Universidade Federal do Piauí

Diversidade genética de *Haemonchus contortus* em populações de pequenos ruminantes do Piauí

Kátia Silene Sousa Carvalho

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Mestre".

Teresina

2013

Kátia Silene Sousa Carvalho

Bióloga

Diversidade genética de *Haemonchus contortus* em populações de pequenos ruminantes do Piauí

Orientador:

Prof. Dr. Fábio Barros Britto

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Mestre".

Teresina

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castelo Branco
Serviço de Processamento Técnico

C331d Carvalho, Kátia Silene Sousa
Diversidade genética de Haemonchus contortus em populações de pequenos ruminantes do Piauí / Kátia Silene Sousa Carvalho.--2013.
47f.: il.
Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.
Orientação: Prof. Dr. Fábio Barros Britto.

l. Pequenos Ruminantes – Diversidade Genética. 2. Nematódeos. 3. Caprinos – Diversidade Genética. 4. Ovinos. I. Título.

CDD: 636.308 2

Diversidade genética de *Haemonchus contortus* em populações de pequenos ruminantes do Piauí

Kátia Silene Sousa Carvalho
Licenciada em Ciências Biológicas

Aprovada em 17/06/2013

Comissão Julgadora:

Prof.Dr. Elmary da Costa Fraga – UEMA

Dra. Izabella Cabral Hassum– Embrapa Meio Norte

Prof. Dr. Fábio Barros Britto UFPI/CCN
(Orientador)

Dedico à minha mãe, Maria de Fátima Sousa Carvalho,

meu pai, Urubatan Pinheiro de Carvalho,

meu irmão, Fco Wellington Sousa Carvalho e

meu sobrinho Luis Miguel Rocha de Carvalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida de bênçãos que me oferece;

À Universidade Federal do Piauí, na pessoa dos seus professores e administradores pela formação pessoal e profissional que me transmitiram;

Ao Centro de Pesquisas Agropecuárias do Meio Norte (Embrapa Meio-Norte) pelo apoio e colaboração;

Ao Programa de Mestrado em Genética e Melhoramento, nas pessoas de suas coordenadoras Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes, Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes e de seus colaboradores Dra. Ana Paula Perón, Dr. Antonio Aécio de Carvalho Bezerra, Dr. Fábio Mendonça Diniz, Dra. Gleice Ribeiro Orasmo, Dr. José Elivalto Guimarães Campêlo, Dr. Kaesel Jackson Damasceno, Dr. Maurisrael de Moura Rocha, Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima, Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente, pelo exemplo e ensinamentos;

Ao meu orientador Dr. Fábio Barros Britto, pela paciência, calma, atenção e confiança transmitidos e por ser o melhor dos orientadores;

À Secretária de Educação do Piauí (SEDUC-PI) que me concedeu liberação para realizar o curso de mestrado, acreditando na qualificação profissional como ferramenta para melhoria na qualidade de ensino na educação básica;

À Carlos Silva, Cíntia Clementino, Daniel Biagiotti, Hereyn Gois, Iolly Marques, Jardel do Vale, Márcio Costa, Polyana Oliveira e Rafael Lino pela disposição em ajudar,

À Antonio Machado, Arturene Rocha, Jean Carvalho, Maíra Krystal, Maria de Lourdes Sousa, Raimundo Nonato Sousa e Welber Mororó pela valorosa ajuda com as coletas, sem as quais este trabalho não poderia ter sido realizado;

Aos amigos de mestrado Camila Campêlo, Mariane Moraes, Rosana Moura (companheiras em Piracicaba), Jaqueline Luz, João Paulo Viana (para todas as horas), Kaline Gonzalez (companheira em Bom Jesus), Éllida Silvestre, Erina Rodrigues e Hendrie Nunes pelos bons momentos de convivência;

Aos amigos da vida Aline Lemos, Gesi Ribeiro, Kelly Cunha, Sharlla Lopes, José Ribamar Júnior, Leillany Cavalcante, Lilliene Melo e Mara Wanessa pela amizade e momentos de descontração,

Ao amigo José Ribamar Filho por todo apoio e encorajamento, desde a graduação;

Aos familiares, pelo apoio, compreensão, força e crédito;

E a todos a quem não pude citar, mas que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho, o meu muito obrigada!

“Tenha fé em Deus, tenha fé na vida, tente outra vez.”

Raul Seixas

SUMÁRIO

RESUMO----------VIII

ABSTRACT----------IX

LISTA DE FIGURAS----------X

LISTA DE TABELAS----------XI

1 INTRODUÇÃO----------12

2 REVISÃO DE LITERATURA----------15

2.1 Pequenos ruminantes e problemas com verminoses----------15

2.2 Métodos de Controle e Tratamento----------17

2.3 *Haemonchus contortus*----------19

2.4 Marcadores moleculares em estudos de variabilidade----------22

3 MATERIAL E MÉTODOS----------25

3.1 Amostragem----------25

3.2 Extração de DNA----------26

3.3 Marcadores microssatélites----------26

3.4 Genotipagem----------27

3.5 Análise estatística----------28

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO----------29

5 CONCLUSÃO----------39

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS----------40

RESUMO

CARVALHO. K. S. S. **Diversidade genética de *Haemonchus contortus* em populações de pequenos ruminantes do Piauí.** 2013. 47p. Dissertação para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Genética e Melhoramento-Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2013.

O nematódeo gastrintestinal *Haemonchus contortus* é o principal parasita de rebanhos de pequenos ruminantes, devido a sua alta incidência e patogenicidade. Sua presença está associada a grandes perdas nos rebanhos e a prejuízos na cadeia produtora. Informações sobre a estrutura populacional destes parasitas poderiam auxiliar diretamente nas estratégias de controle. Assim, este trabalho teve como objetivo analisar a estrutura genética desse parasita em populações do estado do Piauí. Foram coletados 122 espécimes de três municípios: Bom Jesus (região Sul), Barras e José de Feitas (região Norte). Os parasitas foram coletados de dois hospedeiros infectados de cada município. Foram utilizados quatro locos de microssatélites descritos na literatura para o estudo de *H. contortus*. O número médio de alelos encontrado foi de 4,66 por loco, sendo todos os locos polimórficos. Todos os locos apresentaram desvios significativos ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), entretanto este fato pode estar relacionado à presença de alelos nulos. Problemas como este já foram descritos em outros trabalhos da espécie, sendo constatada alta taxa de mutações nas regiões flanqueadoras dos marcadores. No entanto, mesmo nestas condições, os marcadores mostraram-se informativos, de acordo com os valores do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) encontrados, em média 0,656. Análises de agrupamento e estrutura populacional não evidenciaram relação das características genéticas das populações com seus locais de origem. Análises de Variância Molecular (AMOVA) confirmaram estes resultados, onde as diferenças entre as localidades e entre as regiões (Norte e Sul do Piauí) não foram consideradas significativas. Ficou evidenciada, portanto, ausência de estrutura genética na espécie, que pode estar relacionada com o alto fluxo gênico apresentado por *H. contortus*.

Palavras-chave: Nematódeos, caprinos, ovinos, microssatélites, estruturação genética.

ABSTRACT

CARVALHO. K. S. S. **Genetic diversity of *Haemonchus contortus* in small ruminant populations of Piauí.** In 2013. 47p. Dissertation to obtain the title of Master in the concentration area of Genetics and Breeding, Federal University of Piauí, Teresina, Piaui, 2013.

The gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* is the main parasite of small ruminant herds, due to its high incidence and pathogenicity. It is associated with large livestock injuries and losses in production chain. Information about the population structure of these parasites could directly help in control strategies. This study aimed to analyze the genetic structure of this parasite in herds of Piauí State, Brazil. A total 122 nematode specimens were collected in three municipalities in Piauí: Bom Jesus (South region), Barras and José de Freitas (North region). The parasites were collected from two infected hosts in each municipality. Four different microsatellite locos were used, being all described in the literature for *H. contortus*. The average number of alleles per locus was 4,66, being all loci polymorphic. These locos also showed significant deviations from the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE), however this fact can be related to the presence of null alleles. Problems like this have already been described in other studies of the species and probably are associated with the high mutation rates in the flanking regions of the markers. However, even under these conditions they have shown to be informative in accordance with the values found in the Polymorphism Information Content (PIC), on average 0,656. Cluster analysis and population structure analysis found no relationship of genetic characteristics of populations to their places of origin. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) confirmed these results, where differences between locations and between regions (North and South of Piauí) were not significant. Therefore, no genetic structure was observed in this species, according to the makers used, which may be a consequence of the high gene flow presented by *H. contortus.*

Keywords: Nematodes, goats, sheeps, microsatellites, genetic structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplares de *H. contortus* em abomaso de ruminante.----------20

Figura 2- Mapa do Piauí indicando as localidades de coleta.----------25

Figura 3- Polimorfismos de banda do loco Hcms7, visualizados em gel de poliacrilamida.----------29

Figura 4- Dendrograma construído pelo método UPGMA comparando as populações de parasitas de cada caprino e ovino. ----------35

Figura 5- Dendrograma construído pelo método UPGMA considerando todos os indivíduos estudados separadamente. As iniciais de cada indivíduo indicam sua procedência (BJ – Bom Jesus; BA – Barras; JF – José de Freitas).----------36

Figura 6- Gráfico mostrando o número três (maior pico) como provável número de populações estudadas, segundo a estatística de Evanno et al. (2005).----------37

Figura 7- Representação gráfica da estruturação genética das populações para K=3. (1 e 2- Bom Jesus, 3 e 4- Barras, 5 e 6- José de Freitas).----------37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número de parasitas por hospedeiro e por localidade coletados no estado do Piauí.----------26

Tabela 2- Sequência direta e reversa, temperatura de anelamento (Ta), concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e referência bibliográfica dos *primers* utilizados.----------27

Tabela 3- Número total de alelos por loco (Na), número efetivo de alelos (Ne), riqueza alélica (Ar), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), índice de endogamia (Fis), frequência de alelos nulos (AN) e conteúdo de informação polimórfica (PIC).----------30

Tabela 4- Valores de probabilidade para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada loco dentro de cada hospedeiro, para cada localidade e com todos os indivíduos amostrados em conjunto. Os asteriscos evidenciam os casos onde os desvios foram significativos ($P < 0,05$). ----------32

Tabela 5- Análise de variância molecular, realizada com seis populações (dois ovinos e quatro caprinos) divididas em três grupos conforme local de coleta (Bom Jesus, Barras e José de Freitas).----------33

Tabela 6- Matriz das distâncias genéticas entre as populações segundo os parâmetros de Tomiuk e Loeschcke (D_{TL}).----------35

1 INTRODUÇÃO

Há décadas a ovinocaprinocultura vem sendo considerada uma atividade de subsistência e normalmente com baixa produtividade. No entanto, tem se destacado como atividade de importância cultural, social e econômica para a região Nordeste (COSTA et al., 2008). As espécies ovina e caprina são bem adaptáveis, multifuncionais, sem restrições religiosas para o seu consumo e amplamente distribuídas pelo mundo. Representam uma importante fonte de economia para os agricultores (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2007), principalmente nos países próximos aos trópicos onde são utilizadas para obtenção de carne, leite, pele e esterco (DAL MONTE et al., 2010; VIEIRA, 2003).

No Brasil, os efetivos caprinos e ovinos são de aproximadamente nove e 17 milhões de cabeças, respectivamente. Estes números representam um aumento de 1,6% e 3,4% nos respectivos rebanhos, entre os anos de 2009 e 2010. A região Nordeste é a maior mantenedora de rebanhos com 90% e 56% do total de caprinos e ovinos do país. Os estados com maior rebanho de caprinos e ovinos são Bahia e Rio Grande de Sul. O Piauí está na terceira posição para o rebanho caprino e quinta para o ovino (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

A demanda pelo consumo dos derivados da criação de ovinos e caprinos vem crescendo nos últimos anos, sendo acompanhada pelo aumento na criação desses animais, assim como pelo aperfeiçoamento dos sistemas de produção (BUENO et al., 2002; DAL MONTE et al., 2010, TARIQ et al., 2008). Este aumento pode ser explicado também pelas vantagens que esta prática apresenta quando comparada a outras culturas como, por exemplo, a necessidade de menor área para criação, menor consumo de alimento quando comparados aos bovinos, facilidade de manejo, além de diversidade na produção (NEVES et al., 2008).

No Piauí, a criação de caprinos e ovinos é uma atividade econômica importante, no entanto, ainda predomina na região a criação extensiva e baseada em métodos empíricos, ocorrendo limitação nutricional e sanitária. Neste contexto, a verminose apresenta-se como uma das principais causas de mortalidade em animais jovens e da baixa produtividade em animais adultos (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICROS E PEQUENAS EMPRESAS, 2003). Os

animais que prevalecem na região são caracterizados por apresentarem adaptação às condições edafoclimáticas do semi-árido e, quase sempre, estão ligados à agricultura familiar (NOGUEIRA FILHO, 2003). Este tipo de prática compreende 49,7% dos estabelecimentos agrícolas do Nordeste (EVANGELISTA, 2000), nos quais os animais consomem a pastagem nativa, sem suplementação e com acesso limitado à água. Assim, a ovinocaprinocultura apresenta limitações para se tornar mais competitiva, principalmente devido ao alto nível de infecções por helmintos, que têm causado baixo desempenho produtivo mesmo nos rebanhos com uso de práticas e tecnologias adequadas (MOLENTO et al., 2004).

Os parasitas gastrintestinais podem ser encontrados no abomaso (*Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. e *Trichostrongylus axei*), intestino delgado *(Trichostrongylus colubriformes*, *Cooperia* spp., *Bunostomum* spp., *Strongyloides* spp. e *Nematodirus* spp.) e intestino grosso (*Oesophagostomum* spp. e *Trichuris* spp.) dos animais(NEVES et al., 2008).

Em pequenos ruminantes, destaca-se *Haemonchus contortus*, por sua alta patogenicidade e prevalência (GALLIDIS et al., 2012; NEVES et al., 2008; TERRILL et al., 2012). O principal problema no combate às doenças causadas por nematoides gastrintestinais é a resistência que os vermes apresentam à maioria das drogas convencionalmente utilizadas e que apresentam grande espectro de ação (GILLEARD, 2006), por isso a resistência anti-helmíntica deve ser a maior preocupação no manejo sustentável de animais (BEECH et al., 2011). Uma possível falha da ação do anti-helmíntico pode ser devida a fatores que incluem as condições de saúde dos animais, ao modo de administração do medicamento (VIEIRA, 2003) e também a potencial diversidade genética presente na espécie que contribui para o surgimento de linhagens resistentes (URQUHART et al., 1996).

Entender as bases genéticas da resistência permitiria compreender a origem dos alelos da resistência, como eles são selecionados e dispersados nas populações de parasitas, além de determinar as diferenças entre os mecanismos da resistência no que diz respeito a sua ação entre espécies diferentes de parasitas e entre isolados da mesma espécie (GILLEARD, 2006). Este conhecimento pode ser gerado através do uso de técnicas moleculares, que além de responderem as

questões acima também permitem fazer inferências sobre genes que sejam responsáveis pela resistência anti-helmíntica (GILLEARD e BEECH, 2007).

Atualmente sugere-se a criação de uma coletânea com informações geradas pelo sequenciamento do genoma, a identificação e caracterização de um grande número de marcadores genéticos e a caracterização da variação em campo e laboratório das diferentes linhagens de parasitas, que contribuirá para incrementar o estudo da resistência anti-helmíntica (BEECH et al., 2011). A investigação sobre a estruturação genética das populações de vermes vem sendo rotineiramente realizada com base em marcadores moleculares, dentre eles, os microssatélites, que auxiliam também na tipagem de linhagens e variações genéticas (BEECH et al., 2011). Os marcadores microssatélites consistem em um trecho de DNA com alguns nucleotídeos repetidos em sequência de 2 a 6 pares de bases repetidas em *tandem* (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2007).

Assim, os objetivos deste trabalho foram analisar a estrutura genética de populações de *H. contortus* localizadas no estado do Piauí, avaliar sua diversidade intra e inter-populacional e gerar informações que poderão, posteriormente, ser utilizadas em programas de controle desses parasitas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pequenos ruminantes e problemas com verminoses

As endoparasitoses constituem uma das principais causas de perda econômica na ovinocultura e caprinocultura, pois leva ao retardo no crescimento, perda de peso, diminuição da ingestão de alimento, redução na produção de leite, baixa fertilidade e altas taxas de mortalidade nos animais. Assim, os prejuízos devido ao retardo na produção e ao custo dos tratamentos profiláticos e curativos são consideráveis. Estas características de perda podem variar conforme as espécies de parasitas presentes, o nível da infecção ou ainda às condições fisiológicas e nutricionais dos animais (MOLENTO et al., 2004; MOTA et al., 2003; VIEIRA, 2003).

A parasitose mais prevalente em ovinos e caprinos, diferentemente dos bovinos, é a parasitose gastrintestinal (COSTA et al., 2009). Nesta, destacam-se os seguintes gêneros de parasitas: *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Strogyloides* spp., *Moniezia* spp., *Cooperia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Skrjabinema* spp., *Trichuris* spp. e *Cysticercus* (SILVA et al., 2008), mas nos pequenos ruminantes o nematódeo *H. contortus* aparece como principal responsável por uma elevada intensidade de infecção. Consequentemente, este tem sido considerado o maior causador das perdas produtivas e do aumento nos custos de criação (COSTA et al., 2009). A elevada prolificidade, adaptabilidade e resistência a variadas condições climáticas favorecem a ampla distribuição e alta prevalência dos parasitas nas mais variadas regiões (COSTA et al., 2009).

Em geral, as espécies de parasitas que infectam ovinos e caprinos são as mesmas, entretanto a infecção parasitária diferenciada é decorrente das diferenças imunológicas, fisiológicas e comportamentais (COSTA et al., 2011). Dentre os pequenos ruminantes os caprinos são mais susceptíveis às parasitoses gastrintestinais do que os ovinos, o que pode ser explicado tanto pelo hábito alimentar dos mesmos, como também pelo uso incorreto dos anti-helmínticos já que estes metabolizam mais rapidamente os compostos químicos. Portanto, os caprinos, deveriam receber doses mais elevadas do que os ovinos (COSTA et al., 2009; COSTA JUNIOR et al., 2005).

A epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais é influenciada tanto por fatores do ambiente como do hospedeiro (VIEIRA, 2003). A contaminação dos animais é mais frequente nos períodos chuvosos, tornando a pluviometria o principal fator climático que regula o ciclo de vida dos nematódeos. Além disso, as altas temperaturas também podem ser críticas para o desenvolvimento das fases de vida livre (CEZAR et al., 2008). Assim, a condição climática quente e úmida é a ideal para a sobrevivência e desenvolvimento dos estádios de vida livre de *H. contortus* (TERRILL et al., 2012).

Os animais adultos funcionam como fonte de infecção para os mais jovens e estes são, geralmente, mais susceptíveis que os adultos, salvo algumas exceções como fêmeas gestantes ou em fase de lactação (COSTA JUNIOR et al., 2005; VIEIRA, 2003). A maior resistência em animais mais velhos se dá pela imunidade adquirida em infecções anteriores (COSTA et al., 2011).

As parasitoses desencadeiam sinais clínicos típicos que comprometem a produtividade, como anemia, aborto, anorexia, pelagem sem brilho, diarreia, até a morte por infecções secundárias que, consequentemente, comprometem a qualidade da carcaça e os lucros dos criadores (TARIQ et al., 2008). O controle das parasitoses é realizado essencialmente com drogas químicas, sendo que o uso indiscriminado dessas drogas levou à seleção de populações de parasitas com resistência aos diferentes grupos químicos utilizados no tratamento anti-helmíntico (ALMEIDA et al., 2007). Neste contexto, a resistência anti-helmíntica é uma persistente e crescente preocupação mundial (BEECH et al., 2011). Ela se caracteriza pelo crescimento do número de vermes resistentes em uma população que foi submetida a um determinado tratamento químico que, antes, mostrava-se eficaz na população inteira. Em outras palavras, existe um aumento dos indivíduos resistentes em detrimento dos susceptíveis, já que os genes transmitidos geneticamente conferem essa resistência. Estes costumam ser raros, porém se submetidos a constante seleção tornam-se numerosos dentro da população (VIEIRA, 2003).

No entanto, deve-se destacar que uma possível falha da ação do anti-helmíntico pode ser devida a outros fatores que não a resistência, como por exemplo, as condições de saúde dos animais e o modo de administração do

medicamento (VIEIRA, 2003), daí a importância dos testes de detecção de resistência anti-helmíntica. Estes testes podem ser realizados *in vitro* (ensaio de eclosão de larvas, teste de paralisia, migração, motilidade e desenvolvimento larval, teste de desenvolvimento em adultos, testes bioquímicos e testes moleculares) ou *in vivo* (teste controlado e teste de redução de Ovos por Grama de Fezes, mais conhecido como OPG). Porém qualquer que seja o método utilizado, sua eficiência dependerá do acompanhamento, adequação e sensibilidade. O desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis que possam ser combinados com estratégias de controle da resistência torna-se cada vez mais necessário (TAYLOR et al., 2002).

2.2 Métodos de Controle e Tratamento

Nematódeos gastrintestinais resistentes a anti-helmínticos constituem grande problema para criação de caprinos em pastagens cultivadas (KAPLAN, 2004). As substâncias mais utilizadas são os benzimidazóis, as lactonas macrocíclicas e os imidazotiazóis (JACKSON e COOP, 2000; WALLER, 1997). No entanto, apesar da ação comprovada de todos os anti-helmínticos, a resistência à maioria das drogas é uma realidade nos dias de hoje, levando a uma brecha nos sistemas de tratamento e se disseminando juntamente com as populações de parasitas (ARCHIE e EZENWA, 2011).

Além disto, a proporção de resíduos químicos em produtos animais é alarmante (TARIQ et al., 2008), por isso é cada vez maior a demanda por produtos orgânicos livres de substâncias químicas. Porém, a intervenção química para controle de parasitas gastrintestinais é quase sempre necessária, principalmente para *H. contortus*. Métodos como boa nutrição, rotação de pasto, rotação de múltiplas espécies animais e o uso de animais resistentes são utilizados para controle das verminoses, porém nem sempre estes podem ser praticados, pois há demanda de suplementos alimentares que podem ser de difícil acesso em muitas áreas. Também pode haver limitações de área de pasto para realização das rotações e, ainda, as espécies consideradas resistentes podem apresentar queda na produção nos períodos de pós-parto, lactação e nos jovens (BURKE et al., 2009).

As alternativas de controle do parasitismo visam não só aumento da produção, mas também, da qualidade dos produtos, além da diminuição dos custos e mortalidade dos animais (NEVES et al., 2008) e tornam-se indispensáveis para o sucesso dos sistemas de produção de pequenos ruminantes (CEZAR et al., 2008). Neste contexto, alguns dos métodos de controle de nematódeos gastrintestinais utilizados são o controle integrado, a fitoterapia, a homeopatia que, apesar de ser utilizada por alguns produtores, ainda não pode ser totalmente recomendada, a menos que sejam apresentados dados concretos da sua eficácia (MOLENTO, 2009), o controle biológico, a seleção dos animais resistentes e o método FAMACHA (VIEIRA, 2003).

O controle integrado consiste na interação de métodos químicos e não químicos para o controle de parasitas, a fim de retardar o aumento das populações parasitárias resistentes às drogas (VIEIRA, 2003). Estão incluídos nesse método o manejo do rebanho e de pastagens, descontaminação prévia das pastagens, pastoreio com alternância de categorias e/ou espécies de hospedeiros (COSTA et al., 2011).

No que diz respeito à fitoterapia inúmeros extratos de plantas são investigados quanto a sua ação nematicida, aproveitando-se da flora mundial, que representa uma vasta fonte na procura por compostos químicos naturais que possam ser utilizados como anti-helmínticos, dada a alta resistência encontrada nos compostos atualmente utilizados (KAMARAJ e RAHUMAN, 2011).

O controle biológico é realizado com a utilização de espécies que sejam prejudiciais direta ou indiretamente aos parasitas. Dentre as espécies mais utilizadas e que demonstraram resultados positivos destacam-se a espécie de fungo *Duddingtonia flagrans* e a espécie de besouro *Digitonthophagus gazella*. Este método de controle ainda enfrenta barreiras no que se refere a custo/benefício, aplicabilidade e segurança na obtenção de resultados (CEZAR et al., 2008).

A seleção de animais resistentes ou seleção genética baseia-se na escolha de raças resistentes (puras ou cruzadas) ou animais mais resistentes dentro de uma raça e que se destaca em termos produtivos ou de mercado, entretanto a seleção para o caráter resistência pode implicar na redução da produção (CEZAR et al., 2008).

Dentre as metodologias utilizadas para o controle de nematódeos, o método FAMACHA é considerado um método seletivo (COSTA et al., 2011). Este indica os animais para vermifugação (BURKE et al., 2009) identificando aqueles infectados por *H. contortus*, baseando-se na intensidade da anemia (verme hematófago) através da cor da conjuntiva ocular dos mesmos em comparação a uma escala que varia do vermelho (sem anemia) até o branco (anemia grave) (TERRILL et al., 2012). Este método vem sendo utilizado com sucesso em vários países e tem ajudado a manter uma população em refúgia (LEASK et al., 2013), prática essa que tem crescente importância no controle da resistência, tendo em vista, que aqueles vermes que não são expostos ao tratamento anti-helmíntico continuam apresentando susceptibilidade (BEECH et al., 2011) e, portanto diminuem a concentração de genes que codificam para resistência, mantendo a eficácia das drogas e retardando o processo de seleção (COSTA et al., 2011).

Como observado, estes métodos de controle apesar de serem promissores ainda enfrentam algumas limitações, porém sua utilização prevê uma redução do uso de anti-helmínticos o que juntamente com o desenvolvimento de novas pesquisas na área trarão efeitos benéficos (CEZAR et al., 2008). Entre as principais metas do Consórcio de Resistência e Suceptibilidade Anti-helmíntica está o desenvolvimento de marcadores genéticos para detecção e monitoramento de resistência anti-helmíntica, assim como, pesquisas que permitam interação entre pesquisadores no mundo (BEECH et al., 2011).

2.3 *Haemonchus contortus*

A Hemoncose, enfermidade provocada pelo nematódeo do gênero *Haemonchus* (BRITO et al., 2009) tem sido a principal responsável por elevadas perdas econômicas por todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (AMARANTE, 2011), tendo, porém, sido relatada em regiões do círculo polar ártico (LINDQVIST et al., 2001; WALLER e CHANDRAWATHANI, 2005). Neste gênero prevalece como espécie mais importante em ovinos e caprinos a *H. contortus* (Figura 1) (ARAÚJO e RODRIGUES, 2002; MELO et al., 2003), considerada de alto sucesso devido ao seu elevado potencial biótico e variabilidade (WALLER e CHANDRAWATHANI, 2005). Levantamentos realizados revelam que

mais de 80% da carga parasitária de caprinos é composta por *H. contortus* (VIEIRA, 2005). Essa espécie é prevalente em termos de intensidade de infecção em pequenos ruminantes, pois os animais acometidos apresentam alta sensibilidade, com alta taxa de infecção e grande excreção de ovos pelos nematódeos fêmeas, em comparação com outras espécies de ruminantes (JACQUIET et al., 1998; YACOB et al., 2009).

Figura 1- Exemplares de *H. contortus* em abomaso de ruminante. (Fonte: John Gilleard in http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/helminths/haemonchus-contortus.html).

A espécie *H. contortus* apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- Filo: Nemathelminthes
- Classe: Chromadorea
- Ordem: Rhabditida
- Subordem: Strongylida
- Superfamília: Trichostrongyloidea
- Família: Haemonchidae
- Gênero: *Haemonchus*
- Espécie: *H. contortus* (Rudolf, 1803)

Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6289

A Superfamília Trichostrongyloidea engloba ainda outras espécies de nematódeos de importância econômica como *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Cooperia puncata* (ISLAM e TAIMUR, 2008; VIEIRA, 2005).

Os adultos de *H. contortus* estão localizados no abomaso e podem ser facilmente identificados (AMARANTE, 2011; JACQUIET et al., 1998; ZAJAC, 2006). Os machos apresentam uma estrutura copulatória composta por bursa e espículos e comprimento corporal que varia de 1,1 a 1,7cm e as fêmeas 1,4 a 2,7cm. Nestas destaca-se uma alta variação dos processos vulvares que podem apresentar as formas lisa, botão ou linguiforme, além de formas intermediárias (LICHTENFELS et al., 1994). Seus úteros são longos, assim como os ovários, e estão dispostos de forma espiralada em torno do intestino retilíneo (ALMEIDA, 1935). Porém variações na morfometria dessas características podem ser respostas adaptativas as influências do meio (JACQUIET et al., 1998) ou do hospedeiro (ARAÚJO e RODRIGUES, 2002).

O ciclo biológico desses indivíduos apresenta uma fase de vida livre (ovos e larvas imaturas) e outra no hospedeiro (larva infectiva, chamada de L3, a indivíduo adulto) (JACQUIET et al., 1998) e o seu desenvolvimento é direto, ou seja, não necessita de hospedeiro intermediário (BRASIL et al., 2012).

Fêmeas adultas que residem no abomaso produzem os ovos que serão liberados juntamente com as fezes. O desenvolvimento larval ocorre na massa fecal, onde existe proteção e boas condições de desenvolvimento para as larvas. As larvas de primeiro estádio (L1) rompem os ovos, se alimentam das bactérias presentes nas fezes e sofrem duas mudas até chegar a larvas de terceiro estádio (L3), a forma infectiva. A L3 possui habilidade migratória e assim se movimenta para fora da massa fecal, indo se abrigar nas folhagens de onde serão ingeridas pelos hospedeiros, ovinos e caprinos. A fase de vida livre de *H. contortus* é fortemente influenciada pelas condições ambientais como temperatura e umidade que, se forem extremas, podem provocar o ressecamento de L1 e L2 ou inviabilizar a migração de L3. No interior do corpo do animal a L3 sofre ainda duas mudas e alcança o estádio adulto (ZAJAC, 2006).

Esta espécie é bastante prolífica, as fêmeas põem milhares de ovos por dia durante todo o ano que se acumulam nos pastos (ALMEIDA, 1935), mas o período

necessário para eclosão desses ovos e desenvolvimento das larvas é dependente das condições meteorológicas, podendo variar de cinco dias a vários meses. As larvas se desenvolvem melhor em condições quentes e úmidas (WHITTIER et al., 2009) com a temperatura ideal variando entre 18 e 26°C e a umidade entre 80 e 100% (ONYIAH e ARSLAN, 2005). A sobrevivência em clima seco das fases larvais pré infectiva ou parasitárias é de poucos dias (JACQUIET et al., 1998). Entretanto, um fator importante para a epidemiologia desses parasitas é a chamada hipobiose. Este fenômeno permite que, após a infecção, as larvas permaneçam por até vários meses dentro dos animais com seu metabolismo estático, ou seja, ocorre uma interrupção no desenvolvimento larval até o reestabelecimento do ambiente ideal para sua sobrevivência (ZAJAC, 2006).

O período pré-patente (espaço de tempo compreendido entre a infecção e a maturidade do verme) é de aproximadamente 17 a 21 dias. O verme adulto permanece por apenas alguns meses no hospedeiro se alimentando de sangue (ZAJAC, 2006).

Hematófago severo, *H. contortus* é reconhecido como causador de anemia aguda, emagrecimento, edema submandibular e em muitos casos é o responsável pela morte dos animais, resultando em perda de produção e ganho de custos (WALLER e CHANDRAWATHANI, 2005; YACOB et al., 2009; ZAJAC, 2006). Embora grandes avanços estejam ocorrendo no que diz respeito aos estudos da genômica dos parasitas nematódeos, a hemoncose é prevalente nos trópicos, onde a tecnologia não é utilizada, seja por desconhecimento ou baixos recursos financeiros (AMARANTE, 2011).

2.4 Marcadores moleculares em estudos de variabilidade

A caracterização genética molecular é resultado da investigação dos polimorfismos existentes nas proteínas e nas sequências de DNA, através da mensuração da variação existente ao nível de população. Por ser mais polimórfico do que as proteínas, os marcadores de DNA são preferencialmente mais utilizados para investigar a diversidade genética dentro e entre populações e o relacionamento entre elas. A diversidade existente entre os indivíduos é resultado das variações no

DNA e dos efeitos ambientais, enquanto a variação genética é própria de cada indivíduo, consequência de mutações na molécula de DNA (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2007).

Simplificadamente, marcadores genéticos são caracteres herdáveis, ou genes, que podem apresentar múltiplos alelos (SUNNUCKS, 2000). Eles podem ser utilizados tanto em pesquisa básica como em pesquisa aplicada (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2007). Dentre os mais conhecidos e utilizados destacam-se: os RAPDs, RFLPs, AFLPs, ISSRs, Minissatélites, SNPs e os microssatélites.

Os marcadores microssatélites (também conhecidos como Sequências Simples Repetidas-SSR ou Sequências Repetidas em Tandem- STR) consistem num trecho curto de DNA que apresenta repetições de conjunto de bases em cadeia. Essas repetições geralmente ocorrem em conjunto de duas a seis bases, por até 60 vezes. São amplamente distribuídos pelo genoma, apresentam herança mendeliana e expressam-se de forma codominante (BARKER, 2002).

Por serem relativamente pequenos os marcadores microssatélites são facilmente amplificados por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), clonados e caracterizados. Apresentam ampla variabilidade devido a variações no número das unidades repetidas e seus alelos podem ser facilmente visualizados em gel de poliacrilamida. Esses marcadores são utilizados principalmente em estudos de diversidade genética, análise de parentesco e de locos de características quantitativas (QTLs) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2007), monitoramento da qualidade e integridade de isolados (BEECH et al., 2011) e construção de mapas genéticos (BARKER, 2002).

Vários marcadores moleculares têm sido desenvolvidos e apresentam inúmeras utilidades com ampla aplicação no estudo e pesquisa com parasitas (BARKER, 2002) como, por exemplo, na precoce identificação das espécies baseada na extração do DNA de ovos ou de indivíduos em terceiro estádio (AMARANTE, 2011). Aloenzimas, mutações no DNA nuclear, mitocondrial espaçador, RFLP, RAPD, variabilidade nos sítios de integração de transposons e microssatélites são exemplos de marcadores utilizados nos estudos da diversidade de várias populações de nematódeos (ROOS et al., 2004). Otsen et al. (2001)

demonstraram que apesar da potencial utilização de marcadores AFLP para estudos dentro e entre populações de *H. contortus* é mais útil empregar marcadores microssatélites devido ao alto grau de variação, pois este marcador facilita a discriminação e agrupamento das amostras.

O estudo da diversidade genética entre populações de *H. contortus*, em diferentes hospedeiros e regiões geográficas, ainda é pouco realizado, porém, em nível mundial a espécie foi considerada altamente estruturada geneticamente (BRASIL et al., 2012; REDMAN et al., 2008).

O conhecimento da estrutura genética das populações é importante para reconhecer o seu papel na comunidade biológica, permitindo um melhor conhecimento sobre o efeito do comportamento do hospedeiro e da complexidade dos ciclos de vida (BARKER, 2002). Esta é uma área que engloba desde a epidemiologia até a biologia molecular dos parasitas, facilitando a percepção de fluxo gênico e dos processos evolucionários (BARKER, 2002). A estruturação genética é influenciada por fatores como barreiras geográficas e ecológicas, tamanho efetivo da população, migração, seleção natural, sucesso reprodutivo além da história de vida da população (GHARAMAH et al., 2012; SUNNUCKS, 2000).

Haemonchus contortus apresenta alta variabilidade genética tanto no DNA mitocondrial como no nuclear, já comprovada através de SNPs, elementos de inserção dos transposons e marcadores microssatélites. Esta se deve ao seu alto potencial biótico, elevado tamanho efetivo populacional, ciclo de vida rápido, além do fluxo gênico que ocorre entre as populações, resultado da troca de animais entre propriedades (BRASIL et al., 2012, REDMAN et al., 2008).

Os microssatélites são comumente distribuídos pelo genoma dos parasitas assim como no de qualquer outra espécie eucariótica e, vários deles tem sido caracterizados em *H. contortus,* sendo úteis na caracterização da estrutura genética de populações que ainda são pouco estudadas (BARKER, 2002). A caracterização genética é importante para determinar a identificação e o efetivo controle do problema da resistência anti-helmíntica em nematódeos favorecendo o diagnóstico de resistência a drogas e acelerando a escolha do método de controle (GHARAMAH et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Espécimes de *H. contortus* foram coletados diretamente do abomaso de caprinos e ovinos abatidos em fazendas dos municípios piauienses José de Freitas, Barras e Bom Jesus, localidades das regiões Norte e Sul do estado (Figura 2). No total foram utilizados 122 nematódeos, coletados de seis hospedeiros (Tabela 1). Cada hospedeiro representado no trabalho foi considerado como uma população de nematódeos.

Os hospedeiros apresentavam taxas variáveis de infecção, o que pode ser devido ao fato de alguns serem naturalmente resistentes, susceptíveis ou resilientes, aliado ainda, ao fato de uma possível vermifugação nos dias próximos da coleta ter sido realizada. Sabe-se que os animais de Bom Jesus haviam sido vermifugados há dois meses e meio com um benzimidazol, e há um mês com uma lactona macrocíclica. Assim o número de vermes utilizado nas análises foi uma forma de equiparar as populações.

Os espécimes de *H. contortus* foram sexados, pois as análises se restringiram aos indivíduos machos, evitando possíveis contaminações com o DNA dos ovos das fêmeas. Os vermes foram armazenados em tubos de polipropileno contendo álcool absoluto e mantidos sob refrigeração a -18°C.

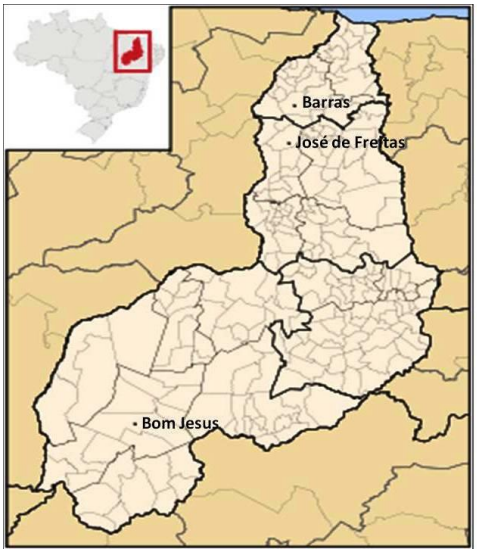

Figura 2- Mapa do Piauí indicando as localidades de coleta. Fonte: Modificado de pt.wikipédia.org/wiki/Piauí.

Tabela 1- Número de parasitas por hospedeiro e por localidade coletados no estado do Piauí.

Município	Hospedeiros (Populações)	Espécie do Hospedeiro	Parasitas (n)
Bom Jesus	BJA18	Ovino	22
	BJA19	Ovino	20
Barras	BA11	Caprino	20
	BA13	Caprino	20
José de Freitas	JFA9	Caprino	30
	JFA10	Caprino	10

Identificação dos animais: BJA18 e BJA19 (hospedeiros de Bom Jesus); BA11 e BA13 (hospedeiros de Barras); JFA9 e JFA10 (hospedeiros de José de Freitas); n: número de parasitas coletados.

3.2 Extração de DNA

Cada indivíduo foi segmentado com auxílio de bisturi e imediatamente exposto ao tampão de lise. Devido ao pequeno tamanho dos vermes não foi necessária etapa de maceração. O DNA foi extraído com o kit QIAamp DNA Mini (Qiagen) segundo protocolo recomendado pelos fabricantes. Para cada amostra foram recuperados 50 µL de DNA, os quais foram quantificados em gel de agarose com auxílio de marcador λDNA, nas concentrações de 25 e 50 ng/µL. Os géis foram banhados em solução de brometo de etídeo (10 mg/mL) por cerca de 30 minutos, sendo posteriormente visualizados e registrados em fotodocumentador (*L-PIX Loccus Biotecnologia*). O DNA obtido foi estocado a -18°C até as análises subsequentes.

3.3 Marcadores microssatélites

No estudo foram utilizados quatro locos de microssatélites previamente isolados e caracterizados para *H. contortus* (Tabela 2). Outros 12 locos foram testados, mas sem êxito nas amplificações.

Tabela 2- Sequência direta e reversa, temperatura de anelamento (Ta), concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e referência bibliográfica dos *primers* utilizados.

Primer	**Sequência direta e reversa (5'→3')**	**Ta (°C)**	**Concentração de $MgCl_2$**	**Referência**
Hcms 7	TTGTTCACCGTTGTCGTCCA GTCAGTACTGGTGCTTGCTT	50	4 mM	HOEKSTRA et al., 1997
Hcms 13	CGGTCGGTTAGTCTCGTC AATTTGAGCTTTCTAGGTCCACGG	53	3 mM	HOEKSTRA et al., 1997
Hcms 30	GGAAATAACGCCATCTCATCCT TTTGCTACCTGTCATAGATCGC	49	3 mM	OTSEN et al., 2000.
Hcms 22co3	GAGCTTCATTGAGAGAATGGAATT AGGTCCTCATATACGATCAACTAA	49	3 mM	REDMAN et al., 2008

As PCRs foram preparadas com ~10ng de DNA, tampão para PCR a 1×, $MgCl_2$ como consta na Tabela 2, dNTP a 0,2 mM cada, *primers* direto e reverso a 0,5 µM cada, 0,5 U de enzima Taq DNA-polimerase (Easygen®) e água q.s.p. 10 µL. O programa da PCR foi realizado em termociclador Amplitherm TX25 nas seguintes condições: 95°C por 8 minutos para desnaturação inicial; 40 ciclos de 94°C por 45 segundos para desnaturação, seguida de anelamento dos *primers* à temperatura indicada na Tabela 2 e 72° por 45 segundos para extensão; na última etapa, o material foi submetido a 72°C por 10 minutos para extensão final.

3.4 Genotipagem

As amostras foram genotipadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% com tampão de corrida Tris-Borato-EDTA (TBE 1,0 ×). O gel foi corado com nitrato de prata. Os procedimentos de coloração incluíram reação de fixação com etanol a 20% e acido acético a 0,5%; coloração com 1,5 mg/ml de nitrato de prata e revelação em 15 mg/mL de hidróxido de sódio. O tamanho dos alelos foi verificado com o auxílio do *ladder* 50 pb (*Fisher Bioreagents*) e amostras controle, de tamanho conhecido que, após a amplificação foram reaplicadas em todas as eletroforeses.

3.5 Análise estatística

Primeiramente foram realizadas análises de diversidade genética como heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) utilizando programa GENALEX 6 (PEAKALL e SMOUSE, 2006). Foram também calculados os índices de endogamia (Fis), bem como o levantamento do número total de alelos por loco (A), o número efetivo de alelos (Ae), a frequência de alelos nulos (AN) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC). Os dados de riqueza alélica foram calculados utilizando o programa FSTAT (GOUDEET, 1995).

A distância genética par-a-par entre as populações foi realizada com o programa MOLKIN 3.0 (GUTIERRES et al., 2005) de acordo com os parâmetros de Tomiuk e Loeschcke (D_{TL}) (TOMIUK et al., 1998). Em seguida, as distâncias obtidas foram utilizadas para a realização de análises de agrupamento, por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*), realizadas no programa MEGA 5.02 (TAMURA et al., 2011).

A estrutura genética das populações foi inferida com o programa STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000). As análises foram realizadas com 200 mil repetições de burn-in e 400 mil iterações. O número de populações simuladas variou de K=2 a K=8, com cinco repetições de cada K. A partir dos valores estimados utilizou-se as estatísticas *ad hoc* desenvolvidas por Evanno et al. (2005) para o cálculo do número mais provável de populações dentro do presente estudo.

A variação genética entre diferentes níveis hierárquicos foi estimada com a Análise de Variância Molecular (AMOVA), calculada a partir do programa ARLEQUIN 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005). As amostras foram agrupadas de acordo com sua origem geográfica, sendo estabelecidos os grupos do Sul e do Norte do Piauí.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quatro locos analisados no presente trabalho foram selecionados por apresentarem amplificação de bandas nítidas para genotipagem e polimorfismo nas amplificações (Figura 3).

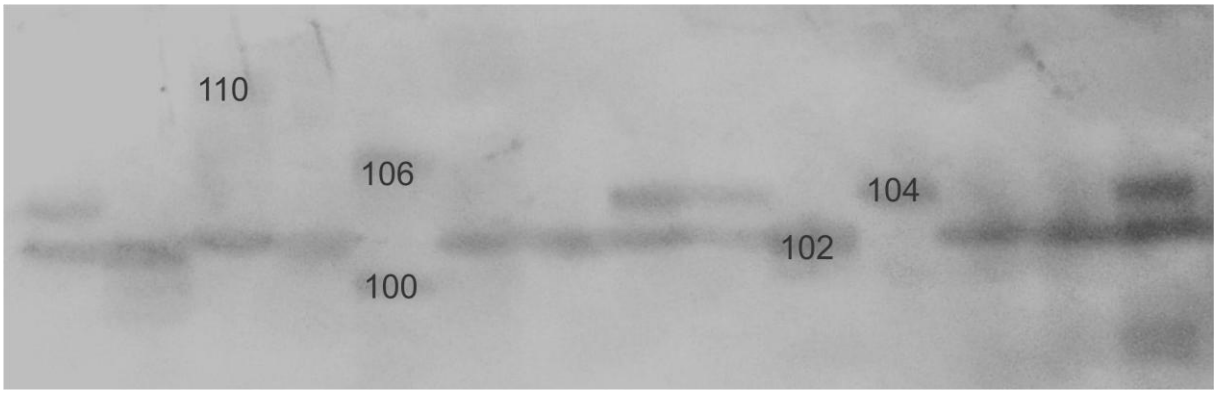

Figura 3- Polimorfismos de banda do loco Hcms7, visualizados em gel de poliacrilamida.(Os números representam alelos do loco.)

O número total de alelos por loco variou de 5 a 11 (média de 7,0 ± 2,45). Valores aproximados foram encontrados em outros estudos com o mesmo tipo de marcador em *H. contortus* (REDMAN et al., 2008; OTSEN et al., 2000; SILVESTRE et al., 2009). Porém o número efetivo médio de alelos no presente estudo foi de 2,72 (Tabela 3), mostrando que a base genética da espécie é representada por um número bem menor de alelos que são mais representativos. Esses números são confirmados pelas medidas de riqueza alélica (Tabela 3). Silvestre et al., (2009) encontrou uma variação de 4,9 a 5,4 para esses valores, analisando oito locos microssatélites em *H. contortus.*

As análises mostraram a presença de um alelo raro na população BA11, presente no loco Hcms22co3 e três alelos raros na população JFA9, presentes nos locos Hcms7 (1) e Hcms22co3 (2). Os alelos raros podem indicar diferenciação genética entre populações (SILVESTRE et al., 2009) e a presença de três alelos privados em espécimes de um único hospedeiro pode ser um indicativo do alto poder adaptativo da espécie.

O índice de polimorfismo para todos os locos foi de 100% e o valor médio do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) (0,656) refletiu o alto nível de polimorfismo dos locos microssatélites. Estes números são superiores aos relatados

por Hoekstra et al., (1997), por isso os locos foram considerados informativos e apropriados para a análise genética das populações.

A heterozigosidade média observada foi menor que a esperada em todos os locos. O índice de endogamia (Fis) foi considerado alto em todos os locos, variando de 0,205 a 0,613 (Tabela 3).

Tabela 3- Número total de alelos por loco (Na), número efetivo de alelos (Ne), riqueza alélica (Ar), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), índice de endogamia (Fis), frequência de alelos nulos (AN) e conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Locos	**Na**	**Ne**	**Ar**	**Ho**	**He**	**Fis**	**AN**	**PIC**
Hcms7	7	2,237	2,357	0,379	0,523	0,275	0,114	0,568
Hcms13	5	3,061	2,606	0,246	0,636	0,613	0,307	0,654
Hcms30	5	2,284	2,572	0,419	0,527	0,205	0,158	0,643
Hcms22co3	11	3,311	2,961	0,321	0,682	0,529	0,391	0,761
Média	7	2,720	2,624	0,341	0,592	0,406	0,242	0,656

Estes valores mais uma vez concordam com os encontrados por Silvestre et al. (2009) e Redman et al. (2008). Porém, a elevada endogamia e a baixa quantidade de indivíduos heterozigotos podem estar relacionadas com a presença de alelos nulos. Os alelos nulos estão correlacionados ao insucesso das amplificações e tem sido relatados em outros estudos com marcadores microssatélites em *H. contortus* (SILVESTRE et al., 2009; HUNT et al., 2008). Esse insucesso é decorrente de mutações nos sítios de ligação dos *primers* (OTSEN et al., 2000; REDMAN et al., 2008). Estas podem ser mutações pontuais ou *indels* (inserções/deleções) de trechos de dois ou mais nucleotídeos ao longo das fitas de DNA.

Como a frequência dessas alterações é alta no genoma de *H. contortus*, as regiões flanqueadoras dos *primers* são, igualmente, alvos em potencial. Há evidências de que os marcadores microssatélites estão associados a sequências de

DNA retrotransponíveis em *H. contortus* (HOEKSTRA et al., 1997). Um desses elementos transponíveis foi identificado e denominado de Hctc1. O loco de microssatélite associado a ele apresentou regiões flanqueadoras altamente variáveis devido ao alto grau de variação genética dos parasitas (HOEKSTRA et al., 1999). Assim, as análises realizadas com estes marcadores podem também subestimar a real variabilidade genética presente na espécie. A taxa de alelos nulos em estudos de microssatélites é altamente considerável para a espécie. Além das não amplificações nas PCRs, o alto índice de alelos nulos também pode gerar alta frequência de falsos homozigotos.

Como consequência, a maioria dos locos também mostrou desvios significativos para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Tabela 4). Observa-se que mesmo dentro do mesmo hospedeiro os casos de desvios são predominantes. O loco com menor número de desvios, no caso, foi Hcms7. Porém, este também foi o loco menos afetado pela presença de alelos nulos (Tabela 3). Isto indica que esses desvios são consequências das baixas heterozigosidades observadas, devido à elevada presença de alelos nulos em geral. Hunt et al., (2008) também observaram locos com desvios para o EHW considerando a presença de alelos nulos como causa para esses desvios e aumento do índice de fixação. Por outro lado, não pode ser descartada a hipótese da provável seleção provocada sobre estes nematódeos devido ao uso indiscriminado de anti-helmínticos a que estão submetidos (PRICHARD, 1994). O uso de anti-helmínticos é a base do controle de parasitas e tem sido realizado de maneira incorreta e indiscriminada, o que acaba por selecionar os indivíduos resistentes presentes na população (SILVA et al., 2008).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) identificou que a maior parte da variação foi encontrada entre indivíduos (50,74%). A variação entre os grupos foi baixa e não se mostrou estatisticamente significativa (FCT = 0,077, P =0,075) e a menor variação encontrada foi entre os hospedeiros de cada grupo (5,8%; FSC = 0,063, P < 0,001), não sendo indicativos de presença de estruturação populacional (Tabela 5).

Tabela 4- Valores de probabilidade para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada loco dentro de cada hospedeiro, para cada localidade e com todos os indivíduos amostrados em conjunto. Os asteriscos evidenciam os casos onde os desvios foram significativos (P < 0,05).

Grupamento das amostras		**Locos**			
		Hcms7	**Hcms13**	**Hcms30**	**Hcms22co3**
Hospedeiro	BJA18	0,028*	0,001*	0,002*	0,003*
	BJA19	0,000*	0,000*	0,001*	0,000*
	BA11	0,569	0,000*	0,055	0,005*
	BA13	0,002*	0,008*	0,000*	0,000*
	JFA9	0,890	0,000*	0,000*	0,000*
	JFA10	0,029*	0,000*	0,637	0,865
Local de coleta	Bom Jesus	0,000*	0,000*	0,003*	0,000*
	Barras	0,067	0,000*	0,004*	0,000*
	J. de Freitas	0,325	0,000*	0,000*	0,000*
Geral		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*

Identificação dos animais: BJA18 e BJA19 (hospedeiros de Bom Jesus); BA11 e BA13 (hospedeiros de Barras); JFA9 e JFA10 (hospedeiros de José de Freitas).

Tabela 5- Análise de variância molecular, realizada com seis populações (dois ovinos e quatro caprinos) divididas em dois grupos conforme regiões dos locais de coleta (Norte e Sul).

Fonte de variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação	Índices de Fixação
Entre Grupos	1	15,314	0,096	7,70	0,077
Entre populações dentro do grupo	4	17,429	0.072	5,80	0,063
Entre indivíduos dentro das populações	116	177,556	0.447	35,76	0,413
Entre indivíduos	122	77,500	0.635	50,74	0,492
Total	243	287,799		100	

Segundo Archie e Ezenwa (2011), parasitas de hospedeiros que vivem em simpatria apresentam alto fluxo gênico, a não ser que forças ecológicas ou comportamentais, como o surgimento de uma barreira geográfica ou diferenças nas épocas de acasalamento possam impedir o contato entre os mesmos. No caso de *H. contortus*, a baixa especificidade e o tipo de mobilidade do hospedeiro estão entre os fatores que diminuem a diferenciação genética entre as populações (ARCHIE e EZENWA, 2011; LOUHI et al., 2010). Parasitas generalistas, ou seja, que infectam espécies diferentes de hospedeiros apresentam alto fluxo gênico e, portanto pouca diferença genética entre os indivíduos que infectam diferentes animais, o que resulta

em pouca ou nenhuma estruturação genética (ARCHIE e EZENWA, 2011).

Evidências de variação morfológica entre parasitas que utilizam diferentes hospedeiros (caprinos ou ovinos) estão descritas para *H. contortus* estudados na França e Iêmem (GRILLO et al., 2007; GHARAMAH et al., 2012). As variações encontradas são indicativos de adaptação aos hospedeiros e à região geográfica (ARAÚJO e RODRIGUES, 2002). Porém, mesmo utilizando diferentes hospedeiros no presente estudo, estas diferenças não foram constatadas em nível molecular. As amostras mais geneticamente semelhantes são oriundas de espécies diferentes de hospedeiros (Tabela 6). No Nordeste do Brasil a prática de criação de caprinos e ovinos utilizando a mesma área é constante, minimizando o isolamento reprodutivo entre parasitas oriundos de diferentes espécies de hospedeiros (LEITE et al., 1995).

Apesar da presença dos alelos nulos, a mobilidade do hospedeiro pode estar diretamente relacionada ao alto fluxo gênico observado nos parasitas. Esta condição afeta principalmente aquelas espécies de parasitas que apresentam estádio de vida livre com mobilidade limitada, como é o caso das larvas de terceiro estádio de *H. contortus.* Estas se espalham pelos pastos graças a alta vagilidade dos pequenos ruminantes (BLOUIN et al., 1995).

As distâncias genéticas calculadas entre os parasitas de cada hospedeiro mostraram a maior distância entre BJA18 e JFA10 (D_{TL} = 0,266, ver Tabela 6 e Figura 4). Entretanto, ao contrário do esperado, os valores mais próximos não foram obtidos entre hospedeiros do mesmo local (BJA18 e BA11, D_{TL} = 0,061). Estes resultados não estão de acordo com a distância geográfica entre essas populações. Mesmo dentro do mesmo rebanho não foram observados os menores índices de distância. As populações de José de Freitas e Barras mostraram a presença de alelos raros o que poderia explicar esse distanciamento genético, já que apenas quatro marcadores estão sendo utilizados na análise. Mas tal situação poderia ser explicada, também, pelo alto fluxo gênico existente entre os parasitas, tendo em vista o comércio que ocorre entre os produtores de ovinos e caprinos no Piauí, a qual afeta diretamente a dinâmica populacional dos parasitas (BARRET et al., 2008).

Tabela 6- Matriz das distâncias genéticas entre as populações segundo os parâmetros de Tomiuk e Loeschcke (D_{TL}).

Hospedeiro	BJA18	BJA19	BA11	BA13	JFA9
BJA19	0,091				
BA11	0,061	0,071			
BA13	0,088	0,107	0,066		
JFA9	0,219	0,148	0,077	0,234	
JFA10	0,266	0,214	0,128	0,105	0,177

Identificação dos animais: BJA18 e BJA19 (hospedeiros de Bom Jesus); BA11 e BA13 (hospedeiros de Barras); JFA9 e JFA10 (hospedeiros de José de Freitas)

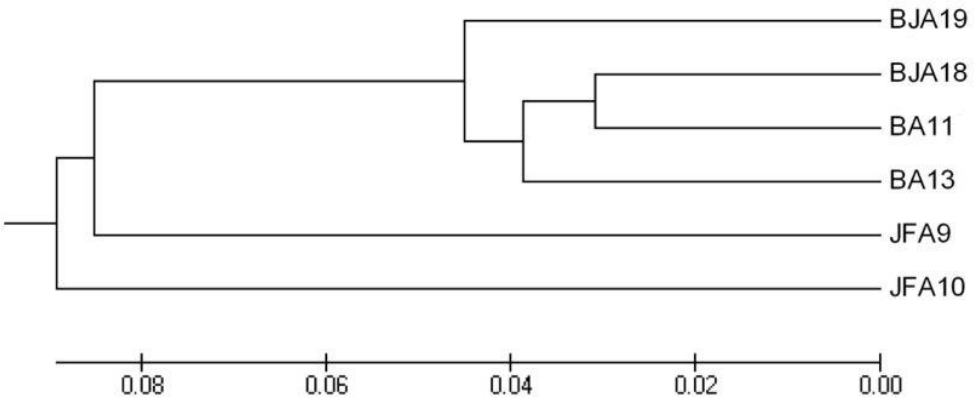

Figura 4- Dendrograma construído pelo método UPGMA comparando as populações de parasitas de cada caprino e ovino.

O dendrograma construído considerando todos os indivíduos separadamente reflete bem o alto fluxo gênico entre as populações, resultando em baixa estruturação populacional (Figura 5). O gráfico mostra que as populações de José de Freitas ficaram mais distantes das demais, mas nele também se pode observar que existem indivíduos dessa população que são mais próximos dos de Bom Jesus e Barras. Assim como, no agrupamento que reúne a maioria das amostras de Bom Jesus e Barras existem indivíduos de José de Freitas. Fica

evidente, portanto, que existe uma miscigenação entre os parasitas desta espécie no estado. Resultados semelhantes foram encontrados por Hunt et al. (2008), que também observaram pouca estruturação genética e alta variação entre os isolares de *H. contortus* em trabalho realizado na Austrália.

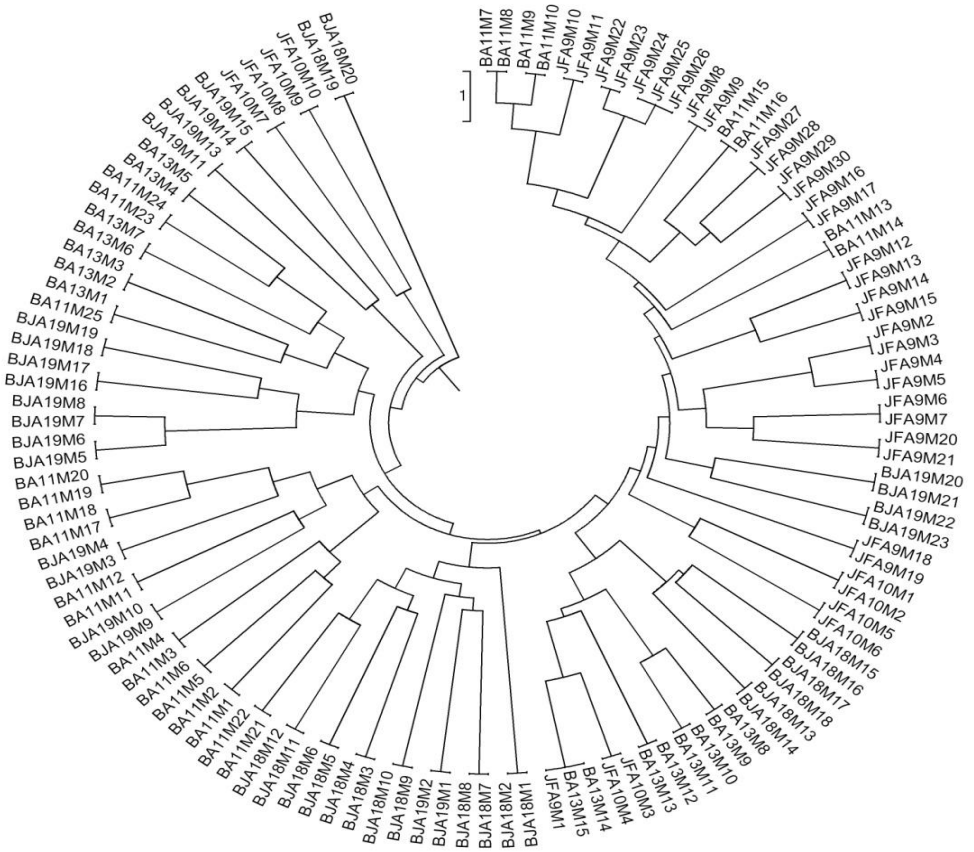

Figura 5- Dendrograma construído pelo método UPGMA considerando todos os indivíduos estudados separadamente. As iniciais de cada indivíduo indicam sua procedência (BJ – Bom Jesus; BA – Barras; JF – José de Freitas).

A ausência de estruturação genética entre as populações de parasitas foi confirmada pelo programa STRUCTURE. As estatísticas de Evanno et al. (2005) mostraram que o número de populações que melhor explica os dados biológicos é K = 3 (Figura 6). Este valor poderia indicar estruturação populacional entre regiões de coleta, já que foram estudados três municípios. Porém, ao analisar o gráfico gerado, observa-se mais uma vez que a estruturação não está relacionada com a localidade, já que o gráfico não apresenta coloração bem definida em nenhuma das regiões (Figura 7). Um perfil de estruturação consistente foi observado apenas para os

parasitas coletados no hospedeiro JFA9 (representado pelo número 5 do gráfico), que apresentou a maioria dos indivíduos com um perfil de coloração único (Figura 7). No geral, poderia ser admitido que as amostras testadas apresentam três perfis genéticos distintos que se misturam dentro de cada localidade. Porém, não se pode ignorar o fato desta análise ter sido realizada com um pequeno número de locos e que, além disto, estes apresentaram elevada frequência de alelos nulos. Hunt et al., (2008) estudaram a estruturação genética em populações de *H. contortus* utilizando o mesmo *software* e observaram o melhor valor para K=4, mas assim como no presente estudo, foi verificada pouca estruturação com muitos genótipos compartilhados entre as populações.

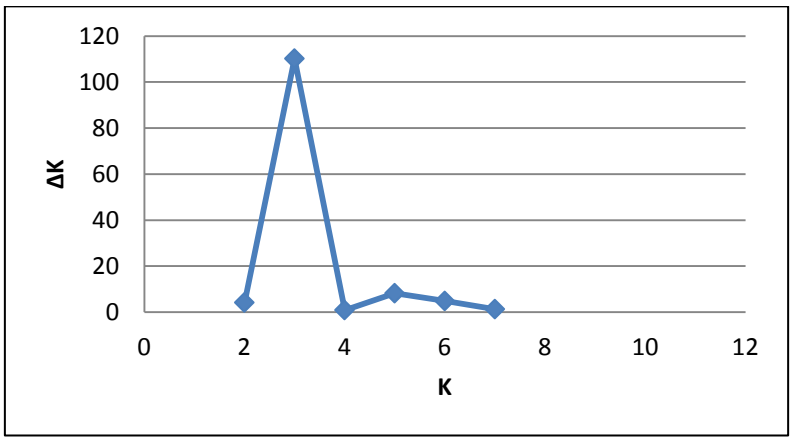

Figura 6- Gráfico mostrando o número três (maior pico) como provável número de populações estudadas, segundo a estatística de Evanno et al. (2005).

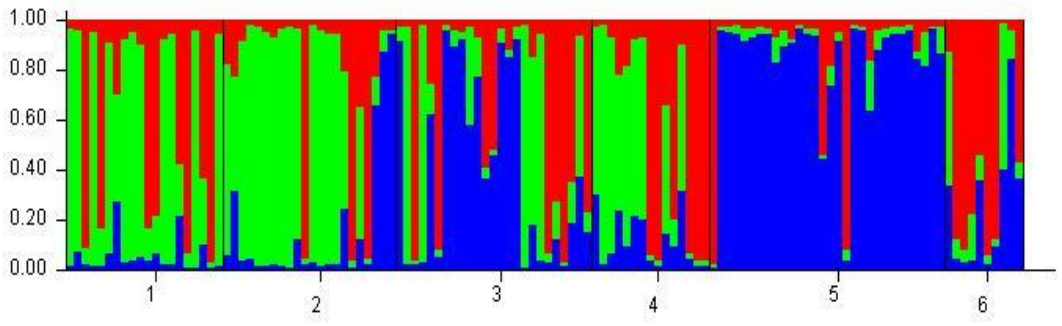

Figura 7- Representação gráfica da estruturação genética das populações para K=3 (1 e 2- Bom Jesus, 3 e 4- Barras, 5 e 6- José de Freitas).

Presume-se, ainda, que o alto grau de diversidade genética observada entre os isolados deve-se não somente ao alto fluxo gênico, mas também ao largo

potencial biótico e alta taxa de mutação da espécie. De acordo com Brasil et al. (2012) este fato acarreta a baixa estruturação genética entre as populações.

De qualquer forma, a migração dos parasitas entre as populações deve ser atenciosamente estudada quando se considera que este movimento pode estar miscigenando populações sensíveis com indivíduos resistentes a anti-helmínticos e promovendo o aumento da variabilidade com cepas de maior efeito patogênico. A mediação humana pode ser considerada uma das principais vias de dispersão do parasita, levando em conta que desde o comércio de animais (caprinos e ovinos) até a migração acidental (transferência de fezes por tráfego veicular, por exemplo) pode dispersar o parasita (HUNT et al., 2008).

Informações sobre a dinâmica populacional desses parasitas são uma valiosa ferramenta, e esta caracterização deve ajudar os programas de melhoramento a elaborar estratégias de ação e traçar metas no combate a verminose e controle da resistência anti-helmíntica no estado.

5 CONCLUSÃO

As populações de *H. contortus* estudadas podem ser consideradas uma única e grande população, devido ao alto fluxo gênico que ocorre entre as mesmas.

Estes dados são importantes para o direcionamento dos programas de controle do parasita, que devem focar na inspeção do fluxo de caprinos e ovinos dentro do estado, tendo em vista que esta é a principal via de migração dos parasitas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. L. Revisão do gênero *Haemonchus* Cobb, 1898: (Nematoda: Trichostrongylidae). **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 30, n. 1, p. 57-114. 1935.

ALMEIDA, W. V. F. et al. Avaliação de plantas medicinais em caprinos da região do semi-árido paraibano naturalmente infectados por nematóides gastrintestinais. **Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 01-07. 2007.

AMARANTE, A. F. T. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 4, p. 263-268. 2011.

ARAUJO, M. M.; RODRIGUES, M. L. A. Estudo morfométrico e variação do apêndice vulvar de *Haemonchus contortus* (Nematoda: trichostrongyloidea) de caprinos e ovinos da região semi-árida da Paraíba – Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 61-64. 2002.

ARCHIE, E. A.; EZENWA, V. O. Population genetic structure and history of a generalist parasite infecting multiple sympatric host species. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 89-98. 2011.

BARKER, G. C. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 96, p.21-24. 2002.

BARRETT, L. G. et al. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host–parasite interactions. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 23, n. 12, p. 678-685. 2008.

BEECH, R. N. et al. Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? **Parasitology**, v. 138, p. 160–174. 2011.

BLOUIN, M.S. et al. Host movement and the Genetic Structure of Populations of Parasitic Nematodes. **Genetics**, v. 141, p. 1007-1014. 1995.

BRASIL, B. S. A. F. et al. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 469–479. 2012.

BRITO, D. R. B. et al. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no estado do Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 967-974. 2009.

BUENO, M. S. et al. Infección por nematodos en razas de ovejas cárnicas criadas intensivamente en la región del sudeste del Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v. 51, p. 271-278. 2002.

BURKE, J. M.; MILLER, J. E.; TERRILL, T. H. Impact of rotational grazing on management of gastrointestinal nematodes in weaned lambs**. Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 67-72. 2009.

CEZAR, A. E.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2083-2091. 2008.

COSTA, R. G. et al. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do estado da Paraíba. Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, n. 218, p. 195-205. 2008.

COSTA JÚNIOR, G. S. Efeito de vermifugação estratégica, com princípio ativo à base de ivermectina na incidência de parasitos gastrintestinais no rebanho caprino da UFPI. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 4, p. 279-286. 2005.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido Brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 563-568. 2009.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 65-71. 2011.

DAL MONTE, H. L. B. et al. Mensuração dos custos e avaliação de rendas em sistemas de produção de leite caprino nos Cariris Paraibanos. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v. 39, n. 11, p. 2535- 2544. 2010.

EVANGELISTA, F. R. **A Agricultura familiar no Brasil e no Nordeste**. Fortaleza: BNB, 2000. 11p.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-20, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47–50. 2005.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** 1ed. Brasília: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture**, Rome: FAO, 2007. 511p.

GALLIDIS, E.; ANGELOPOULOU, K; PAPADOPOULOS, E. First identification of benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* in sheep in Greece. **Small Ruminant Research**,v. 106, p. 27-29. 2012.

GHARAMAH, A. A.; SITI AZIZAH, M. N.; RAHMAN, W. A. Genetic variation of *Haemonchus contortus* (Trichostrongylidae) in sheep and goats from Malaysia and Yemen. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 268-276. 2012.

GILLEARD, J. S. Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1227-1239. 2006.

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

GOUDEET, J. FSTAT: a computer program to calculate F-statistics. **Jounal of Heredity**, v. 86, p. 485–486. 1995.

GRILLO, V. et al. Population genetic analysis of the ovine parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta* and evidence for a cryptic species. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 435-447. 2007.

GUTIERRES, J.P. et al. MolKin: A Computer Program for Genetic Analysis of Population Using Molecular Coancestry Information. **Journal of Heredity**, v. 96, n. 6, p. 718-772, 2005.

HOEKSTRA, R. et al. Microsatellites of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*: polymorphism and linkage with a direct repeat. **Molecular and Biochemical Parasitology** v. 89, n.1, p. 97–107, 1997.

HOEKSTRA, R. et al. Characterization of a polymorphic Tc1-like transposable element of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102, p. 157-166. 1999.

HUNT, P. W. et al. Genetic and phenotypic differences between isolates of *Haemonchus contortus* in Australia. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 885–900. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal.** Rio de Janeiro: IBGE, 2010. 65p.

ISLAM, K. B. M. S.; TAIMUR, M. J. F. A. Helminthic and protozoan internal parasitic infections in free ranging small ruminants of Bangladesh. **Slovenian Veterinary Research**, v. 45, n. 2, p. 67-72. 2008.

JACKSON, F.; COOP, R. L. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Parasitology**, v. 120, p. 95-107, 2000.

JACQUIET, P. et al. Host range and the maintenance of *Haemonchus* spp. in an adverse arid climate. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 253-26. 1998.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. A. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 400-404. 2011.

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

TAMURA K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739. 2011.

LEASK, R. et al. The effect of application of the FAMACHA© system on selected production parameters in sheep. **Small Ruminant Research,** v. 110, p.1- 8, 2013.

LEITE, E.R.; ARAÚJO FILHO, J.A.; PINTO, F.C. Pastoreio combinado de caprinos com ovinos em caatinga rebaixada: desempenho das pastagem e dos animais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n.8, p. 1129-1134. 1995.

LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A.; HOBERG, E. P. New Morphological Characters for Identifying Individual Specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a Key to Species in Ruminants of North America. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 107-119. 1994.

LINDQVIST, A. et al. The Dynamics, Prevalence and Impact of Nematode Infections in Organically Raised Sheep in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, n. 3, p. 377-389, 2001.

LOUHI, K. et al. Is the population genetic structure of complex life cycle parasites determined by the geographic range of the most motile host? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 1271–1277. 2010.

MELO, A. C. F. L. et al. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 339-344. 2003.

MOLENTO, M. B. et al. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1139-1145, 2004.

MOLENTO, M.B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 229–234. 2009.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 93-100. 2003.

NEVES, M. R. M.; VIEIRA, L. S.; ANDRIOLI, A. **Controle do Parasitismo em Cabras Leiteiras Criadas a Pasto**.1.ed. Sobral: Embrapa Caprinos. 2008. 6p.

NOGUEIRA FILHO, A. Ações de fomento do Banco do Nordeste e potencialidades da caprino-ovinocultura. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE. 2., 2003. João Pessoa. **Anais…** João Pessoa: 2003. CD-Rom.

ONYIAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, p. 203-211. 2005.

OTSEN, M. et al. Microsatellite diversity of isolates of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 110, p. 69–77. 2000.

OTSEN, M. et al. Amplified fragment length polymorphism analysis of genetic diversity of *Haemonchus contortus* during selection for drug resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1138-1143. 2001.

PEAKALL, R. AND SMOUSE, P.E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295. 2006.

PRICHARD, R. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology,** v. 54, p. 259-268. 1994.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959. 2000.´

REDMAN, E. et al. Microsatellite analysis reveals marked genetic differentiation between *Haemonchus contortus* laboratory isolates and provides a rapid system of genetic fingerprinting. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 111-122. 2008.

ROOS, M. H. et al. Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 109-115. 2004.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICROS E PEQUENAS EMPRESAS -PI. **Diagnóstico da cadeia produtiva da ovinocaprinocultura piauiense.** Teresina: SEBRAE - PI, 2003. 116p.

SILVA, C. A. S. et al. Estudo comparativo da carga parasitária e hematócrito em caprinos (*Capra hircus* L.) abatidos em matadouro público. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**. Patos, v. 04, p. 01-06. 2008.

SILVESTRE, A. et al. Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 5086-5100. 2009.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, n. 5, p. 199-203. 2000.

TARIQ, K. A. et al. Evaluation of anthelmintic activity of Iris hookeriana against gastrointestinal nematodes of sheep. **Journal of Helminthology**, v. 82, n. 2, p.135-141. 2008.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p.183-194. 2002.

TERRILL, T. H. et al. Experiences with integrated concepts for the control of *Haemonchus contortus* in sheep and goats in the United States. **Veterinary Parasitology**, v.186, p.28– 37. 2012.

TOMIUK, J.; GULDBRANDTSEN, B.; LOESCHCKE, V. Population differentiation through mutation and drift – a comparison of genetic identity measures. **Genetica**, v. 102-103, p. 545–558. 1998.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária.** 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

VIEIRA, L. S. **Alternativa de controle de verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes.** 1.ed. Sobral: Embrapa Caprinos, 2003. 10p.

VIEIRA, L. S. **Endoparasitoses Gastrintestinais em Caprinos e Ovinos.** 1.ed. Sobral: Embrapa Caprinos, 2005. 32p.

WALLER, P. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 391-412, 1997.

WALLER, P. J.; CHANDRAWATHANI, P. *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from Tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. **Tropical Biomedicine**, v. 22, n. 2, p. 131-137. 2005.

WHITTIER W. D; ZAJAC, A.; UMBERGER, S. H. Control of Internal Parasites in Sheep. **Virginia State University**. 2009.

YACOB, H. T. et al. Parasitological and clinical responses of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* (L3) with and without ivermectin treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 119-123. 2009.

ZAJAQ, A. M. Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. **Veterinary Clinics of North America**: **Food Animal Practice**, v. 22, p. 529-541. 2006.