

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AÇÃO REVERSORA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO VERAPAMIL
SOBRE A RESISTÊNCIA DE *Haemonchus contortus* À
IVERMECTINA.**

Fernando de Almeida Borges

Orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AÇÃO REVERSORA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO VERAPAMIL
SOBRE A RESISTÊNCIA DE *Haemonchus contortus* À
IVERMECTINA.

Fernando de Almeida Borges

Orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária (Patologia Animal)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

DEZEMBRO DE 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDO DE ALMEIDA BORGES – filho de José Machado Borges e Zilda Therezinha de Almeida Borges, nascido em 28 de outubro de 1978, no município de Uberaba – MG. Médico Veterinário, graduado pela Universidade Federal de Uberlândia em janeiro de 2001. Iniciou, no mesmo ano, suas atividades como pesquisador no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR), FCAVJ/UNESP, onde permaneceu até maio 2007, quando então, foi aprovado em concurso público para o cargo de professor de Parasitologia e Doenças Parasitárias, no curso de Medicina Veterinária, na Universidade estadual de Maringá – campus avançado de Umuarama, Paraná. Em dezembro de 2007 foi aprovado no concurso público para Professor Assistente de Doenças Parasitárias para o curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Dedico este trabalho à Dra. Johanna
Martha Kopte, em reconhecimento
ao seu apoio, exemplo de
profissionalismo.e ao suporte dado
para a realização desta tese.

Agradecimentos

Agradeço a Deus.

Ao Prof. Dr. Alvimar José da Costa, não apenas por sua orientação em meu doutorado, mas por todas as oportunidades, ensinamentos, apoio e confiança. Minha gratidão é o mínimo que posso oferecer-lhe.

Ao Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento, meu co-orientador e amigo.

Aos professores que aceitaram compor as bancas de qualificação e defesa: Prof. Dr. Gilson, Prof. Dr. Adjair, Prof. Dr. Alessandro Amarante, Dra. Giane, Prof. Dr. Flávio e Prof. Dr. Edanir, por sua imensurável contribuição.

A todos aqueles com quem tive a oportunidade de conviver no CPPAR, mais do que colegas de trabalho, amigos e companheiros: Carol, Welber, Rafael, Cláudio, Tiago, Daniel, Luis Fernando, Mário, Vando, Roberto, Marina, Lívia, Tatisa, Thaís, Nancy, Fortunato Alexandre, Ana Lúcia, Jouvana, Cláudia, Paulo e Walter

Ao pessoal do LBM/FCAVJ, especialmente à profa. Maria Ines Tiraboschi Ferro.

À meus pais, Zilda e José por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus irmãos Fabiano e Flávia, por tudo o que construímos juntos e com quem sempre poderei contar.

À família Vieira: Orestes, Yvone, Karina e Gustavo, pela torcida e apoio.

À Juliana Arena Galhardo, por sua presença, dedicação, companheirismo e amor.

A todos aqueles que consideraram esta vitória como se fosse deles próprios.

À Fapesp, pela concessão do auxílio financeiro (processo 04/12803-1), sem o qual não seria possível a realização deste projeto.

SUMÁRIO

ASSUNTO	PÁGINA
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
I. INTRODUÇÃO.....	12
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
III. OBJETIVOS.....	27
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Caracterização de estirpes de <i>Haemonchus contortus</i> resistente e susceptível à ivermectina.....	28
4.2. Manutenção da estirpe pura de <i>H. contortus</i> resistente a ivermectina.....	30
4.3. Avaliação da atividade reversora do verapamil: teste <i>in vitro</i> – migração de larvas em gel de ágar.....	31
4.4 Avaliação da atividade reversora do verapamil: teste <i>in vivo</i> – avaliação anti-helmíntica em ovinos experimentalmente infectados.....	34
4.5 Estudo genotípico relacionado à glicoproteína P e canais de cloro ativados por glutamato na estirpe de <i>H. contortus</i> resistente à ivermectina.....	37
4.6 Análise estatística.....	41
V. RESULTADOS.....	43
5.1 Caracterização de estirpes de <i>Haemonchus contortus</i> resistente e susceptível à ivermectina.....	43
5.2. Avaliação da atividade reversora do verapamil: teste <i>in vitro</i> – migração de larvas em gel de agar.....	46
5.3 Avaliação da atividade reversora do verapamil: teste <i>in vivo</i> – avaliação anti-helmíntica em ovinos experimentalmente infectados.....	50
5.4 Estudo genotípico relacionado à glicoproteína P e canais de cloro ativados por glutamato na estirpe de <i>H. contortus</i> resistente à ivermectina..	53
VI. DISCUSSÃO.....	61
VII. CONCLUSÕES.....	70
VIII. REFERÊNCIAS.....	71

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
Tabela 1. Contagens de OPG, sexo, e peso no período pré-tratamento dos ovinos experimentais, naturalmente infectados por <i>Haemonchus contortus</i> (cepa R). CPPAR/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.....	29
Tabela 2. Grupos experimentais e respectivos tratamentos aplicados às larvas de <i>Haemonchus contortus</i> no teste de migração em gel de ágar. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.....	34
Tabela 3. Grupos experimentais e respectivos tratamentos administrados nos ovinos experimentalmente infectados com larvas de <i>Haemonchus contortus</i> resistente à ivermectina. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.....	36
Tabela 4. Quantificação de <i>Haemonchus contortus</i> recolhidos de ovinos dos grupos controle e tratado, necropsiados no sétimo dia pós-tratamento; percentuais de eficácia da ivermectina 1%. Médias aritméticas. CPPAR/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.....	44
Tabela 5. Quantificação de <i>Haemonchus contortus</i> recolhidos de ovinos dos grupos controle e tratado, necropsiados no sétimo dia pós-tratamento; percentuais de eficácia da ivermectina 1% e análise estatística. Médias geométricas. CPPAR/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.....	44
Tabela 6. Número médio de larvas de <i>Haemonchus contortus</i> sobreviventes e percentuais de eficácia da ivermectina em diferentes diluições, isoladamente (Grupo I) e associada ao Verapamil (Grupo II), provenientes do teste in vitro. CPPAR/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.....	48
Tabela 7. Número médio de larvas de <i>Haemonchus contortus</i> sobreviventes e percentuais de eficácia do verapamil em diferentes diluições, isoladamente (Grupo III) e associado à ivermectina (Grupo IV).....	48
Tabela 8. Contagens médias de OPG*, realizadas em ovinos dos grupos controle e tratados. CPPAR/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. Médias aritméticas.....	51
Tabela 9. Contagens médias de <i>Haemonchus contortus</i> , realizadas em ovinos dos grupos controle e tratados CPPAR/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. Médias geométricas.....	52
Tabela 10. Matriz de identidade das sequências de bases das amostras submetidas a diferentes tratamentos* e amplificadas com o iniciador PGP2.....	55

Tabela 11. Matriz de identidade das sequências de bases das amostras submetidas a diferentes tratamentos* e amplificadas com o iniciador MXD.....	57
Tabela 12. Matriz de identidade das sequências de bases das amostras submetidas a diferentes tratamentos* e amplificadas com o iniciador F4275.....	59
Tabela 13. Matriz de identidade das sequências de bases das amostras submetidas a diferentes tratamentos* e amplificadas com o iniciador R603.....	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Placa de Petri contendo o aparato utilizado no teste de migração de larvas em gel de Agar.....	32
Figura 2. Estufa do tipo BOD onde foram mantidas as placas de Petri, demonstrando exposição a uma fonte de luz incandescente de 60W.....	33
Figura 3. Número de <i>Haemonchus contortus</i> recolhidos de ovinos dos grupos controle e tratado, necropsiados no sétimo dia pós-tratamento. Médias geométricas. CPPAR/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.....	45
Figura 4. Percentuais de eficácia (médias geométricas) da ivermectina 1% em ovinos naturalmente infectados e necropsiados no sétimo dia pós-tratamento.....	45
Figura 5. Curva dose x resposta da ivermectina contra a cepa de <i>Haemonchus contortus</i> resistente (grupo I) e resultado do cálculo da DL50.....	47
Figura 6. Curva dose x resposta da ivermectina associada a 2mM de verapamil (grupo II) contra a cepa de <i>Haemonchus contortus</i> resistente e resultado do cálculo da DL50.....	47
Figura 7. Número médio e desvio padrão de larvas da cepa de <i>Haemonchus contortus</i> resistente, sobreviventes ao tratamento com verapamil em diferentes diluições, isoladamente (Grupo III) e associado à ivermectina (Grupo IV).....	49
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de amostras de <i>Haemonchus contortus</i> , submetido a diferentes tratamentos.....	53
Figura 9. Sequências alinhadas dos produtos das sete amostras de <i>Haemonchus contortus</i> , submetidas a diferentes tratamentos*, amplificadas por meio da PCR, utilizando-se o iniciador PGP-2.....	55
Figura 10. Sequências alinhadas dos produtos das sete amostras de <i>Haemonchus contortus</i> , submetidas a diferentes tratamentos*, amplificadas por meio da PCR, utilizando-se o iniciador MXD.....	56
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de amostras de <i>Haemonchus contortus</i> , submetido a diferentes tratamentos.....	58

Figura 12. Sequências alinhadas dos produtos das sete amostras de <i>Haemonchus contortus</i> , submetidas a diferentes tratamentos*, amplificados por meio da PCR, utilizando-se o iniciador F4275.....	58
Figura 13. Sequências alinhadas dos produtos das sete amostras de <i>Haemonchus contortus</i> , submetidas a diferentes tratamentos*, amplificados por meio da PCR, utilizando-se o iniciador R603.....	59
Figura 14. Desenho esquemático da glicoproteína P na membrana celular.	60

Ação reversora *in vitro* e *in vivo* do verapamil sobre a resistência de *Haemonchus contortus* à ivermectina.

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo caracterizar e isolar uma estirpe de campo de *Haemonchus contortus* resistente à ivermectina, avaliar a ação reversora do verapamil, por meio de testes *in vitro* (migração de larvas em gel de ágar) e *in vivo* (redução de OPG e necropsias parasitológicas), e realizar a análise de genes relacionados à glicoproteína-P e canais de cloro ativados por glutamato (GP-P e HcGluCL). A estirpe de *H. contortus* isolada apresentou elevada resistência à ivermectina, sendo observada eficácia ínfima de 6,59%. O verapamil isoladamente não apresentou efeito nematodícea, porém, em concentrações crescentes, associado à ivermectina (DL50-4,317 μ mol) proporcionou aumento de eficácia contra a cepa resistente de *H. contortus*, alcançando o percentual de 94,3% (verapamil 100 mmol). Os resultados do teste anti-helmíntico controlado, em que foram utilizados 42 ovinos experimentalmente infectados com *H. contortus* resistente à ivermectina, revelaram que o verapamil apresentou uma atividade de reversão parcial significativa ($P < 0,05$) da resistência. Pela análise genotípica efetuada nas sete amostras desta população de *H. contortus*, submetidas aos diferentes tratamentos com ivermectina, verapamil ou associação entre estas drogas, verificou-se similaridade em relação à glicoproteína-P e pouca semelhança em relação aos canais de cloro ativados por glutamato..

Palavras-chave: fosfo-glicoproteína, *Haemonchus contortus*, ivermectina, resistência, reversão, verapamil.

Verapamil *in vitro* and *in vitro* reversing action in *Haemonchus contortus* ivermectin resistance.

SUMMARY

The present work aimed to identify and isolate a field ivermectin-resistant *Haemonchus contortus* strain, evaluate the effect of verapamil as a P-GP modulator agent by *in vitro* (agar gel larval migration assay) and *in vivo* (FECRT and controlled test), and analyze the genes related to the P-glycoprotein (P-GP) and *H. contortus* glutamate chloride (HcCluCl) channel expression. The *H. contortus* field strain isolated was highly resistant to ivermectin, showing only 6.59% of efficacy. Verapamil alone didn't show any *in vitro* anthelmintic action but increasing concentrations of this drug associated to ivermectin (LD50-4.317 μ mol) resulted in higher efficacy, when compared to ivermectin alone, with 94.3% efficacy in the 100 mmol concentration. The results of the anthelmintic controlled test, in which it was used 42 sheep experimentally infected with the field ivermectin-resistant *H. contortus* strain, showed a significant ($P < 0.05$) partial ivermectin resistance reversion by verapamil. The genomic analysis of the seven samples from this *H. contortus* resistant population submitted to different treatment with ivermectin, verapamil and the association between these two drugs, showed similarity in the genes related to the expression of P-GP and high polymorphism related to HcGluCL.

Keywords: *Haemonchus contortus*, ivermectin, P glycoprotein, resistance, reversion, verapamil.

I. INTRODUÇÃO

A produção de lã e carne ovina desempenha importante papel sócio-econômico no Brasil. O rebanho ovino brasileiro está estimado em 15.588.041 animais (IBGE, 2005). Ao contrário do que ocorria no passado, quando a maior parte dos criatórios encontrava-se na região sul, atualmente, 58,44% deste rebanho pertence à região nordeste, onde predominam ovinos com pelagem curta, e apenas 28,56% à região sul, onde a maioria é lanada.

A ovinocultura, embora tenha sofrido com a diminuição do comércio internacional da lã, principalmente por Japão e Austrália, e também pela competição com a agricultura, especialmente na região sul do Brasil, continua, ainda, uma atividade rentável. Segundo DORNELLES (2002), é o setor mais lucrativo da pecuária, propiciando rápida recuperação do capital empregado. Além disto, possui grande importância social, representando significativa fonte de renda para a produção agropecuária familiar, fixando o homem no campo.

As infecções parasitárias causadas por nematódeos gastrintestinais representam grave problema sanitário na pecuária ovina, sendo responsáveis por grandes perdas econômicas. Dentre os helmintos, o *Haemonchus contortus* destaca-se como sendo o de maior importância econômica no Brasil. Este parasito apresenta grande capacidade de adaptação a adversidades climáticas, podendo ser encontrado até mesmo no Círculo Ártico (LINDQUIST et al., 2001). Possui maior intensidade de infecção dentre os demais nematódeos em ovinos nos estados de São Paulo (AMARANTE, 1995), Santa Catarina (PALOSCHI & RAMOS, 1991), Paraná (CUNHA FILHO et al., 1998) e Rio Grande do Sul (BORBA, 1996). Sua patogenicidade é caracterizada pelo intenso

hematofagismo na fase adulta (PRADHAN & JOHNSTONE, 1972). Além dos danos à mucosa gástrica na forma inibida, a ação deste parasito causa queda na produção e na qualidade da lã, redução no ganho de peso (20 a 60%) e mortalidade (20 a 40%) (ECHEVARRIA, 1988).

O método mais empregado no controle de verminoses de ruminantes domésticos é o uso de produtos químicos. Porém, a utilização de anti-helmínticos como ferramenta exclusiva de controle, tem seu futuro comprometido devido ao progressivo aumento do número de casos de resistência e à falta de perspectiva de descoberta de novas moléculas com propriedades terapêuticas antiparasitárias. Desta forma, é importante adotar medidas que prolonguem a vida útil das drogas disponíveis no mercado, assim como meios de controle complementares (FAO, 2003).

Estes fatores têm levado ao desenvolvimento de pesquisas de controles complementares, tais como pastejo alternado (FERNANDES et al., 2004), seleção de animais geneticamente resistentes (AMARANTE & AMARANTE, 2003) e controle biológico utilizando fungos nematófagos (ARAÚJO et al., 2004), dentre outros. Uma nova alternativa que está sendo pesquisada é a utilização de drogas com atividade reversora na resistência a anti-parasitários, a chamada "reversão química da resistência", que poderia prolongar o uso de importantes grupos químicos como os benzimidazóis e as lactonas macrocíclicas.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A resistência às drogas é atualmente o maior entrave no controle de parasitos dos animais de produção (NARI & EDDI, 2003). É definida como a habilidade de uma população de parasitos em tolerar doses de drogas que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população normal (susceptível) desta mesma espécie (STONE, 1972). Esta é uma característica genética, portanto, herdável.

Os benzimidazóis, introduzidos no mercado em 1962, foram os primeiros anti-helmínticos com amplo espectro de ação, apresentando elevada eficácia contra nematódeos gastrintestinais. No entanto, já em 1964 foram encontradas cepas de campo de *H. contortus* resistentes a este grupo químico (CONWAY, 1964; DRUDGE et al., 1964). No Brasil, a resistência deste parasito a este princípio ativo foi relatada pela primeira vez em 1967 no Rio Grande do Sul por SANTOS & GONÇALVES (1967).

A partir de 1979, surgiu outro grupo químico de amplo espectro de ação, denominado lactonas macrocíclicas (LM). Tais compostos resultam do processo de fermentação de um actinomiceto do gênero *Streptomyces*, encontrado no solo (BURG et al., 1979). A este grupo pertencem as avermectinas (*a* sem + *verm* verme + *ect* ectoparasita + *in* produto farmacêutico): ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina.

O produto semi-sintético, 22,23 – dihidroavermectin B₁, ou ivermectina, foi o primeiro entre as LM a ser comercializado (CHABALA et al., 1980; EGERTON et al., 1980) e graças a sua elevada eficácia contra artrópodes e nematódeos, segurança clínica e novo modo de ação, tornou-se o tratamento de escolha para parasitoses de

bovinos, ovinos, caprinos, suínos e eqüinos (CAMPBELL et al., 1983; CAMPBELL & BENZ, 1984).

O exato mecanismo de ação das LM ainda não está esclarecido, devido a algumas características da droga, tais como, apresentar vários locais de ação, várias espécies alvo com sensibilidades diferentes a seu efeito e pouca solubilidade em soluções aquosas (TURNER & SCHAEFFER, 1989).

A primeira hipótese formulada para explicar o modo de ação das LM constitui em sua atuação como agonistas do ácido gama amino butírico (GABA), aumentando a permeabilidade dos íons cloro (Cl^-), resultando em paralisia muscular (MELLIN et al., 1983; ALBERT et al., 1986).

Esta hipótese poderia explicar porque as avermectinas não agem sobre cestódeos e trematódeos, uma vez que estes não possuem receptores GABA. Sua baixa toxicidade para os mamíferos é explicada pela impossibilidade de atravessar a barreira hematocefálica, não atingindo, assim, os receptores GABA restritos quase exclusivamente ao sistema nervoso central (MARTIN et al., 2002). Recentemente, confirmou-se que os receptores GABA estão associados ao modo de ação das LM nos insetos (LUDMERER et al., 2002).

Observações de alguns autores desencadearam a hipótese de que poderia haver outro mecanismo de ação nos nematódeos. SCOTT & DUCE (1987) demonstraram que feixes musculares específicos do gafanhoto (*Schistocerca gregaria*) que recebem apenas inervação excitatória, não sendo sensíveis ao GABA, exibiram resposta irreversível à ivermectina. MARTIN & PENNIGTON (1988), utilizando um modelo experimental com *Ascaris suum*, observaram que não houve ação da ivermectina nos

canais GABA, mas sim em canais diferentes de cloro. Outro fato que suporta esta hipótese é a presença, em mamíferos, de receptores GABA periféricos, que não possuem barreira protetora como os do sistema nervoso central, estando vulneráveis a ação destas drogas. Deste modo, como explicar porque as LM não agem nestes receptores e não causam efeitos nos mamíferos?

O uso do nematódeo de vida livre *Caenorhabditis elegans* permitiu estudos mais aprofundados sobre o modo de ação de drogas anti-helmínticas. A primeira descoberta importante, com este tipo de estudo, foi que a ivermectina liga-se especificamente a proteínas de membrana deste nematódeo (SCHARFFER & HAINES, 1989). Posteriormente, outros autores (SCHAEFFER et al., 1989, 1990; ARENA et al., 1995) apontaram a presença de um possível receptor para ivermectina em nematódeos.

A manipulação do material genético de *C. elegans* permitiu a descoberta dos canais de cloro potencializados pelo glutamato (GluCl), sensíveis à ivermectina e presentes apenas em invertebrados (ARENA et al., 1991,1992). Os receptores GluCl possuem duas subunidades, α e β , a primeira é sensível às avermectinas e a segunda ao glutamato (CULLY et al. 1994). Estes receptores estão presente em diversos locais do organismo dos invertebrados. Deste modo, as LM possuem vários locais de ação, bloqueando transmissões interneurais de nervos excitatórios, agindo diretamente sobre a musculatura (KASS et al., 1980), causando paralisia, principalmente da faringe (GEARY et al., 1993). Há evidências da presença de receptores em células musculares do aparelho reprodutivo de *Ascaris* (FELLOWES et al. 2000), o que pode explicar a ação destas drogas na fertilidade e ovipostura dos nematódeos.

Em 1985, 33 meses após a introdução da ivermectina na África do Sul, foi constatado o primeiro relato de resistência, quando foi observada redução na eficácia anti-helmíntica em ovinos que haviam sido tratados 26 vezes ao longo de 32 meses. Estes animais eram parasitados por *Ostertagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp., e em menor intensidade, por *Haemonchus* spp. Após os sucessivos tratamentos com ivermectina, todos gêneros de nematódeos haviam sido eliminados, exceto *Haemonchus* spp (CARMICHAEL et al., 1987).

Resistência à ivermectina também foi registrada em *H. contortus* no estado do Rio Grande do Sul em 1989 em ovinos que haviam recebido 32 tratamentos no decorrer de 54 meses. Ao final deste período, foi observado um acentuado declínio da eficácia contra vermes adultos (apenas 59%) (ECHEVARRIA & TRINDADE, 1989). Outro estudo, realizado no mesmo Estado, investigou 29 rebanhos de ovinos, sendo observada resistência em *H. contortus* à ivermectina, em oito deles (FARIAS et al., 1997). Em Santa Catarina, a resistência deste nematódeo à ivermectina (0,2 mg/kg) foi constatada em 77% dos 65 rebanhos estudados (RAMOS et al., 2002). Entre dez propriedades avaliadas na região de Londrina, oito apresentaram ocorrência de resistência, prevalecendo o gênero *Haemonchus* spp. (CUNHA FILHO et al., 1998). Também no Paraná, SOCCOL et al. (1996) relacionaram casos clínicos agudos, e mortalidade causados por *H. contortus* resistente à ivermectina. Em São Paulo, foi avaliada a eficácia anti-helmíntica da ivermectina (0,2 mg/kg) em nove propriedades rurais, sendo observada ineficácia da droga em quatro delas (AMARANTE et al., 1992). Melo et al. (2003), no Ceará, avaliaram a eficácia de oxfendazole, levamisole e ivermectina em 25 rebanhos (16 de ovinos, 7 de caprinos e 2 mistas) e observaram

prevalência da resistência em 88%, 41% e 59% rebanhos ovinos e 87.5%, 75% e 37.5% em caprinos, respectivamente, sendo *Haemonchus* o principal gênero. Em alguns destes trabalhos estão relatados casos de resistência múltipla desta espécie a diversos grupos químicos, demonstrando a gravidade do problema.

A resistência de *Haemonchus* spp. às lactonas macrocíclicas é controlada por um gene único e completamente dominante, quando em estágio larval e ligado ao sexo no estágio adulto, estando mais presente em fêmeas (LE JAMBRE et al., 2000). Modelos matemáticos sugerem que o desenvolvimento de resistência às lactonas macrocíclicas se desenvolve mais rapidamente que para os benzimidazóis, nos quais é determinada por mais de um gene (BARNES et al., 1995).

Nos nematódeos, o fenômeno da mutação parece estar ausente, sendo a resistência causada pela seleção dentro de uma população de genes que conferem esta característica, pela sua existência, antes do primeiro contato com a droga (MCKENZIE, 1985). Neste processo, ocorrem três fases: na inicial há baixa frequência de indivíduos resistentes na população; na intermediária, com a contínua exposição à droga, há aumento dos indivíduos heterozigotos (SR); na última fase, os indivíduos homozigotos (RR) predominam na população e não são eliminados pela droga (PRICHARD et al., 1990).

As características genéticas que conferem resistência são traduzidas em diferentes modificações bioquímicas e moleculares que determinam a diminuição do efeito da droga contra o parasito. Podem ocorrer as seguintes modificações: alterações de sistemas enzimáticos necessários para que se produza o efeito da droga, diminuição do número e/ou da afinidade dos receptores aos quais a droga se liga, modificações

estruturais que reduzem a captação do princípio ativo, aumentem do metabolismo enzimático e/ou efluxo (MOTTIER & LANUSSE, 2001).

O mecanismo de resistência a lactonas macrocíclicas pode ser resultado de mais de uma alteração genética (KÖHLER, 2001). Comparações entre o polimorfismo de cepas de *H. contortus* sensível e resistente à ivermectina revelaram que há seleção de um gene que codifica sub-unidades de canais de cloro ativados por glutamato (GluCl) (BLACKHALL et al., 1998a), os quais estão relacionados ao mecanismo de ação deste grupo químico (CULY et al., 1994; ARENA et al., 1995).

Estudos com *Caenorhabditis elegans*, que teve todo seu genoma seqüenciado, revelaram alterações dos genes denominados *Dyf*, que expressam produtos responsáveis pela captação da ivermectina na cutícula do nematódeo, causando resistência nos parasitos, que tornam-se menos permeáveis à droga (DENT et al., 2000).

O primeiro gene, associado à resistência das lactonas macrocíclicas em *H. contortus* foi o PGP-A, responsável pela expressão de uma glicoproteína de membrana, a fosfo-glicoproteína (GP-P), membro da família dos transportadores tipo ABC com cassete de ligação com ATP (XU et al., 1998). Muitos organismos, inclusive os vertebrados, possuem GP-P que age como transportadora na membrana plasmática, retirando componentes estranhos à célula, estando, também, envolvida nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de compostos xenobióticos (MEALEY, 2004).

A GP-P está sendo muito estudada, pois o aumento de sua expressão está relacionado à resistência de células cancerígenas humanas à quimioterápicos, uma vez

que age transportando a droga para fora da célula tumoral. Este fenômeno é denominado resistência múltipla a drogas (RMD), pois pode envolver vários grupos químicos (JULIANO & LING, 1976; GOTTESMAN & PASTAN, 1993). Resistência múltipla a drogas também é observada em parasitos do gênero *Trypanosoma*, protozoário de grande importância para o homem e para os animais (KERBOEUF et al., 2003).

A primeira evidência de que as lactonas macrocíclicas poderiam interagir com a GP-P surgiu ao acaso, quando camundongos, cujo gene *mdr1a* (responsável pela expressão de GP-P) havia sido bloqueado, apresentaram infestação por sarna e necessitaram de tratamento, sendo aplicado ivermectina spray. Após tratamento, os camundongos apresentaram sintomas neurotóxicos e, decorridas 24 horas, estavam todos mortos. Descobriu-se que nestes camundongos havia um defeito na barreira hemato-encefálica, sendo encontrada concentração de ivermectina no sistema nervoso central 100 vezes maior que em animais normais (SCHINKEL et al., 1994).

Em *H. contortus*, o RNAm relacionado à expressão de GP-P localiza-se predominantemente no tecido do trato digestivo, destacando-se a faringe (SMITH & PRICHARD, 2002). Neste segmento anatômico há intenso transporte de membrana, deste modo, esta proteína participaria da excreção, no trato digestivo, de moléculas de drogas, como as lactonas macrocíclicas.

A clara evidência de associação entre genes da GP-P e a resistência a lactonas macrocíclicas sugere que estes genes possam ser marcadores moleculares úteis para seu diagnóstico (PRICHARD, 2002). Até o momento, sabe-se que existem três

homólogos de GP-P relacionados a resistência à ivermectina em *H. contortus* (XU et al., 1998; LE JAMBRE et al., 1999; SANGSTER et al., 1999).

Considerando o surgimento de estirpes de nematódeos com resistência múltipla às drogas e o fato dos princípios ativos disponíveis para o controle químico poderem ser considerados um recurso não renovável, a procura por medidas que possam reverter o quadro de resistência aos atuais grupos químicos parasiticidas pode trazer uma importante alternativa no controle anti-parasitário. Existem diferentes estratégias de reversão que estão sendo avaliadas por diversos autores, entre elas: reversão natural, diluição dos genes resistentes, substituição total de populações e utilização de drogas moduladoras.

A técnica da reversão natural consiste em um retorno à susceptibilidade quando da ausência da pressão de seleção pela droga por longos períodos (acima de 10 anos). Segundo esta teoria, os parasitos dentro de uma população que possuem os genes que conferem a resistência a determinado princípio ativo estão, inicialmente, em frequência muito baixa por apresentarem menor vantagem de sobrevivência quando comparados aos nematódeos susceptíveis. A população resistente que foi selecionada com o uso de determinado princípio ativo, normalmente, apresenta-se em desvantagem biológica em relação aos parasitos susceptíveis, assim sendo, na ausência da seleção por anti-helmínticos, a população susceptível teria a tendência a predominar novamente (JACKSON & COOP, 2000). Porém, segundo SANGSTER (1999), os isolados de parasitos resistentes apresentam pouca ou nenhuma tendência a reverterem à susceptibilidade. Tal fato se deve à permanência de alelo para a resistência na população, mesmo após um longo período de desuso de determinada droga. Assim, a

reutilização do princípio ativo precedente do processo de reversão, pode resultar em um retorno rápido da resistência.

Os resultados obtidos pela técnica da reversão natural são controversos. BORGESTEED & DUYN (1989) não observaram aumento de susceptibilidade ao benzimidazole contra um isolado resistente de *H. contortus* após seis anos de suspensão do uso desta molécula. WARUIRU (1997) também observou que uma população de *H. contortus* manteve a resistência a benzimidazol e levamizol, apesar do fato desta cepa não ter sido exposta a estes princípios ativos durante quatro anos, em um rebanho ovino em Kênia. Por outro lado, MELO et al. (2004) observaram em uma propriedade no Estado do Ceará, onde houve suspensão do uso de benzimidazóis em ovinos durante dois anos, aumento da eficácia de 91% em 2001 para 97% em 2003.

WYK & VAN SCHALKWYK (1990) propuseram a diluição dos genes da resistência em *H. contortus* por meio de infecções artificiais com populações de parasitos susceptíveis. Com o objetivo de obter resultados sob condições de campo, todos os animais de duas propriedades, onde havia resistência múltipla a drogas, foram medicados com uma formulação altamente eficaz e inoculados com larvas de uma estirpe susceptível. Os resultados demonstraram aumento da susceptibilidade das populações desta espécie nas duas áreas, inclusive nos parasitos presentes nos animais que nasceram naquelas pastagens após o início do experimento e que não haviam sido inoculados.

A técnica de reversão da resistência por meio da substituição total de uma população de *Teladorsagia circumcincta* resistente a benzimidazóis por outra susceptível, foi avaliada na França por MOUSSAVOU-BOUSSOUGOU et al. (2006).

Foram utilizados diferentes piquetes onde havia histórico de resistência a benzimidazóis, com frequência genotípica de até 89%, os quais permaneceram sem animais durante sete meses. Prosseguindo, os piquetes receberam ovinos experimentalmente infectados por um isolado de *T. circumcincta* susceptível a benzimidazóis. Em período pré determinado, estes ovinos foram tratados com fenbendazole, sendo observada eficácia entre 97% e 99% na redução da carga parasitária e frequência da resistência entre 0 e 3% na avaliação genotípica desta população após a substituição e o tratamento com benzimidazol. Segundo estes autores, para o estabelecimento desta nova população de helmintos deve-se evitar tratamentos com benzimidazóis durante dois anos e apontaram, ainda, a necessidade do monitoramento da eficácia por um longo período, alertando para algumas possíveis dificuldades na introdução de uma nova população de nematódeos em uma propriedade, entre elas, o risco de emergência de novos patógenos.

Segundo JACKSON & COOP (2000), o sucesso da reversão depende da frequência dos genes de resistência na população parasitária, podendo ocorrer pouca ou nenhuma reversão quando houver predominância de homozigotos resistentes. Por outro lado, quando a maioria for heterozigota, a chance de reversão é maior.

Atualmente, um conceito muito utilizado no tratamento químico de células tumorais é a reversão da resistência múltipla a fármacos, empregando-se drogas moduladoras. Estes moduladores agem competindo com as drogas de interesse terapêutico por locais de ligação na GP-P, impedindo que sejam retiradas da célula alvo e/ou inibindo a hidrólise de ATP (WATANABE et al., 1995, GARRIGOS et al., 1997).

O verapamil é um bloqueador de canais de cálcio (TSURUO et al., 1981) que está sendo utilizado com esta finalidade. O primeiro estudo a respeito do uso de verapamil como agente modulador reversor de resistência a anti-helmínticos foi realizado por BEUGNET et al. (1997), sendo observada reversão parcial da resistência de *H. contortus* a benzimidazóis por meio de teste *in vitro* de eclodibilidade de ovos. O aumento da atividade anti-helmíntica de ivermectina e de moxidectina, associados ao verapamil, foi observado em um modelo experimental utilizando gerbils experimentalmente infectados com larvas de *H. contortus* resistentes (MOLENTO & PRICHARD, 1999). O estudo *in vitro* de migração de larvas em gel também demonstrou que há aumento de eficácia destas associações medicamentosas, contra cepas de *H. contortus* resistente a estas lactonas macrocíclicas (MOLENTO & PRICHARD, 2001).

Experimento realizado com ovinos demonstrou que o verapamil, administrado via subcutânea (3mg/kg, 3x), proporcionou aumento significativo dos parâmetros farmacocinéticos como área sob a curva e pico de concentração máxima de ivermectina, administrada via oral (MOLENTO et al., 2004). Segundo os autores, o verapamil inibe a ação de GP-P presente no fígado e no intestino, reduzindo a excreção biliar, além de aumentar a absorção intestinal da droga.

O verapamil é considerado modulador de GP-P de primeira geração e outras drogas estão sendo estudadas para esta finalidade. Segundo MEALEY (2004), diversos princípios ativos poderiam ser utilizados como inibidores seletivos de GP-P, entre eles os anti-depressivos floxetina, erva-de-São-João e paroxetina; os agentes antimicrobianos eritomicina, itraconazol e cetoconazol; os opióides metadona e pentazocina; os antiarrítmicos cardíacos verapamil, amiodarona, carvedilol, quinidina e

nicardipina; imunossupressores, incluindo a cyclosporina, tacrolimus e outros, como bromocriptina, clorpromazina e tamoxifen.

Reversão altamente significativa (acima de 50%) da resistência ao tiabendazol foi obtida em ovos de *H. contortus* previamente expostos a lecitina, sendo desconhecido ainda o exato mecanismo de ação (KERBOUEF et al., 2002). RIOU et al. (2003) observaram que a composição da membrana celular, especialmente os lipídios, condiciona a atividade da GP-P, havendo aumento da resistência anti-helmíntica em *H. contortus* quando há redução de colesterol e, o efeito contrário, quando há acréscimo desta substância. O efeito de itraconazol e valspodar como moduladores de GP-P foi observado por BALLENT et al. (2006) por meio de testes *in vitro* e *in vivo*.

LIFSCHITZ et al. (2002) após a administração de loperamida, juntamente a moxidectina em ovinos, observaram que o uso de estratégias baseadas na combinação de endectocidas e substratos de GP-P aumentam a biodisponibilidade da droga, e, conseqüentemente, a eficácia anti-helmíntica contra nematódeos resistentes. O mesmo efeito foi observado por DUPUY et al. (2003) em ovinos medicados com quercetina e moxidectina.

A redução dos investimentos na descoberta de novas drogas anti-parasitárias, pela indústria farmacêutica veterinária ou por centros de pesquisas e o limitado conhecimento da biologia básica dos parasitos, caminho que poderia apontar para novos mecanismos de ação de drogas, diminuem a perspectiva do surgimento de novos grupos químicos, especialmente aqueles com excelente ação endectocida, como as lactonas macrocíclicas (GEARY & THOMPSON, 2003). Desta forma, qualquer

medida que possibilite o prolongamento do período de utilização deste grupo químico é importante.

III. OBJETIVOS

Em face à ausência de trabalhos com a avaliação de bloqueadores da GP-P em ovinos experimentalmente infectados, assim como de estudos moleculares de estirpe brasileira de campo de *H. contortus* resistente à ivermectina, os objetivos do presente trabalho foram:

1. caracterização e isolamento de estirpes de campo de *H. contortus* resistente e susceptível à ivermectina;
2. avaliar a ação do verapamil como reversor da resistência à ivermectina em *H. contortus*, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*;
3. caracterização molecular de pontos de mutação gênica relacionados à expressão de glicoproteína P em *H. contortus* resistente à ivermectina, submetido a diferentes tratamentos.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização de estirpes de *Haemonchus contortus* resistente e susceptível à ivermectina

Foram feitas várias tentativas para encontrar uma estirpe de *H. contortus* sensível à ivermectina. Dezoito propriedades rurais no Estado de São Paulo foram visitadas, sendo colhidas amostras de fezes de 850 ovinos para realização de exames coprológicos (contagens de OPG e coproculturas) antes e após o tratamento com ivermectina, via subcutânea (200 µg/kg de peso vivo).

A estirpe de *H. contortus* resistente à ivermectina foi obtida de ovinos pertencentes ao setor de ovinocultura da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - Unesp, onde eram criados cerca de 150 animais da raça Ile de France, mantidos em pastagens do gênero *Cynodon sp.* Estes animais eram submetidos a freqüentes tratamentos anti-helmínticos ao longo do ano, utilizando-se diversos princípios ativos, conforme a disponibilidade. Devido ao histórico do rebanho e à realização de exames coproparasitológicos prévios, os quais levantaram a suspeita de ineficácia da ivermectina, realizou-se um teste anti-helmíntico controlado (necropsias), seguindo-se a metodologia recomendada por WOOD et al. (1995).

Dez ovinos naturalmente infectados por nematódeos, incluindo o gênero *Haemonchus* sp foram selecionados, por meio de três contagens diárias consecutivas (-3, -2 e -1) de ovos por grama de fezes (OPG) (GORDON & WHITLOCK, 1939) em, sendo o diagnóstico genérico quantificado por meio de coproculturas (Robert &

O'Sullivan, 1950). Os animais foram listados em ordem decrescente pelo número médio de OPG e distribuídos em dois grupos com cinco repetições cada. Os dois ovinos com contagens mais elevadas foram destinados à repetição número um, os dois seguintes à repetição dois e assim, consecutivamente, até a constituição das cinco repetições. Após sorteio, um dos grupos foi tratado com ivermectina, via subcutânea (200 µg/kg de peso vivo) e outro mantido como controle (não tratado), conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Contagens de OPG, sexo, e peso no período pré-tratamento dos ovinos experimentais, naturalmente infectados por *Haemonchus contortus*. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Ovino	Sexo	Tratamento	Contagens de OPG/Dias pré-tratamento				Peso (kg)	Dose (ml)
			-3	-2	-1	Média		
5	M	Controle	400	525	470	465	20	-
6	M		800	755	830	795	20	-
10	M		600	675	650	642	20	-
13	M		475	425	500	467	20	-
18	M		525	500	550	525	20	-
Média						579		
2	M	Ivermectina	675	600	625	633	21,7	0,43
5	M		750	875	775	800	20,5	0,41
6	F		225	250	200	225	19,0	0,38
7	F		625	500	525	550	18,4	0,37
113	M		550	500	625	558	17,0	0,34
Média						553		

No sétimo dia pós-tratamento os ovinos foram sacrificados e submetidos à necropsia parasitológica para estimativa da carga parasitária. O sistema digestório foi separado, por meio de ligaduras duplas, nos diferentes segmentos anatômicos (abomaso, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto), sendo seus conteúdos removidos, e as mucosas raspadas. O material obtido foi lavado em tamis (0,297mm e tyler 48) e a parte sólida retida, fixada em solução de formol 10% a 80°C. Apesar da localização de *H. contortus* ser restrita ao abomaso, durante a necropsia pode haver passagem do

material presente neste órgão para outros compartimentos do sistema digestório, o que justifica a pesquisa deste parasito nos diferentes segmentos anatômicos.

Para digestão da mucosa abomasal foi empregada metodologia preconizada por WOOD et al. (1995), ou seja, o órgão foi imerso em solução de pepsina 1% e ácido clorídrico 3% a 37°C durante cinco horas.

A colheita, contagem e identificação genérica dos parasitos presentes em cada órgão foram efetuadas em microscópio estereoscópio. O diagnóstico específico foi realizado por meio de microscopia de luz comum (LEVINE, 1968; COSTA, 1982; UENO & GONÇALES, 1998).

4.2. Isolamento e manutenção da estirpe pura de *H. contortus* resistente à ivermectina

Fêmeas de *H. contortus* foram colhidas de abomaso de ovinos, pertencentes ao mesmo rebanho no qual a estirpe havia sido caracterizada como resistente à ivermectina (item 4.1) e imediatamente colocadas em placas de Petri contendo solução fisiológica, sendo mantidas em estufa a 36°C durante duas horas para realização de ovipostura. Posteriormente, os ovos foram colocados em vermiculita e mantidos a 27°C durante dez dias, quando foram obtidas larvas de terceiro estágio.

Dois ovinos, com idade entre dois e quatro meses, foram adquiridos e medicados com anti-helmínticos até apresentarem-se livres de infecção por *H. contortus*. Posteriormente, foram infectados com 1000 larvas e permaneceram no setor de ovinos do Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR/UNESP), em baias suspensas

individuais que impossibilitavam possíveis reinfecções helmínticas, recebendo silagem de milho e água *ad libitum*.

4.3. Avaliação da atividade reversora do verapamil: teste *in vitro* – migração de larvas em gel de ágar

4.3.1 Larvas infectantes (L3) de *H. contortus*

Larvas (L3) de *H. contortus* da cepa resistente, oriundas de coproculturas realizadas com amostras de fezes dos ovinos experimentalmente infectados, foram utilizadas para avaliação *in vitro* da reversão da resistência à ivermectina pelo verapamil.

4.3.2 Produtos

Ivermectina 0,08% (Ivomec[®] Solução Oral, Merial Saúde Animal).

Verapamil (Sigma, St Luis, Missouri).

4.3.3 Procedimentos experimentais

Foi utilizada a metodologia de D'ASSONVILLE et al. (1996) modificada por MOLENTO & PRICHARD (2001).

Número variável de larvas infectantes (L3) de *H. contortus* foi colocado em contato com solução de hipoclorito de sódio 0,08%, em estufa tipo B.O.D. à temperatura de 27°C, durante aproximadamente duas horas. Quando mais de 90% das larvas viáveis estavam sem a bainha, o material foi lavado três vezes com água

destilada e separado em alíquotas de 0,5 mL. A esta alíquota foi adicionado 0,5 mL de solução contendo os tratamentos em diferentes concentrações, conforme o grupo experimental (Tabela 2). Após homogeneização, esta solução contendo larvas e a droga foi mantida em estufa a 27° C, durante seis horas. Decorrido este período, foi adicionado 1 mL de solução de ágar (1,4%) a 45° C. A solução final (2mL) contendo ágar, larvas e a droga foi transferida para uma placa de Petri contendo um aparato especial (Figura 1) e mantida em estufa a 27° C, onde foi exposta a uma fonte de luz incandescente de 60W, durante 18 horas (Figura 2.).

Este aparato especial consiste em um cilindro de plástico (0,8 cm de altura x 3,0 cm de diâmetro) sobreposto a duas telas metálicas, uma delas com abertura de 38 µm e outra com abertura maior (Figura 1). A placa de Petri contendo o aparato foi previamente preenchida com 22 mL de água destilada e mantida em congelador. A água congelada deve cobrir as telas metálicas e o fundo do cilindro plástico, deixando espaço suficiente neste para a solução final.

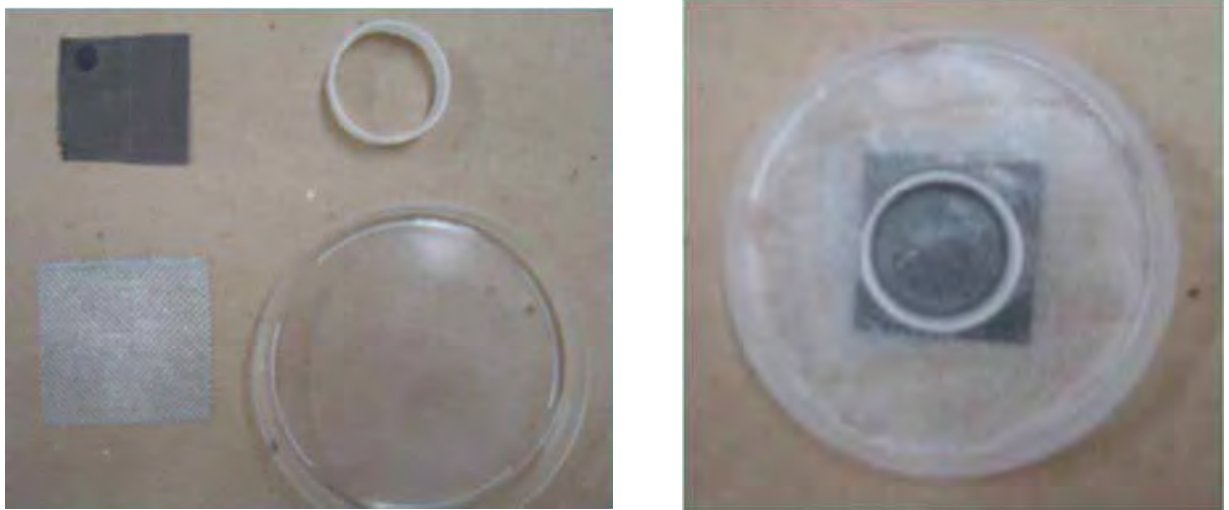


Figura 1. Placa de Petri contendo o aparato utilizado no teste de migração de larvas em gel de ágar



Figura 2. Estufa do tipo BOD onde foram mantidas as placas de Petri, demonstrando exposição a uma fonte de luz incandescente de 60W.

Como a exposição à luz estimula a movimentação das larvas que sobrevivem à ação da droga, consideradas resistentes, migraram para fora do ágar, passando pelas telas metálicas, indo para a porção aquosa, presente na placa de Petri. Esta porção líquida foi transferida para um tubo plástico de 50 mL. Após sedimentação, o sobrenadante foi retirado, mantendo volume de 10 mL no tubo. Deste volume, foram retiradas três alíquotas homogêneas (vortex) de 1 mL para quantificação das larvas. O resultado das contagens de larvas em cada alíquota foi multiplicado por 10. O experimento foi realizado em triplicata.

4.3.5 Grupos experimentais do teste *in vitro*

Tabela 2. Grupos experimentais e respectivos tratamentos aplicados às larvas de *Haemonchus contortus* no teste de migração em gel de ágar. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Grupo	Tratamento	Concentrações
I	Ivermectina	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 μ M
II	Ivermectina +	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 μ M de
	Verapamil	ivermectina + 2 mM de verapamil
III	Verapamil	1, 2, 5, 10 e 100 mM
IV	Ivermectina +	DL50 de ivermectina + 0, 1, 2, 5, 10 e 100 mM
	Verapamil	de verapamil

Em cada grupo experimental houve uma triplicata que recebeu apenas água destilada, servindo como controle para o cálculo de eficácia.

4.4 Avaliação da atividade reversora do verapamil: teste *in vivo* – avaliação anti-helmíntica em ovinos experimentalmente infectados.

Os procedimentos experimentais foram realizados seguindo a metodologia preconizada pelos guias internacionais para avaliação de anti-helmínticos para ruminantes, "World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology" (WOOD et al., 1995) e "International Co-operation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products" (VERCRUYSSSE et al., 2001).

4.4.1 Local

Os animais foram mantidos, durante o período experimental, em baias individuais pertencentes ao setor de ovinos do CPPAR/FCAVJ/UNESP”.

4.4.2 Seleção de ovinos

50 ovinos, sem raça definida, foram adquiridos de um rebanho, pesados individualmente e identificados com a colocação de brincos numerados na orelha direita e medicados com a associação albendazole 2,0%, cloridrato de levamisole 2,55% e ivermectina 0,08%¹, via oral, na dose de 1mL/4kg de peso vivo, visando a eliminação das infecções naturais por helmintos gastrintestinais. Todos os animais foram mantidos, ao longo do experimento, em baias que impossibilitavam possíveis reinfecções helmínticas.

4.4.3 Desafio

Cada animal foi inoculado, via oral, no mesmo dia para todos os grupos experimentais, com 15 mL de água contendo 8460 larvas infectantes (L3) de *H. contortus* resistente à ivermectina.

4.4.4 Delineamento experimental

Entre os 50 ovinos infectados experimentalmente, foram selecionados 42 animais por meio de três contagens consecutivas de OPG (32, 33 e 34 dias pós-inoculação). Os animais foram listados em ordem decrescente pelo número médio de OPG e distribuídos em sete grupos com seis repetições cada. Os sete ovinos com

¹ Trimix™ – Merial Saúde Animal Ltda.

contagens mais elevadas foram destinados à repetição número um, os sete seguintes à repetição dois e assim, consecutivamente, até a constituição das seis repetições. Após sorteio, foram realizados os seguintes tratamentos, via subcutânea, no 35º dia pós-inoculação, nos grupos experimentais, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Grupos experimentais e respectivos tratamentos administrados nos ovinos experimentalmente infectados com larvas de *Haemonchus contortus* resistente à ivermectina. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Grupo	Nº de ovinos	OPG (-3,-2 e-1)	Tratamento	Dose
I	6	3520	Controle	-
II	6	3532	Ivermectina 1%	200µg de ivermectina/kg
III	6	3569	Verapamil (oleoso)	3mg de verapamil/kg
IV	6	3532	Verapamil (aquoso)	3mg de verapamil/kg (3x)
V	6	3415	Ivermectina 1% + Verapamil (aquoso)	200µg de ivermectina/kg + 3mg de verapamil/kg (3x)
VI	6	3584	Ivermectina 1% + Verapamil (oleoso)	200µg de ivermectina/kg + 3mg de verapamil/kg
VII	6	3656	Ivermectina 2% + Verapamil (oleoso)	400µg de ivermectina/kg + 3mg de verapamil/kg

Os ovinos pertencentes aos grupos IV e V receberam três doses de verapamil 3 mg/kg, via subcutânea, a cada 12 horas. Esta dose é a que apresenta menor ocorrência de reação no local de administração em ovinos, utilizando-se como veículo solução salina (Molento et al. 2004).

4.4.5 Exames coprológicos

Foram realizados novos exames coprológicos para avaliação do efeito dos medicamentos na redução das contagens de ovos de nematódeos (OPG) no dias 1, 2, 3, 5 e 7 pós-tratamento (DPT) .

4.4.6 Necropsias parasitológicas

Foram realizadas necropsias parasitológicas no sétimo dia DPT, segundo metodologia descrita no item 2.1, exceto na forma de conservação dos parasitos, sendo utilizado álcool absoluto.

4.5 Estudo genotípico relacionado à glicoproteína P e canais de cloro ativados por glutamato na estirpe de *H. contortus* resistente à ivermectina

4.5.1 Amostras de parasitos

50 exemplares de *H. contortus* machos, foram colhidos à necropsia do abomaso de ovinos de cada grupo experimental (Tabela 3) e imediatamente lavados quatro vezes com solução RPMI, acondicionados individualmente em tubos tipo eppendorf, congelados e mantidos em temperatura de -20°C até o momento de sua utilização.

4.5.2 Extração de DNA

O DNA total de cada amostra foi extraído utilizando o DNeasy® Tissue Kit - Qiagen, segundo protocolo preconizado pelo fabricante, que utiliza a tecnologia avançada da

membrana de gel de sílica. Trata-se de um processo rápido e eficiente de purificação do DNA celular total, sem necessidade de extração orgânica ou precipitação com etanol. Cada amostra de DNA foi eluída em 150 µL de Buffer AE (10 mM de Tris-HCl; 0,5 mM de EDTA; pH 9.0).

4.5.3 Amplificação de DNA relacionado à GP-P

Um fragmento de DNA, relacionado à expressão de GP-P, foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A amplificação foi realizada com uma solução de reação de 50 µL, contendo 5 µL 10x de Taq Buffer, 5 µL 2 mM dNTPs (Dntp Set - Eppendorf®), 2 µL 50 mM MgCl₂, 1 µL de 20mM de primer solutions, 1 U Taq polimerase (Platinum Taq Dna Polimerase High Fidelity - Invitrogen®), 2 ng DNA template e água até completar 50 µL. Um iniciador direto PGP2s (5'-3') com a seguinte sequência: GAAATGACTCAAGCACAAG e um iniciador reverso MX-D (5'-3') com a sequência AGACAAAGACATTCAGAG (invitrogen®) foram empregados para amplificar um fragmento de DNA de 840-bp que codifica a região de ligação de ATP em GP-P e é altamente conservada, com 85-94% de homologia a GP-P ou proteínas relacionadas à resistência múltipla, oriundas de outras fontes (BLACKHALL et al., 1998a).

Após desnaturação inicial a 95°C, durante quatro minutos, foram realizados 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos, anelamento a 53°C durante 30 segundos e alongamento a 70°C durante um minuto e 30 segundos, após a realização dos ciclos, foi mantida a temperatura de 70°C por cinco minutos (termociclador PTC-100 MJResearch Inc®).

Alíquotas dos produtos da PCR foram analisados em eletroforese em ágar gel contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL). Os produtos restantes foram purificados utilizando QIAquick (Qiagen) e eluído em água para seqüenciamento.

4.5.4 Amplificação de DNA relacionado aos canais de cloro ativados por glutamato (GluCl)

Para a amplificação de um fragmento de DNA relacionado à expressão dos canais de cloro ativados por glutamato, preparou-se uma solução de reação contendo 5 µL 10x de Taq Buffer, 5 µL 2 mM dNTPs (Dntp Set - Eppendorf®), 2 µL 50 mM MgCl₂, 1 µL de 20mM de primer solutions, 1 U Taq polimerase (Platinum Taq Dna Polimerase High Fidelity - Invitrogen®), 2 ng DNA template e água até completar 50 µL. Um iniciador direto F4275 (5'-3') com a seguinte seqüência: GAA TTT TTC TTA CAG GTT GG e um iniciador reverso R603 (5'-3') com a seqüência CGG TTT TTC CTC TTT CCA (invitrogen®).

Após desnaturação inicial a 94°C, durante três minutos, foram realizados 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 segundos, anelamento a 53°C durante 25 segundos e alongamento a 72°C durante 20 segundos. Após a realização dos ciclos, foi mantida a temperatura de 72°C por cinco minutos.

Alíquotas dos produtos da PCR foram analisados em eletroforese em ágar gel contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL). Os produtos restantes foram purificados utilizando QIAquick (Qiagen) e eluído em água para seqüenciamento.

4.5.5 PCR para Sequenciamento

As reações para o seqüenciamento foram realizadas em microplacas utilizando 0,5 µL dos terminadores Big Dye, 2 µL de Primer, 1 µL de DNA plasmidial, 3,5 µL de tampão Save Money 2,5 X e completando a reação com H₂O mili-Q estéril para 10 µL.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos da amplificação. A reação foi submetida a um termociclador (PTC-100 MJResearch Inc[®]) seguindo o mesmo programa utilizado anteriormente

4.5.6 Lavagem dos produtos da PCR

Após a reação, as amostras foram preparadas para o seqüenciamento, sendo adicionados 80 µL de isopropanol 75%, em seguida, as placas foram vedadas com selos de alumínio e agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram durante 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas a 4000g, por 30 minutos, a 20°C. Descartado o sobrenadante, as placas foram deixadas por cinco minutos, invertidas em papel absorvente. Nelas, foram adicionados 200 µL de etanol 70%, sendo então novamente seladas e centrifugadas a 4000g, por 10 minutos, a 20°C. Esta última operação foi repetida novamente. Foi colocado um pedaço fino de papel absorvente sob a placa e esta, invertidamente, centrifugada por 20 segundos em aceleração um e breque um. Na seqüência, a placa foi seca por cinco minutos na bomba de vácuo.

Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 9µL de Hi-Di Formamide – Catálogo – P/N 4311320 ABI Prism) e desnaturadas a 95° C por cinco minutos e colocadas no gelo por mais dois minutos.

O sequenciamento dos produtos da PCR foi realizado no sequenciador modelo ABI 3700 – Perkin Elmer.

4.5.7 Análise dos resultados do sequenciamento

As sequências de bases obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) . Para o conjunto de sete amostras amplificadas com cada um dos quatro iniciadores (PGP2, MXD, F 4275 e R603), foram contruídas as matrizes de identidade por meio deste mesmo programa.

Foram pesquisadas analogias com sequências depositadas no banco de dados *Genbank*, por meio do endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

4.6 Análise estatística

Nas avaliações anti-helmínticas em ovinos (itens 4.1 e 4.4), foi utilizado um delineamento do tipo em blocos casualizados. Para Análise de Variância dos dados obtidos, utilizou-se uma transformação [$\log (x + 1)$], preconizada por LITTLE & HILLS (1978). As análises foram realizadas aplicando-se o teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando-se o Software SAS (1996).

Para o cálculo da eficácia terapêutica das formulações ensaiadas, foi utilizada a fórmula recomendada por WOOD et al. (1995).

$$\text{Percentual de eficácia} = \frac{\text{Média do número de helmintos do grupo controle} - \text{Média do número de helmintos do grupo tratado}}{\text{Média do número de helmintos do grupo controle}} \times 100$$

Para a avaliação da atividade reversora do verapamil: teste *in vitro* – migração de larvas em gel de ágar, calculou-se a DL50 de ivermectina contra a cepa resistente isolada de *H. contortus*, sendo utilizadas diluições de 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µMol de ivermectina/0,5 mL (Grupo I). Dos resultados obtidos, construiu-se uma curva sigmóide da relação dose x resposta, sendo os dados das contagens de larvas que migraram pelo gel (sobreviventes) transformados em logaritmo e, posteriormente, normalizados, utilizando o programa GraphPad Prism. Version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, California,. USA, <http://www.graphpad.com>), utilizando-se a seguinte equação:

$$Y = (100 * X^{-1.039}) / [(DL50^{-1.039}) + (X^{-1.039})]$$

Em que:

X= logaritmo da concentração

Y= número de larvas

V. RESULTADOS

5.1 Caracterização de estirpes de *Haemonchus contortus* resistente e susceptível à ivermectina

Não foi possível caracterizar uma estirpe de campo de *H. contortus* susceptível à ivermectina no Estado de São Paulo. Os percentuais de redução de OPG, nos 18 rebanhos ovinos avaliados, demonstraram claramente a insensibilidade, das diferentes estirpes encontradas, à ivermectina. A maior eficácia encontrada foi de 75 % em uma propriedade rural onde não é realizado o controle de verminoses com ivermectina há mais de dois anos.

Em relação à estirpe resistente, a quantificação de *H. contortus* recuperados após a necropsia de ovinos tratados e controle está condensada nas Tabelas 4 (médias aritméticas) e 5 (média geométrica) e ilustrada na Figura 3. Os percentuais de eficácia e os resultados da análise estatística efetuada estão também registrados na Tabela 5 e na Figura 4.

Observou-se maior número de *H. contortus* nos animais tratados com ivermectina do que nos ovinos não tratados (grupo controle), particularmente, em relação ao número de machos deste parasito (Tabela 4). Porém, quando estes dados foram transformados em $\log(x+1)$, médias geométricas, houve um ajuste e o número total de *H. contortus* presentes nos animais tratados foi estatisticamente inferior ($P < 0,05$) ao dos animais controle (Tabela 5). Resultado aceitável em face da discrepância observada no número de nematódeos recuperados no abomaso do ovino número sete.

Tabela 4. Quantificação de *Haemonchus contortus* recolhidos de ovinos dos grupos controle e tratado, necropsiados no sétimo dia pós-tratamento; percentuais de eficácia da ivermectina1%. **Médias aritméticas.** CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Ovino	Tratamento	Total de <i>Haemonchus contortus</i>		
		Machos	Fêmeas	Total
10	Controle	51	52	103
13		100	99	199
18		74	80	154
6		111	94	205
5		137	157	294
média		94,6	96,4	191
113	Ivermectina	13	28	41
7		424	155	579
2		54	18	72
5		194	179	373
6		127	87	214
média		162,4	93,4	255,8
Eficácia (%)		0,00	3,11	0,00

Tabela 5. Quantificação de *Haemonchus contortus* recolhidos de ovinos dos grupos controle e tratado, necropsiados no sétimo dia pós-tratamento; percentuais de eficácia da ivermectina1% e análise estatística. **Médias geométricas.** CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Ovino	Tratamento	Total de <i>Haemonchus contortus</i>		
		Machos	Fêmeas	Total
10	Controle	1,7160	1,7243	2,0170
13		2,0043	2,0000	2,3010
18		1,8751	1,9085	2,1903
6		2,0492	1,9777	2,3139
5		2,1399	2,1987	2,4698
total		9,7845	9,8091	11,2921
média		89,55 ^b	90,59 ^a	180,31 ^a
113	Ivermectina	1,1461	1,4624	1,6128
7		2,6284	2,1931	2,7634
2		1,7404	1,2788	1,8633
5		2,2900	2,2553	2,5729
6		2,1072	1,9445	2,3324
total		9,9121	9,1340	11,1448
média		95,03 ^a	66,11 ^b	168,42 ^b
Eficácia (%)		0,00	27,02	6,59
Valor de F		0,0848	0,1531	0,1229
Probabilidade de significância do valor de F		0,0174	0,0482	0,0333

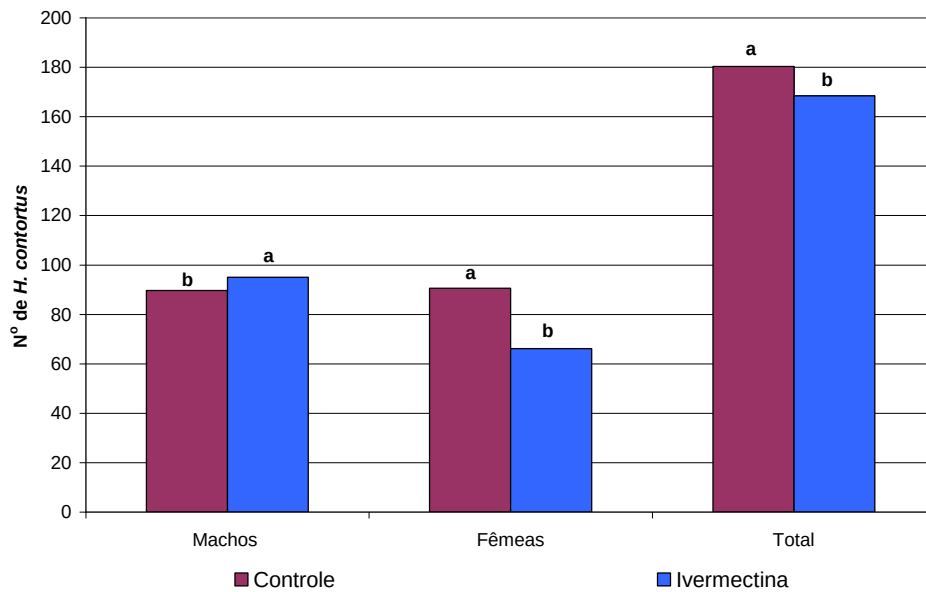


Figura 3. Número de *Haemonchus contortus* recolhidos de ovinos dos grupos controle e tratado, necropsiados no sétimo dia pós-tratamento. **Médias geométricas.** CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

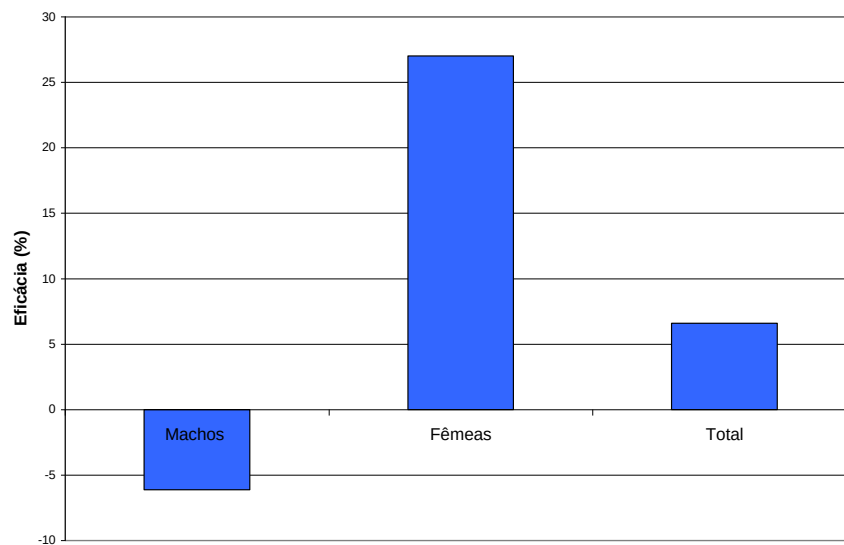


Figura 4. Percentuais de eficácia (médias geométricas) da ivermectina 1% em ovinos naturalmente infectados e necropsiados no sétimo dia pós-tratamento. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

A ivermectina 1% apresentou eficácia nula (-33,97%) quando calculada por meio de médias aritméticas e alcançou 6,59% utilizando-se médias geométricas, sendo, desta maneira, demonstrada claramente a resistência desta população de *H. contortus*.

5.2. Avaliação da atividade reversora do verapamil: teste *in vitro* – migração de larvas em gel de agar.

Na Figura 5 está apresentada a curva sigmóide da relação dose x resposta, utilizando-se apenas ivermectina em concentrações crescentes (Grupo I). O valor da DL50 de ivermectina foi de 4,317 μMol , obtido por meio de análise de regressão não linear, com 95% de probabilidade deste valor encontrar-se entre 3,045 e 5,900 μMol

A curva sigmóide da relação dose x resposta da ivermectina associada a 2mM de verapamil (Grupo II) está apresentada na Figura 6.

Os percentuais de eficácia da ivermectina em diferentes concentrações isoladamente (Grupo I) e associada ao verapamil (Grupo II) estão apresentados na Tabela 6.

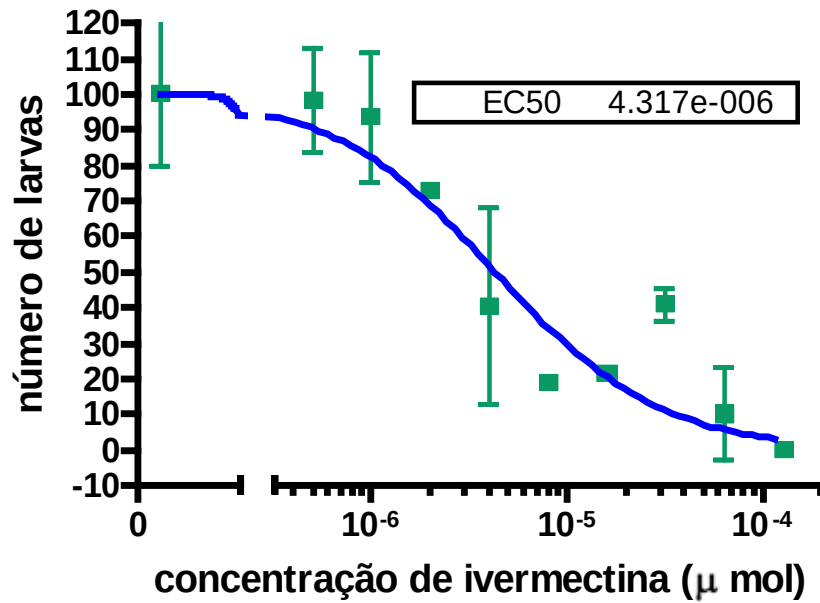


Figura 5. Curva dose x resposta da ivermectina contra a cepa de *Haemonchus contortus* resistente (grupo I) e resultado do cálculo da DL50. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

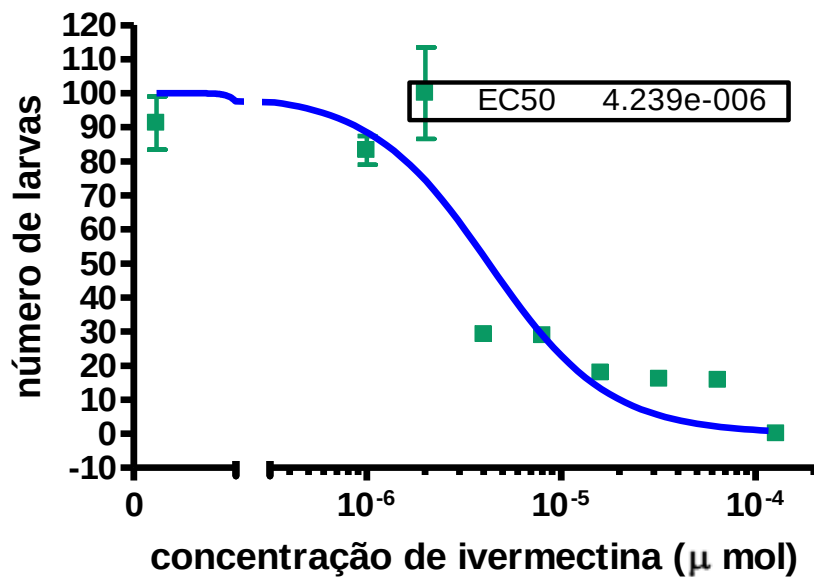


Figura 6. Curva dose x resposta da ivermectina associada a 2mM de verapamil (grupo II) contra a cepa de *Haemonchus contortus* resistente e resultado do cálculo da DL50. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Tabela 6. Número médio de larvas de *Haemonchus contortus* sobreviventes e percentuais de eficácia da ivermectina em diferentes diluições, isoladamente (Grupo I) e associada ao Verapamil (Grupo II), provenientes do teste in vitro. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Grupo I: Ivermectina			Grupo II: Ivermectina + 2 mM Verapamil		
Ivermectina (μ M/0,5 ml)	Número de larvas	Eficácia	Ivermectina (μ M/0,5 ml)	Número de larvas	Eficácia
zero*	572	-	zero*	2197	-
1	548	4,2	1	2050	6,69
2	474	17,2	2	2357	0,00
4	356	37,8	4	1063	51,62
8	278	51,4	8	1057	51,89
16	288	49,7	16	857	60,99
32	358	37,4	32	823	62,52
64	246	56,9	64	817	62,83
128	210	63,3	128	530	75,88

* As triplicatas receberam apenas água destilada, servindo como grupo controle

Na Tabela 7, estão registrados as médias de larvas sobreviventes à exposição ao verapamil em concentrações crescentes (Grupo III) e da associação deste com a ivermectina DL50 (Grupo IV), assim como os percentuais de eficácia.

Tabela 7. Número médio de larvas de *Haemonchus contortus* sobreviventes e percentuais de eficácia do verapamil em diferentes diluições, isoladamente (Grupo III) e associado à ivermectina (Grupo IV). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Grupo III: Verapamil			Grupo IV: Ivermectina (LD50) + Verapamil		
Verapamil (m mol)	Número de larvas	Eficácia	Verapamil (m mol)	Número de larvas	Eficácia
zero*	467	-	zero	219	53,1
1	420	10,0	1	310	33,6
2	417	10,7	2	177	62,1
5	417	10,7	5	157	66,4
10	430	7,9	10	180	61,4
100	458	1,9	100	27	94,3

* As triplicatas receberam apenas água destilada, servindo como grupo controle

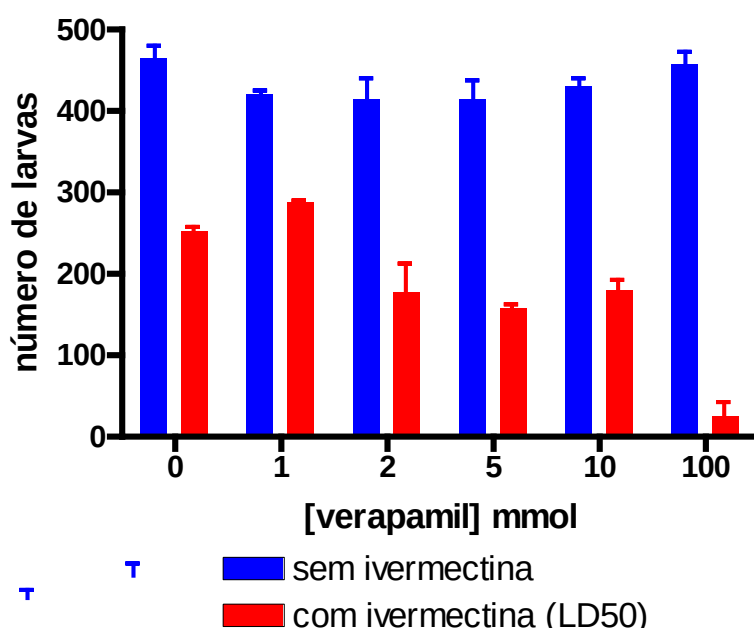


Figura 7. Número médio e desvio padrão de larvas da cepa de *H. contortus* resistente, sobreviventes ao tratamento com verapamil em diferentes diluições, isoladamente (Grupo III) e associado à ivermectina (Grupo IV). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Os resultados de contagens de larvas após tratamento com verapamil isoladamente e DL50 de ivermectina + verapamil, grupos III e IV, respectivamente, estão ilustrados na Figura 7.

O verapamil isoladamente não apresentou ação nematocida (Grupo II), mesmo em altas concentrações (100mM).

A ivermectina associada ao verapamil (grupo II), quando comparada a esta lactona macrocíclica administrada isoladamente (grupo I), apresentou percentuais de eficácia superiores, exceto na concentração de 2 μ M/0,5mL. Observou-se que na concentração de 128 μ M/0,5mL de ivermectina houve aumento de 12,55% de eficácia quando adicionou-se 2mM de verapamil (Tabela 6).

Em contraste a estes resultados, a DL50 da ivermectina associada ao verapamil, contra a estirpe resistente de *H. contortus* (Figura 6), permaneceu semelhante à da ivermectina isolada (Figura 5).

Os resultados apresentados na Tabela 7 demonstram que concentrações crescentes de verapamil associado à ivermectina (DL50) resultaram em aumento dos percentuais de eficácia da ivermectina contra a cepa resistente de *H. contortus* (Grupo IV). Verapamil na concentração de 1 mM não causou aumento na eficácia da ivermectina, porém, nas concentrações de 2, 5 e 10, observou-se efeito reversor à resistência, com acréscimo de 8,3% a 13,3% na eficácia antihelmíntica. A ivermectina (DL50) administrada isoladamente apresentou eficácia de 53,1% contra larvas da estirpe resistente de *H. contortus*, enquanto esta mesma concentração de ivermectina associada a 100 mM de verapamil atingiu eficácia de 94,3%, ou seja, aumento de 41,2%.

5.3 Avaliação da atividade reversora do verapamil: teste *in vivo* – avaliação anti-helmíntica em ovinos experimentalmente infectados.

Os resultados das contagens médias aritméticas de OPG em ovinos dos grupos controle e tratados estão inseridos na Tabela 8.

A quantificação de *H. contortus* recolhidos nos abomasos dos em ovinos pertencentes aos controle e tratados, assim como os percentuais de eficácia, estão apresentados nas Tabelas 9 (médias aritméticas) e 10 (médias geométricas).

Ao final do estudo, não foi observada qualquer reação, de natureza local ou sistêmica, em decorrência da administração de verapamil e de ivermectina.

Os resultados das contagens de OPG (Tabela 8) demonstram que houve aumento do número de ovos de *H. contortus* eliminados junto às fezes dos animais de todos os grupos, tratados e não tratado, em relação ao dia zero. Em relação ao grupo controle, apenas o tratamento ivermectina 1% + verapamil 15% (veículo oleoso) apresentou eficácia anti-helmíntica, embora tenha sido um valor muito reduzido (14,84%).

O verapamil administrado isoladamente, assim como foi observado nos resultados do teste *in vitro*, não apresentou atividade anti-helmíntica.

TABELA 8. Contagens médias de OPG*, realizadas em ovinos dos grupos controle e tratados. Médias aritméticas. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

TRATAMENTO	Contagens de OPG / Dias pós-tratamento					
		0**	1	3	5	7
Ivermectina 1%	Média	3533	2777	2348	4563	8166
	Eficácia (%)	-	17,48	46,90	9,88	0,00
Verapamil (veic. oleoso)	Média	3569	3373	5970	5947	10363
	Eficácia (%)	-	0,00	0,00	0,00	0,00
Verapamil (veic. aquoso) 3X	Média	3533	3617	4095	7429	11576
	Eficácia (%)	-	0,00	7,40	0,00	0,00
Ivermectina 1% + Verapamil aquoso	Média	3415	4292	3608	4963	10006
	Eficácia (%)	-	0,00	18,41	1,99	0,00
Ivermectina 1%+Verapamil 15%	Média	3585	2145	2432	4069	6165
	Eficácia (%)	-	36,27	45,00	19,64	14,84
Ivermectina 2%+Verapamil 15%	Média	3657	2910	2591	5594	8130
	Eficácia (%)	-	13,51	41,41	0,00	0,00
Controle	Média	3520	3365	4423	5063	7240

Observou-se ineficácia da ivermectina administrada isoladamente, o que confirma o fenótipo de resistência na estirpe de *H. contortus*, isolada e inoculada nos ovinos experimentais (Tabela 9).

A ivermectina administrada concomitantemente ao verapamil em veículo aquoso, porém em formulações distintas, apresentou eficácia de 36,02%, sendo 29,89% contra machos e 42,15% contra as fêmeas de *H. contortus*. Este valor foi 4,65 vezes maior que o apresentado pelo endectocida administrado isoladamente (7,75%). Estes resultados demonstram uma reversão parcial da resistência deste nematódeo à ivermectina.

TABELA 9. Contagens médias de *Haemonchus contortus*, realizadas em ovinos dos grupos controle e tratados. Médias geométricas. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

TRATAMENTO	Número de <i>Haemonchus contortus</i>			
		Machos	Fêmeas	Total
Ivermectina 1%	Média	408	506	937
	Eficácia (%)	9,43	7,26	7,75
Verapamil (veic. oleoso)	Média	480	597	1087
	Eficácia (%)	0,00	0,00	0,00
Verapamil (veic. aquoso) 3X	Média	338	440	789
	Eficácia (%)	24,95	19,43	22,35
Ivermectina 1% + Verapamil aquoso	Média	316	316	650
	Eficácia (%)	29,89	42,15	36,02
Ivermectina 1%+Verapamil 15%	Média	415	566	995
	Eficácia (%)	7,97	0,00	2,14
Ivermectina 2%+Verapamil 15%	Média	468	538	1042
	Eficácia (%)	0,00	1,34	0,00
Controle	Média	451	546	1016

A associação verapamil e ivermectina (1% ou 2%) em uma mesma formulação, contendo veículo oleoso, não causou aumento na eficácia anti-helmíntica da ivermectina contra esta estirpe resistente de *H. contortus*, sendo encontrado elevado número de parasitos nos animais tratados.

5.4 Estudo genotípico relacionado à glicoproteína P e canais de cloro ativados por glutamato na estirpe de *H. contortus* resistente à ivermectina

5.4.1 Glicoproteína P

Os fragmentos de DNA amplificados por meio da PCR, foram analisados em eletroforese em ágar gel (1%) contendo brometo de etídio (Figura 8). As sete amostras, oriundas de ovinos submetidos a tratamento com ivermectina, verapamil e/ou a associação entre estes dois fármacos, apresentaram uma banda com o tamanho de aproximadamente 840 pares de base, o que indica que esta população de *H. contortus* após exposição ou não aos tratamentos supracitados, apresentou o mesmo padrão em relação a este gene.

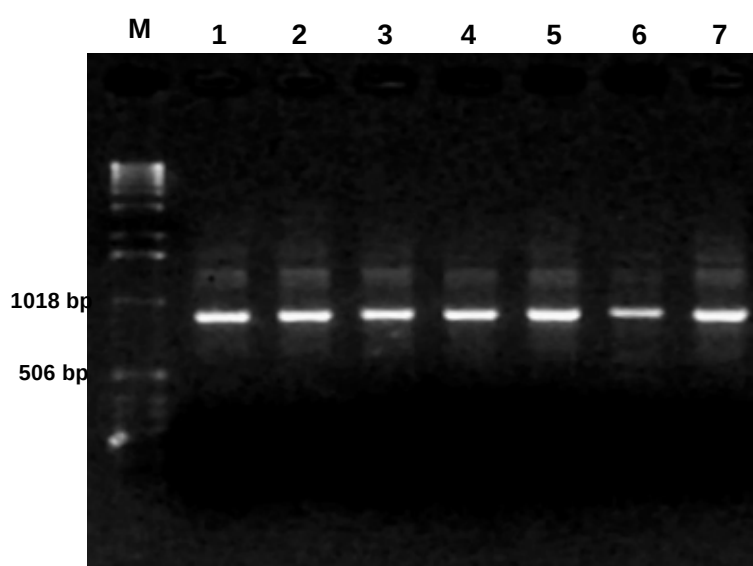


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de amostras de *H. contortus*, submetido a diferentes tratamentos: (M) Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; 1) Controle. (2) Ivermectina, sc (200 mcg/kg); (3) Verapamil veículo oleoso (3 mg/kg); (4) Verapamil veículo aquoso (3 mg/kg, 3x a cada 12 horas); (5) Ivermectina, sc (200 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg, 3x a cada 12 horas); (6) Ivermectina, sc (200 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg); (7) Ivermectina, sc (400 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg)

As sequência de bases do produtos de PCR obtidos com os iniciadores PGP2S e MX-D a partir do DNA genômico de amostras de *H. contortus* submetidas a diferentes tratamentos, estão apresentadas nas Figuras 9 e 10.

As matrizes de identidade das sequências, obtidas após amplificação com estes dois iniciadores, estão inseridas nas Tabelas 9 e 11.

Não foi observada nenhuma homologia com qualquer sequência depositada no *GenBank*.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
1 PGP2 GAGAGGAGTTTTNGGTCAGACNCGTTCGTTTTTCATCTATACTACCCGNNTCGCTAGTCAGAGCCTGNAGTTTCATAGTGAAGACCTCCCTTGATGT
2 PGP2 GAGAGGAGTTTTNGGTCAGANCGTTCGTTTTTCATCTAAACGTACCCGTCAGTCGCTAGTCAGAGCCTGAAGTTTCATAGTGAAGACCTCCCTTGATGT
3 PGP2 GAGAGGAGTTTNGGTCAGATCCCTTCGTTTTTCATCTATACGTACCCGTCGCTAGTCAGAGCCTGAAGTTTCATAGTGAAGACCTCCCTTGATGT
4 PGP2 GAGAGGAGTTTTAGGTCAGANCGTTCGTTTTTCATCTAAACGTACCCGTCAGTCGCTAGTCAGAGCCTGAAGTTTCATAGTGAAGACCTCCCTTGATGT
5 PGP2 GAGAGGAGTTTTAGGTCAGACCGATTCGTTTTTCATCTAAACGTACCCGTCAGTCGCTAGTCAGAGCCTGAAGTTTCATAGTGAAGACCTCCCTTGATGT
6 PGP2 GAGAGGAGTTTTAGGTCANNCAGTTCGTTTTTCATCTAAACGTANCCNTAGTCGCTANTCAANGCCTGAAGTTTCATAGTGAAGACCTCCCTTGATGT
7 PGP2 GAGAGGAGTTTTAGGTCAGANTCCTTCGTTTTTCATCTAAACGTACCCGTCAGTCGCTAGTCAGAGCCTGAAGTTTCATAGTGAAGACCTCCCTTGATGT

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
1 PGP2 TTTTGATTGCGAATCGGACGCTCATAATCGCAGAGGTCAACCAACTCGGCGACTTCAACCAATCCAGCGCCATTGATTGACGCAAAAGCGTCGAGCGCTA
2 PGP2 TTTTGATTGCGAATCGGACGCTCATAATCGCAGAGGTCAACCAACTCGGCGACTTCAACCAATCCAGCGCCATTGATTGACGCAAAAGCGTCGAGCGCTA
3 PGP2 TTTTGATTGCGAATCGGACGCTCATAATCGCAGAGGTCAACCAACTCGGCGACTTCAACCAATCCAGCGCCATTGATTGACGCAAAAGCGTCGAGCGCTA
4 PGP2 TTTTGATTGCGAATCGGACGCTCATAATCGCAGAGGTCAACCAACTCGGCGACTTCAACCAATCCAGCGCCATTGATTGACGCAAAAGCGTCGAGCGCTA
5 PGP2 TTTTGATTGCGAATCGGACGCTCATAATCGCAGAGGTCAACCAACTCGGCGACTTCAACCAATCCAGCGCCATTGATTGACGCAAAAGCGTCGAGCGCTA
6 PGP2 TTTTGATTGCGAATCGGACGCTCATAATCGCAGAGGTCAACCAACTCGGCGACTTCAACCAATCCAGCGCCATTGATTGACGCAAAAGCGTCGAGCGCTA
7 PGP2 TTTTGATTGCGAATCGGACGCTCATAATCGCAGAGGTCAACCAACTCGGCGACTTCAACCAATCCAGCGCCATTGATTGACGCAAAAGCGTCGAGCGCTA

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
1 PGP2 AGCGTCGGCGGGCAAGCGGCTCAATCAGTGGCGCTGTGCTCACTTGAGAGCGCGCGTCGTCGATCGATACCATGAGTCTGTGTTTGATACCTTTCCG
2 PGP2 AGCGTCGGCGGGCAAGCGGCTCAATCAGTGGCGCTGTGCTCACTTGAGAGCGCGCGTCGTCGATCGATACCATGAGTCTGTGTTTGATACCTTTCCG
3 PGP2 AGCGTCGGCGGGCAAGCGGCTCAATCAGTGGCGCTGTGCTCACTTGAGAGCGCGCGTCGTCGATCGATACCATGAGTCTGTGTTTGATACCTTTCCG
4 PGP2 AGCGTCGGCGGGCAAGCGGCTCAATCAGTGGCGCTGTGCTCACTTGAGAGCGCGCGTCGTCGATCGATACCATGAGTCTGTGTTTGATACCTTTCCG
5 PGP2 AGCGTCGGCGGGCAAGCGGCTCAATCAGTGGCGCTGTGCTCACTTGAGAGCGCGCGTCGTCGATCGATACCATGAGTCTGTGTTTGATACCTTTCCG
6 PGP2 AGCGTCGGCGGGCAAGCGGCTCAATCAGTGGCGCTGTGCTCACTTGAGAGCGCGCGTCGTCGATCGATACCATGAGTCTGTGTTTGATACCTTTCCG
7 PGP2 AGCGTCGGCGGGCAAGCGGCTCAATCAGTGGCGCTGTGCTCACTTGAGAGCGCGCGTCGTCGATCGATACCATGAGTCTGTGTTTGATACCTTTCCG

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
1 PGP2 ATTTGATTATTTGGCGTAGAGTCAGTTAGTTTGTATATATGGACTTGTTTTTTTNCNNTTNNACNACGGAAGGAAGAGGACCAANTTCCGCCTNTN
2 PGP2 ATTTGATTATTTGGCGTAGAGTCAGTTAGTTTGTATATATGGACTTGTTTTTTTNCNNTTNNACNACGGAAGGAAGAGGACCAANTTCCGCCTNTN
3 PGP2 ATTTGATTATTTGGCGTAGAGTCAGTTAGTTTGTATATATGGACTTGTTTTTTTNCNNTTNNACNACGGAAGGAAGAGGACCAANTTCCGCCTNTN
4 PGP2 ATTTGATTATTTGGCGTAGAGTCAGTTAGTTTGTATATATGGACTTGTTTTTTTNCNNTTNNACNACGGAAGGAAGAGGACCAANTTCCGCCTNTN
5 PGP2 ATTTGATTATTTGGCGTAGAGTCAGTTAGTTTGTATATATGGACTTGTTTTTTTNCNNTTNNACNACGGAAGGAAGAGGACCAANTTCCGCCTNTN
6 PGP2 ATTTGATTATTTGGCGTAGAGTCAGTTAGTTTGTATATATGGACTTGTTTTTTTNCNNTTNNACNACGGAAGGAAGAGGACCAANTTCCGCCTNTN
7 PGP2 ATTTGATTATTTGGCGTAGAGTCAGTTAGTTTGTATATATGGACTTGTTTTTTTNCNNTTNNACNACGGAAGGAAGAGGACCAANTTCCGCCTNTN

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
1 PGP2 ANAAAAANNCNNAAGAACNNNGTNAANNNANCNNNCNNTTGGCNCAAACCGGNACNTNGCNNNACAAANNANNCNNCCNNNCNNAANNAACNNTTGGAC
2 PGP2 ANAAAAANNCNNAAGAACNNNGTNAANNNANCNNNCNNTTGGCNCAAACCGGNACNTNGCNNNACAAANNANNCNNCCNNNCNNAANNAACNNTTGGAC
3 PGP2 ANAAAAANNCNNAAGAACNNNGTNAANNNANCNNNCNNTTGGCNCAAACCGGNACNTNGCNNNACAAANNANNCNNCCNNNCNNAANNAACNNTTGGAC
4 PGP2 ANAAAAANNCNNAAGAACNNNGTNAANNNANCNNNCNNTTGGCNCAAACCGGNACNTNGCNNNACAAANNANNCNNCCNNNCNNAANNAACNNTTGGAC
5 PGP2 ANAAAAANNCNNAAGAACNNNGTNAANNNANCNNNCNNTTGGCNCAAACCGGNACNTNGCNNNACAAANNANNCNNCCNNNCNNAANNAACNNTTGGAC
6 PGP2 ANAAAAANNCNNAAGAACNNNGTNAANNNANCNNNCNNTTGGCNCAAACCGGNACNTNGCNNNACAAANNANNCNNCCNNNCNNAANNAACNNTTGGAC
7 PGP2 ANAAAAANNCNNAAGAACNNNGTNAANNNANCNNNCNNTTGGCNCAAACCGGNACNTNGCNNNACAAANNANNCNNCCNNNCNNAANNAACNNTTGGAC

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
1 PGP2 GCNGTCNNNGAANGCCCCCATNNNGTTANNACNCCNNTNNTGGCATCAGAAATCCGNGGGGATGNTGGTCCTNAAAAATAAAAGTNTTTTCAANAANA
2 PGP2 NGTNNNNGGAANNCCCCCACNCGGTTNATNCNCCTTAGTGGCATCAGAAATCCGNGGGGATGNTGGTNCNTNATAAAATAAAANGAATTTCCAGAAAA
3 PGP2 NGTNNNNGGAANNCCCCCACNCGGTTTATACCAACNATNTGGCANCCGAATCCAGGNGANNCGGGTCTTCTAGTCAAAATAGAGGNTTTTNCANANATA
4 PGP2 GTACTCTGAAAGCNCCCTCTGCTTTTATACCATCCTGCTGNCATCAGAAACAGGTGAATGCTTCTTCTAATAGAAATAGAAAGTANTTTTCAAAAAANT
5 PGP2 NNNANNCNNAANCCCCCNCCCTGGTTNTTACNCCNNTNANGGATCCNAAACCGGGGANGCGGTTNCTNANAAAAANNAANNTTTTCAAAAAATC
6 PGP2 NNNNNCNNAANCCCCCNCCCTGGTTNTTACNCCNNTCCGTANTGNCATCCGAANCCNGGGAATGNTGGTCTTAATANAATAAAAGTANTTTTCAANAATAAT
7 PGP2 NGTANTNNGAANCCCCCACNCGGTTTATACNCCNNNNNGCAATNGAATCCGNGGGGANGGNTNTTNTAAAAANAAAAAGAAATTTTTCNANAATAAT

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
1 PGP2
2 PGP2
3 PGP2
4 PGP2
5 PGP2
6 PGP2
7 PGP2

```

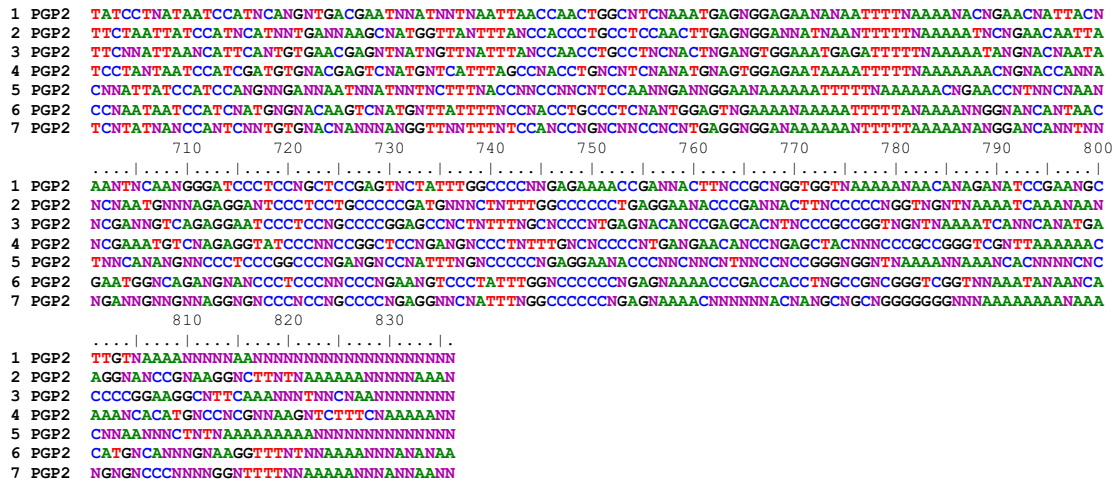


Figura 9. Sequências alinhadas dos produtos das sete amostras de *H. contortus*, submetidas a diferentes tratamentos*, amplificadas por meio da PCR, utilizando-se o iniciador PGP-2. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Tabela 10. Matriz de identidade das sequências de bases das amostras submetidas a diferentes tratamentos* e amplificadas com o iniciador PGP2.

	1 PGP2	2 PGP2	3 PGP2	4 PGP2	5 PGP2	6 PGP2	7 PGP2
1* PGP2	ID	0,606	0,304	0,559	0,635	0,580	0,619
2* PGP2	0,606	ID	0,420	0,647	0,694	0,680	0,751
3* PGP2	0,304	0,420	ID	0,329	0,372	0,368	0,413
4* PGP2	0,559	0,647	0,329	ID	0,601	0,688	0,617
5* PGP2	0,635	0,694	0,372	0,601	ID	0,681	0,682
6* PGP2	0,580	0,680	0,368	0,688	0,681	ID	0,675
7* PGP2	0,619	0,751	0,413	0,617	0,682	0,675	ID

* (1) Controle. (2) Ivermectina, sc (200 mcg/kg); (3) Verapamil veículo oleoso (v.o.) (3 mg/kg); (4) Verapamil veículo aquoso (v.a.) (3 mg/kg, 3x a cada 12 horas); (5) Ivermectina, sc (200 mcg/kg) + Verapamil (v.a.) (3 mg/kg, 3x a cada 12 horas); (6) Ivermectina, sc (200 mcg/kg) + Verapamil (v.o.) (3 mg/kg); (7) Ivermectina, sc (400 mcg/kg) + Verapamil (v.o.) (3 mg/kg).

Observou-se que as sete subpopulações, pertencentes à mesma população de *H. contortus* resistente à ivermectina, expostas a sete diferentes tratamentos apresentaram semelhança nas sequências de bases sequenciadas (Tabelas 10 e 11).

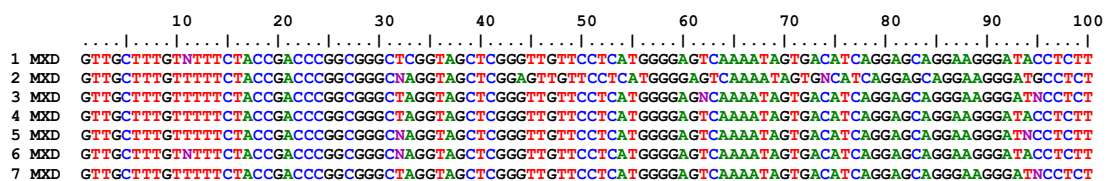




Figura 10. Sequências alinhadas dos produtos das sete amostras de *H. contortus*, submetidas a diferentes tratamentos*, amplificadas por meio da PCR, utilizando-se o iniciador MXD. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Tabela 11. Matriz de identidade das sequências de bases das amostras submetidas a diferentes tratamentos* e amplificadas com o iniciador MXD. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

	1 MXD	2 MXD	3 MXD	4 MXD	5 MXD	6 MXD	7 MXD
1 MXD	ID	0,328	0,347	0,670	0,684	0,667	0,390
2 MXD	0,328	ID	0,365	0,318	0,314	0,320	0,383
3 MXD	0,347	0,365	ID	0,359	0,357	0,358	0,670
4 MXD	0,670	0,318	0,359	ID	0,683	0,751	0,420
5 MXD	0,684	0,314	0,357	0,683	ID	0,754	0,382
6 MXD	0,667	0,320	0,358	0,751	0,754	ID	0,464
7 MXD	0,390	0,383	0,670	0,420	0,382	0,464	ID

* 1) Controle. (2) Ivermectina, sc (200 mcg/kg); (3) Verapamil veículo oleoso (3 mg/kg); (4) Verapamil veículo aquoso (3 mg/kg, 3x a cada 12 horas); (5) Ivermectina, sc (200 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg, 3x a cada 12 horas); (6) Ivermectina, sc (200 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg); (7) Ivermectina, sc (400 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg)

5.4.2 Canais de cloro ativados por glutamato (HcGluCl)

Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em ágar gel (1%) contendo brometo de etídio. Observou-se que as sete amostras apresentaram uma banda de aproximadamente 200 pares de bases (pb), relacionada com a subunidade α do canal HcGluCl bem definida e sem a presença de bandas inespecíficas (Figura 11).

Estes sete produtos de PCR foram seqüenciados e os resultados estão apresentados nas Figuras 12 e 13, referentes aos iniciadores F4275 e R603, respectivamente.

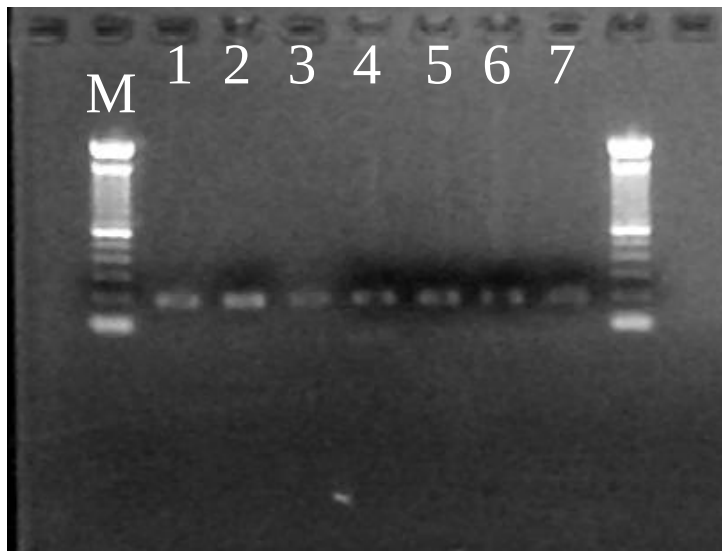


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de amostras de *H. contortus*, submetido a diferentes tratamentos: (M) Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder Invitrogen®; 1) Controle. (2) Ivermectina, sc (200 mcg/kg); (3) Verapamil veículo oleoso (3 mg/kg); (4) Verapamil veículo aquoso (3 mg/kg, 3x a cada 12 horas); (5) Ivermectina, sc (200 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg, 3x a cada 12 horas); (6) Ivermectina, sc (200 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg); (7) Ivermectina, sc (400 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg)

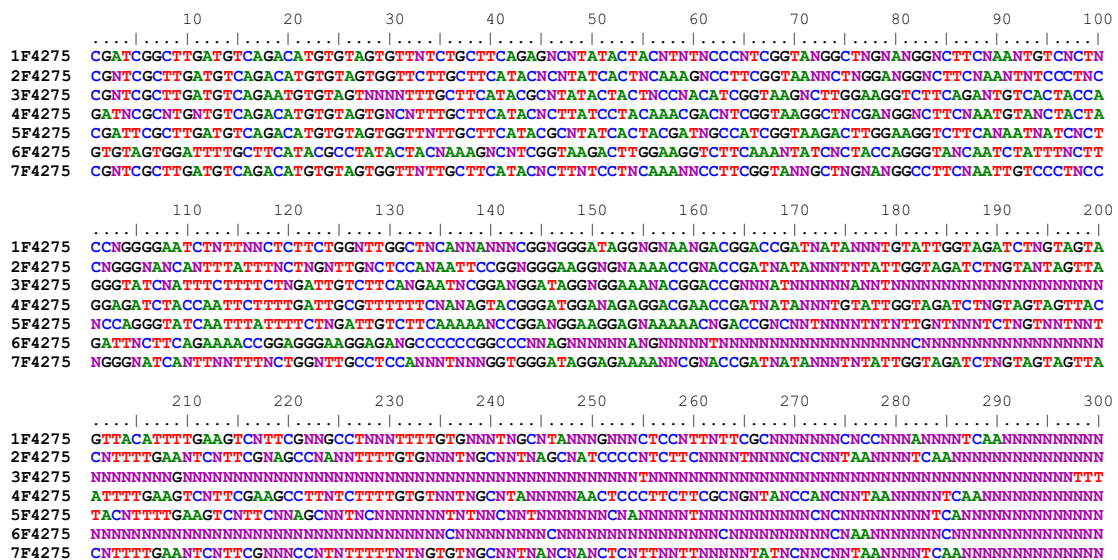


Figura 12. Sequências alinhadas dos produtos das sete amostras de *H. contortus*, submetidas a diferentes tratamentos*, amplificadas por meio da PCR, utilizando-se o iniciador F4275. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

Tabela 13. Matriz de identidade das sequências de bases das amostras submetidas a diferentes tratamentos* e amplificadas com o iniciador R603. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil.

	1 R603	2 R603	3 R603	4 R603	5 R603	6 R603	7 R603
1 R603	ID	0,446	0,544	0,267	0,611	0,321	0,285
2 R603	0,446	ID	0,486	0,250	0,325	0,388	0,281
3 R603	0,544	0,486	ID	0,263	0,366	0,343	0,276
4 R603	0,267	0,250	0,263	ID	0,258	0,209	0,200
5 R603	0,611	0,325	0,366	0,258	ID	0,334	0,285
6 R603	0,321	0,388	0,343	0,209	0,334	ID	0,281
7 R603	0,285	0,281	0,276	0,200	0,285	0,281	ID

*1) Controle. (2) Ivermectina, sc (200 mcg/kg); (3) Verapamil veículo oleoso (3 mg/kg); (4) Verapamil veículo aquoso (3 mg/kg, 3x a cada 12 horas); (5) Ivermectina, sc (200 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg, 3x a cada 12 horas); (6) Ivermectina, sc (200 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg); (7) Ivermectina, sc (400 mcg/kg) + Verapamil (3 mg/kg)

VI. DISCUSSÃO

Devido à forma errônea como o controle de verminose em ovinos vem sendo realizado na região sudeste do Brasil, sobretudo pelo uso indiscriminado de anti-helmínticos, a prevalência de populações de helmintos, resistentes à ivermectina, tem alcançado índices elevados, sendo observados casos de resistência múltipla às drogas, como relatado por SOUTELLO et al. (2006) na região noroeste de São Paulo. Por esta razão, não foi possível, identificar e isolar uma estirpe de *H. contortus* sensível à ivermectina, que seria utilizada no estudo. A dificuldade encontrada para identificar uma cepa sensível à ivermectina, ressalta, ainda mais, a importância de pesquisas em medidas complementares e no desenvolvimento de drogas reversoras.

Os resultados do teste anti-helmíntico controlado realizado para a caracterização da estirpe de campo de *H. contortus* demonstraram diferença na atividade nematodocida da ivermectina em relação ao sexo do parasito, ou seja, eficácia nula contra os indivíduos machos e 27,02% contra fêmeas. Segundo LE JAMBRE et al. (2000), a resistência à ivermectina é uma característica genética completamente dominante e ligada ao sexo, considerando-se os machos de *H. contortus* mais susceptíveis do que as fêmeas, fato contrário ao observado neste experimento.

A eficácia contra *H. conturtus* apresentada pela ivermectina (6,59%) permite inferir que esta população era resistente, uma vez que para uma estirpe de nematódeo pode ser denominada resistente quando mais de 1000 vermes sobrevivem ao tratamento ou quando a eficácia de um determinado princípio químico, calculada por meio de médias geométricas, é inferior a 90% (FAO, 2004).

Quando foram utilizadas as médias aritméticas para o cálculo de eficácia anti-helmíntica, observou-se eficácia nula da ivermectina, embora o recomendado seja a utilização de médias geométricas que representam melhor a distribuição do número de ovos ou da população de nematódeos em um grupo de animais, fornecendo, assim, percentuais de eficácia mais precisos (WOOD et al., 1995).

A metodologia utilizada para a realização do teste de migração de larvas em gel de ágar apresentou-se como uma forma prática, pouco onerosa e rápida para avaliação de eficácia de formulações anti-helmínticas, mostrando-se, ainda, como uma possível ferramenta para o diagnóstico de resistência de nematódeos parasitos de ruminantes.

MOLENTO & PRICHARD (2001), empregando a mesma metodologia, obtiveram resultados semelhantes aos do presente trabalho. Foram utilizadas duas populações de *H. contortus* selecionadas após 17 passagens (gerações) em ovinos para resistência à ivermectina (IVF17) e à moxidectina (MOF17), sendo observadas eficácias de 41% e 63% para a moxidectina isoladamente e associada a 2nM de verapamil, respectivamente, assim como 55% e 84% para a ivermectina, contra a estirpe MOF17. Contra a população IVF17, foi observado efeito significativo ($P < 0,05$) apenas na associação moxidectina e verapamil.

A reversão parcial da resistência pelo verapamil em *H. contortus* também foi observada por BEUGNET et al. (1997), utilizando teste *in vitro* de eclodibilidade de ovos em isolados susceptíveis e resistentes a benzimidazóis. Observou-se redução da DL50 de tiabendazole e albendazole quando associados ao verapamil, sendo este efeito mais acentuado em populações resistentes do que nas sensíveis. Também não foi observada reversão total da resistência após o uso de verapamil.

Os resultados do presente experimento estão de acordo com os encontrados para outras drogas moduladoras da P-GP. A exposição prévia de ovos de *H. contortus* à lecitina aglutinina de *Lens culinaris* (lentilha) resultou em redução da DL50 do tiabendazol em 50,9% em uma estirpe susceptível e 47,2% e 27,4% em dois isolados resistentes, sendo desconhecido ainda o exato mecanismo pelo qual isso ocorreu (KERBOUEF et al., 2002). Estes resultados são contrários aos demais trabalhos supracitados em que a ação de drogas moduladoras da GP-P foi mais acentuada em estirpes resistentes.

O efeito de itraconazol e valspodar como moduladores de GP-P foi avaliado por BALLENT ET AL. (2006) por meio de teste *in vitro*, empregando o modelo do saco intestinal invertido, e *in vivo*. Observou-se que o acúmulo de ivermectina na parede intestinal foi maior quando associada ao itraconazol (0,115 nmol/g/min) e ao valspodar (0,238 nmol/g/min) do que quando administrada isoladamente (0,016 nmol/g/min), devido à ação moduladora da GP-P, destas drogas. Segundo estes autores, os agentes moduladores de GP-P podem ser uma ferramenta útil para melhorar os parâmetros farmacocinéticos de anti-helmínticos.

Ivermectina e verapamil são substratos para a GP-P, sendo transportados por esta proteína de membrana. No entanto, as taxas de efluxo destas drogas e dos demais moduladores de GP-P são diferentes, ou seja, a afinidade, velocidade e quantidade de transporte podem variar. Os fatores que influenciam na ligação e no transporte pela GP-P ainda não foram totalmente elucidados. Aparentemente, interações hidrofóbicas são responsáveis pela ligação entre a droga e a proteína, enquanto a carga catiônica associada à lipofilicidade da droga está relacionada ao seu transporte (efluxo). Devido a

estas características, a ivermectina é transportada cerca de nove vezes a mais do que o verapamil (POULIOT et al., 1997). Por este motivo, segundo estes autores, a ivermectina representa um potente reversor de GP-P no tratamento de células cancerígenas com resistência múltipla a drogas.

O estudo da composição físico química das drogas moduladoras de GP-P pode indicar futuras moléculas com maior potencial de ligação e transporte por esta proteína, com taxas de efluxo superiores à ivermectina, superando os resultados obtidos na reversão da resistência à ivermectina pelo verapamil observados no presente trabalho e na literatura (BEUGNET et al., 1997; MOLENTO & PRICHARD, 2001).

O teste *in vivo* demonstrou uma reversão parcial da resistência deste nematódeo à ivermectina. Estes são os primeiros resultados na literatura demonstrando o efeito do verapamil na reversão de resistência à ivermectina em ovinos experimentalmente infectados com uma estirpe de campo de *H. contortus*.

BORGES et al. (2005) avaliaram a associação destas duas drogas por meio de teste de redução de contagens de OPG em ovinos naturalmente infectados e observaram 74,71% de eficácia no 14^o dia pós-tratamento, enquanto a ivermectina nesta mesma data apresentou eficácia nula.

MOLENTO & PRICHARD (1999) avaliaram o efeito reversor do verapamil por meio de um modelo experimental utilizando gerbils (*Meriones unguiculatus*) infectados com *H. contortus*, sendo observada eficácia de 26% para a ivermectina isolada e 48% para a associação desta droga com o modulador de GP-P. utilizando este mesmo modelo experimental, XU et al. (1998) observaram eficácia da ivermectina de 80% e 93% e da moxidectina de 70 e 96%, respectivamente na ausência e na presença de

verapamil contra uma estirpe de *H. contortus* selecionada artificialmente para resistência à moxidectina durante 14 gerações (MOF14), sendo utilizada uma dose de verapamil de 20 mg/kg, muito acima da empregada no presente trabalho (3mg/kg).

A associação verapamil e ivermectina (1% ou 2%) em uma mesma formulação, contendo veículo oleoso, não causou aumento na eficácia anti-helmíntica da ivermectina contra a estirpe resistente de *H. contortus*, sendo encontrado elevado número de parasitos nos animais tratados. Estes resultados demonstraram a influência da formulação na eficácia anti-helmíntica, visto que utilizando-se veículo aquoso, foram obtidos resultados satisfatórios. O objetivo de utilizar um veículo oleoso para o verapamil seria permitir uma absorção mais lenta no local de aplicação, uma vez que esta droga é absorvida e eliminada muito rapidamente do organismo (MCTAVISH & SORKIN, 1989), enquanto as lactonas macrocíclicas apresentam maior meia-vida de absorção e tempo de residência médio mais prolongado. Estudos futuros sobre a farmacocinética desta associação administrada em ovinos serão necessários para que seja obtida uma formulação com veículo e concentração adequados.

No presente trabalho, foi observada diferença entre os resultados obtidos nos testes *in vitro* e *in vivo*. tal diferença pode ser explicada pelo fato de terem sido utilizadas altas concentrações de verapamil no teste *in vitro*, o que não seria possível no teste *in vivo* devido à possível ocorrência de efeitos adversos, conforme descrito por MOLENTO & PRICHARD (1999). Além disso, a interação organismo : droga : parasito é eliminada nos estudos *in vitro*, sendo a atividade anti-parasitária relacionada à presença de uma concentração ativa da droga no local de ação, por um determinado período de tempo.

Os produtos de PCR obtidos no presente trabalho, com os iniciadores PGP2S e MX-D a partir do DNA genômico amplificam uma região que codifica uma porção do loop citoplasmático central da estrutura da GP- P (Figura 14), segundo BLACKHALL et al (1998a).

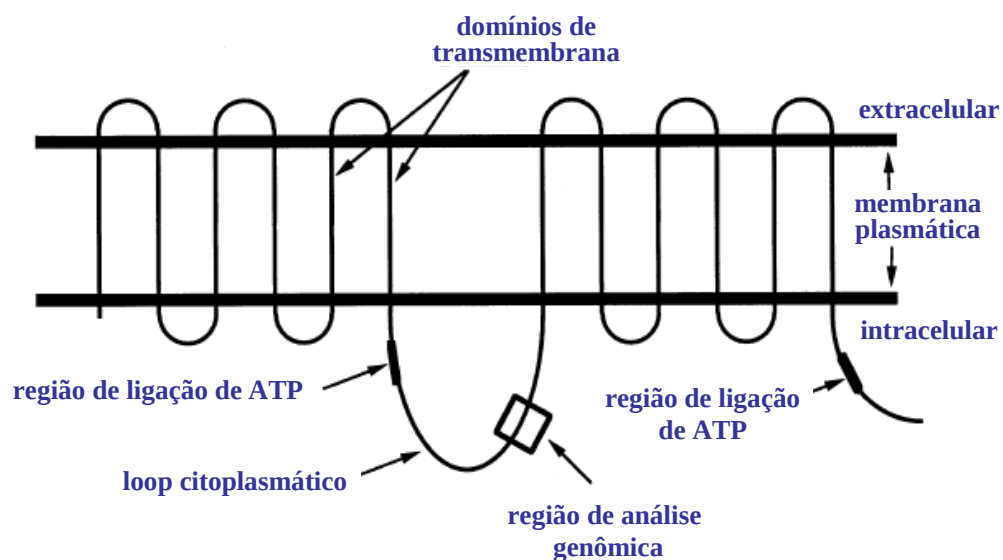


Figura 14. Desenho esquemático da glicoproteína P na membrana celular. O quadrado indica, aproximadamente, a região do DNA genômico amplificada por PCR (extraído de BLACKHALL et al., 1998a).

A presença de polimorfismo genético associado à resistência a ivermectina, evidencia o envolvimento da glicoproteína P neste mecanismo, uma vez que maior quantidade desta glicoproteína poderia resultar em maior efluxo da droga. No entanto, parece não haver um aumento no número de cópias desta estrutura em parasitos resistentes, mas sim, a expressão de diferentes alelos deste gene (BLACKHALL et al., 1998a; XU et al., 1998).

ZUBIETA (2005), na Argentina, estudou a variação genética relacionada à codificação da GP-P e da subunidade α dos receptores de cloro ativados por glutamato

(HcGluCI), entre estirpes de *H. contortus* resistentes e sensíveis à ivermectina, por meio da técnica de Polimorfismo de DNA amplificado randomicamente (Random Amplified Polymorphic Dna - RAPD). O autor estabeleceu um padrão diferencial de bandas de amplificação com RAPD-PCR apenas para os receptores GluCI entre estas duas estirpes. Não foi possível realizar um padrão para a fosfo-glicoproteína devido a presença de uma banda de amplificação inespecífica. Segundo SANGSTER et al. (1999), a GP-P faz parte de uma grande família de proteínas codificadas por genes que apresentam uma grande quantidade de alelos. Provavelmente, esta grande variedade seria responsável por amplificações inespecíficas.

No presente trabalho, os produtos de PCR foram do tamanho esperado (840 bp), seguindo descrição de BLACKHALL et al. (1998a). Porém, após o sequenciamento, não se observou homologia com qualquer seqüência depositada no GenBank, nem mesmo com a aquela da qual foram extraídos os iniciadores utilizados na PCR (PGP-A, GenBank No. AF003908). É necessário cautela na extrapolação de resultados obtidos de estirpes selecionadas em laboratório para estirpes de campo, pois, no desenvolvimento das estirpes de laboratório poderia haver perda na variabilidade genética da população, o que não ocorreria na seleção natural presente na estirpe de campo (BLACKHALL et al., 1998a). Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho poderiam, possivelmente, ser uma constatação deste conceito.

O desenvolvimento de marcadores moleculares para os genes que estejam relacionados à sobrevivência de *H. contortus* aos tratamentos com anti-helmínticos pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico precoce da resistência, permitindo que seja detectada quando a frequência de genes resistentes ainda é baixa. Isso

representa uma grande vantagem em relação às demais técnicas de diagnóstico, pois, realizado precocemente, pode-se adotar medidas para seu controle. Segundo LE JAMBRE et al. (2000), no caso de nematódeos gastrintestinais, especialmente para o grupo das lactonas macrocíclicas, seria importante dispor de técnicas que detectam a frequência do fenótipo resistente na população, quando esta ainda for abaixo de 1%.

Os resultados deste experimento demonstram a participação do gene relacionado à GP-P no processo de resistência de *H. contortus* à ivermectina e reforça a necessidade de mais estudos envolvendo outras estirpes resistentes de campo e, também, de uma estirpe sensível à ivermectina. A pesquisa de polimorfismo do gene relacionado a GP-P foi prejudicada pela ausência de uma estirpe sensível, que seria comparada à estirpe resistente isolada.

Além do efluxo de ivermectina pela GP-P, outro mecanismo molecular da resistência são alterações nos receptores nos canais de cloro ativados por glutamato (HcGluCl). Estes canais são constituídos por três subunidades: α , ativada pela ivermectina; β , ativada por glutamato e δ que tem apenas a função estrutural (CULLY et al., 1994). A ivermectina apresenta um comportamento dual nestes receptores, ou seja, em baixas concentrações atua como potencializadora do glutamato e em altas concentrações esta molécula liga-se direta e irreversivelmente ao canal de cloro, ativando-o e, conseqüentemente, causando paralisia flácida em invertebrados (CULLY et al., 1994).

Aparentemente, isolados de *H. contortus* resistentes apresentam alterações na quantidade de sítios α e β nos canais de cloro ativados por glutamato, com evidente aumento destes últimos, que não são receptores para a ivermectina, o que reduz a

eficácia do anti-helmíntico (HEJMADI et al., 2000). BLACKHALL et al. (1998b) demonstraram o aumento da frequência de um alelo do gene da subunidade α de HcGluCL em populações de *H. contortus* resistentes a ivermectinas.

No presente trabalho, observou-se que as sete amostras apresentaram uma banda de aproximadamente 200 pares de bases (pb), relacionada com a subunidade α do canal HcGluCl bem definida e após o seqüenciamento dos produtos da PCR, houve pouca similaridade entre as amostras, podendo indicar diferença na seleção após tratamento com ivermectina, verapamil ou a associação entre ambas drogas. Estas alterações também podem indicar a participação deste gene no mecanismo molecular de resistência à ivermectina nesta população de campo de *H. contortus*.

Desta forma, a reversão apenas parcial da resistência à ivermectina observada no presente trabalho pode ser justificável devido à participação de mais de um mecanismo molecular de resistência e não apenas a GP-P. Ou seja, o verapamil age apenas sobre um mecanismo de resistência, a GP-P, e não sobre as alteração nos receptores HcGluCl.

O verapamil mostrou-se um eficiente modulador da glicoproteína-P, porém outros mecanismos de resistência à ivermectina estão presentes em *H. contortus*. As formulações avaliadas no teste *in vivo* não apresentaram o elevado percentual de eficácia observado no teste *in vitro*, provavelmente devido a diferenças de concentração e à interação organismo:droga. Estes resultados demonstram o potencial do uso de drogas reversoras de resistência e a necessidade de estudos utilizando o modelo animal e não apenas testes *in vitro*.

VI. CONCLUSÕES

1. A dificuldade na obtenção de uma estirpe de *H. conturtus* sensível à ivermectina reforça a grave situação da resistência anti-helmíntica em ovinos no Estado de São Paulo

2 Os resultados obtidos por meio de teste *in vitro* permitem inferir que o verapamil é um potente reversor da resistência à ivermectina.

3 O efeito da formulação na eficácia anti-helmíntica, observado no teste *in vivo*, demonstra a necessidade de novos estudos, incluindo a farmacocinética de verapamil e ivermectina em ovinos.

4 GP-P e HcGluCl participaram do mecanismo molecular de resistência à ivermectina desta estirpe de campo de *H. conturtus*.

5 O uso de drogas moduladoras de GP-P podem ser uma importante ferramenta no controle de populações de helmintos resistentes às lactonas macrocíclicas e merecem outros estudos.

VII. REFERÊNCIAS

ALBERT, J. et al. A GABA-activated chloride conductance not blocked by picrotoxin on spiny lobster neuromuscular preparations. *British Journal of Pharmacology*, v. 87, p. 771-779, 1986.

AMARANTE, A.F.T. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamizol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 29, p. 31-38, 1992.

AMARANTE, A.F.T. Atualidades no controle de endoparasitoses ovinas. In: Simpósio Paulista de Ovinocultura, 4., 1995, Campinas, *Anais..Campinas:CATI/SAA*, p.33-49, 1995.

AMARANTE, A. F. T. ; AMARANTE, M. R. V. . Breeding sheep for resistance to nematode infections. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, Faisalabad, v. 2, n. 3, p. 147-161, 2003.

ARENA, J.P. et al. Avermectin- sensitive chloride currents induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus* oocytes. *Molecular Pharmacology*, v. 40, p. 368-373, 1991.

ARENA, J.P. et al. Expression of a glutamate- activated chloride currents in *Xenopus* oocytes injected with *Caenorhabditis elegans* RNA: evidence for modulation by avermectin. *Molecular Brain Research*, v. 15, p. 339-348, 1992.

ARENA, J.P. et al. The mechanism of action of avermectin in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane-binding, and biological activity. *Journal of Parasitology*, v. 81, p. 286-294, 1995.

- ARAÚJO, J.V. et al. Controle biológico de tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense* *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.4, p.467-471, 2004
- BALLENT, M et al. Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: in vitro and in vitro assessments. *Drug metabolism and Disposition*, v. 34, n.3, p. 457-463, 2006.
- BARNES, E.H. et al. Worm control and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, v. 11, p. 55-63, 1995.
- BEUGNET F.; GAUTHEY, M.; KERBOUEF, D. Partial in vitro reversal of benzimidazole resistance by the free-living stages of *Haemonchus contortus* with verapamil. *Veterinary Records*, v. 29, p. 575-576, 1997.
- BLACKHALL, W.J. et al. Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 95, n.2, p.193-201, 1998a.
- BLACKHALL, W. J.et al. *Haemonchus contortus*: Selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. *Experimental Parasitology*, v. 90, p. 42-48, 1998b.
- BORBA, M.F.S. Efeitos do parasitismo gastrintestinal sobre o metabolismo do hospedeiro. In: SILVA SOBRINHO, A.G. *Nutrição de ovinos*. Jaboticabal: FUNEP, p. 213-233, 1996.
- BORGES, F.A. et al. Use of verapamil to increase anthelmintic efficacy of ivermectin against drug-selected strain of *Haemonchus contortus*. In: 20TH World Associations for the Advancement of veterinary Parasitology. Christchurch, Nova Zelândia, D11. 2005.

BORGSTEEDE, F.H.M & DUYN, S.P.J. Lack of reversion of a benzimidazole resistant strain of *Haemonchus contortus* after six years of levamisole usage. *Research in Veterinary Science*, v. 47, n.2, p. 270-272, 1989.

BURG, R.W et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.15, p. 361-367, 1979.

CAMPBELL, W.C. et al. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, v. 221, p. 823-828, 1983.

CAMPBELL, W.C.; BENZ, G.W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* , v. 7, p. 1-16, 1984.

CARMICHAEL, I. et al. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin. *Journal of South African Veterinary Association*, v. 58, p. 93, 1987.

CHABALA, J.C. et al. Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 23, p.1134-1136, 1980.

CONWAY, D.P. Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, v. 25, p. 106-107, 1964.

COSTA, A.J. *Diagnóstico laboratorial em Parasitologia*. I. Helmintologia. FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP. 1982. 89p.

CULLY, D.F.; VASSILATIS, D.K.; LIU, K.K.; PARESS, P.S.; VANDERPLOEG, L.H.T.; SCHAEFFER, J.M. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 371, p. 707-711, 1994.

CUNHA FILHO, L.F.C. et al. Resistência a anti-helmínticos em ovinos na região de Londrina – Paraná – Brasil. *Semina Londrina*, v. 19, n.1, p. 31-37, 1998.

- D'ASSONVILLE, J.A. et al. In vitro screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. *Veterinary Parasitology*, v.61, p.73-80, 1996
- DENT, J.A. et al. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, p. 2674-2679, 2000.
- DORNELLES, W.J.M. Ovinocultura de lã e carne – uma verdade que voltou a ser evidenciada. *A Hora Veterinária*, ano 22, n.130, p. 6-8, 2002.
- DRUDGE, J.H. et al. Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene and phenothiazine. *American Journal of Veterinary Research*, v. 25, p. 1512-1518, 1964.
- DUPUY, J et al. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by natural flavonoid: quercetin. *Veterinary Parasitology*, v. 112, p. 337-347, 2003.
- ECHEVARRIA F.A.M. Doenças parasitárias de ovinos e seu controle. In: Simpósio Paranaense de Ovinocultura, 3., 1986, Guarapuava. *Anais...Londrina:IAPAR*, p.46-47, 1988.
- ECHEVARRIA, F.A.M.; TRINDADE, G.N.P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil: a preliminary report. *Veterinary Records*, v. 124, p.147-148, 1989.
- EGERTON, J.R. et al. 22,23-Dihydroavermectin B1, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *British Veterinary Journal*, v.136, p. 88-97, 1980.
- FAO. *Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina*. Roma:FAO, Salud Animal, p. 1-52, 2003.

- FAO. Module 2. helminths: anthelmintic resistance: diagnosis, management and prevention. *Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants*. FAO:Roma, p. 78-118, 2004.
- FARIAS, M.T. et al. A survey on resistance to anthelmintics in sheep stud farms of souther Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 72, p. 209-214, 1997.
- FERNANDES, L.H. et al. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.6, p.733-740, 2004
- FELLOWES, R.A. et al. Classical neurotransmitters in the ovijector of *Ascaris suum*: localization and modulation of muscle activity. *Parasitology*, v. 121, p. 325-336, 2000.
- GARRIGOS, M.; MIR, L.M.; ORLOWSKI, S. Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase – further experimental evidence for a multisite model. *European Journal of Biochemistry*, v. 244, p. 664-673, 1997.
- GEARY, T.G. et al. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. *Experimental Parasitology*, v.77, p.88-96, 1993.
- GEARY, T.G.; THOMPSON, D.P. Development of antiparasitic drugs in the 21st century. *Veterinary Parasitology*, v. 115, p. 167-184, 2003.
- GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counn. Sci. Ind. Res. Aust.*, v. 12, p. 50-52. 1939.
- GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrog transporter. *Annual Review of Biochemistry*, v. 62, p. 385-427., 1993.

- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium.*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HEJMADI, M. V. L-glutamate binding sites of parasitic nematodes: an association with ivermectin resistance?. *Parasitology*, v. 120, p. 535-545, 2000.
- JACKSON, F. & COOP, R.L. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, v. 120, p. 95-107, 2000.
- JULIANO, R.L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 455, p. 152-162, 1976.
- KERBOEUF, D. et al. Analysis and partial reversal of multidrug resistance to anthelmintics due to P-glycoprotein in *Haemonchus contortus* eggs using *Lens culinaris* lectin. *Parasitology Research*, v. 88, p. 816-821, 2002.
- KERBOEUF, D. et al. P-glycoprotein in helminthes: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 22, p. 332-346, 2003.
- KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 336-345, 2001.
- Le JAMBRE, L.F. et al. Selection for anthelmintic resistance by macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 1101-1111, 1999.
- KASS, I.S. et al. Avermectin B_{1a}, a paralyzing anthelmintic that affects interneurons and inhibitory motoneurons in *Ascaris*. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, v.77, p. 6211-6215, 1980.

- Le JAMBRE, L.F. et al. Inheritance of avermectin resistance in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, v. 30, p. 105-111, 2000.
- LEVINE, N.D. *Nematode parasites of domestic animals and of man*. Burgess Pub. Comp., Minneapolis, 1968. 600p.
- LIFSCHTZ, A. et al. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.25, p. 111-120, 2002.
- LINDQUIVIST, A. et al. The dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 42, p. 377-389, 2001.
- LITTLE, T.M.; HILLS, F.J. *Agricultural experimentation designs ad analysis*. Wiley, New York, 1978. 350p.
- LUDMERER, S.W. et al. Ivermectin and nodulisporic acid receptors in *Drosophila melanogaster* contain both γ -amino butyric acid-gated Rdl and glutamate-gated CluCl α chloride channel subunits. *Biochemistry*, v.41, p. 6548-6560, 2002.
- MARTIN, R.; PENNINGTON, A.J. Effect of dihydroavermectin B_{1a} on Cl single channel currents in *Ascaris* muscle. *Pesticide Science*, v.24, p. 90-91, 1988.
- MARTIN, J.R. et al.. Mode of action of the macrocyclic lactones. In: VERCRUYSSSE-J; REW-RS (ed.), *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. CAB International, Wallingford, UK, p. 125-140, 2002
- McKENZIE, J.A. Genetics of resistance to chemotherapeutic agents. In: ANDERSON, N.; WALLER, P.J (ed) *Resistance to anthelmintic drugs*, Melbourne: Australian Wool Corporation Technical Publication, p. 89-95, 1985

- MCTAVISH, D.; SORKIN, E.M. Verapamil: an update review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in hypertension. *Drugs* v. 38, p.19–76, 1989.
- MEALEY, K.L. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 27, p. 257-264, 2004.
- MELLIN, T.N. et al. Postsynaptic inhibition of invertebrate neuromuscular transmission by avermectin B_{1a}. *Neuropharmacology*, v. 22, p.89-96, 1983.
- MELO, A.C.F.L.; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; VIEIRA, L.-DA-S.; ECHEVARRIA, F.A.M.; MELO, L.M.; Nematodeos resistentes a anti-helmintico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceara, Brasil. *Ciencia Rural*, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2003
- MELO, A.C.F.L., et al. Desenvolvimento da resistência ao oxfendazol em propriedades rurais de ovinos na região do baixo e médio Jaguaribe, Ceará, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n.4, p. 137-141, 2004.
- MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R.K. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Parasitology Research*, v. 85, p. 1007-1011, 1999.
- MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R.K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, p. 117-121, 2001.
- MOLENTO, M.B. et al. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitology Research*, v. 92, p. 121-127, 2004.

- MOTTIER, L.; LANUSSE, C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. *Revista de Medicina Veterinária*, v. 82, n. 2, p. 74-85, 2001.
- MOUSSAVOU-BOUSSOUGOU, M.N. et al. Substitution of benzimidazole-resistant nematodes for susceptible nematodes in grazing lambs. *Parasitology*, v. 134, p. 1-8, 2007.
- NARI, A.; EDDI, C. Resistance to ecto and endo-parasites. A challenge for the XXI century? In: International Seminar in Animal Parasitology – “World situation of parasite resistance in veterinary medicine”, 5., October, 2003, Merida, Yucatan, México. *Anais...* 2003, p. 53-60.
- PALOSCHI, C.Z.; RAMOS, C.I. *Verminose ovina em Santa Catarina*. EMPASC, Florinaópolis, BT, n. 54, p. 14-15, 1991.
- POULIOT, J.F.; L'HEUREUX, F.; LIU, Z.; PRICHARD, R.K.; GEORGES, E. Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochemical Pharmacology*, v. 53:p. 17-25,1997.
- PRADHAN, S.L.; JOHNSTONE, I.L. *Haemonchus contortus*-the effect on lambs of prolonged exposure to daily and weekly doses of infective larvae. *Parasitology*. v. 64, n. 1, p. 143-52, 1972.
- PRICHARD, R. Anthelmintic resistance in nematodes: Extent, recent understanding and future directions for control and research. *International Journal for Parasitology*, v.20, p. 515-523, 1990.
- PRICHARD, R.K. Resistance Against Macrocyclic Lactones. In: *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. (Eds. J. Vercruysse & R.S. Rew), CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 163-182. 2002.

- RIOU, M. et al. Modulation of the multidrug resistance (MDR) system in the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: effects on resistance to anthelmintics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p. 180-187, 2003.
- RAMOS, C.I. et al. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciência Rural*, v. 32, p. 473-477, 2002.u
- ROBERTS, F.H.S; O`SULLIVAN, J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.1, p. 99, 1950.
- SANGSTER, N.C. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 115-124, 1999.
- SANGSTER, N.C. et al. *Haemonchus contortus*: sequence heterogeneity of internucleotide binding domains from P-glycoproteins and an association with avermectin resistance. *Experimental Parasitology*, v. 91, p. 250-257, 1999.
- SANTOS, V.T.; GONÇALVES, P.C. O aparecimento de *Haemonchus contortus* resistente ao radical benzimidazole em Uruguaiana. In: Congresso Latino Americano de Parasitologia, 1., Santiago, Chile, *Anais...*Santiago, p. 105, 1967.
- SCHAEFFER, J.M.; HAINES, H. Avermectin binding in *Caenorhabditis elegans*: a two-state model for the avermectin binding site. *Biochemical Pharmacology*, v. 38, p. 2329-2338, 1989.
- SCHAEFFER, J.M. et al. A chemi-luminescent assay for measuring avermectin binding-sites. *Analytical Biochemistry*, v. 177, p. 291-295, 1989.

SCHINKEL, A. H. et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, v. 77, p. 491-502, 1994.

SCOTT, R.H.; DUCE, I.J. Pharmacology of GABA receptors on skeletal muscle fibres of the locust (*Schistocerca gregaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 86, p. 305-311, 1987.

SMITH, J.M.; PRICHARD, R.K. Localization of P-glycoprotein mRNA in the tissues of *Haemonchus contortus* adult worms and its relative abundance in drug-selected and susceptible strains. *Journal of Parasitology*, v. 88, p. 612-620, 2002.

SOCCOL, V.T. et al. Ocurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná state, Brazil. *Veterinary Records*, v. 139, p. 421-422, 1996.

STONE, B.F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Australian Veterinary Journal*, v. 48, p. 345-350, 1972.

SOUTELLO, R.V.G et al. Eficácia de diversos anti-helmínticos em borregos mestiços ½ sangue Dorper-santa Inês naturalmente infectados a pasto. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 14., 2006, Ribeirão Preto. *Anais...*Ribeirão Preto: CBPV, 2006. P. 260.

TSURUO, T. et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Research*, v. 41, p. 1967-1972, 1981.

TURNER, M.J.; SCHAEFFER, J.M. Mode of action of ivermectin. In: CAMPBELL, W.C. (ed.) *Ivermectin and abamectin*, Springer Verlag, New York, p. 73-88, 1989.

- VERCRUYSSSE, J. et al. International Harmonisation of Anthelmintic Efficacy Guidelines. *Veterinary Parasitology*, v. 96, p. 171-193, 2001.
- WATANABLE, T. et al. Comparative study on reversal efficacy of SDZ PSC 833, cyclosporin A and verapamil on multidrug resistance *in vivo*. *Acta Oncology*, v. 34, p. 235-241, 1995.
- WARUIRU, R.M. Efficacy of closantel, albendazole and levamisole on an ivermectin resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, v.73, p. 65-71, 1997.
- WYK J.A. & van SCHALKWYK , P.C. Anovel aproach to the control of anthelmintic-resistente *Haemonnchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 135, p. 337-346, 1990.
- WOOD, I.B. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, v. 58, n. 3, p. 181-213, 1995.
- UENO, H. & GOLÇALVES, P.C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 4 ed. Japão: JICA. 1998. 166p.
- XU, MING et al. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.91, n.2, p. 327-335, 1998.
- ZUBIETA, R.C. *Estudio de la variación genética entre cepas de nematodos parásitos trichostrongylídeos de los rumiantes, resistentes y susceptibles a la ivermectina*

mediante el empleo de marcadores moleculares. Dissertação de Mestrado. Instituto de Patobiología. Área de Parasitología, CICVyA, INTA Castelar. 2005