a infecção se estabelece progressivamente após a

exposição ao agente, porém não garante proteção ou cura à infecção. Além disso, animais infectados e locais com alta carga parasitária podem necessitar de tratamentos anti-helmínticos frequentes para o controle da ancilostomíase. Ressalta-se ainda que em animais jovens com manifestações clínicas da infecção, pode ser indispensável a adoção de medidas terapêuticas complementares, associadas ao uso de antiparasitários, e terapias de suporte à recuperação (ESCCAP, 2021).

Cães infectados por meio desse mecanismo frequentemente eliminam ovos de ancilóstomos de forma consistente, embora em pequenas quantidades e geralmente sem apresentar sintomas clínicos. O uso de anti-helmínticos proporciona apenas um alívio temporário, pois as larvas em estado de hipobiose podem se reativar, repovoando o trato intestinal, atingindo a maturidade, acasalando e produzindo ovos novamente em algumas semanas após a administração do antiparasitário, perpetuando o ciclo de transmissão fecal-oral (McKean *et al.*, 2024).

O tratamento anti-helmíntico farmacológico em cães é baseado no uso de benzimidazóis (BZs) (albendazol, febendazol e febantel), lactonas macrocíclicas (LMs) (ivermectina), tetrahidropirimidinas (THPs) (pamoato de pirantel) e prazinoisoquinolinas (PHQs) (praziquantel), a partir do 15^o dia de vida, simultaneamente aos demais hospedeiros definitivos alocados no mesmo ambiente (Ribeiro, 2004; CCAP, 2019).

Os BZs são amplamente empregados no combate ao *A. caninum* por sua ação contra todas as fases do ciclo de vida do helminto, por meio da ligação à β -tubulina (proteína presente no citoesqueleto do parasito), impedindo a formação dos microtúbulos e, conseqüentemente, impedimento da divisão celular e transporte de nutrientes (Ribeiro, 2004). Além disso, os BZs interferem diretamente no metabolismo energético do parasita ao inibir a fumarato redutase, uma enzima essencial para a produção de energia em um ambiente anaeróbico (intestino do hospedeiro), impedindo, portanto, a síntese adequada de ATP (adenosina trifosfato), bem como a redução da absorção de glicose pelo agente, levando à morte do parasito (Prado, 2022).

As LMs exercem sua ação anti-helmíntica em *A. caninum* ao interagirem com canais de cloro regulados pelo glutamato, que são independentes do ácido gama-aminobutírico (GABA). Essa interação aumenta a permeabilidade das membranas neuronais dos parasitas aos íons cloro, resultando em hiperpolarização e conseqüente bloqueio neuromuscular, levando à paralisia flácida e morte do helminto. Além disso, essas substâncias podem potencializar a ação inibitória neuronal mediada pelo GABA, promovendo hiperpolarização dos neurônios e inibindo a transmissão nervosa. A ação das LMs é considerada a mais eficaz e rápida, pois atua diretamente nas vias de ligação iônicas de cloreto do parasito, promovendo desintegração tegumentar, sendo

o fármaco de eleição por sua ação sob ectoparasitos (Delayte *et al.*, 2006; Prado, 2022).

Já as THPs, atuam como agonistas enérgicos nos receptores de acetilcolina, gerando um influxo descontrolado de íons sódio e cálcio nas células musculares do parasita e sua consequente morte por paralisia espástica; sendo o composto de eleição para tratamento de infecções com sintomas clínicos em cadelas lactantes e recém-paridas, graças à rápida ação vermífida sob formas adultas (Ribeiro, 2004 e Aziz *et al.*, 2023).

A classe farmacológica PHQs é utilizada em tratamentos anti-helmínticos devido a sua atuação aumentando a permeabilidade das membranas celulares dos parasitas aos íons cálcio, causando uma contração muscular intensa e paralisia espástica; além disso, provoca danos significativos ao tegumento do verme, resultando em vacuolização e desintegração do tegumento, o que facilita a eliminação do parasita pelo sistema imunológico do hospedeiro. Embora essa classe seja amplamente utilizada contra cestódeos e trematódeos, sua eficácia contra nematódeos, como o *A. caninum*, é limitada. Portanto, para o tratamento de infecções por *A. caninum*, são preconizadas medicações com associação à outras bases farmacológicas, como THPs, que atua como agonista colinérgico, causando paralisia espástica do parasita (Krka, 2021).

No Canadá, as opções de tratamento para *A. caninum* incluem LMs (ivermectina, selamectina, moxidectina e milbemicina oxima), BZs (febantel) e pirantel. O FBZ (febantel) é amplamente utilizado devido à sua segurança clínica e amplo espectro de ação, incluindo eficácia contra *Giardia* spp. (Nezami *et al.*, 2023).

O uso generalizado de fármacos antiparasitários sem avaliação de eficácia por reavaliação coproparasitológica e a venda/translado de cães com histórico persistente de infecção por esse parasito são características que auxiliam na dispersão de espécies do parasito com genes de Resistência Múltipla a fármacos (RMF) (Nezami *et al.*, 2023).

A associação entre as bases anti-helmínticas disponíveis no mercado é válida, visando sinergismo de seus efeitos, bem como maior biodisponibilidade dos agentes antiparasitários no intestino delgado (Campos *et al.*, 2017).

3.8 Mecanismos biológicos e adquiridos de resistência anti-helmíntica

A resistência biológica em *Ancylostoma caninum* refere-se à capacidade do parasita de evadir ou modular as respostas imunológicas do hospedeiro, permitindo sua sobrevivência e perpetuação. Um dos mecanismos mais relevantes nesse contexto é a hipobiose, fase em que as larvas do parasita tornam-se metabolicamente inativas e se alojam em tecidos como músculos e pulmões. Essa condição não apenas dificulta a ação do sistema imunológico, como também

contribui para a resistência farmacológica, uma vez que muitos anti-helmínticos atuam sobre parasitas metabolicamente ativos (Nezami *et al*, 2023).

Durante o ciclo biológico, *A. caninum* é capaz de desenvolver mecanismos para evasão de respostas imunológicas do organismo frente à infecção por nematódeos, como secreção de imunomoduladores, os quais inibem ativação de células dendríticas e, conseqüentemente, há redução de citocinas pró-inflamatórias; adsorção de proteínas dos hospedeiros na cutícula do parasito, o que reduz eficácia da resposta humoral; e imunossupressão local por estimulação de linfócitos T regulatórios, a qual limita ação eosinofílica (Maizels, Yazdanbakhsh; 2003; Junginger *et al*, 2017).

De maneira geral, os nematódeos induzem uma resposta imunológica do tipo Th2 (mediada por linfócitos do tipo T *helper* 2, responsáveis pela estimulação e produção de anticorpos), na qual há produção de anticorpos pela resposta imune humoral e liberação de mediadores inflamatórios, como eosinófilos, leucócitos especializados no combate helmíntico por degranulação citotóxica e liberação de proteínas catiônicas eosinofílica, as quais atuam nas membranas dos parasitos e provocam reação inflamatória local; e liberação de eotaxina, quimiocina que atua no recrutamento e ativação de eosinófilos (Maizels, Yazdanbakhsh, 2003; Sakyi, 2022).

Os fatores que influenciam a reativação parasitária envolvem a eliminação de vermes adultos, visto que o decréscimo da fase adulta do verme induz a reativação larval; e fatores hormonais e imunológicos, os quais envolvem imunossupressores (como gestação), que contribuem para reativação larval em estado hipobiótico (Balk *et al.*, 2023). É importante ressaltar que durante a gestação, ocorre a ativação larval em estados hipobióticos, resultando em sua concentração nas glândulas mamárias e posterior excreção pelo leite materno, possibilitando que a cadela transmita larvas de *A. caninum* para seus filhotes através do leite materno (CAPC, 2025).

Dados da literatura indicam que *Ancylostoma caninum* adota mecanismos de manutenção evolutiva que envolvem a utilização de hospedeiros paratênicos e acidentais, como roedores e baratas (Illiano *et al.*, 2023; CAPC, 2025). Quando cães ingerem esses animais, especialmente em ambientes com baixo controle sanitário ou hábito de predação, as larvas são liberadas no trato digestório e completam seu ciclo no intestino delgado (Nezami *et al.*, 2023). Estudos demonstram que roedores podem atuar como reservatórios silenciosos do parasito, contribuindo para sua persistência ambiental e facilitando a infecção de hospedeiros definitivos (Hotez *et al.*, 2004). Tais estratégias aumentam a eficiência de transmissão do helminto, mesmo na ausência de contato direto com o solo contaminado, e reforçam a necessidade de controle

integrado dos vetores e da vigilância do comportamento alimentar dos animais (Illiano *et al.*, 2023).

A resistência anti-helmíntica é definida como uma característica hereditária presente em uma parcela significativa de indivíduos em uma população parasitária, tornando-os insensíveis à dose habitual de um fármaco, ou exigindo doses maiores para alcançar a mesma eficácia (Nezami *et al.*, 2023).

A administração de antiparasitários em intervalos menores do que o período pré-patente do *A. caninum* propicia a seleção de indivíduos geneticamente resistentes, configurando uma pressão seletiva do parasito frente às medicações utilizadas contra os mesmos. Essa combinação de mecanismos de resistência aos anti-helmínticos tornam o manejo de tratamento contra esse parasita cada vez mais difícil, compactuando com a prevalência e o aumento de incidência do mesmo (Castro *et al.*, 2021; Nezami *et al.*, 2023).

Os helmintos, particularmente *A. caninum*, têm ganhado especial atenção em seus tratamentos graças aos efeitos refratários a um ou mais anti-helmínticos capazes de se desenvolver em estudos clínicos nos EUA e Canadá. O uso de doses e dosagens inadequadas corroboram para esse mecanismo de RMF (Nezami *et al.*, 2023).

Já existem mecanismos RMF em *Haemonchus contortus* à fenotianiza e tiabendazol (EUA, 1954 e 1960, respectivamente). Com relação à RMF do *A. caninum.*, há descrição da resistência à pamoato de pirantel/febantel/praziquantel, moxidectina/imidaclopride, praziquantel/emodepside. Um dos fatores causadores da RMF é a alteração genética polimórfica no gene da β -tubulina F167Y (TTC>TAC), o qual está relacionado à funcionalidade e estrutura do citoesqueleto do parasito, promovendo resistência à BZs, MLs e THPs. Alterações no códon Q134H (CAA>CAT), as quais codificam proteínas dos canais colinérgicos sensíveis ao neurotransmissor de acetilcolina, reduzem a sensibilidade da ação dos antiparasitários da classe das lactonas macrocíclicas (Ex: ivermectina) (Castro *et al.*, 2021; Balk *et al.*, 2023; Venkatesan *et al.*, 2023).

A resistência de *A. caninum* a anti-helmínticos já foi documentada no Brasil, ainda que em baixa frequência. Um estudo conduzido na Universidade Federal de Minas Gerais identificou a presença da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1, um marcador genético associado à resistência aos benzimidazóis. Essa mutação foi detectada em 0,8% das amostras analisadas, todas provenientes de Belo Horizonte, enquanto não foi identificada em amostras coletadas em Teresina, Piauí. Esse achado representa o primeiro registro da mutação em populações de *A. caninum* no país, reforçando a necessidade de monitoramento constante para evitar a disseminação de linhagens resistentes a essa classe de fármacos (Furtado, 2014; Furtado

et al, 2014).

A resistência de *A. caninum* tem se tornado uma preocupação crescente, especialmente em contextos de manejo intensivo. A hipótese predominante sugere que o uso frequente de vermífugos em canis comerciais, principalmente nos primeiros meses de vida dos filhotes, pode estar acelerando a seleção de cepas resistentes. Apesar da necessidade de investigações adicionais para compreender a real extensão do problema, esses achados destacam a importância de estratégias terapêuticas mais eficazes e racionais para evitar a propagação da resistência a anti-helmínticos (Jimenez Castro *et al*, 2019).

Do ponto de vista filogenético, a subordem Strongylida, na qual o *A. caninum* marcada por uma rápida taxa de evolução das sequências de nucleotídeos e por tamanhos populacionais efetivos excepcionalmente grandes, o que contribui para uma alta diversidade genética. Essas características, combinadas com a pressão seletiva gerada pelos tratamentos antiparasitários, favoreceram o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica em diversos integrantes dessa superfamília, incluindo *A. caninum* (Nezami *et al.*, 2023).

A combinação de mecanismos biológicos, como a hipobiose, e genéticos, como mutações específicas, contribui para a complexidade do controle de *A. caninum*, exigindo abordagens integradas que considerem tanto a biologia do parasita quanto o uso racional de medicamentos (Venkatesan *et al*, 2023).

3.9 Métodos para prevenção e controle helmíntico

Os métodos para controle de infecções por *A. caninum* são baseados no isolamento e tratamento de animais positivos e/ou com suspeita de infecção, principalmente em centros de reprodução (canis), além da restrição do fluxo de animais em áreas endêmicas (Nezami *et al*, 2023). O controle primário é realizado pela desparasitação dos hospedeiros definitivos, bem como controle de hospedeiros paratênicos e tendo em vista o compartilhamento de espaços entre cães e hospedeiros de passagem, sugere-se que a alimentação seja exclusiva de ração aos cães, a fim de evitar carnivorismo, visto que parte do ciclo parasitário pode envolver encistamento em tecido muscular e gorduroso (ECCAP, 2021; Nezami *et al*, 2023).

O controle ambiental de *A. caninum* envolve a combinação de medidas gerais, químicas e físicas, as quais incluem a remoção diária das fezes, limpeza com água quente e sabão (impedem eclosão dos ovos); higienização local com hipoclorito de sódio 5%, enxofre de cal, amônia quaternária, borato de sódio e/ou sal de cozinha a 10%, as quais possuem ação larvicida; e uso de cal virgem, exposição ao sol e queima controlada, para inativação larval (Traversa, 2012). O uso de pisos impermeáveis em canis e áreas de convivência é preconizado por evitar

solos úmidos e arenosos também minimiza o desenvolvimento larval (Bowman *et al.*, 2010).

Para o controle eficaz de helmintos em cães, orienta-se um protocolo intensivo de vermifugação em fêmeas gestantes e filhotes. A recomendação inclui administrações a cada 14 dias nas primeiras oito semanas de vida, seguidas de aplicações mensais; esse regime tem como principal objetivo reduzir o risco de transmissão perinatal de *A. caninum*, considerando seu potencial zoonótico (ESCCAP, 2021; CAPC, 2025). A maioria das infecções ativas pode ser evitada com tratamentos em intervalos entre quatro e seis semanas, enquanto frequências inferiores a três ou quatro vezes ao ano demonstram pouca eficácia na redução da prevalência dos ancilostomídeos além disso, normalmente esse protocolo inclui o uso de uma lactona macrocíclica, substância eficaz contra larvas migratórias de nematoides parasitas (Nezami *et al* 2023).

O controle de infecções por parasitas gastrointestinais em cães envolve medidas preventivas e terapêuticas, como a desparasitação com bases anti-helmínticas segundo recomendações dos fabricantes, bem como remoção das fezes diariamente e higienização ambiental com hipoclorito de sódio a 1% em áreas concretadas e borato de sódio na concentração de 5 kg/m² em áreas gramadas, a fim de reduzir/eliminar ovos e larvas. A mesma diretriz sugere que alimentação baseada em vísceras cruas sejam evitadas, a fim de evitar infecções por hospedeiros paratênicos (CAPP, 2019).

3.10 Considerações finais

A ancilostomíase em cães permanece como um importante problema de saúde veterinária e pública, com ampla distribuição geográfica e tendência de aumento. O ciclo de vida complexo do parasita, somado à sua capacidade de adquirir resistência a diferentes princípios ativos, impõe a necessidade de estratégias de controle que combinem intervenções clínicas e ambientais. O tratamento dos animais parasitados deve ser acompanhado por ações voltadas à melhoria da higiene dos locais frequentados, além da vigilância contínua da eficácia dos anti-helmínticos utilizados. É imprescindível reforçar a conscientização sobre o risco zoonótico envolvido, especialmente em regiões com deficiências no saneamento básico. Diante desse cenário, torna-se essencial adotar uma abordagem colaborativa entre diferentes áreas da saúde. A detecção precoce da infecção, associada ao tratamento eficaz e à aplicação sistemática de medidas preventivas, como vermifugação periódica e saneamento ambiental, é decisiva para reduzir a carga parasitária e proteger tanto os cães quanto a população humana. Além disso, o avanço nas pesquisas sobre resistência anti-helmíntica e o desenvolvimento de novas opções terapêuticas são aspectos-chave para superar os obstáculos atuais e promover a saúde animal e

coletiva de forma duradoura.

REFERÊNCIAS

ADAM, Sitthithana; DEKUMYOY, Paron; NACAPUNCHAI, Duangporn; KETBOONLUE, Thawatchai; CHARUNWATTHANA, Prakaykaew; DHITAVAT, Jittima; KOOMPAPONG, Khuanchai; CHONSAWAT, Putza e WATTHANAKULPANICH, Dorn. Assessment of an immuno-diagnostic method for hookworm-related cutaneous larva migrans using crude extracts of *Ancylostoma caninum*. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 4, p. 209, 2023. DOI: 10.3390/tropicalmed8040209.

ALTREUTHER, G.; RADELOFF, I.; LeSUEUR, C.; SCHIMMEL, A., KRIEGER, K. J. Field evaluation of the efficacy and safety of emodepside plus praziquantel tablets (Profender tablets for dogs) against naturally acquired nematode and cestode infections in dogs. **Parasitology Research**, v. 105, Suppl. 1, p. S23-9, Aug. 2009. DOI: 10.1007/s00436-009-1492-z.

ALVES, Ana Paula da Silva Moreira; COÊLHO, Francine Alves da Silva; COÊLHO, Matheus Diniz Gonçalves. Frequência de enteroparasitos em fezes de cães coletadas em praças públicas do município de Pinfamonhagada – SP, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 3, p. 341-350, jul./set. 2014. DOI: 10.5216/rpt.v43i3.32204.

AZIZ, M. H. e RAMPHUL, K. *Ancylostoma*. In: STATPEARLS. Treasure Island, FL. **StatPearls Publishing**, jan. 2023.

BALK, J. D.; MITCHELL, N. D.; HUGHES, J.; SOTO NAUTO, P.; ROSSI, J. e RAMIREZ-BARRIOS, R. Multiple anthelmintic drug resistant *Ancylostoma caninum* in foxhounds. **Journal of Parasitology Drugs and Drug Resistance**, v. 22, p. 102-106, Aug. 2023. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2023.07.001.

BOWMAN, Dwight D.; MONTGOMERY, Susan P.; ZAJAC, Anne M.; EBERHARD, Mark L. e KAZACOS, Kevin R. Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 162-167, 2010.

CAMPOS, Diefrey Ribeiro; PERIN, Livia Reisen; CAMATTA, Nayara Campos; OLIVEIRA, Luanna Castro; SIQUEIRA, Daniele Fassina de; APTEKMANN, Karina Preising; MARTINS, Isabella Vilherna Freire. Canine hookworm: correlation between hematological disorders and serum proteins with coproparasitological results. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine, Seropédica**, v. 39, n. 3, p. 147-151, 2017. DOI: 10.29374/2527-2179.bjvm019117

CAPC – Companion Animal Parasite Council. Hookworms: guidelines for the control of hookworm infections in companion animals - *Ancylostoma* spp. 2025.

CAPPELLO, Michael; VLASUK, George P.; BUERGUM, Paul W.; HUANG, Sheng e HOTEZ, Peter J. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: a hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 13, p. 6152–6156, 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.13.6152.

CASTRO, P. D. J.; MANSOUR, A.; CHARLES, S.; HOSTETLER, J.; SETTJE, T.; KULKE,

D. e KAPLAN, R. M. Efficacy evaluation of anthelmintic products against an infection with the canine hookworm (*Ancylostoma caninum*) isolate Worthy 4.1F3P in dogs. **IJP: Drugs and Drug Resistance**, v. 13, p. 22-27, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2020.04.003.

CASTRO, P. D. J.; HOWELL, S. B.; SCHAEFER, J. J.; AVRAMENKO, R. W.; GILLEARD, J. S. e KAPLAN, R. M. Multiple drug resistance in the canine hookworm *Ancylostoma caninum*: an emerging threat? **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 576, 2019. DOI: 10.1186/S13071-019-3828-6.

CASTRO, P. D. J.; DURRENCE, K.; DURRENCE, S.; GIANECHINI, L. S.; COLLINS, J.; DUNN, K. e KAPLAN, R. M. Resistência múltipla a medicamentos anti-helmínticos em ancilostomídeos (*Ancylostoma caninum*) em um canil de criação e treinamento de Labradores na Geórgia, EUA. **American Veterinary Medical Association**, v. 261, n. 3, p. 342-347, 15 dez. 2022. DOI: 10.2460/javma.22.08.0377.

CASTRO, Pablo D. Jiménez; BRUNEL, Hilana dos Santos Sena; MALARD, Patrícia Furtado e DE SOUZA, Cláudio Rodrigues Perigo. Revisão bibliográfica – Ancilostomíase. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 9, p. 90835-90852, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n9-306.

COELHO, W. M. D.; DO AMARENTE, A. F. T.; APOLINÁRIO, J. C.; COELHO, N. M. D. e BRESCIANE, K. D. S. Occurrence of *Ancylostoma* in dogs, cats and public places from Andradina city, São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 5, p. 181-184, ago. 2011. DOI: 10.1590/S0036-46652011000400001.

Conselho tropical para parasitos de animais de companhia. Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e controle de endoparasitos caninos nos trópicos. 2. ed. 17 mar. 2019.

DE ALENCAR, F. A.; DE QUEIROZ, L. N.; UCHÔA, S. K. S. e DE MOURA, L. Enteroparasitas zoonóticos do gênero *Ancylostoma* spp. e *Toxocara* sp. em fezes de cães coletadas em locais públicos do 1º distrito da cidade de Rio Branco-AC. **Scientia Naturalis, Rio Branco**, v. 2, n. 1, p. 241-253, 2020.

DELAYTE, Eliane Helena; OTSUKA, Maurício; LARSSON, Claes Erik e CASTRO, Regina Celia Caparroz. Eficácia das lactonas macrocíclicas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicidose canina generalizada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 31-38, 2006.

DE MELO, P. H. M.; BRUNEL, H. S. S.; MALARD, P. F. e DE SOUZA, C. R. P. Revisão bibliográfica – Ancilostomíase. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, set., p. 90835-90852, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n9-306.

DOS SANTOS, B. Avaliação bioquímica e hematológica de cães infectados por *Ancylostoma* spp. – estudo retrospectivo. 2019. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

ESCCAP – European Scientific Council Companion Animal Parasites. Worm control in dogs and cats. 2021.

FOREYT, William J. **Veterinary parasitology reference manual.** 5. ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 2001. ISBN 0-8138-2419-2.

FURTADO, Luis Fernando Viana. Desenvolvimento e aplicação de uma metodologia para varredura de polimorfismo relacionado à resistência aos benzimidazóis em *Ancylostoma caninum*. 2014. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – **Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2014.

FURTADO, L. F. V.; DIAS, L. T. O.; RODRIGUES, T. de O.; SILVA, V. J. da; OLIVEIRA, V. N. G. M. de e RABELO, É. M. L. Egg genotyping reveals the possibility of patent *Ancylostoma caninum* infection in human intestine. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3006, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-59874-8.

FURTADO, L. F. V.; BELO, A. C. P. de P. e ANDRADE, H. First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 3-4, p. 313-316, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.10.021.

FURTADO, Luis Fernando Viana; BELO, Ana Carolina Pereira de Paiva e ANDRADE, Heloisa Maria. Hookworm infection as a model for deepening knowledge of iron metabolism and erythropoiesis in anemia. **Cytokine**, v. 177, 2024. DOI: 10.1016/j.cyto.2024.156559.

GUIMARÃES, A. M.; ALVES, E. G. L.; REZENDE, G. F.; RODRIGUES, M. C. Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 2, p. 293-293, 2005.

HOTEZ, Peter J.; HAWDON, John M.; HSU, Suh-Chin; KLEIN, Eric S.; RICHARDS, Dennis; CHAPMAN, Patricia L.; HOFFMAN, Stephen L.; STEWART, Tina. Experimental animal models for hookworm infection. **Parasitology Today**, [S.l.], v. 11, n. 7, p. 235–237, 1995. DOI: 10.2307/3275302.

ILLIANO, Sergio; CIUCA, Lavinia; MAURELLI, Maria Paola; PEPE, Paola; CARUSO, Valeria; BOSCO, Antonio; PENNACCHIO, Saverio; AMATO, Ruggero; POMPAMEO, Marina; RINALDI, Laura. Canine gastrointestinal parasites perceptions, practices, and behaviours: a survey of dog owners in the south of Italy. **BMC Veterinary Research**, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 1–11, 2023. DOI: 10.1186/s12917-023-03765-3.

JIMENEZ CASTRO, Pablo David; HOWELL, Sue B.; SCHAEFER, John J.; AVRAMENKO, Russell W.; GILLEARD, John S.; KAPLAN, Ray M. Multiple drug resistance in the canine hookworm *Ancylostoma caninum*: an emerging threat? **Parasites & Vectors**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 576, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3828-6.

JUNGINGER, Johannes; RAUE, Katharina; WOLF, Karola; JANECEK, Elisabeth; STEIN, Veronika M.; TIPOLD, Andrea; GÜNZEL-APEL, Anne-Rose; STRUBE, Christina;

HEWICKER-TRAUTWEIN, Marion. Zoonotic intestinal helminths interact with the canine immune system by modulating T cell responses and preventing dendritic cell maturation. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 7, art. 10310, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-10677-4.

KRKA, D.D. Novo mesto. Anthelmin Comprimidos para cães grandes: resumo das características do medicamento. **Direção Geral de Alimentação e Veterinária - DGAMV**, Última revisão: junho de 2021.

LABRUNA, Marcelo Bahia; PENA, Hilda Fátima de Jesus; SOUZA, Sônia Luiza Patitucci; PINTER, Adriano; SILVA, José Carlos Ribeiro; RAGOZO, Alessandra Mara Alves; CAMARGO, Luís Marcelo Aranha; GENNARI, Solange Maria. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 183–193, 2006.

LEUTENEGGER, C. M.; LOZOYA, C. E.; SAVARD, C.; OGEER, J. e LALLIER, R. Emergence of *Ancylostoma caninum* parasites with the benzimidazole resistance F167Y polymorphism in the US dog population. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 21, p. 131-140, Apr. 2023. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2023.01.001.

LI, H.; GAZZOLA, D.; HU, Y. e AROIAN, R. V. An efficient method for viable cryopreservation and recovery of hookworms and other gastrointestinal nematodes in the laboratory. **International Journal of Parasitology**, v. 53, n. 8, p. 451-458, jul. 2023. DOI: 10.1016/j.ijpara.2023.05.001.

MAIZELS, Rick M.; YAZDANBAKHSI, Maria. Immune responses in hookworm infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 16, n. 4, p. 689–703, 2003. DOI: 10.1128/CMR.16.4.689-703.2003.

MARIE, Chelsea; PETRI JUNIOR, William A. Infecção por ancilostomídeos. In: **MANUAL MSD – Versão Profissional**. [S.l.]: Merck Sharp & Dohme Corp., 2023.

MARSH, A. E. e LAKRITZ, J. Reflecting on the past and fast forwarding to present day anthelmintic resistant *Ancylostoma caninum* – A critical issue we neglected to forecast. **International Journal Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 22, p. 36-43, Ago. 2023. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2023.04.003.

McKEAN, Elise L.; GRILL, Emilia; CHOI, Young-Jun; HAWDON, John M. Altered larval activation response associated with multidrug resistance in the canine hookworm *Ancylostoma caninum*. **Parasitology**, v. 151, n. 3, p. 271–281, mar. 2024. DOI: 10.1017/S0031182023001385.

MELO, Pedro Henrique Martins de; BRUNEL, Hilana dos Santos Sena; MALARD, Patrícia Furtado e SOUZA, Cláudio Rodrigues Perigo de. Revisão bibliográfica – Ancilostomíase. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 9, p. 90835-90852, set. 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n9-306.

MONTEIRO, Silvia Gonzalez. **Parasitologia na medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2016. Reimpressão. Inclui bibliografia e índice. ISBN 978-85-7241-882-9.

MOORHEAD, Andy. *Hookworms in dogs*. **Today's Veterinary Practice**, Gainesville, nov/dez. 2019. Disponível em: <https://todaysveterinarypractice.com/parasitology/hookworms-in-dogs/>.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NEZAMI, R.; BLANCHARD, J. e GODOY, P. The canine hookworm *Ancylostoma caninum*: A novel threat for anthelmintic resistance in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 64, n. 4, p. 372-378, Apr. 2023.

OLIVEIRA, Fábio; FAGUNDES, Eduardo; BIAZOTTO, Gabriel; NEVES, Maria Francisca. Ancilostomíase. **Faef Revista**, Garça, v. 6, n. 11, p. 1–5, jul. 2008.

PRADO, Maria Clara. Estudo sobre mecanismos de ação dos benzimidazóis em helmintos. 2022. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2022.

RIBEIRO, Vitor Márcio. Controle de helmintos de cães e gatos. **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses**, Ouro Preto, MG, 2004.

SAKYI, Samuel A.; AMOANI, Beatrice; OPOKU, Stephen; DZATA, Lydia; ANIAGYEI, William; SENU, Emmanuel; WILSON, Michael D. Assessing the role of eosinophil-mediated immune response markers in detecting hookworm infection: A case-control study in Kintampo, Ghana. **Health Science Reports**, Hoboken, v. 5, n. 4, e674, 2022. DOI: 10.1002/hsr2.674.

TRAVERSA, Donato. Pet roundworms and hookworms: A continuing need for global worm control. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 91, 2012. DOI: 10.1186/1756-3305-5-91.

UGALDE, Jéssica Martins de; SAKAMOTO, Carlos Augusto Monteiro; CUNHA, Nathália Cristina; BARROS, Luciano Alves. Diagnóstico parasitológico de amostras fecais de cães domésticos provenientes do município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 75, n. 1, p. 35–40, jan./fev. 2023. DOI: 10.1590/1678-4162-12732.

University of Saktchewan. *Ancylostoma caninum*. Disponível em: <https://wcvm.usask.ca/learnaboutparasites/parasites/ancylostoma-caninum.php>. Acesso em: 9 mar. 2025.

VENKATESAN, A. *et al.* Molecular evidence of widespread benzimidazole drug resistance in *Ancylostoma caninum* from domestic dogs throughout the USA. **PLOS Pathogens**, v. 19, n. 3, 2023. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011146.

WILLIAMSON, A. L.; LUSTIGMAN, S.; OKSOY, Y.; DEUMIC, V.; PLIESTKATT, J.; Mendez, S.; ZHAN, B.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. e LOUKAS, A. *Ancylostoma caninum* MTP-1, an Astacin-Like Metalloprotease Secreted by Infective Hookworm Larvae, Is Involved in Tissue Migration. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 961–967, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.961-967.2006>

YOUSSEF, A. G.; NETTO, L. L.; FRIOLANI, M. e TEIXEIRA, D. B. Prevalence of intestinal parasites, of zoonotic importance, in asymptomatic kennel dogs in the region of Marília-SP. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 94718-94727, dez. 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n12-089.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO COPROPARASITOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE DA B TUBULINA EM *Ancylostoma caninum* EM BORDER COLLIE NATURALMENTE INFECTADOS

RESUMO

A presente pesquisa objetivou realizar um estudo com cães da raça Border Collie com histórico recorrente de infecção por *Ancylostoma caninum*, visando avaliar a eficácia de diferentes protocolos terapêuticos disponíveis no mercado e investigar a presença de mutações associadas à resistência genética aos benzimidazóis (mutações no códon 200 do gene da β -tubulina). O estudo foi conduzido em um canil na região de Uberaba-MG, onde foram avaliados 33 cães, divididos em quatro grupos experimentais e submetidos a esquemas terapêuticos contendo pamoato de pirantel, praziquantel, ivermectina, albendazol e febantel em diferentes associações. As amostras fecais foram coletadas antes e após o tratamento e submetidas aos métodos coproparasitológicos direto, Willis-Mollay e Ritchie. Também foram realizados coprocultivos para obtenção de larvas, das quais se extraiu DNA para análise por PCR, com uso de primers específicos para a região do códon 200 para identificação de mutação e necropsia de filhotes que vieram a óbito durante o período experimental. Os resultados demonstraram que, embora todos os grupos tenham apresentado redução na eliminação de ovos de *A. caninum* após o tratamento (16,7 a 66,7%), a persistência do parasitismo indica a possível existência de resistência aos princípios ativos avaliados, o que reforça a importância da reavaliação coproparasitológica sistemática no período pós-tratamento. A detecção da mutação específica no códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 por meio da análise molecular confere a presença de helmintos com resistência aos benzimidazóis. Além disso, a necropsia de um filhote de um dia de idade, evidenciou-se transmissão materno-filial transplacentária de *A. caninum*, uma vez que o animal veio a óbito antes de ingerir o colostro. Conclui-se, portanto, que a persistência do parasitismo após o tratamento configura existência de resistência a fármacos e ressalta a importância da reavaliação coproparasitológica pós-tratamento, há transmissão materno-filial do parasito e a análise genética do perfil de resistência identificou a mutação específica no códon 200 do gene da β -tubulina isotipo 1.

Palavras-chave: Canino; Nematoda; Resistência a múltiplas drogas; Parasitoses gastrintestinais.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate Border Collie dogs with a recurrent history of *Ancylostoma caninum* infection in order to assess the efficacy of different commercially available therapeutic protocols and investigate the presence of mutations associated with genetic resistance to benzimidazoles, particularly mutations at codon 200 of the β -tubulin isotype 1 gene. The study was conducted in a kennel located in the region of Uberaba, Minas Gerais, Brazil, where 33 dogs were evaluated. The animals were divided into four experimental groups and treated with therapeutic protocols containing pyrantel pamoate, praziquantel, ivermectin, albendazole, and febantel in different combinations. Fecal samples were collected before and after treatment and analyzed using direct fecal examination, Willis-Mollay flotation, and Ritchie sedimentation techniques. Fecal cultures were also performed to obtain larvae, from which DNA was extracted for PCR analysis using primers specific to the codon 200 region of the β -tubulin isotype 1 gene. In addition, necropsies were performed on puppies that died during the experimental period. The results showed that, although all experimental groups exhibited a reduction in *A. caninum* egg shedding after treatment, ranging from 16.7% to 66.7%, the persistence of parasitism indicates the possible occurrence of resistance to the active compounds evaluated. These findings reinforce the importance of systematic post-treatment coproparasitological reassessment. Molecular analysis detected a specific mutation at codon 200 of the β -tubulin isotype 1 gene, confirming the presence of helminths resistant to benzimidazoles. Furthermore, the necropsy of a one-day-old puppy provided evidence of maternal–fetal transplacental transmission of *A. caninum*, since the animal died before ingesting colostrum. In conclusion, the persistence of parasitism after treatment supports the occurrence of anthelmintic resistance and highlights the need for post-treatment coproparasitological monitoring. The study also demonstrated maternal–fetal transmission of the parasite and identified a mutation at codon 200 of the β -tubulin isotype 1 gene associated with benzimidazole resistance.

Key-words: Canine; Nematoda; Multidrug resistance; Gastrointestinal parasitoses.

INTRODUÇÃO

Ancylostoma caninum é um nematódeo causador da ancilostomíase canina, com prevalência relevante em regiões tropicais, como por exemplo, no Brasil (73,7%) (Labruna *et al.*, 2006) e com caráter expansivo nos últimos anos (Castro *et al.*, 2020; de Melo *et al.*, 2021; Nezami *et al.*, 2023). Possui caráter zoonótico, sendo o agente etiológico de doenças como larva migrans (bicho geográfico) e síndrome de Löffler (Petri Jr, 2022).

A ancilostomíase possui importância na medicina veterinária devido à gravidade dos sinais clínicos da doença em cães, desenvolvidos pelo caráter hematófago do parasito, que ocasiona processos anêmicos, deficiência de ferro, hipoalbuminemia e entre outras deficiências nutricionais, o que prejudica o desenvolvimento físico-somático de cães, principalmente jovens, além de perda de peso, processos diarreicos e muitas vezes, morte do animal parasitado (Nezami *et al.*, 2023).

O tratamento anti-helmíntico farmacológico em cães é baseado no uso de benzimidazóis (BZs) (albendazol, febendazol e febantel), lactonas macrocíclicas (LMs) (ivermectina) e tetraidropirimidina (THPs) (pamoato de pirantel) associada à prazinoisoquinolinas (PHQs) (praziquantel), a partir da segunda semana de vida, simultaneamente aos demais hospedeiros definitivos alocados no mesmo ambiente (Castro *et al.*, 2021; Balk *et al.*, 2023). Porém, a infecção por *A. caninum* em cães têm recebido especial atenção nos últimos anos pelo desenvolvimento de múltiplos fatores que englobam: liberação de mediadores inflamatórios, capacidade de desenvolvimento de estado hipobiótico; carreamento de formas larvais infectantes por hospedeiros paratênicos, e mutações genéticas, que propiciam resistência à resistência a múltiplos fármacos (RMF), tais como como BZs, LMs e THPs (Castro *et al.*, 2020, Nezami *et al.*, 2023).

A resistência de *A. caninum* aos fármacos tem sido uma preocupação crescente no Brasil, principalmente referente ao uso frequente e muitas vezes indiscriminado de anti-helmínticos de modo intensivos, os quais podem contribuir para uma forte pressão seletiva sobre os parasitos (Fernandes, 2022). Resistência à BZ's já foram identificadas em *A. caninum* obtidos de amostras de fezes de cães provenientes de Belo Horizonte-MG e Teresina -Pi (Furtado, 2014).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou identificar a infecção por *Ancylostoma* sp. em cães da raça Border Collie provenientes de um canil com histórico prévio de infecção pelo parasito e avaliar o perfil de resistência de *A. caninum* frente a quatro antiparasitários disponíveis no mercado e a mutação em gene β -tubulina de *A. caninum*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

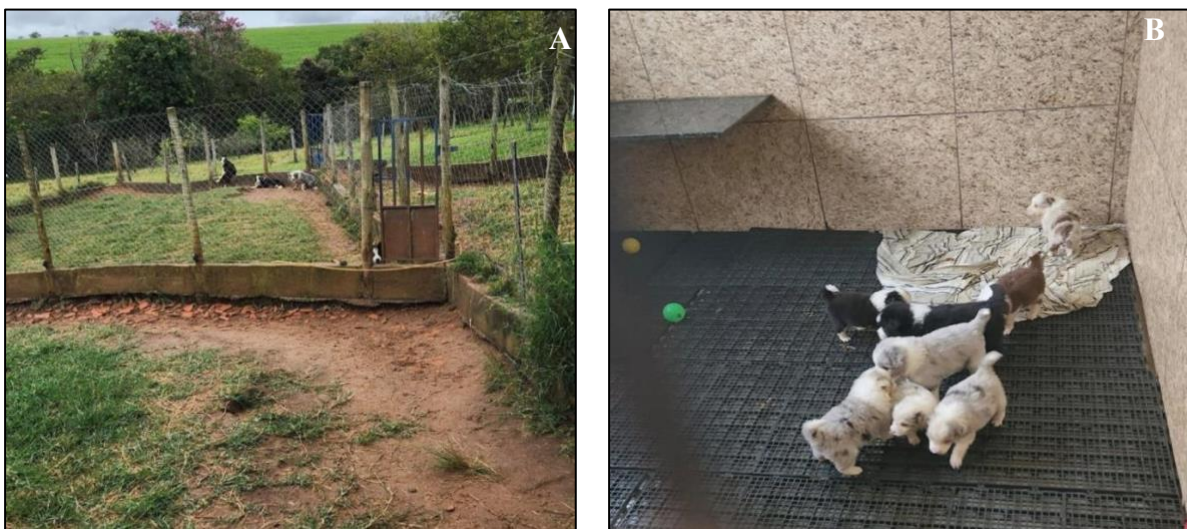
4.1 Comitê de ética e experimentação animal

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (CEEA-022/2023 - Anexo I).

4.2 Caracterização do canil

O canil da raça Border Collie era localizado nas proximidades da cidade de Uberaba-MG e possuía cerca de 45 exemplares para reprodução e venda de filhotes. O local era dividido em baias gramadas com alocação de 4 animais adultos em cada baia (Figura 1A), e baias cimentadas para animais em fase final da gestação e lactação/lactentes (Figura 1B).

Figura 1: Instalações do canil de cães da raça Border Collie localizado nas proximidades de Uberaba-MG. (A) Baia gramada com cerca de contenção, utilizada para alocação de cães adultos; (B) Baia cimentada, destinada a fêmeas em fase final de gestação, lactação e filhotes.



Fonte: Arquivo pessoal.

A alimentação dos cães era baseada na ração Fórmula Natural Life[®], oferecida duas vezes ao dia para os cães adultos. Os filhotes se alimentavam exclusivamente de leite materno até 30 dias, quando era iniciada a transição para alimentação sólida (ração Fórmula Natural Life Filhote[®]) oferecida duas vezes ao dia.

A sanidade dos animais do canil era mantida a partir de esquemas vacinais e de vermifugação. Os animais recebiam três doses da vacina V8-Vanguard[®] (vacina polivalente para imunização ativa para cinomose, hepatite infecciosa, laringotraqueite infecciosa, parvovirose,

parainfluenza e leptospirose) a partir dos 45 dias de vida, com intervalo de 21 dias entre doses. Vacina antirrábica (Rabisin[®]), era aplicada juntamente à última dose de V8 nos filhotes, com reforços vacinais associada a V8. A vermifugação nas fêmeas era realizada no momento do acasalamento, após nascimento dos filhotes e após seguiam o esquema dos filhotes. Os filhotes recebem febendazol em suspensão (VetMax[®]) a partir dos 15 dias de vida, com repetição do protocolo a cada 15 dias, até saída do canil (por volta dos 60 dias de idade). Os cães que não se encontravam em reprodução eram vermifugados a cada 3 meses de forma intercalada com Duprante plus 10 Kg[®] (praziquantel, pamoato de pirantel e febantel), Top Dog 10 Kg[®] (praziquantel, pamoato de pirantel, febantel e ivermectina) e Albendazol. O uso de vermífugos pertencentes à classe das lactonas macrocíclicas era possível porque os animais eram negativos para mutações no gene *ABCB1* (Figura 2), conhecido por estar associado à sensibilidade à ivermectina em cães da raça Border Collie. Portanto, todos os cães não tinham risco genético para reações adversas a ivermectina.

Figura 2: Relatório genético de sensibilidade medicamentosa: ausência da mutação no gene *ABCB1* em cão da raça Border Collie, pertencente às matrizes reprodutoras do canil.

Health Report	
BREED-RELEVANT RESULTS	
Research studies indicate that these results are more relevant to dogs like Yukon MDB, and may influence his chances of developing certain health conditions.	
✓ Cobalamin Malabsorption (CUBN Exon 53, Border Collie Variant)	Clear
✓ Collie Eye Anomaly (NHEJ1)	Clear
✓ Goniodysgenesis and Glaucoma, Pectinate Ligament Dysplasia, PLD (OLFM3)	Clear
➔ ✓ Multiple Drug Sensitivity (ABCB1)	Clear
✓ Myotonia Congenita (CLCN1 Exon 23, Australian Cattle Dog Variant)	Clear
✓ Neuronal Ceroid Lipofuscinosis 5, NCL 5 (CLN5 Exon 4 SNP, Border Collie Variant)	Clear
✓ Primary Lens Luxation (ADAMTS17)	Clear
✓ Raine Syndrome (FAM20C)	Clear
✓ Sensory Neuropathy (FAM134B, Border Collie Variant)	Clear
✓ Trapped Neutrophil Syndrome, TNS (VPS13B)	Clear

Fonte: Arquivo pessoal.

A higienização ambiental da ala-maternidade (onde os lactantes e lactentes eram mantidos), era realizada com HerbalVet T.A.[®] (cloreto de benzalcônio) (diluído na proporção 1/500 em água, SID). A higienização ambiental nas baias gramadas era feita com Bórax[®] (sal de sódio

do ácido bórico) (100 g/1 L de água, pulverizado em aproximadamente 2 m²/L), com finalidade larvicida, inseticida e fungicida. Todas as condições estipuladas ao canil foram feitas pela Médica Veterinária responsável técnica pelo mesmo.

4.3 Coleta de amostras biológicas

Amostras de fezes frescas, de todos os cães adultos e jovens da raça Border Collie presentes no canil no momento do estudo, foram coletadas, antes da vermifugação previamente estipulada no calendário do canil, por estimulação retal a fim de evitar contaminação ambiental. Foram obtidas amostras de 33 cães, sendo 10 animais jovens com até 12 meses de idade e 23 adultos com idade entre 13 meses e 7 anos.

As amostras foram acondicionadas individualmente em potes coletores, transportadas para processamento caixas térmicas com gelo reciclável, e submetidas aos exames parasitológicos (método direto, Willis Mollay e Ritchie) em até 12 horas após a coleta, e foram coletadas pré-tratamento anti-helmíntico, para determinação dos grupos experimentais, e pós-tratamento anti-helmíntico, para averiguação da presença ou ausência de ovos de *A. caninum* (Chiu *et al*, 2022). Ressalta-se que a vermifugação seguiu o calendário interno, e o trabalho iniciou-se na data de início da nova vermifugação.

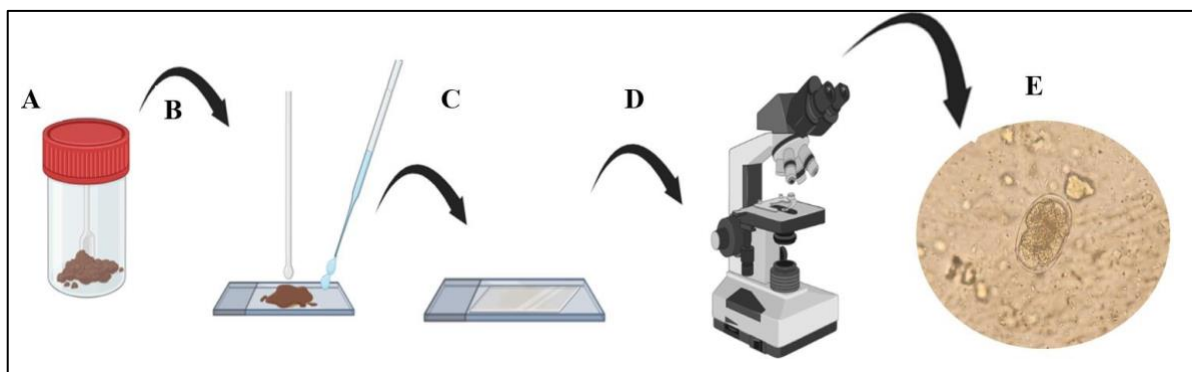
4.4 Exames coproparasitológicos

Os exames coproparasitológicos foram processados no laboratório de pesquisa do Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal - Universidade de Uberaba.

4.4.1 Método direto

O exame coproparasitológico foi realizado conforme metodologia descrita por Leal *et al* (2015), no qual uma pequena porção das fezes foi colocada em uma lâmina de vidro juntamente com solução salina 0,9% (Figura 3A, B). A amostra foi homogeneizada com auxílio de bastão de vidro, em seguida colocou-se a lamínula por cima do material obtido (Figura 3C) e fez-se análise microscópica em microscópio óptico Nikon E200[®] em diferentes aumentos (4x, 10x e 40x) (Figura 3D) para a detecção de ovos de *A. caninum* (Figura 3E).

Figura 3: Método coproparasitológico direto para visualização de ovos de *Ancylostoma caninum* em fezes de cão Border Collie pertencente a canil da região de Uberaba-MG. Porção de fezes é depositada em lâmina de vidro (A), contendo solução salina a 0,9% (B). Amostra é homogeneizada com o auxílio de bastão de vidro (C) e lamínula é colocada (D) para posterior leitura em microscópio óptico Nikon E200®, em diferentes aumentos (4x, 10x e 40x). Nota-se ovo de *A. caninum* (E) com cápsula em formato de barril e presença de blastômeros internos.

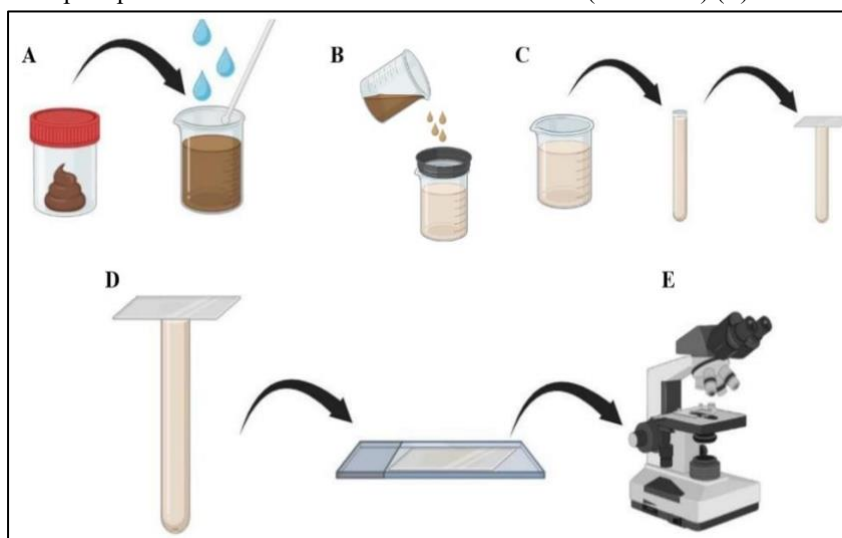


Fonte: Arquivo pessoal.

4.4.2 Método Willis-Molay

Em um Becker adicionou-se 2g de fezes e 40 mL de solução hipersaturada (NaCl 33%) (Figura 4A). Após homogeneização, a solução foi filtrada em peneira para remoção de detritos maiores e, em seguida, foi vertida em tubo de ensaio até formação do menisco (Alencar *et al.*, 2015) (Figura 4C). Colocou-se uma lamínula de vidro sob o menisco e aguardou-se 10 minutos. Em seguida, a mesma foi colocada sob uma lâmina de vidro (Figura 4D). A análise microscópica foi feita em microscópio óptico Nikon E200® em diferentes aumentos (10x e 40x) para a detecção de ovos de *A. caninum* (Figura 4E).

Figura 4: Método coproparasitológico de Willis Mollay. Amostra de fezes é transferida para Becker contendo solução hipersaturada (NaCl 33%) (A). Após homogeneização a solução é filtrada (B) e vertida para tubo de ensaio (C). Lamínula de vidro é colocada sob o menisco e após 10 minutos é colocada sob lâmina de vidro (D), para posterior leitura em microscópio óptico Nikon E200® em diferentes aumentos (10x e 40x) (E).

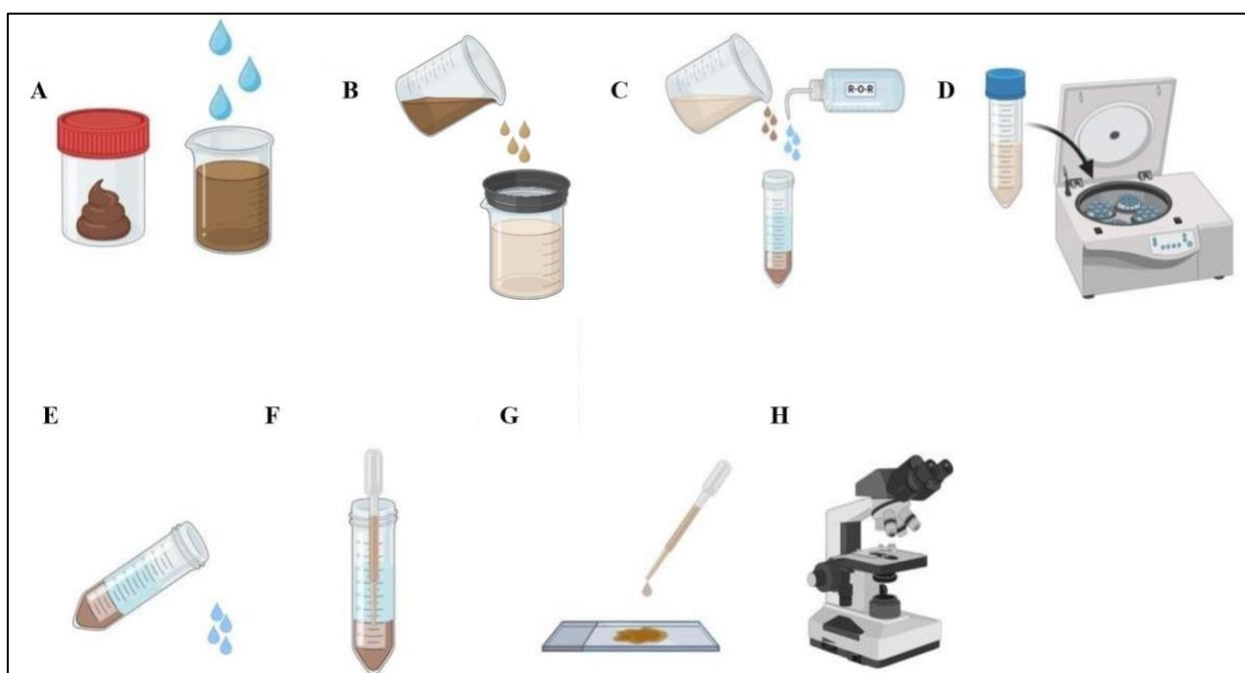


Fonte: Arquivo pessoal.

4.4.3 Método de Ritchie

O método de Ritchie foi adaptado de De Oliveira *et al* (2022) e realizado a partir da diluição de 2g de fezes em Becker, acrescidas de solução salina (Figura 5A); em seguida, foi realizada a filtração do material em peneira e a água foi colocada em tubo tipo Falcon, juntamente com éter na proporção de 1:3 (Figura 5B,C). A centrifugação foi realizada por 10 minutos à 1500 rpm (Figura 5D). Após esse processo, o sobrenadante foi descartado (E) e o sedimento obtido foi observado entre lâmina e lamínula nos aumentos de 10x e 40x, em microscópio óptico Nikon E200[®] (Figura 5E-H).

Figura 5: Método coproparasitológico de Ritchie. Amostra de fezes diluída em solução salina (A) é filtrada (B) e transferida para um tubo tipo Falcon[®], contendo éter (C). Após centrifugação (D) o sobrenadante é descartado (E) e o sedimento obtido (F) é depositado entre lâmina e lamínula (G) para posterior análise em microscópio óptico Nikon E200[®] (H).



Fonte: Arquivo pessoal.

4.5 Avaliação da resistência

4.5.1 Resistência parasitária múltipla a fármacos - RMF (anti-helmínticos)

Para avaliação da RMF, após os resultados dos exames coproparasitológicos, os animais (n=33) foram separados em quatro grupos compostos por animais jovens e adultos, e todos os animais dos grupos experimentais receberam tratamento antiparasitário, segundo recomendações

do fabricante (tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos animais, medicamentos utilizados e posologia dos grupos experimentais.

Grupo	No de animais		Tratamento antiparasitário	Posologia
	Adultos	Filhotes		
G1	6	3	Praziquantel + pamoato de pirantel (Duprantel Plus®)	Dose única, oral 1 comp./10 kg
G2	6	2	Fembendazol (Fenzol®)	Oral por 3 dias 1 comp./10 kg
G3	5	3	Praziquantel + pamoato de pirantel + febantel + ivermectina (Top Dog®)	Dose única, oral 1 comp./10 kg
G4	6	2	Albendazol	Dose única, oral 25 mg/kg

Fonte: Arquivo pessoal.

O exame de fezes foi repetido após 10 dias do período inicial de tratamento para avaliação da eficácia do anti-helmíntico, como protocolo qualitativo descrito por Kaplan e colaboradores (2023), na qual descreve-se avaliação coproparasitológica entre 10 e 14 dias, na qual confere-se que não há possibilidade de re-infecção entre as coletas.

4.5.2 Avaliação genética de resistência aos benzimidazóis

4.5.2.1 Obtenção das larvas para extração de DNA

Para avaliação genética da resistência, larvas de *A. caninum* foram obtidas pelo método de Harada-Mori como descrito por Thienpont *et al* (1979). A obtenção das larvas foi realizada no laboratório do Grupo de Imunologia Celular e Molecular – Fiocruz Minas. A coleta das amostras para esse processamento foi realizada 53 dias após os protocolos de tratamento.

Quatro amostras de fezes frescas positivas (com ovos de *A. caninum*) por algum dos métodos coproparasitológicos realizados (direto, Willis Molay e/ou Ritchie), pertencentes aos grupos 3 e 4, foram utilizadas para realização do ensaio.

Em um tubo de ensaio (18x180mm) colocou-se água destilada e na sua superfície acrescentou-se papel filtro contendo 1 a 2g de fezes parasitadas com ovos de *A. caninum*, de modo que a água não entrasse em contato com o papel. Posteriormente o tubo foi fechado com papel celofane preso com um anel de borracha e mantido em temperatura ambiente (24-28°C) entre 7 e 10 dias. O nível da água era avaliado diariamente objetivando manter as fezes úmidas

para que ocorresse a eclosão dos ovos e liberação das larvas. Após o período de incubação, com auxílio de uma lupa, o fundo do tubo era examinado para observar a existência de larvas e remoção das mesmas com pipeta de Pasteur (Thienpont *et al.*, 1979).

4.5.2.2 Extração de DNA das larvas obtidas

A extração do DNA das larvas de *A. caninum* de duas das amostras enviadas, as quais foram consideradas viáveis para tal processamento, foi realizada conforme metodologia descritas por Furtado (2014) e Avila *et al* (2021) com modificações. A extração de DNA das larvas e PCR foram realizadas no laboratório de Biotecnologia Molecular – Grupo de Pesquisa: Biologia Sintética e Modelagem de Sistemas Biológicos – Universidade de Viçosa.

Primeiramente, os tubos com os vermes foram submersos em nitrogênio líquido, e em seguida as larvas foram maceradas individualmente com o auxílio de um pistilo de vidro. Após a maceração, foram adicionados 400 µL de tampão de lise (50 mM de EDTA, 100 mM de Tris-HCl pH 7,4, 100 mM de NaCl e SDS 10%), e realizada a digestão com 100 µg/mL de proteinase K (Promega[®], EUA) a 65°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 400 µL de uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, e o material foi centrifugado a 12.000 x g, a 25°C, por 5 minutos.

A fase superior foi transferida para um novo tubo de microcentrifugade 1,5 mL e tratada com 100 µg/mL de RNase A (Ludwig Biotec[®], Brasil) a 37°C por 30 minutos para digestão do RNA. Novos 400 µL da solução de clorofórmio e álcool isoamílico foram adicionados, seguidos de uma segunda centrifugação com os mesmos parâmetros descritos. A fase superior foi novamente transferida para um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, onde foram adicionados 400 µL de isopropanol para precipitação do DNA, que foi armazenado a -20°C. Após cerca de 16 horas, o tubo foi centrifugado a 14.000 x g, a 4°C, por 30 minutos.

O precipitado foi então lavado com 400 µL de etanol a 70% e centrifugado a 12.000 x g, a 4°C, por 10 minutos. Essa etapa de lavagem foi repetida, e o DNA foi ressuscitado em 20 µL de água ultrapura e armazenado a 4°C.

A concentração de DNA foi verificada por espectrofotometria no NanoDrop[®] ND-1000 (ThermoScientific, EUA), considerando as razões 260/280 e 260/230 para avaliação da qualidade (Furtado, 2014).

4.5.2.3 Iniciadores utilizados para avaliação da presença do códon 200 do gene da β -tubulina

Os iniciadores utilizados neste estudo foram os projetados por Furtado (2014) (Quadro 1).

Quadro 1: Iniciadores empregados, suas correspondentes temperaturas de anelamento e locais das possíveis substituições (quando aplicável). As posições alteradas estão destacadas em negrito. A nomenclatura foi definida pelo sentido do iniciador (Direto - F ou Reverso - R), indicando se era sensível (s) ou resistente (r), no fragmento de controle (c) e na modificação para a técnica de Megaprimer-PCR (m). Os iniciadores para a primeira reação foram identificados com a letra "a", e os números representam a localização da segunda incompatibilidade na extremidade 3' do iniciador.

Iniciador (5 – 3')	Alteração	Temperatura de anelamento (60°C)
Fa: TGT AGT GAA AAA GCA GTC TCG		60
Fs0: TTG AGA ATA CAG ATG AGA CCT T		60
Fs2: TTG AGA ATA CAG ATG AGA CCA T	T → A	60
Fs3: TTG AGA ATA ACAG ATG AGA C G T T	C → G	60
Fs4: TTG AGA ATA ACAG ATG AGA G CT T	C → G	60
Fs4<: GAA TAC AGA TGA G A G CT T	C → G	50
Ra: AGC CGA AAG TGG AGC AAA TC		60
Rc: AGG TAG TGA CAC CGG ACA TT		60
Rr0: GAG CCT CGT TAT CAA TAC AGT		60
Rr2: GAG CCT CGT TAT CAA TAC A C T	G → C	60
Rr3: GAG CCT CGT TAT CAA TAC T G T	A → T	60
Rr4: GAG CCT CGT TAT CAA T A G AGT	C → G	60
Rr4<: CCT CGT TAT CAA T A G AGT	C → G	50
Rm: GGT ATC AAT ACA G T A GGT CTC	A → T	58

Fonte: Furtado (2014).

4.5.2.4 PCR em termociclador de gradiente e combinações de primers

Foi realizada PCR em termociclador de gradiente, com combinações de iniciadores em pares para amplificar regiões específicas do gene da β -tubulina isotipo 1 de *A. caninum*, visando identificar mutações associadas à resistência aos benzimidazóis (Furtado, 2014). Cada combinação de primers resultou em um fragmento de tamanho específico, cuja presença ou ausência indicou o genótipo do parasito em relação às mutações de interesse (Quadro 2).

Quadro 2: Combinação dos iniciadores empregados com os respectivos tamanhos dos fragmentos em pares de base (pb) e o significado das amplificações. Fonte: Furtado (2014).

Iniciadores	Tamanho fragmentos (pares de base)	Interpretação
Fa+Ra	441pb	Controle positivo. Confirma a presença do gene alvo na amostra
Fa+Rc	331pb	Controle para a presença do gene da β -tubulina sem mutações.
Fa+Rr0	164pb	Indica presença de mutação específica no códon 167 do gene da β -tubulina
Fa+Rr2	164pb	Indica presença de mutação específica no códon 198 do gene da β -tubulina.
Fa+Rr3	164pb	Indica presença de mutação específica no códon 199 do gene da β -tubulina.
Fa+Rr4	164pb	Indica presença da mutação no códon 200 do gene da β -tubulina.
Fa+Rr4<	161pb	Variante do primer Rr4. Melhora a especificidade da amplificação da mutação no códon 200
Fa+Rm	157pb	Indica presença de mutação específica no códon 201 do gene da β -tubulina.
Fs0+Rc	209pb	Indica ausência de mutações nos códons 167, 198, 199, 200 e 201 do gene da β -tubulina.
Fs2+Rc	209pb	Indica a ausência de mutação no códon 198 do gene da β -tubulina.
Fs3+Rc	209pb	Indica ausência de mutação no códon 199 do gene da β -tubulina.
Fs4+Rc	209pb	Indica ausência de mutação no códon 200 do gene da β -tubulina.
Fs4<+Rc	205pb	Variante do primer Fs4. Melhora a especificidade da amplificação. Indica a ausência de mutação no códon 200
60S	167pb	Controle interno. Auxilia na identificação dos fragmentos amplificados

Fonte: Furtado (2014).

As técnicas de PCR foram realizadas em produto final de 25 μ L, contendo de 12,5 μ L de GoTaq[®] Green Master Mix (Promega[®], USA), 0,5 μ L de cada iniciador (com concentração final de 0,2 μ M/iniciador), 9,5 μ L de água ultrapura e 2 μ L de DNA (cerca de 20ng). As amplificações ocorreram em um termociclador Mastercycler[®] (Eppendorf[®], Germany) obedecendo ao seguinte programa: 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial da dupla fita de DNA, seguido

de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um passo final de extensão a 72°C por 8min. Nas reações, foi incluído o “branco”, com a substituição do DNA por água, para avaliar a presença de possíveis contaminantes. O produto da reação dos iniciadores em pares foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v - relação massa/volume), enquanto o produto da Tetraprimer ARMS (Amplification Refractory Mutation System) - PCR foi corrido em gel de agarose 2,0% (Midsci[®], USA), ambos com tampão TAE 0,5x, corados com GelRed[®] (Biotium[®], USA).

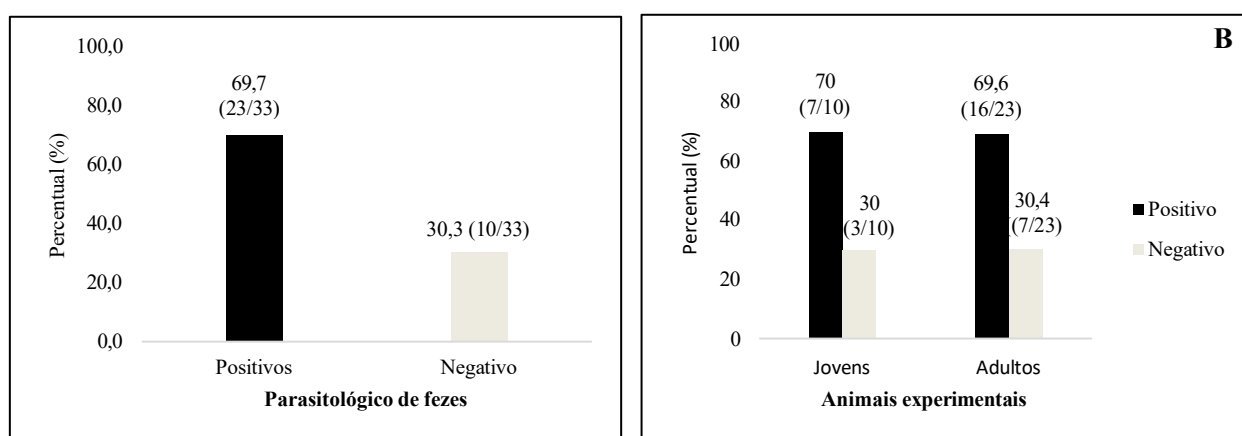
4.6 Análise estatística

Inicialmente avaliou-se a distribuição de resultados positivos e negativos em diferentes faixas etárias e grupos experimentais, antes e após um tratamento específico. Para análise estatística, foram empregados dois testes: o Teste Exato de Fisher, utilizado para examinar a relação entre idade e positividade dos resultados, e para avaliar o índice de redução de positividade após tratamento; e o Teste Qui-Quadrado, aplicado para verificar a diferença entre a distribuição observada e a esperada entre os grupos de tratamento. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas pelo Software Prisma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 33 cães avaliados, 69,7% (23/33) apresentaram ovos de *A. caninum* em pelo menos um dos exames coproparasitológicos (Figura 6A). Analisando a positividade por categoria animal, não se notou diferença significativa entre animais jovens (70% - 7/10) e adultos (69,6% - 16/23) (Figura 6B).

Figura 6: Frequência de ovos de *Ancylostoma caninum* nas fezes de cães Border Collie (A) pertencentes a um canil da região de Uberaba-MG, e correlação entre idade e positividade (B).



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

A positividade de *Ancylostoma caninum* (69,7% - 23/33) nos animais avaliados do presente estudo, corrobora com a prevalência encontrada por Oliveira *et al.* (1990) em cães atendidos em hospital veterinário no município de Uberlândia-MG (61,15%) e a encontrada por Youssef *et al.* (2020), em amostras fecais de cães do município de Marília-SP (66,6% - 50/79).

Em contrapartida, o percentual encontrado diverge dos achados de Buzatti *et al.* (2023), que observaram uma prevalência consideravelmente menor (26,68%), em cães atendidos em uma clínica veterinária em Santa Catarina (Buzatti *et al.*, 2023). Diferença semelhante foi constatada no estudo de Ugalde *et al.* (2023), que identificaram 39% (124/318) de positividade para *A. caninum* em amostras fecais de cães em Niterói-RJ.

As diferenças nas taxas de positividade entre os estudos podem ser atribuídas a múltiplos fatores ambientais e de manejo como: temperatura, umidade e características do solo, além da densidade populacional canina e do rigor nos protocolos de vermifugação (Nugui *et al.*, 2012; CAPC, 2025).

A temperatura média mais baixa observada em Santa Catarina, associada a um perfil de atendimento predominante de cães domiciliados em clínicas particulares, pode ter reduzido a exposição ambiental dos animais ao parasita e contribuído para a menor prevalência observada (Buzatti *et al.*, 2023). Em contraste, a alta densidade populacional e a temperatura tropical observadas em Uberlândia, Marília e Niterói favorecem o ciclo ambiental do parasita, justificando as taxas elevadas nesses locais (CAPC, 2025; Ugalde *et al.*, 2023).

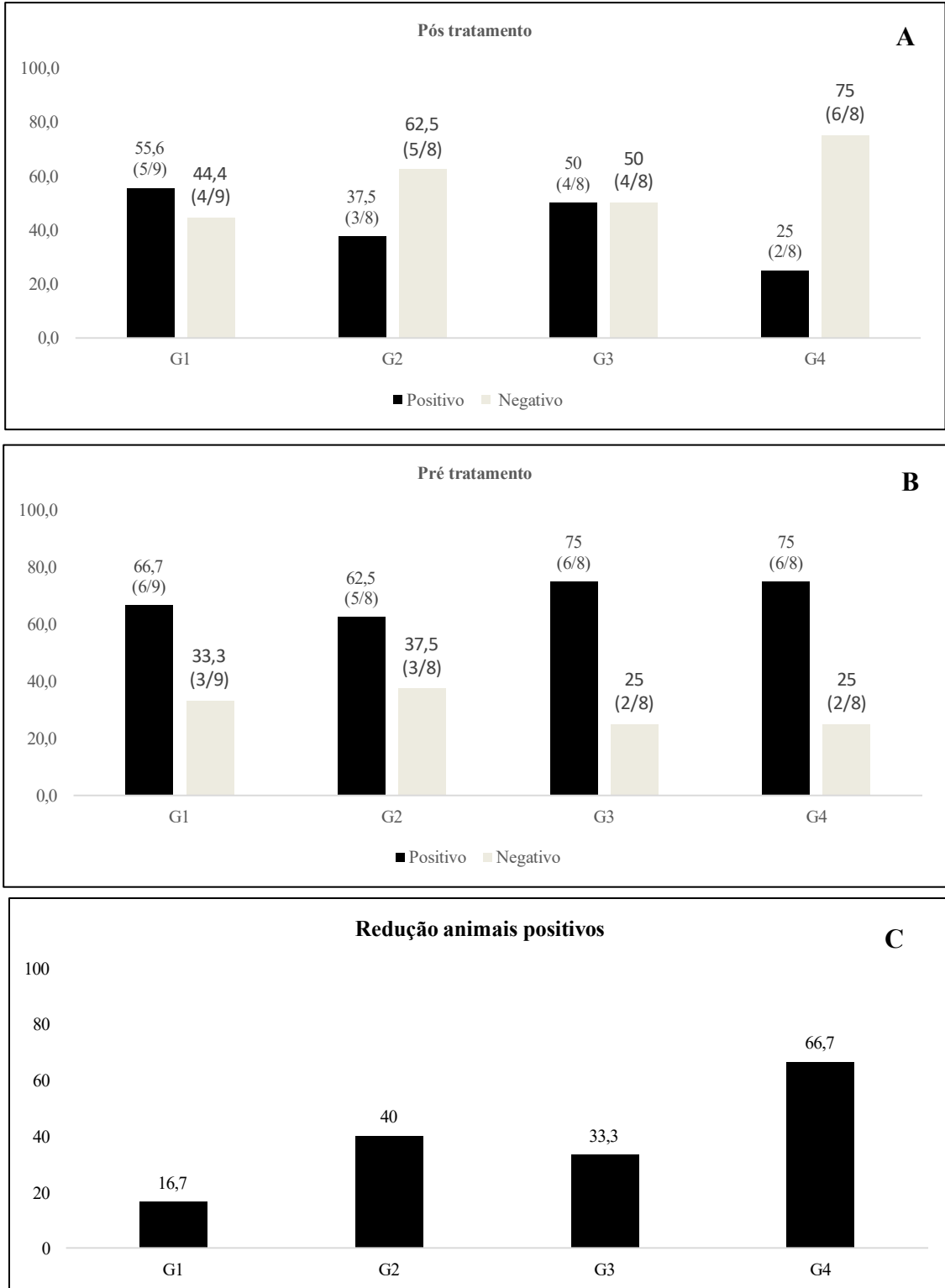
No que tange à análise por faixa etária, não se evidenciou diferença na positividade entre cães jovens (70% – 7/10) e adultos (69,6% – 16/23), sugerindo que a distribuição da infecção por *Ancylostoma caninum* é ampla e independe da idade. Essa observação é corroborada por estudos conduzidos por Fontanarrosa *et al.* (2006) na Argentina, que, ao analisarem mais de duas mil amostras fecais, não identificaram diferença significativa na prevalência de *A. caninum* entre filhotes e adultos, apesar de taxas numericamente mais elevadas em animais mais jovens. De forma semelhante, Ashraf *et al.* (2008) demonstraram que, embora a prevalência de ancilostomídeos fosse ligeiramente maior em cães jovens, a diferença entre as faixas etárias não foi estatisticamente relevante. Ainda segundo o Companion Animal Parasite Council (CAPC, 2025), cães de todas as idades são suscetíveis à infecção por ancilostomídeos, o que reforça a importância da vigilância contínua e do controle ambiental, independentemente da faixa etária (Fontanarrosa *et al.*; 2006; Ashraf *et al.*, 2008; CAPC, 2025). A ausência de diferença estatística significativa nas categorias de animais sugere que a suscetibilidade à infecção não se limita à idade, podendo estar relacionada a fatores individuais, como resposta imune e hábitos comportamentais (Davidsohn, Violato; Sérvio, 2023; CAPC, 2025).

Avaliando o perfil parasitológico por grupo experimental antes do tratamento observou-se que no G1 66,7% (6/9) eram positivos, sendo 1 filhote e 5 adultos; no G2 62,5% (5/8) eram positivos (2 filhotes e 3 adultos) e no G3 e G4 75% (6/8) eram positivos, sendo 3 filhotes e 3 adultos no G3, e 1 filhote e 5 adultos no G4 (Figura 7A).

Após a realização dos protocolos de tratamento, pode-se notar a presença de ovos de *A. caninum*, nas fezes dos animais dos grupos experimentais, em pelo menos um exame parasitológico e em animais negativos nos exames iniciais. A frequência de ovos observada foi de 55,6% (5/9) nos animais no G1 (1 filhote e 4 adultos), 37,5% (3/8) no G2 (2 filhotes e 1 adulto), 50,0% (4/8) no G3 (2 filhotes e 2 adultos), e 25,0% (2/8) no G4 (2 adultos) (Figura 7B).

A redução significativa de positividade após tratamento, realizada pelo teste exato de Fisher, foi de 16,7% - G1, 40% - G2, 33,3% - G3 e 66,7% - G4, não havendo diferença na redução da positividade entre os grupos tratados com diferentes bases farmacológicas ($p > 0,05$) (Figura 7C).

Figura 7: Frequência de ovos de *Ancylostoma caninum* nas fezes de cães Border Collie pertencentes a um canil da região de Uberaba-MG, antes (A) e após (B) o tratamento com anti-helmínticos a base de praziquantel + pamoato de pirantel (G1), fembendazol (G2), praziquantel + pamoato de pirantel + febantel + ivermectina (G3) e Albendazol (G4). Redução de positividade em diferentes grupos de tratamento (C).



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Segundo Traversa (2012), a detecção de ovos no exame coproparasitológico pós-tratamento, independentemente da quantificação, já configura falha terapêutica, uma vez que a eliminação completa da infecção exige a ausência total de ovos eliminados nas fezes. Da mesma forma, as diretrizes da ESCCAP (2021) estabelecem que o critério primário para confirmar a eficácia de um protocolo de vermifugação é a negatização dos exames coproparasitológicos subsequentes, mesmo em avaliações qualitativas.

Complementarmente, o *Companion Animal Parasite Council* recomenda a reavaliação entre sete e dez dias após o tratamento, sendo a persistência de ovos nas fezes um forte indicativo de resistência do parasito ou falha do protocolo utilizado (CAPC, 2025). Embora Balk e colaboradores (2023) ressaltem que a reativação de larvas hipobióticas pode, em alguns casos, justificar a presença de ovos mesmo após tratamento adequado, a prática clínica corrente adota como parâmetro de sucesso terapêutico a ausência total de eliminação de ovos no período de reavaliação). Dessa forma, os resultados observados neste estudo, com detecção de ovos de *A. caninum* após o tratamento nos diversos grupos avaliados, indicam que não foi alcançada eficácia terapêutica plena, corroborando a necessidade de reavaliação dos protocolos empregados.

Analisando os resultados dos grupos experimentais, a redução na positividade observada no G1 (16,7%), mostra que o praziquantel associado ao pamoato de pirantel apresenta eficácia limitada no combate a *Ancylostoma caninum*, embora seja amplamente reconhecido por sua ação contra cestódeos, sua atividade contra nematódeos é reduzida (Risso *et al*, 2016). Os autores indicam que a associação do praziquantel com outros fármacos, como pamoato de pirantel e febantel, resulta em um controle mais eficiente das infecções causadas por esses parasitas (Risso *et al*, 2016). Assim, a baixa resposta terapêutica no G1 evidencia a importância de protocolos combinados para um tratamento mais eficaz de *A. caninum*.

A persistência de positividade de *A. caninum* nos cães pertencentes ao grupo G2 indica resistência ao fenbendazol como já relatado por Castro e colaboradores, (2019) onde mostraram que os cães positivos para o nematódeo e submetidos a tratamentos sucessivos com fenbendazole se tornaram refratários ao medicamento.

Castro *et al* (2021) relatou que ancilostomatídeos resistentes à ivermectina também podem desenvolver resistência à moxidectina. Tendo em vista que o grupo de animais G3 que receberam tratamento com ivermectina apresentaram exames coproparasitológicos positivos após o tratamento, é suposto que o uso da moxidectina não apresenta boa eficácia contra o *A. caninum*. No mesmo estudo, foi declarado que há resistência parasitária ao uso de BZs e MLs, sugerindo que ambas as bases medicamentosas são ineficazes no tratamento de cães infectados

com *A. caninum*, o que corrobora com os dados obtidos no presente estudo, visto que os grupos tratados exclusivamente com BZs (G2 e G4) obtiveram positividade coproparasitológica após tratamento, assim como no grupo tratado com LMs (G3), não sendo possível discriminar o agente efetivo no combate ao parasito (Castro *et al.*, 2021). O uso isolado de princípios ativos, sobretudo benzimidazóis, tem demonstrado eficácia limitada em áreas com histórico de uso repetitivo, favorecendo a seleção de cepas resistentes (Furtado *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2021).

Em relação ao uso do albendazol (G4), a presença de ovos de *Ancylostoma caninum* nas fezes dos cães mesmo após o tratamento sugere fortemente a existência de resistência parasitária a esta base farmacológica. Este achado torna o trabalho corroborativo com diversos estudos recentes que apontam falhas terapêuticas envolvendo benzimidazóis, grupo ao qual o albendazol pertence, especialmente quando utilizados isoladamente e de forma repetida em ambientes com alta pressão infecciosa (Furtado *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2021). Em um estudo conduzido por Idika e colaboradores (2016) na Nigéria, foram avaliadas a eficácia *in vivo* e *in vitro* do Albendazol contra infecções naturais de *A. caninum* em cães locais, observou-se baixa taxa de eficácia do medicamento, reforçando a suspeita de resistência anti-helmíntica emergente na população canina local.

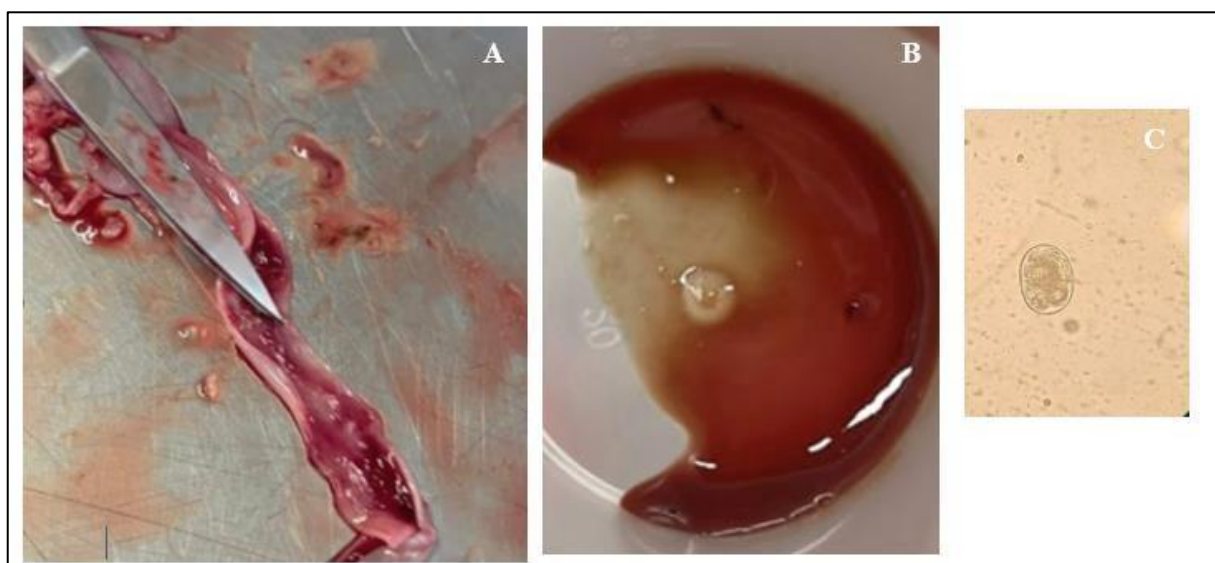
A literatura atual recomenda o uso de protocolos combinados, que associam princípios ativos com diferentes mecanismos de ação, como praziquantel, pamoato de pirantel, febantel e ivermectina, a fim de ampliar o espectro de ação e minimizar o risco de resistência (Bowman *et al.*, 2010; CAPC, 2023). Assim, pode-se inferir que a reavaliação dos exames coproparasitológicos pós-tratamento contribui para vigilância diagnóstica de supostas resistências e para infecções recorrentes, reinfecções e/ou reativação de larvas em estado de hipobiose, muitas vezes sequer consideradas pelos clínicos que instituem os protocolos de vermifugação (Castro *et al.*, 2021). O presente estudo reforça a importância desta reavaliação, visto que houve positividade nos exames realizados após os tratamentos instituídos.

Ressalta-se, ainda, que a persistência da infecção pode ser agravada pela seleção de cepas resistentes de *A. caninum*, portadoras de mutações no gene da β -tubulina, como a alteração no códon 200, que conferem resistência aos benzimidazóis sem necessariamente aumentar a capacidade infecciosa do parasito (Furtado *et al.*, 2014; Nezami *et al.*, 2023). Essa resistência favorece a manutenção da infecção no hospedeiro e, conseqüentemente, o aumento secundário da carga ambiental de ovos e larvas infectantes (Furtado *et al.*, 2014; CAPC, 2025).

Durante o experimento, um filhote um dia de vida e que ainda não havia realizado amamentação, cuja mãe apresentou positividade para *Ancylostoma caninum* no exame

coproparasitológico, veio a óbito. A necrópsia foi realizada, permitindo a coleta de material fecal diretamente do intestino do animal, no qual foi confirmada a presença de *A. caninum* (Figura 8). Levando-se em consideração a idade do filhote e o fato que não ter ingerido leite materno, configura-se que a transmissão foi transplacentária, destacando a importância de medidas preventivas em cadelas gestantes para evitar a disseminação precoce da parasitose aos filhotes (Burke, Roberson, 1985; Davidsohn, Violato, Sérvio, 2023). E como a vermifugação era realizada no momento do acasalamento e após nascimento dos filhotes pode-se suspeitar de resistência, visto que o tratamento realizado seguiu as recomendações do fabricante.

Figura 8: Intestino delgado de filhote de cão de um dia de idade (A), conteúdo fecal coletado diretamente do intestino delgado durante necrópsia (B) e ovo de *A. caninum* (C) do conteúdo fecal obtido (enterite hemorrágica), observado em exame coproparasitológico direto no aumento de 40x em microscópio Nikon E200®.



Fonte: arquivo pessoal.

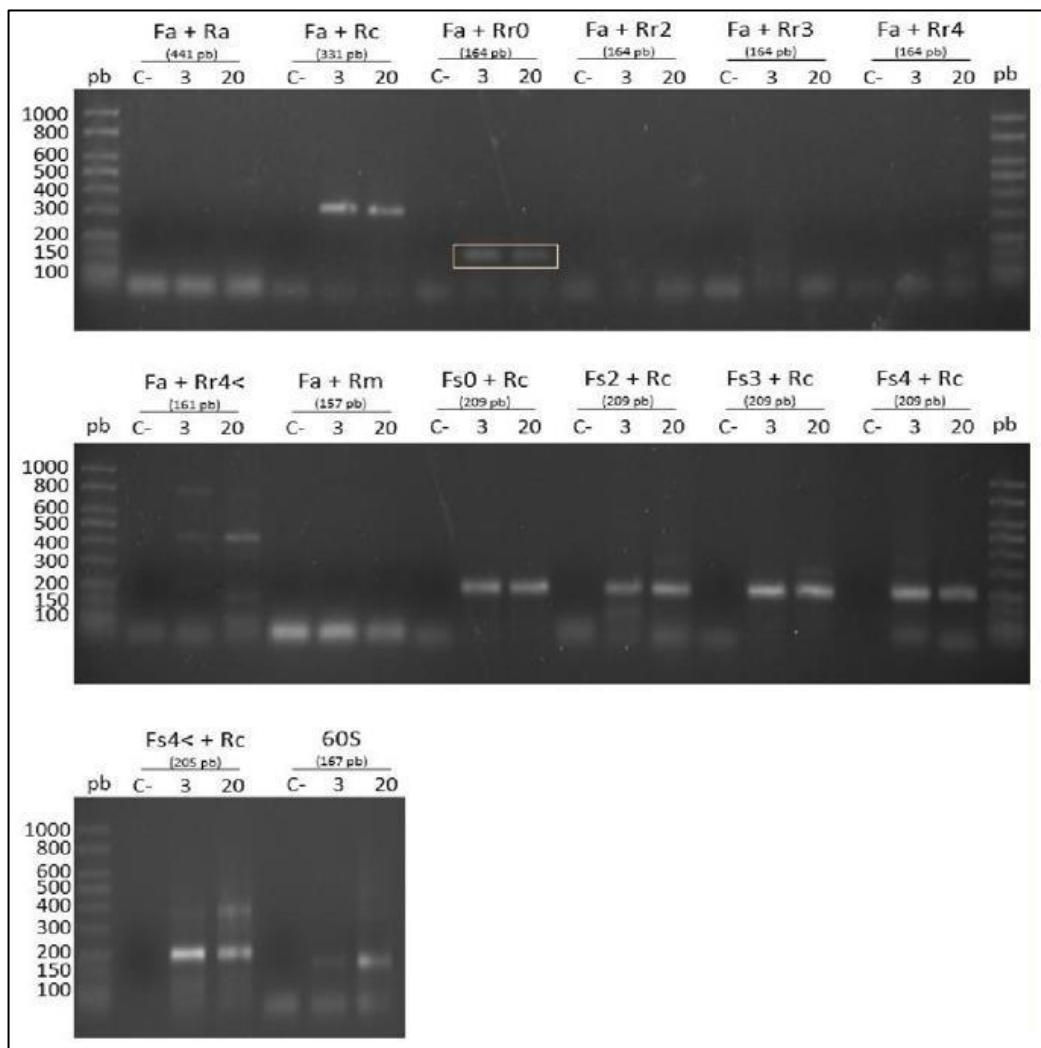
Para verificação de resistência genética aos BZs quatro amostras de fezes de cães positivas para *A. caninum* foram cultivadas para obtenção de formas larvais para posterior extração do DNA. Somente duas destas amostras obteve-se *pool* de larvas, denominadas como “3” e “20” no resultado de eletroforese (Figura 9).

A amplificação do fragmento corresponde ao grupo "Fa + Rr0" na PCR, com aproximadamente 164pb o correu na amostra 3, está associada à detecção de mutação no códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1 em *A. caninum*. Esse marcador é empregado na técnica de ARMS-PCR para diferenciar alelos selvagens daqueles que apresentam mutações ligadas à resistência aos BZs (Furtado, 2014). A identificação desse fragmento específico sugere a

possível sequenciamento da mutação na amostra analisada, possibilitando avaliar a suscetibilidade ou resistência do parasita aos BZs (Furtado, 2014).

Os códons 167, 168, 198 e 200 no *Ancylostoma caninum* são alvos importantes em estudos sobre resistência a BZs, sendo que os códons 167 e 200 possuem mutação resultante na substituição fenilalanina por tirosina; códon 198 substitui ácido glutâmico por alanina; e códon 168 ainda é pouco estudado, mas está envolvido na modulação da resistência (Furtado, 2014; Castro *et al.*, 2019; Castro *et al.*, 2021).

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 1%, evidenciando produtos de PCR amplificados a partir de DNA extraído de amostras positivas para *Ancylostoma caninum* após tratamento. As canaletas indicadas como “C-” correspondem aos controles negativos (brancos da reação), enquanto as canaletas numeradas “3” e “20” referem-se às respectivas amostras testadas. O retângulo branco nas canaletas 3 e 20, na combinação de primers “Fa e Rr0”, destaca uma banda próxima a 200 pares de bases (pb), indicando amplificação específica para o códon 167.



Fonte: Arquivo pessoal.

Diante do exposto, pesquisas recentes indicam que *A. caninum* está desenvolvendo resistência a múltiplas classes de anti-helmínticos, incluindo o pirantel (THPs) (Kopp *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2019), e LMs (ivermectina e moxidectina) (Kitchen *et al.*, 2019; Castro *et al.*, 2021). Essa resistência tem sido associada a mutações no gene da β -tubulina isotipo 1, especificamente no códon 167, embora o gene não atue diretamente no pirantel (Castro *et al.*, 2019). Alterações pontuais no gene da β -tubulina, especialmente nos códons 167, 198 e 200, estão associadas à diminuição da ligação dos benzimidazóis à proteína, resultando em resistência que é restrita a essa família de anti-helmínticos (Prichard *et al.*, 2018). Isso sugere que as mutações podem conferir uma vantagem seletiva aos parasitas, permitindo-lhes sobreviver a tratamentos com diferentes classes de medicamentos (Castro *et al.*, 2019).

É importante ressaltar que o gene de resistência aos BZs está presente nos helmintos que infectam os cães da população estudada, pois os espécimes de *A. caninum* avaliados apresentaram mutações no códon 200 do gene de relevância (Castro *et al.*, 2019; ESCCAP, 2021; CAPC, 2025). Diante dessas evidências, torna-se essencial acompanhar a eficácia dos anti-helmínticos utilizados no controle desse nematódeo, além de adotar estratégias alternativas para impedir a propagação de cepas resistentes (Castro *et al.*, 2019).

Com base nos resultados obtidos e tipo de manejo dos animais avaliados, pode-se inferir que a RMF observada ocorreu porque os animais eram expostos a ambientes de difícil controle (locais com areia/grama), o favorecia o aumento da taxa de infecção e transmissão de ancilostomídeos e pela realização de vermifugação em períodos inferiores ao período pré-patente do *Ancylostoma caninum* (14 a 21 dias). Segundo Jimenez Castro *et al* (2021) essa prática expõe repetidamente os parasitos imaturos a subdoses terapêuticas, permitindo a sobrevivência e posterior reprodução de indivíduos com perfis genéticos mais tolerantes aos antiparasitários, sendo um fator positivo a mutações do parasito que levam à RMF (ESCCAP, 2021; CAPC, 2025).

De Melo e colaboradores (2021) apontam que a resistência de *A. caninum* tem se tornado uma preocupação crescente, especialmente em contextos de manejo intensivo. A hipótese predominante sugere que o uso frequente de vermífugos em canis comerciais, principalmente nos primeiros meses de vida dos filhotes, pode estar acelerando a seleção de cepas resistentes. Apesar da necessidade de investigações adicionais para compreender a real extensão do problema, esses achados destacam a importância de estratégias terapêuticas mais eficazes e racionais para evitar a propagação da resistência a anti-helmínticos (De Melo *et al*, 2021).

Isto posto, Castro e colaboradores (2021) relatam que, apesar das características genéticas que implicam à RMF, os níveis de resistência são multifatoriais e independentes da classe de

medicamento utilizada no tratamento antiparasitário, visto que possuem diferentes mecanismos de ação e mesmo assim, são passíveis de ineficácia. Outro fator que corrobora à RMF é a falta de alternância entre as bases medicamentosas disponíveis, visto que os parasitos resistentes à determinadas bases podem ser propagadas entre os animais, dificultando o controle da ancilostomíase (Castro *et al.*, 2021).

Diante dos achados obtidos, torna-se imprescindível adotar uma abordagem terapêutica mais eficaz e estrategicamente estruturada para o controle da *A. caninum*.

O emodepside é um desipeptídeo com ação em larvas e adultos (paralisia flácida do parasito), e obteve alta eficácia (99,6%) no tratamento contra nematoides nos estudos de Castro *et al* (2020) nos EUA, sendo um potencial vertente de tratamento para esses animais. Entretanto, essa base é comercializada somente em produtos para felinos no Brasil (Drontal gatos SpotOn[®]). No mesmo estudo, relatou-se que o uso de milbemicina não apresentou eficácia no tratamento contra ancilostomídeos (apenas 8,8% dos animais apresentaram negatividade após o uso dessa base), a qual não foi utilizada no presente estudo (Castro *et al.*, 2020). Entretanto, não foram encontrados estudos com delineamento genético do parasito encontrado nas fezes de cães no Brasil submetidos a tal método de controle para correlação de possível resistência à tal base.

A realização do exame coproparasitológico antes do início da vermifugação é fundamental para diagnóstico preciso, escolha racional do antiparasitário e acompanhamento posterior. A técnica de escolha, como a de Willis-Mollay associada aos métodos direto e de Ritchie, permite identificação das estruturas parasitárias (CAPC, 2023). Além disso, a reavaliação entre 7 a 14 dias após o tratamento é considerada um critério clínico importante para verificar a eficácia do fármaco e detectar possíveis falhas terapêuticas ou presença de resistência (CAPC, 2023). A ausência de ovos nas fezes em coletas sequenciais indica sucesso terapêutico, sendo recomendada a repetição do exame pelo menos uma vez ao mês nos primeiros três meses após a vermifugação em áreas de alta endemicidade.

A avaliação quantitativa da eliminação de ovos de *A. caninum* pelas fezes, por meio de métodos como a contagem de ovos por grama, incluindo o Teste de Redução da Contagem de Ovos (TRCO), é uma ferramenta útil para o monitoramento da eficácia terapêutica e acompanhamento da carga parasitária em estudos clínicos e experimentais (Traversa, 2012; Jimenez Castro *et al.*, 2020). Técnicas tradicionais como as de Willis-Mollay e Ritchie, embora mais voltadas ao diagnóstico qualitativo, quando associadas à quantificação de ovos permitem estabelecer parâmetros comparativos entre diferentes protocolos terapêuticos (Furtado *et al.*, 2014). Não há um valor mínimo universalmente consensual de redução de ovos que garanta

eficácia plena do tratamento em cães, mas algumas referências sugerem que reduções superiores a 90% na carga parasitária após a vermifugação indicam boa resposta, baseando-se em critérios aplicados a ruminantes e adotados de forma adaptativa para animais de companhia (Jimenez Castro *et al.*, 2020; ESCCAP, 2021). Contudo, na rotina clínica de pequenos animais, a negatificação completa das amostras fecais continua sendo considerada o parâmetro mais seguro e objetivo para aferir sucesso terapêutico (Traversa, 2012). A persistência de ovos após o tratamento deve ser interpretada com cautela, pois pode refletir falha farmacológica, reinfeção precoce ou reativação de larvas hipobióticas, sendo indispensável o seguimento coproparasitológico criterioso e periódico (Furtado *et al.*, 2014; ESCCAP, 2021).

Para conter a disseminação de genes de resistência, é necessário adotar práticas de controle populacional do parasita que reduzam a exposição contínua aos mesmos antiparasitários (Traversa *et al.*, 2021). Isso inclui o uso rotativo de classes farmacológicas, realização de exames coproparasitológicos antes de qualquer tratamento, e o isolamento temporário de animais positivos até negatificação confirmada (Traversa *et al.*, 2021). Medidas sanitárias como a remoção diária das fezes, desinfecção periódica do ambiente e o uso de pisos drenantes e exposição solar direta também são eficazes na redução da carga ambiental de larvas infectantes (CAPC, 2023).

Entre os compostos químicos recomendados para desinfecção ambiental, destaca-se o hipoclorito de sódio a 5%, com ação oxidante potente sobre larvas de nematoides, especialmente eficaz quando aplicado em superfícies lisas, devendo ser reaplicado semanalmente ou após chuvas intensas (Esser, 1972). O enxofre de cal, tradicionalmente utilizado na agricultura, também possui ação ovicida e larvicida e pode ser utilizado diluído em água, com reaplicações quinzenais (UFMG, 2014). Já o borato de sódio, utilizado especialmente em áreas gramadas, pode ser aplicado na proporção de 1 kg/2 m², com reaplicação mensal, agindo como dessecante sobre larvas de estágios infectantes (Merck Sharp, Dohme Corp, 2024). O cloreto de sódio (sal de cozinha) a 10% exerce ação osmótica sobre larvas em substratos argilosos ou arenosos, sendo recomendado para uso pontual em locais de elevada contaminação, com reaplicação semanal (UFMG, 2014).

Em relação à prevenção da transmissão vertical, a implementação de programas estratégicos de desparasitação para fêmeas reprodutoras é fundamental. Recomenda-se a vermifugação da fêmea gestante com fármacos seguros, como fenbendazol (50 mg/kg/dia por via oral no 40º dia de gestação e 14º dia pós-parto), com eficácia demonstrada na prevenção da migração larval e transmissão transplacentária e transmamária (Burke, Roberson, 1985; Bowman *et al.*, 2019).

Portanto, o controle eficaz da ancilostomíase canina requer a integração de medidas farmacológicas, sanitárias, genéticas e de manejo reprodutivo. Essa abordagem multidimensional visa não apenas o tratamento dos casos clínicos, mas também a prevenção da disseminação de cepas resistentes e a interrupção dos ciclos de transmissão, especialmente em criadouros e locais com alta densidade populacional animal.

Por fim, este estudo contribui para a ampliação do conhecimento sobre a resistência de *A. caninum* a antiparasitários e alerta para a necessidade de revisões nos protocolos terapêuticos adotados na medicina veterinária. A continuidade das pesquisas sobre os mecanismos de resistência e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas são fundamentais para garantir a eficácia dos tratamentos e minimizar os impactos da ancilostomíase tanto na saúde animal quanto na saúde pública.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir:

- A persistência do parasitismo após o tratamento comprova a existência de resistência a fármacos e ressalta a importância da reavaliação coproparasitológica pós-tratamento.

- Há transmissão materno-filial, o que sugere a necessidade de revisão dos manejos sanitários em canis.

- A análise genética do perfil de resistência identificou a mutação específica no códon 167 do gene da β -tubulina isotipo 1, o que comprovou que as bases disponíveis no mercado têm uma eficácia limitada no controle da ancilostomíase canina, o que comprova a necessidade de estudos e investimentos na área.

REFERÊNCIAS

ADAM, Sithithana; DEKUMYOY, Paron; NACAPUNCHAI, Duangporn; KETBOONLUE, Thawatchai; CHARUNWATTHANA, Prakaykaew; DHITAVAT, Jittima; KOOMPAPONG, Khuanchai; CHONSAWAT, Putza e WATTHANAKULPANICH, Dorn. **Assessment of an immuno-diagnostic method for hookworm-related cutaneous larva migrans using crude extracts of *Ancylostoma caninum***. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 4, p. 209, 2023. DOI: 10.3390/tropicalmed8040209.

American Animal Hospital Association. **Canine Life Stage Guidelines**. AAHA, 2019. Disponível em: <https://www.aaha.org/professional/resources/canine-life-stage-guidelines/>.

ASHRAF, Kamran; RAFIQUE, S.; HASHMI, H. A.; CHAUDHARY, Zafar Iqbal. Ancylostomosis and its Therapeutic Control in Dogs. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 28, n. 1, p. 19–22, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/273756360_Ancylostomosis_and_its_Therapeutic_Control_in_Dogs.

AVILA, Héctor Gabriel; RISSO, Marikena Guadalupe; CABRERA, Marta; RUYBAL, Paula; REPETTO, Silvia Analía; BUTTI, Marcos Javier; TRANGONI, Marcos David; SANTILLÁN, Graciela; PÉREZ, Verónica Mirtha e PERIAGO, María Victoria. **Development of a new LAMP assay for the detection of *Ancylostoma caninum* DNA (Copro-LAMPac) in dog fecal samples**. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 8, 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.770508.

AVRAMENKO, R. W.; REDMAN, E. M.; LEWIS, R.; YAZWINSKI, T. A.; WASMUTH, J. D. e GILLEARD, J. S. **Exploring the gastrointestinal “nemabiome”: deep amplicon sequencing to quantify the species composition of parasitic nematode communities**. *PLOS ONE*, 2 dez. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0143559.

AZIZ, M. H. e RAMPHUL, K. ***Ancylostoma***. In: **STATPEARLS**. Treasure Island, FL. StatPearls Publishing, jan. 2023.

BALK, J. D.; MITCHELL, N. D.; HUGHES, J.; SOTO, N. P.; ROSSI, J. e RAMIREZ-BARRIOS, R. **Multiple anthelmintic drug resistant *Ancylostoma caninum* in foxhounds**. *Journal of Parasitology Drugs and Drug Resistance*, v. 22, p. 102-106, Aug. 2023. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2023.07.001.

BOWMAN, Dwight D. **Georgis' Parasitology for Veterinarians**. 10. ed. St. Louis: Elsevier Health Sciences, 2010.

BOWMAN, Dwight D.; MONTGOMERY, Susan P.; ZAJAC, Anne M.; EBERHARD, Mark L. e KAZACOS, Kevin R. **Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans**. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 4, p. 162-167, 2010.

BOWMAN, D. D.; *et al.* **Georgis' Parasitology for Veterinarians**. 11. ed. St. Louis: Elsevier, 2021.

BURKE, T. Michael; ROBERSON, Edward L. Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: experimental infection of the bitch before pregnancy. **International Journal for Parasitology**, v. 15, n. 1, p. 71–75, 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(85\)90104-3](https://doi.org/10.1016/0020-7519(85)90104-3).

BUZATTI, Andréia; PISSATTO, Jéssica Decker; GUARANGNI, Leticia Zanin e SILVA, Maria Eduarda Rodrigues da. **Prevalência de parasitismo gastrointestinal em cães e gatos de São Miguel do Oeste e avaliação de riscos à saúde humana e animal**. *Brazilian Journal of Development*, v. 9, n. 12, p. 643-654, 2023. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv9n12-063>

CAPC – Companion Animal Parasite Council. **Hookworms: guidelines for the control of hookworm infections in companion animals - *Ancylostoma* spp.** 2025.

CASTRO, P. D. J.; MANSOUR, A.; CHARLES, S.; HOSTETLER, J.; SETTJE, T.; KULKE, D. e KAPLAN, R. M. **Efficacy evaluation of anthelmintic products against an infection with the canine hookworm (*Ancylostoma caninum*) isolate Worthy 4.1F3P in dogs**. *IJP. Drugs and Drug Resistance*, v. 13, p. 22-27, 2020. DOI: [10.1016/j.ijpddr.2020.04.003](https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.04.003).

CASTRO, P. D. J.; HOWELL, S. B.; SCHAEFER, J. J.; AVRAMENKO, R. W.; GILLEARD, J. S. e KAPLAN, R. M. **Multiple drug resistance in the canine hookworm *Ancylostoma caninum*: an emerging threat?** *Parasites & Vectors*, v. 12, n. 576, 2019. DOI: [10.1186/S13071-019-3828-6](https://doi.org/10.1186/S13071-019-3828-6).

CASTRO, Patricia D. J.; HOWE, Lisa; CRANSTON, Emily; COLE, Sarah; COLE, Rebecca; HEATH, David D.; BOAG, Bronwen; SUTHERST, Robert W.; SLOCOMBE, John O. D. e JENKINS, Emily J. **Multiple drug resistance in *Ancylostoma caninum*: an emerging threat to pet and public health**. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021. DOI: [10.1186/s13071-019-3828-6](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3828-6)

CASTRO, P. D.; DURRENCE, K.; DURRENCE, S.; GIANECHINI, L. S.; COLLINS, J.; DUNN, K. e KAPLAN, R. M. **Resistência múltipla a medicamentos anti-helmínticos em ancilostomídeos (*Ancylostoma caninum*) em um canil de criação e treinamento de Labradores na Geórgia, EUA**. *American Veterinary Medical Association*, v. 261, n. 3, p. 342-347, 15 dez. 2022. DOI: [10.2460/javma.22.08.0377](https://doi.org/10.2460/javma.22.08.0377).

COLES, G. C. et al. **The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance**. *Veterinary Parasitology*, v. 136, n. 3-4, p. 167-185, 2006.

Conselho tropical para parasitos de animais de companhia. **Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e controle de endoparasitos caninos nos trópicos**. 2. ed. 17 mar. 2019.

CHIU, Olivia; GOMEZ, Diego E.; OBREGO, Dasiel; DUNFIELD, Kari; MACNICOL, Jennifer L.; LIVERSIDGE, Brooklynn; VERBRUGGHE, Adronie. Impact of fecal sample preservation and handling techniques on the canine fecal microbiota profile. **PLOS ONE**, v. 17, n. 12, p. e0278821, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278821>.

DAVIDSOHN, Alexia Franscoviaki; VIOLATO, Thaís Caroline; SÉRVIO, Cristiane Maia da Silva. **Avaliação coproparasitológica em cães domésticos domiciliados em Cacoal - RO, bioma amazônico**. Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação, v. 9, n. 5, p. 1103–1114, 31 maio 2023. doi.org/10.51891/rease.v9i5.9698.

DE ALENCAR, F. A.; DE QUEIROZ, L. N.; UCHÔA, S. K. S. e DE MOURA, L. **Enteroparasitas zoonóticos do gênero *Ancylostoma* spp. e *Toxocara* sp. em fezes de cães coletadas em locais públicos do 1º distrito da cidade de Rio Branco-AC**. Scientia Naturalis, Rio Branco, v. 2, n. 1, p. 241-253, 2020.

DE MACEDO, H. W. **Exame parasitológico de fezes (EPF)**. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2010.

DE MELO, P. H.; BRUNEL, H. S. S.; MALARD, P. F. e SOUZA, C. R. P de. **Revisão bibliográfica – Ancilostomíase**. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v. 7, n. 9, p. 90835-90852, 2021.

DE OLIVEIRA, B. S.; DA SILVA, J. V. e DE OLIVEIRA, H. B. **Nematódeos de interesse médico veterinário em represa urbana no município de Catalão, no sudeste do estado de Goiás, Brasil**. Journal of Health & Biological Sciences, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2022. DOI: 10.12662/2317-3206jhbs.v10i1.4610.p1-6.2022.

EMEA – European Medicines Agency. (2004). **Veterinary Use of Anthelmintics in Pregnant Animals: Risk Assessments**.

EPE, Christian. **Intestinal nematodes: biology and control**. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, [S.l.], v. 39, n. 6, p. 1091-1107, 2009. DOI: 10.1016/j.cvsm.2009.07.002.

ESCCAP – European Scientific Council Companion Animal Parasites. **Worm control in dogs and cats**. 2021.

ESSER, Robert P. Effect of Sodium Hypochlorite Concentrations on Selected Genera of Nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 39, n. 1, p. 108–114, 1972. Disponível em: <https://bionames.org/bionames-archive/issn/0018-0130/39/108.pdf>.

EUROPEAN COMMISSION. Community register of medicinal products for veterinary use: Annex I. 2012. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2012/20120618122490/anx_122490_pt.pdf

FERNANDES, Fagner D'Ambroso. Ancilostomídeos do trato gastrointestinal de cães: ocorrência, fatores de risco e multirresistência aos antiparasitários. 2022. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – **Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, RS, 2022

FONTANARROSA, M.F.; VEZZANI, D.; BASABE, J., EIRAS, D. F. An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. **Vet Parasitol**. 2006 Mar 31;136(3-

4):283-95. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.11.012. Epub 2005 Dec 20. PMID: 16364551.

FOREYT, W. J. **Veterinary parasitology reference manual**. 5. ed. ISBN 0-8138-2419-2.

FURTADO, L. F. V.; BELLO, A. C. P. de P. e RABELO, É. M. L. **Benzimidazole resistance in helminths: from problem to diagnosis**. *Acta Tropica*, v. 162, p. 95-102, 2016. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.06.021.

FURTADO, L. F. V.; BELO, A. C. P. de P. e ANDRADE, H. **First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum***. *Veterinary Parasitology*, v. 206, n. 3-4, p. 313-316, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.10.021.

FURTADO, L. F. V. e RABELO, É. M. L. **Molecular analysis of the F167Y SNP in the β -tubulin gene by screening genotypes of two *Ancylostoma caninum* populations**. *Veterinary Parasitology*, v. 210, n. 3-4, p. 114-117, 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.03.018.

FURTADO, Luis Fernando Viana; MIRANDA, Rodrigo Rodrigues Cambraia de; TENNESSEN, Jacob Adam; BLOUIN, Michael Scott e RABELO, Élide Mara Leite. **Molecular variability of the *Ancylostoma* secreted Protein-2 (Aca-asp-2) gene from *Ancylostoma caninum* contributes to expand information on population genetic studies of hookworms**. *Experimental Parasitology*, v. 253, p. 108590, 2023. DOI: 10.1016/j.exppara.2023.108590.

FURTADO, Luis Fernando Viana; AGUIAR, Pedro Henrique Nascimento de; ZUCCHERATO, Luciana Werneck; TEIXEIRA, Talita Tatiana Guimarães; ALVES, William Pereira; SILVA, Vivian Jordania da; GASSER, Robin B. e RABELO, Élide Mara Leite. **Resistência ao albendazol induzida em *Ancylostoma ceylanicum* não é devida a polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos códons 167, 198 ou 200 do gene da beta-tubulina, indicando outro mecanismo de resistência**. *Parasitology Research*, v. 118, n. 3, p. 837-849, 2019. DOI: 10.1007/s00436-019-06218-9.

HANCHEN, L.; GAZZOLA, D.; HU, Y. e AROIAN, R. V. **An efficient method for viable cryopreservation and recovery of hookworms and other gastrointestinal nematodes in the laboratory**. *International Journal of Parasitology*, v. 53, n. 8, p. 451-458, Jul. 2023. DOI: 10.1016/j.ijpara.2023.05.001.

HENDRIX, Charles M. e ROBINSON, Ed. **Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians**. 5. ed. St. Louis: Elsevier, 2016.

IDIKA, I. K.; EZEUDU, T. A.; EZE, U. U.; ANEKE, C. I.; NWOSU, C. O.; ONAH, D. N.; CHIEJINA, S. N. **In vivo and in vitro efficacy of albendazole against canine ancylostomosis: a possible presence of anthelmintic resistance in Nigerian local breed of dogs**. *Research Journal of Parasitology*, v. 11, n. 1-2, p. 20-26, 2016.

JIMENEZ CASTRO, Pablo David; VENKATESAN, Abhinaya; REDMAN, Elizabeth; CHEN, Rebecca; MALATESTA, Abigail; HUFF, Hannah; ZULUAGA SALAZAR, Daniel A.;

AVRAMENKO, Russell; GILLEARD, John S.; KAPLAN, Ray M. **Multiple drug resistance in hookworms infecting greyhound dogs in the USA**. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, [S.l.], v. 17, p. 107–117, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.08.005>.

KAPLAN, Ray M.; DENWOOD, Matthew J.; NIELSEN, Martin K.; THAMSBORG, Stig M.; TORGERSON, Paul R.; GILLEARD, John S.; DOBSON, Robert J.; VERCRUYSSSE, Jozef; LEVECKE, Bruno. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. **Veterinary Parasitology**, v. 318, p. 109936, 2023. DOI: 10.1016/j.vetpar.2023.109936.

KITCHEN, Sarah; MASSA, Heather; SLOCOMBE, John O. D.; COADY, Allison M.; SCHWANTJE, Helene M.; JARDINE, Claire M.; GOTTSTEIN, Bernhard e JENKINS, Emily J. **Detection of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 polymorphisms in *Ancylostoma caninum* from domestic dogs in Canada**. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2019.

KOPP, Steven R.; KOTZE, Andrew C.; McCARTHY, James S.; SOTIRIOU, Theophilos; HOLT, Deborah C.; LYMBERY, Alan J. e THOMPSON, R. C. Andrew. **Detection of pyrantel-resistant *Ancylostoma caninum* in Australian dogs**. International Journal for Parasitology, v. 38, n. 7, p. 783-790, 2008.

LABRUNA, Marcelo Bahia; PENA, Hilda Fátima Juchem; SOUZA, Silvia Lúcia Pavaneli de; PINTER, Anaiá; SILVA, José Carlos da; RAGOZO, Ana Maria Aparecida e GENNARI, Solange Maria. **Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 73, n. 2, p. 183-192, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v73p1832006>.

LEUTENEGGER, C. M.; LOZOYA, C. E.; SAVARD, C.; OGEER, J. e LALLIER, R. **Emergence of *Ancylostoma caninum* parasites with the benzimidazole resistance F167Y polymorphism in the US dog population**. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 21, p. 131-140, Apr. 2023. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2023.01.001.

MACHADO, A.; FERRAZ, L. e SILVA, S. **Métodos em Nem. Agrícola.**, 2019.

MARSH, A. E. e LAKRITZ, J. **Reflecting on the past and fast forwarding to present day anthelmintic resistant *Ancylostoma caninum* – A critical issue we neglected to forecast**. International Journal Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 22, p. 36-43, Aug. 2023. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2023.04.003.

MEDEIROS, C. D. S.; FURTADO, L. F. V.; MIRANDA, G. S. e RABELO, É. M. L. **Moving beyond the state of the art of understanding resistance mechanisms in hookworms: confirming old and suggesting new associated SNPs**. Acta Tropica, v. 233, p. 106533, 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2022.106533.

MERCK SHARP; DOHME CORP. Hookworms in small animals. In: **The Merck Veterinary**

Manual. Rahway, NJ: Merck & Co., Inc., 2024. Disponível em: https://www.merckvetmanual.com/digestive-system/gastrointestinal-parasites-of-small-animals/hookworms-in-small-animals#Treatment-and-Control_v3267693.

NEZAMI, Roxana; OTIS, Colombe; BOYER, Alexandre; BLANCHARD, Julie; MOREAU, Maxim; PELLETIER, Jean-Pierre; MARTEL-PELLETIER, Johanne; GODOY, Pablo e TRONCY, Eric. **Surveillance of *Ancylostoma caninum* in naturally infected dogs in Quebec, Canada, and assessment of benzimidazole anthelmintics reveal a variable efficacy with the presence of a resistant isolate in imported dogs.** *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 52, p. 101036, jul. 2024. DOI: 10.1016/j.vprsr.2024.101036.

NEZAMI, R.; BLANCHARD, J. e GODOY, P. **The canine hookworm *Ancylostoma caninum*: A novel threat for anthelmintic resistance in Canada.** *Canadian Veterinary Journal*, v. 64, n. 4, p. 372-378, Apr. 2023.

NUGUI, Romano; LIM, Yvonne A. L.; TRAUB, Rebecca; MAHMUD, Rohela; MISTAM, Mohd Sani. Epidemiological and genetic data supporting the transmission of *Ancylostoma ceylanicum* among human and domestic animals. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1522, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001522>.

OLIVEIRA, Paulo Roberto de; SILVA, Paulo Lourenço da; PARREIRA, Vander Ferreira; RIBEIRO, Sueli Cristina de Almeida e GOMES, João Batista. **Prevalência de endoparasitos em cães da região de Uberlândia, Minas Gerais.** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 27, n. 2, p. 193-197, 1990.

PRADO, Maria Clara. **Estudo sobre mecanismos de ação dos benzimidazóis em helmintos. 2022.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

PRICHARD, R. K. *et al.* **Anthelmintic resistance: molecular and mechanistic perspectives.** *Veterinary Parasitology*, v. 254, p. 26-35, 2018.

RABELO, Élide Mara Leite; MIRANDA, Rodrigo Rodrigues Cambraia de; FURTADO, Luis Fernando Viana; REDONDO, Rodrigo Aparecido Fernandes; TENNESSEN, Jacob Adam e BLOUIN, Michael Scott. **Development of new microsatellites for the hookworm *Ancylostoma caninum* and analysis of genetic diversity in Brazilian populations.** *Infection, Genetics and Evolution*, v. 50, p. 24-27, 2017. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.03.008.

REY, L. **Um século de experiência no controle de ancilostomíase.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 1, p. 61-67, jan.-fev. 2001.

RISSO, D. F. A.; FRANCO, R. P.; MANHOSO, F; F; R.; GALVANI, G. D.; CRUZ, A. S.; SILVA, Y. T. Eficácia da associação do praziquantel, pamoato de pirantel, febantel e ivermectina no controle de *Toxocara canis* e *Ancylostoma caninum* em animais albergados em canil da Universidade de Marília/SP. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 2, (2016). ISSN 2179-6645.

THIENPONT, D.; ROCHETTE, F.; VANPARIJS, O. F. J. Diagnóstico de helmintoses por meio de exames coprológicos. **Beerse: Janssen Research Foundation**, 1979.

TRAVERSA, Donato. **Pet roundworms and hookworms: A continuing need for global worm control**. *Parasites & Vectors*, v. 5, n. 1, p. 91, 2012. DOI: 10.1186/1756-3305-5-91.

UGALDE, Jéssica Martins de; SAKAMOTO, Carlos Augusto Monteiro; CUNHA, Nathália Cristina; BARROS, Luciano Alves. Diagnóstico parasitológico de amostras fecais de cães domésticos provenientes do município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 75, n. 1, p. 35–40, jan./fev. 2023. DOI: 10.1590/1678-4162-12732.

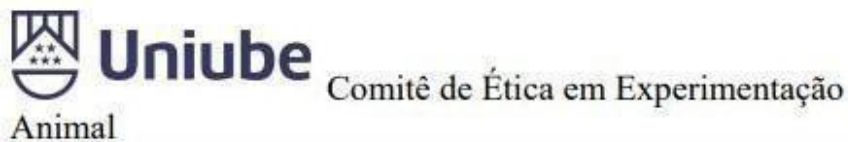
Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária. Caderno técnico 72: epidemiologia e conservação de animais silvestres. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2019. 54 p. Disponível em: <https://www.vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/editora/caderno%20tecnico%2072%20epidemiologia%20e%20conservacao%20animais%20silvestres.pdf>.

VENKATESAN, A. *et al.* **Molecular evidence of widespread benzimidazole drug resistance in *Ancylostoma caninum* from domestic dogs throughout the USA**. *PLOS Pathogens*, v. 19, n. 3, 2023. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011146.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Monitoring Anthelmintic Efficacy for Soil Transmitted Helminths (STH). Março, 2008.

YOUSSEF, A. G.; NETTO, L. L.; FRIOLANI, M. e TEIXEIRA, D. B. Prevalence of intestinal parasites, of zoonotic importance, in asymptomatic kennel dogs in the region of Marília-SP. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 94718-94727, dez. 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n12-089.

ANEXO I



Ofício CEEA-022/2023

Uberaba, 4 de outubro de 2024

Ilma. Prof^a,

JOELY FERREIRA FIGUEIREDO BITTAR

Assunto: Encaminha processo nº 022/2023, sobre o protocolo de pesquisa: "**Avaliação parasitológica e genética do perfil de resistência de *Ancylostoma caninum* à diferentes bases antiparasitárias em cães da raça Border Collie**".

Prezado (a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido a avaliação do CEEA-UNIUBE, em reunião no dia 25/09/2024, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,



Profa. Joely F. Figueiredo Bittar

Coordenadora do CEEA-UNIUBE