

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

POLIANA ARAUJO PACHECO

**Incremento da atividade anti-helmíntica da Ivermectina pela ação sinérgica
de compostos fitoquímicos sob isolados de *Haemonchus contortus*
susceptível e resistente a antihelmínticos**

Piracicaba

2022

POLIANA ARAUJO PACHECO

Incremento da atividade anti-helmíntica da Ivermectina pela ação sinérgica de compostos fitoquímicos sob isolados de *Haemonchus contortus* susceptível e resistente a antihelmínticos

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Area de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Helder Louvandini

Co orientador: Dra Luciana Morita Katiki

Piracicaba

2022

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Pacheco, Poliana Araujo

Incremento da atividade anti-helmíntica da Ivermectina pela ação sinérgica de compostos fitoquímicos sob isolados de *Haemonchus contortus* susceptível e resistente a anti-helmínticos. / Poliana Araujo Pacheco; orientador Helder Louvandini. - Piracicaba, 2022.

68 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Anti-helmintos 2. Compostos fenólicos 3. Glicoproteínas 4. Óleos essenciais
5. Parasitologia animal I. Título

CDU 576.89 : 665.52

Elaborada por:

Rubenildo Oliveira da Costa

CRB-8/7946

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Dedico esta tese ao meu pai
Siderlei Pacheco (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família pela oportunidade de estar presente nessa vida.

Ao meu pai que acompanhou a distância muitas etapas desta tese, principalmente do experimento *in vivo*, se fazendo presente em momentos de dificuldade, mas que cumpriu sua missão antes que essa tese fosse finalizada.

A FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto. Além de todo o suporte financeiro em outras etapas cruciais para o desenvolvimento desta tese e meu crescimento profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helder Louvandini, por contribuir para o meu desenvolvimento, por compartilhar seus conhecimentos e me direcionar na condução desta tese.

A minha coorientadora, Dra Luciana Katiki, por estar presente durante a trajetória na pós-graduação e por ter sido mais que uma professora, por ser luz em dias sombrios e alguém muito importante em minha vida.

Ao Dr Jorge Ferreira, por idealizar este projeto juntamente a Dra Luciana Katiki.

Ao Dr Livio Costa e Dr Adrian Lifschitz pelo apoio nos protocolos.

A Equipe do Instituto de Zootecnia/APTA e Laboratorio de Nutrição Animal/CENA/USP pelo apoio incondicional e por terem sido fundamentais para que esse trabalho fosse finalizado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

RESUMO

PACHECO, P. A. **Incremento da atividade anti-helmíntica da Ivermectina pela ação sinérgica de compostos fitoquímicos sob isolados de *Haemonchus contortus* susceptível e resistente a anti-helmínticos.** 2022. 68 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

Os fitoquímicos podem aumentar o efeito da ivermectina (IVM) através da modulação da atividade da glicoproteína P (PgP), uma proteína de transporte transmembrana que livra as células de nematóides como o *Haemonchus contortus* de moléculas tóxicas e considerado um dos principais mecanismos de resistência à IVM. Uma triagem completa foi proposta para verificar a interação entre IVM e fitoquímicos. A primeira etapa deste estudo foi avaliar e comparar a atividade anti-helmíntica de IVM isolada ou combinada com os principais componentes de óleos essenciais (alfa terpineno, beta citronelol, beta pineno, citronelal, limoneno, mentol e terpinoleno) e compostos fenólicos (epicatequina, epigallocatequina, galocatequina pentagalactilglicose, procianidina e quercetina). Todos os compostos foram testados contra isolados suscetíveis (HcS) e resistentes (HcR) de *H. contortus* através do teste de desenvolvimento larval (TDL), teste de motilidade de adultos (TMA) e análise de expressão de PGP de vermes adultos por RT-PCR, usando verapamil (VP), conhecido modulador de PgP, como controle em todos os testes. No TDL, a concentração letal de IVM necessária para matar 50% dos nematóides (LC50) foi 10 vezes maior para HcR do que para HcS. IVM + VP inibiu a atividade de PgP em HcR. IVM + limoneno e IVM + quercetina mostraram-se semelhantes a IVM+VP e foram escolhidos para testes subsequentes. No TMA, IVM + VP em HcR foram semelhantes a IVM + limoneno e superaram IVM + quercetina. Na expressão gênica de vermes HcR expostos a IVM, IVM+VP e IVM + limoneno, para a maioria das concentrações avaliadas, PGP-9 foi significativamente mais expresso em vermes tratados com IVM isolada do que em vermes tratados com IVM + VP ou IVM + limoneno. Em conclusão, o limoneno está envolvido na modulação do gene PGP-9 e restaurou a atividade de IVM no isolado HcR. Na última etapa foi proposto um experimento *in vivo* para verificar a interação entre o limoneno fornecido na dieta com o concentrado e uma etapa de vermifugação com dose única de ivermectina oral (1 mL/4kg/PV) em 24 cordeiros Dorper com aproximadamente 5 meses de idade infectados artificialmente com um isolado resistente de *H. contortus* e distribuídos em 4 tratamentos: CONTROLE, LIMO (limoneno - 200 mg/kg/PV/dia), LIVM (limoneno + ivermectina - 200 mg/kg/PV/dia + dose única 1 mL de Ivermectina /4kg PV), IVM (1 mL/4kg PV). Foram coletadas amostras de fezes e sangue durante o período experimental e após 14 dias da administração da IVM aos respectivos tratamentos, todos os animais foram eutanasiados para contagem do total de vermes presentes no abomaso, avaliação de medidas morfométricas de machos e fêmeas, fertilidade das fêmeas. Não foram observadas diferenças nas contagens de vermes e parâmetros de comprimento de machos e fêmeas, nos tratamentos. No entanto, a fertilidade das fêmeas foi afetada, pois observamos diferenças estatísticas entre CONTROLE e LIMO e LIMO e LIVM. Sobre o FEC, o LIVM e o LIMO diferiram entre si e o IVM foi igual ao CONTROLE. LIVM diferiu do controle e IVM, IVM diferiu apenas de LIVM. O uso do limoneno associado a ivermectina pode ser uma alternativa de controle ao uso único de anti-helmínticos na pecuária, sendo importante destacar a necessidade de mais pesquisas de validação.

Palavras chaves: Ivermectina. PgP. Limoneno. Óleos essenciais. Compostos fenólicos. *Haemonchus contortus*.

ABSTRACT

PACHECO, P. A. **Anthelmintic activity increase of Ivermectin by the synergistic action of phytochemical compounds in isolates of *Haemonchus contortus* susceptible and resistant to anthelmintics.** 2022. 68 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, São Paulo, Piracicaba, 2022.

Phytochemicals can increase ivermectin (IVM) effect through the modulation of glycoprotein P (PgP) activity, a trans-membrane transport protein that rids worm cells like *Haemonchus contortus* from toxic molecules and its considered of the main IVM-resistance mechanisms. A complete screening was proposed to verify the interaction between IVM and phytochemicals. The first step of this work was to evaluate and compare the anthelmintic activity of IVM alone or combined with essential-oil main components (alpha terpinene, beta citronellol, beta pinene, citronellal, limonene, menthol, and terpinolene) and with phenol compounds (epicatechin, epigallocatechin, gallic acid, gallocatechin pentagalloylglucose, procyanidin, and quercetin). All compounds were tested against susceptible (HcS) and resistant (HcR) isolates of *H. contortus* through the larval development test (TDL), adult motility assay (AMT) and gene expression of PgP by RT-PCR, using verapamil (VP), a known PgP modulator, as a control in all tests. In TDL the lethal concentration of IVM required to kill 50% of nematodes (LC50) was 10 times greater for HcR than for HcS. IVM + VP inhibited the activity of PgP in HcR. IVM + limonene and IVM + quercetin both showed similar to IVM+VP and were chosen for subsequent tests. In AMT, IVM + VP in HcR were similar to IVM + limonene and outperformed IVM + quercetin. In gene expression of adult worms exposed to IVM, IVM+VP and IVM + limonene, for most concentrations evaluated, PGP-9 was significantly more expressed in worms treated with IVM alone than worms treated with IVM + VP or IVM + limonene. In conclusion, limonene is involved in the modulation of the PGP-9 gene and restored the activity of IVM in the HcR isolate. The last step an *in vivo* experiment was proposed to verify the interaction between limonene supplied in the diet with the concentrate and a deworming step with single oral ivermectin (1 mL/4kg/PV) in 24 Dorper lambs at approximately 5 months of age artificially infected with a resistant strain of *H. contortus* distributed into 4 treatments: CONTROL, LIMO (limonene - 200 mg/kg/pv/day supply), LIVM(limonene plus ivermectin - 200 mg/kg/BW/day and a single oral dose of Ivermectin 1 mL/4kg BW), IVM (1 mL/4kg BW). Fecal and blood samples were collected during the experimental period and after 14 days of IVM administration to the respective treatments, all animals were euthanized to count the total worms present in the abomasum, evaluation of morphometric measurements of males and females, fertility of females Worms. No differences were observed in the worm counts and length parameters of males and females, in the treatments. However, female fertility was affected, as we observed statistical differences between CONTROL and LIMO, LIMO and LIVM. About fecal egg count, LIVM and LIMO differed from each other and IVM was equal to CONTROL. LIVM differed control and IVM, IVM differed only LIVM. The use of limonene associated a ivermectin as a control alternative to the single anthelmintics in livestock, being important to highlight the need for more validation research.

Keywords: Ivermectin. Pgp. Limonene. Essential oil. Phenolic compounds. *Haemonchus contortus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos fenólicos e monoterpênicos previamente avaliados pela atividade como moduladores da P-glicoproteína (PgP) e reversão da multirresistência (MDR) em bactérias e células neoplásicas.

Tabela 2. Concentração letal (CL₅₀) obtida no Teste de desenvolvimento larvarl in Larval Development Test with anthelmintic susceptible (HcS) and resistant (HcR) isolate of *Haemonchus contortus* in response to compounds evaluated individually.

Tabela 3. Concentrações letais (CL₅₀) obtidas no Teste de Desenvolvimento Larval com isolado anti-helmíntico (HcS) e resistente (HcR) de *Haemonchus contortus* em resposta a combinações dos compostos fitoquímicos com ivermectina (IVM).

Tabela 4. Concentrações letais (CL₅₀) obtidas pelo Teste de Motilidade com fêmeas adultas de *Haemonchus contortus* resistentes (HcR) e suscetíveis (HcS) à ivermectina (IVM) e outros anti-helmínticos.

Tabela 5. Concentrações letais (CL₅₀ µg.mL⁻¹) obtidas pelo Teste de Motilidade com fêmeas adultas de *Haemonchus contortus* resistentes (HcR) e suscetíveis (HcS) à ivermectina (IVM) e outros anti-helmínticos.

Tabela 6. Cromatografia gasosa: Espectrometria de massa do compost: Limoneno.

Tabela 7. Parâmetros médios e desvio padrão da contagem total, de comprimento do corpo (cm) e fecundidade (ovos/fêmea) dos parasitas recuperados no abomaso dos cordeiros infectados no experimento *in vivo*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Nível de expressão gênica relativa de PGP-9 analisado em *Haemonchu contortus* vivos tratados com Ivermectina (vermelho), Ivermectina + Verapamil (cinza) e Ivermectina + Limoneno (azul) entre as concentrações de 10^1 a 10^{-5} μg analisado em amostras de RNA coletadas de fêmeas adultas. Comparações entre as diferentes concentrações foram feitas para cada tratamento. * = significativamente diferente em $P < 0,05$; **= significativamente diferente em $P < 0,10$.

Figura 4.1. Linha do tempo do período experimental.

Figura 4.2. Parâmetros hematológicos observados durante as coletas no período experimental; WBC (glóbulos brancos), RBC (glóbulos vermelhos) e MCV (volume corpuscular médio) HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. <i>Haemonchus contortus</i>	20
2.2. Resistência anti-helmíntica	20
2.3. Ivermectina	21
2.4. Glicoproteína P (PGP)	21
2.5. Fitoquímicos	22
REFERÊNCIAS	22
3. Moduladores fitoquímicos de PGP em isolados de <i>Haemonchus contortus</i> resistentes a ivermectina, triagens <i>in vitro</i> e expressão gênica	25
Resumo	
Abstract	
3.1. Introdução	27
3.2. Material e métodos	30
3.2.1. Isolados de <i>Haemonchus contortus</i>	31
3.2.2. Teste de desenvolvimento larval (TDL)	32
3.2.3. Teste de Motilidade do Adulto (AMT)	34
3.2.4. Análise da expressão de PgP-9 em fêmeas adultas vivas de <i>H. contortus</i>	35
3.3. Resultados	36
3.4. Discussão	40
3.5. Conclusão	45
Referências	46
4. Limoneno associado à ivermectina: eficácia anti-helmíntica e ação de reversão da resistência <i>in vivo</i>	52
Resumo	
Abstract	
4.1. Introdução	54
4.2. Material e métodos	55
4.2.1. Procedimentos com animais	55
4.2.2. Procedimentos laboratoriais	58
4.3. Resultados	59
4.4. Discussão	63
4.5. Conclusão	66
Referências	66

1. INTRODUÇÃO

Os helmintos gastrointestinais causam perdas econômicas com redução da produtividade, morte de animais e uso frequente de anti-helmínticos, levando ao consequente aumento da resistência parasitária aos anti-helmínticos, dificultando o tratamento dos animais de produção (Miller; Horohov, 2006).

Dentre os helmintos gastrointestinais de ovinos, *Haemonchus contortus* é o mais relevante, um parasita hematófago que causa perda de eritrócitos e ferro além da inflamação da mucosa abomasal e ativação do sistema imunológico, o que leva à produção de citocinas, moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células de defesa e responsáveis por direcionar a resposta imune (Miranda et al., 2009).

Além da perda sanguínea determinada pela ação dos parasitas adultos no abomaso ocorre também um aumento do pH levando a uma inflamação, comprometimento da capacidade digestiva dos animais, perda proteica e energética, hiporexia e/ou anorexia (Rowe et al., 1988; Simpson, 2000; Miller; Horohov, 2006). Os principais sinais clínicos observados incluem anemia, edema submandibular, diarreia e inapetência (Pugh; Baird, 2012; Amarante, 2014).

Devido a resistência parasitária, muitas pesquisas buscam encontrar alternativas ao uso de vermífugos, como identificar e ativar os mecanismos naturais de resistência do organismo, ou formas de selecionar animais naturalmente resistentes (Pugh; Baird, 2012).

A infecção pelo *H. contortus* e a ineficácia dos medicamentos podem causar perdas diretas devido à redução da produtividade e mortalidade dos animais. Além disso, perdas econômicas devido a sintomas subclínicos que não são imediatamente observados também devem ser contabilizadas. Os custos econômicos para o controle desses parasitas são consideráveis, como por exemplo chegando a 220 a 500 milhões de dólares (na Austrália) para o controle de parasitas em ovinos (Jabbar et al., 2006).

Os anti-helmínticos são classificados por grupos químicos, como benzimidazóis, imidazotiazóis, avermectinas, entre outros. A resistência ocorre com a presença de populações de helmintos que possuem modificações genéticas capazes de resistir à dosagem terapêutica a fim de reduzir a eficácia desses produtos químicos. A frequência de alelos de resistência em uma população de nematoides sem exposição prévia é baixa. No entanto, quando a pressão de seleção é alta, a seleção de isolados que carregam alelos de tolerância ou resistência pode ocorrer (Sangster et al., 2005).

A disseminação da resistência pode estar associada à frequência de tratamentos, eficácia do medicamento, introdução de genótipos suscetíveis, tipo de parasita, frequência de resistência alélica, número de genes envolvidos e dominância ou recessividade desses genes (Fortes; Molento, 2013).

A ivermectina é um fármaco importante na medicina veterinária devido à sua alta potência, amplo espectro e persistência da molécula no organismo. Devido ao grande sucesso nos tratamentos, a ivermectina passou a ser amplamente utilizada, muitas vezes de forma incorreta, levando a uma aceleração do processo de seleção de parasitas resistentes (Geary, 2005; Omura; Crump, 2004).

A ivermectina afeta os parasitas gastrointestinais induzindo paralisia devido à interferência nos canais de cloreto controlados pelo ácido glutâmico e secundariamente nos canais de cloreto controlados pelo GABA (ácido gama-aminobutírico), causam um aumento no fluxo desses íons nas sinapses nervosas em vermes redondos localizados na faringe musculatura e musculatura somática. Conseqüentemente, há hiperpolarização das membranas nervosas, causando paralisia flácida, morte e eliminação dos parasitas (Sangster et al., 2005).

A ivermectina também interage com transportadores ABC, que também são proteínas relacionadas à resistência a múltiplas drogas (MRP). Um dos mecanismos hipotéticos envolvidos na resistência do nematoide é possivelmente a ativação de transportadores ativos de drogas como a P-glicoproteína. (P-gp). A P-gp é uma proteína de transporte de membrana e ligação de ATP cuja principal função é ativar o efluxo de vários compostos através da ligação a moléculas com massa entre 300 e 2000 kDa e moléculas com anel aromático protegendo vertebrados e invertebrados contra moléculas potencialmente tóxicas (Lanusse; Ballent; Lifschitz, 2008).

A superexpressão de P-gp foi demonstrada em células tumorais em resposta à quimioterapia, diminuindo significativamente a eficácia de drogas anticancerígenas. Essa mesma bomba de efluxo de droga é descrita no nematoide *Caenorhabditis elegans* e *H. contortus* (Kerboeuf et al., 2011).

O genoma de *H. contortus* foi sequenciado e alguns genes que regulam a P-gp foram identificados em isolados resistentes, foram encontrados pelo menos 10 genes de resistência ligados à glicoproteína (Hco-P-gp). Hco-P-gp-9.1 é identificado como um regulador de lactonas macrocíclicas em isolados resistentes de *H. contortus*. Os genes P-gp são superexpressos em alguns nematóides resistentes e um aumento na expressão de P-gp em *H. contortus* resistente foi relatado após o tratamento de animais com ivermectina (Riou; Koch; Kerboeuf, 2005).

Uma variedade de medicamentos e alimentos atuam como alimentos inibitórios da P-gp incluem chá verde, frutas cítricas (bergamota, tangerina, laranja, toranja e toranja) e entre os medicamentos, verapamil, ciclosporina e quinidina (Yoshida et al., 2005; Deferme; Van Gelder; Augustijns, 2002).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Haemonchus contortus*

O *H. contortus* é um parasita pertencente à família Trichostrongylidae, subfamília Haemoncinae. É hematófago, infecta o abomaso, onde a forma larval e os parasitas adultos causam gastrite e anemia em seu hospedeiro. É reconhecido como o principal parasita de ovinos e caprinos do mundo, e o principal do Brasil (Amarante, 2014).

Os efeitos do *H. contortus* nos hospedeiros são variáveis, dependendo da categoria animal, idade, nutrição e imunidade. Em geral, esse helminto causa anemia, hipoalbuminemia, perda de peso e hiporexia ou anorexia, podendo em alguns casos causar a morte do animal (Miller; Horohov, 2016). O ciclo biológico deste helminto inicia-se com os parasitas adultos dentro do abomaso, com alta fertilidade e grande capacidade de oviposição, cujos ovos morulados são eliminados nas fezes. No bolo fecal, na presença de oxigênio, os ovos eclodem em larvas de primeiro estágio (L1), que se alimentam de microrganismos no ambiente fecal, onde mudam para a larva de segundo estágio (L2). Em poucos dias, a larva L2 muda para uma larva de terceiro estágio (L3), nesta fase a larva não se alimenta e é chamada de larva infectante, que é a forma ingerida pelo animal (Freitas, 1981).

A forma mais eficaz de controle do *H. contortus* é através do uso de vermífugos, porém o controle desse parasita está atrelado a questões ainda mais complexas. Esse parasita tem a capacidade de adquirir resistência aos princípios ativos dos anti-helmínticos a uma taxa tão alta que as pesquisas atuais buscam alternativas de controle sem o uso indiscriminado de anti-helmínticos (Kotze; Prichard, 2016).

2.2. Resistência anti-helmíntica

A resistência anti-helmíntica é a capacidade natural das espécies de nematóides gastrointestinais de tolerar uma dose de anti-helmíntico que seria eficaz para a maioria dos indivíduos em uma população sensível, resultante da seleção natural após a exposição de uma população de parasitas ao fármaco (Prichard, 1980; Vadlejch et al., 2014).

O controle do *H. contortus* é feito através do uso dessas drogas anti-helmínticas. No entanto, o manejo inadequado acelerou o desenvolvimento de populações resistentes a todas as classes de anti-helmínticos de amplo espectro disponíveis no mercado. O *H. contortus* tem alta capacidade de desenvolver resistência em pouco tempo de uso de determinado medicamento

anti-helmíntico. A sobrevivência desse nematoide se deve ao alto nível de variação genética nas populações de parasitas sob seleção com anti-helmínticos. Os mecanismos de resistência são multifatoriais e relacionados a uma série de alterações genéticas, cuja compreensão é importante para interpretar associações aparentes de marcadores genéticos com o fenótipo de resistência a drogas e identificar novos sítios de resistência a drogas (Gasser; Von Samson-Himmelstjerna, 2016).

2.3. Ivermectina

A ivermectina pertence à classe das lactonas macrocíclicas (LM), lançada no mercado na década de 1980, inaugurando uma nova era de eficácia endectocida contra a maioria das espécies de parasitos e todos os estágios de nematóides (exceto cestóides e trematódeos), além de outros ectoparasitas (Campbell et al., 1983).

Os LM são derivados de processos fermentativos de actinomicetos e possuem propriedades nematicidas, inseticidas e acaricidas. São classificados como endectocidas, ou seja, agem sobre parasitas internos e externos; e são divididos em avermectinas (ivermectina, abamectina e doramectina) e milbemicinas (moxidectina e milbemicina) (Campbell, 2016). Apesar dessa divisão, os princípios têm o mesmo mecanismo principal de ação, que consiste na interrupção da transmissão nervosa através da potencialização dos canais de cloreto de glutamato (Martin, 1997).

2.4. Glicoproteína P

Algumas hipóteses têm sido consideradas em estudos sobre resistência macrocíclica à lactona em nematóides, como o envolvimento da glicoproteína P (PgP), que é uma proteína hidrofóbica de alto peso molecular e alta lipofilicidade e membro dos transportadores ATP-dependentes. As PgP são responsáveis pelo efluxo celular, permitindo que os xenobióticos sejam expulsos da célula. Ao prevenir o acúmulo intracelular, a PgP protege as células de moléculas potencialmente tóxicas (Lanusse; Ballent; Lifschitz, 2008).

A superexpressão do gene MDR (multiple Drug Resistance), que codifica a PgP cuja função principal é proteger as células mantendo o efluxo de substâncias do meio intracelular para o meio extracelular, pode ser a principal causa de resistência (Varma et al., 2003).

A presença de PgP foi verificada em todos os estágios de *H. contortus* por vários autores. Em todo o corpo do parasita adulto (Xu et al., 1998). Em ovos de *H. contortus* foi verificado por Kerboeuf et al. (2003) através de estudos com sondas moleculares. Eles também

observaram diferenças entre ovos de isolados resistentes e suscetíveis de *H. contortus* para IVM. Na cutícula de larvas de primeiro estágio (Riou; Koch; Kerboeuf, 2005).

A inibição desta glicoproteína pode aumentar a disponibilidade de fármacos no interior da célula proporcionando um aumento na eficácia. A inibição pode ocorrer pela competição com o sítio de ligação do fármaco ou pelo bloqueio da reação de hidrólise do ATP (Azeredo; Uchôa; Costa, 2009).

A reversão da resistência tem sido atribuída à modulação de transportadores dependentes de ATP associados à resistência a múltiplas drogas, como a P-gp, citada como o principal mecanismo associado à resistência do nematoide às lactonas macrocíclicas (David et al., 2018).

2.5. Fitoquímicos

Os moduladores de PgP são classificados em 4 gerações de acordo com os escores de toxicidade e incluem drogas sintéticas e naturais. Os fitoquímicos estão incluídos na quarta geração, que inclui medicamentos de baixa toxicidade (Bastos et al., 2015).

Dentro da classe dos fitoquímicos estão os terpenóides e os compostos fenólicos, alguns deles podem induzir ou inibir o metabolismo de fármacos. Alguns autores atribuem essa atividade a mecanismos relacionados à PgP (Clark, 2007).

Os terpenóides citronelal, beta citronelol, alfa terpineno, terpinoleno, beta pineno e mentol apresentados neste estudo foram classificados como potenciais inibidores de PgP em pesquisas com células humanas (Yoshida et al., 2005; Deferme; Van Gelder; Augustijns, 2002). Compostos fenólicos como catequinas, pentagalloylglicose e procianidinas também foram avaliados (Molan et al., 2003; Kitagawa et al., 2004). A administração de inibidores fitoquímicos pode ser uma ferramenta para reverter a resistência a drogas como a ivermectina, modulando a atividade da PgP (Ballent et al., 2007).

Vários compostos moduladores de PgPs estão sendo associados a lactonas macrocíclicas em diferentes espécies propondo tratamentos eficazes contra diferentes parasitas (Lifschitz et al., 2002; Dupuy et al., 2003; Alvinerie et al., 2008).

Referências

Amarante, M. R. V. et al. PCR primers for straightforward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their hybrids. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 6, p. 757-761, 2017.

Azeredo, F. J.; Uchôa, F. T.; Costa, T. D. P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, p. 321-326, 2009.

Ballent, M. et al. Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep: itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 3, p. 242-248, 2007.

Carmichael, I. et al. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin. **Journal of the South African Veterinarian Association**, v. 58, n.2, p. 93, 1987.

Clark IV, G. S. An Aroma Chemical Profile. **Perfumer Flavorist**, v. 23, p. 33-46, 2007.

Coles, G. C. C. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.

Geary, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 530-532, 2005.

Godoy, P. et al. Characterisation of P-glycoprotein-9.1 in *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 52, 2016.

Kerboeuf, D. et al. P-Glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 223, p. 332-346, 2002.

Kitagawa, S.; Nabekura, T.; Kamiyama, S. Inhibition of P-glycoprotein function by tea catechins in KBC2 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1001-1005, 2004.

Lanusse, C. E.; Ballent, M.; Lifschitz, A. Modulation of cellular drug efflux: impact on antiparasitic therapy. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 25., Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, 2., 2008, Curitiba, PR. **Programa e resumos**. Curitiba, PR: UFPR; Universidade Estadual de Londrina, 2008.

Lifschitz, A. et al. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 2, p. 111-120, 2002.

Molan, A. L. et al. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1691-1698, 2003.

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.

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

Prichard, R.; Ménez, C.; Lespine, A. Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 134-153, 2012.

Riou, M.; Koch, C.; Kerboeuf, D. Increased resistance to anthelmintics of *Haemonchus contortus* eggs associated with changes in membrane fluidity of eggshells during embryonation. **Parasitology Research**, v. 95, p. 266-272, 2005.

Varma, M. et al. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 347-359, 2003.

Xu, M. et al. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 327-335, 1998.

Yoshida, Y. et al. Glycoprotein-specific ubiquitin ligases recognize N-glycans in unfolded substrates. **EMBO Reports**, v. 6, p. 239-244, 2005.

Yoshida, N. et al. Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by terpenoids contained in herbal medicines and natural products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 12, p. 2033-2039, 2006.

3. Moduladores fitoquímicos de PGP em isolados de *Haemonchus contortus* resistentes a ivermectina, triagens *in vitro* e expressão gênica

Resumo

Haemonchus contortus é o nematoide gastrointestinal mais importante em sistemas de pequenos ruminantes em todo o mundo e tem desenvolvido resistência a várias drogas, incluindo a ivermectina (IVM). Um dos principais mecanismos de resistência à IVM no *H. contortus* envolve a glicoproteína-P (PgP), uma proteína de transporte transmembrana que livra as células dos vermes de moléculas tóxicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a atividade anti-helmíntica de IVM isolada ou associada a diferentes compostos pertencentes à classe dos terpenos (alfa terpineno, beta citronelol, beta pineno, citronelal, limoneno, mentol e terpinoleno) e com compostos fenólicos (epicatequina, epigallocatequina, galocatequina, pentagalatoilglicose, procianidina e quercetina). Todos os compostos foram testados em isolado sensível (HcS) e resistentes (HcR) de *H. contortus* através do teste de desenvolvimento larval (TDL) e do teste de motilidade adulta (TMA) usando verapamil (VP), um conhecido modulador de PgP, como controle. Como esperado para o TDL, a concentração letal necessária para matar 50% dos nematóides (LC50) com IVM foi 10 vezes maior ($0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para HcR do que para HcS ($0,001 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A combinação IVM + VP inibiu a atividade de PgP em HcR resultando em $\text{LC}_{50} = 0,002 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As combinações IVM + limoneno e IVM + quercetina produziram $\text{LC}_{50} = 0,002 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (semelhante a IVM+VP) e foram escolhidas para testes subsequentes. Como os parasitas adultos são o alvo final dos anti-helmínticos, a IVM foi avaliada em HcS ($\text{LC}_{50} = 0,067 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e HcR ($\text{LC}_{50} = 164,94 \mu\text{g.mL}^{-1}$) através da AMT. Os resultados obtidos com IVM + VP ($\text{LC}_{50} = 0,020 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em HcR foram semelhantes a IVM + limoneno ($\text{LC}_{50} = 0,028 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e superaram IVM + quercetina ($\text{LC}_{50} = 1,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Quando o RNA extraído de vermes adultos HcR expostos a IVM, IVM+VP e IVM + limoneno foi avaliado quanto à expressão de PGP por RT-PCR, para a maioria das concentrações avaliadas, PGP-9 foi significativamente mais expresso em vermes tratados com IVM sozinho do que em vermes tratados com IVM + VP ou IVM + limoneno. Em conclusão, o limoneno está envolvido na modulação do gene PGP-9 e restaurou a atividade de IVM no isolado HcR de volta aos níveis observados em HcS. O limoneno é um dos principais compostos encontrados na casca cítrica e tem potencial para ser seguro e acessível se usado para restaurar a eficácia da IVM contra isolados multirresistentes de *H. contortus*.

Palavras-chaves: ivermectina, PGP, fitoquímicos, *Haemonchus contortus*, Resistência anti-helmíntica.

Abstract

Haemonchus contortus is the most important gastrointestinal nematode in small ruminant systems worldwide and has developed resistance to several drugs, including ivermectin (IVM). IVM is not only a veterinary drug, but also a safe, broad spectrum, antiparasitic drug used in humans. One of the main IVM-resistance mechanisms in *H. contortus* involves P-glycoprotein (PgP), a trans-membrane transport protein that rids worm cells from toxic molecules. The aim of this work was to evaluate and compare the anthelmintic activity of IVM alone or combined with essential oil main components which belongs to the class of terpenes (alpha terpinene, beta citronellol, beta pinene, citronellal, limonene, menthol, and terpinolene) and with phenolic compounds (epicatechin, epigallocatechin, gallic acid, pentagalloylglucose, procyanidin, and quercetin). All compounds were tested against susceptible (*HcS*) and resistant (*HcR*) isolates of *H. contortus* through the larval development test (TDL) and the adult motility assay (AMT) using verapamil (VP), a known PgP modulator, as a control. As expected for the TDL, the lethal concentration required to kill 50% of nematodes (LC_{50}) with IVM was 10 times greater ($0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for *HcR* than for *HcS* ($0.001 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The combination IVM + VP inhibited the activity of PgP in *HcR* resulting in a $LC_{50} = 0.002 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The combinations IVM + limonene and IVM + quercetin both produced $LC_{50} = 0.002 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (similar to IVM+VP) and were chosen for subsequent tests. Because adult parasites are the final target for anthelmintics, IVM was evaluated in *HcS* ($LC_{50} = 0.067 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and *HcR* ($LC_{50} = 164.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) through the AMT. Results obtained with IVM + VP ($LC_{50} = 0.020 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in *HcR* were similar to IVM + limonene ($LC_{50} = 0.028 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and outperformed IVM + quercetin ($LC_{50} = 1.39 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). When RNA extracted from *HcR* adult worms exposed to IVM, IVM+VP and IVM + limonene was evaluated for *PGP* expression by RT-PCR, for most concentrations evaluated, *PGP-9* was significantly more expressed in worms treated with IVM alone than worms treated with IVM + VP or IVM + limonene. In conclusion, limonene is involved in the modulation of the *PGP-9* gene and restored the activity of IVM in the *HcR* isolate back to levels seen in *HcS*. Limonene is one of the main compounds found in citrus peel and has the potential to be both safe and affordable if used to restore the efficacy of IVM against *H. contortus* multi-drug resistant isolates.

Keywords: ivermectin, PGP, phytochemicals, *Haemonchus contortus*, anthelmintic resistance

3.1. Introdução

As avermectinas são uma classe de lactonas macrocíclicas produzidas pela bactéria *Streptomyces avermitilis*, um actinomiceto isolado de uma amostra de solo do Japão há 42 anos, que sintetiza um complexo de oito avermectinas diferentes (Burg et al., 1979). Os pesquisadores Satoshi Omura e William Campbell compartilharam o Prêmio Nobel de Medicina de 2015 por suas descobertas de avermectinas no tratamento de infecções causadas por lombrigas (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/press-release/>). No entanto, esta molécula apresenta vários relatos de resistência adquirida em todo o mundo. Em ovinos, a resistência à ivermectina em *Haemonchus contortus* foi relatada pela primeira vez em 1987, aproximadamente dez anos após seu lançamento pela indústria farmacêutica veterinária (Carmichael et al., 1987; Waruiru et al., 1998).

Algumas hipóteses têm sido consideradas em estudos sobre a resistência a lactonas macrocíclicas em nematoides, como o envolvimento da glicoproteína P (permeabilidade) ou PgP, que é uma proteína hidrofóbica de membrana celular com alto peso molecular e alta lipofilicidade, e um membro dos transportadores dependentes de ATP. As PgPs são responsáveis pelo efluxo celular dos xenobióticos da célula, impedindo o acúmulo intracelular de xenobióticos, a PgP protege as células de moléculas potencialmente tóxicas (Ferreira et al., 2014).

Acredita-se que a superexpressão de genes que codificam para PgP seja a principal causa de MDR (Multidrug resistance) (Varma et al., 2003). A MDR é determinada não apenas pela expressão desses genes, mas também pelo nível de expressão desses genes, o que é crucial para que as células recebam sinalização e sejam capazes de realizar mudanças no sistema que levarão à resistência anti-helmíntica (Kerboeuf et al., 2003).

A presença de PgP foi verificada em todas as fases da vida de *H. contortus*, desde os ovos até o parasita adulto (Xu et al., 1998; Kerboeuf et al., 2003). PgP também foi encontrada na cutícula de larvas de primeiro e terceiro estágios. Assim, a presença de PgP nessas estruturas constitui uma barreira bioquímica protetora durante todos os estágios de desenvolvimento do parasita (Riou; Koch; Kerboeuf, 2005).

A modulação da PgP pode aumentar a disponibilidade de fármacos no interior da célula, competindo com o sítio de ligação do fármaco ou bloqueando a reação de hidrólise do ATP, proporcionando maior eficácia do fármaco (Azeredo; Uchôa; Costa, 2009). A modulação de transportadores dependentes de ATP associados à MDR, como a PgP, pode levar à reversão da MDR, principal mecanismo associado à perda de efeito das lactonas macrocíclicas (David et al., 2018).

Os moduladores de PgP são classificados em 4 gerações de acordo com os escores de toxicidade e incluem drogas sintéticas e compostos de origem natural. Os fitoquímicos são compostos naturais produzidos pelas plantas e estão incluídos na quarta geração, que contém drogas de baixa toxicidade para mamíferos (Bastos et al., 2015). Alguns fitoquímicos, como terpenos e compostos fenólicos, podem induzir ou inibir o metabolismo de drogas. PgP estão localizados na membrana apical do intestino fígado e rim. Nesses locais, essas proteínas podem limitar a disponibilidade oral de seus substratos, mediando a excreção hepatobiliar e intestinal direta. Além disso, participam de diversas barreiras fisiológicas, limitando a entrada de xenobióticos (Alvarez et al., 2010).

Citronelal, beta citronelol, alfa terpineno, terpinoleno, beta pineno e mentol avaliados neste estudo foram classificados como potenciais moduladores de PgP em pesquisas com células humanas (Yoshida et al., 2006). Compostos fenólicos como catequinas, pentagalloyl glicose e procianidinas também foram avaliados (Kitagawa; Nabekura; Kamiyama, 2004) (**Tabela 1**). O monoterpene limoneno foi avaliado quanto ao seu efeito de modulação de PgP em bactérias, mas não em *H. contortus* (**Tabela 1**). A coadministração de moduladores fitoquímicos de PgP com IVM pode reverter a resistência à IVM e outras drogas anti-helmínticas.

Tabela 1. Compostos monoterpênicos e fenólicos que foram previamente avaliados quanto à sua atividade como moduladores da glicoproteína P (PgP) e reversão da resistência a múltiplas drogas (MDR) em bactérias e células cancerígenas

	Pub Chem ID	Composto	Peso molecular g/mol	Atividade em PgP	Referências
	6321424	Ivermectina	875.1	-	-
	62969	Verapamil	491.1	Inibidor de PgP	Huber; Maruiama; Almeida, (2010)
	7462	Alfa terpineno	136.23	Inibidor de transporte mediado por Pg Pem células de cancer	Yoshida et al. (2006)
	14896	Beta pineno	136.23		Yoshida et al. (2006)
<i>Terpenoids</i>	7794	Citronellal	154.25		Yoshida et al. (2006)
	81263	Citronellol	156.26	Acúmulo intracelular de substrato de PgP	Eid et al. (2015)
	1254	Menthol	156.26		Yoshida et al. (2006)
	440917	Limoneno	136.23	Resistência reversa em bactérias MDR	Araújo et al. (2021)
	11463	Terpinoleno	136.23	Efeito prejudicial no crescimento de células cancerosas com alta expressão de PgP	Calcabrini et al. (2004)
	72276	Epicatequina	290.27	Inibição da atividade de Pg Pem células de linfoma de ratos	Martins et al. (2010)
	65064	Epigallocatequina	458.4	Acúmulo intracelular de substrato de PgP	Kitagawa; Nabekura; Kamiyama (2004)
<i>Phenolics</i>	9882981	Gallocatequina	306.27	Reversão de resistência a Drogas em células KB-A-1	Kitagawa; Nabekura; Kamiyama (2004)
	65238	Pentagalactoglucos e	940.7	Inibição de Pg Pem células MDR KB-C2 cells	Kitagawa et al. (2007)
	11250133	Procianidina	578.5	Inibição da função e expressão de PgP	Zhao et al. (2013)
	5280343	Quercetina	302.23	Inibição de PgP em células MDR	Mohana et al. (2016)

A interação de moduladores que podem reverter a resistência precisa ser estudada minuciosamente. Vários compostos moduladores de PgPs estão associados a lactonas macrocíclicas em diferentes espécies, propondo tratamentos eficazes contra diferentes parasitas (Lifschitz et al., 2002; Dupuy et al., 2003; Ballent et al., 2007; Alvinerie et al., 2008).

Isolados resistentes de *H. contortus* podem apresentar alta expressão para diferentes genes PgP, uma vez que o genoma foi totalmente sequenciado e pelo menos 10 genes relacionados a transportadores ABC foram observados (Laing et al., 2013). Dois genes foram identificados como os principais envolvidos na resistência: PgP-2 (expressa na faringe, primeira porção do intestino e tecidos nervosos adjacentes sugerindo a proteção dos nematoides contra os efeitos das lactonas macrocíclicas) (Reyes-Guerrero et al., 2020; Godoy et al., 2015) e PgP-9 foi superexpressa no sistema reprodutor feminino (útero de *H. contortus* adulto) em nematoide de verme resistente (Godoy et al., 2016).

O foco deste trabalho foi avaliar o efeito de uma combinação de diferentes fitoquímicos e ivermectina em isolados sensíveis e resistentes de *H. contortus* utilizando o teste de desenvolvimento larval (TDL) e o teste de motilidade adulta (TMA).

TDL e TMA foram utilizados para avaliar o efeito da droga. O último passo foi estudar a expressão gênica para verificar se havia alguma interferência dos moduladores IVM e PgP com os genes *PgP-9* em vermes tratados com esses compostos.

3.2. Material e Métodos

Os compostos avaliados foram: ivermectina (Sigma Aldrich), Verapamil (ChemCruz), alfa terpineno e mentol (AlfaAesar), beta pineno e limoneno (Sigma Aldrich ® ®), citronelal e citronelol (Dierberger®), epicatequina, epigalocatequina, galocatequina e quercetina (Cayman Chemical®), pentagalloyl glicose e procianidina (ChemCruz TM®). Os medicamentos e compostos fitoquímicos utilizados eram padrões moleculares com pelo menos 98% de pureza e foram adquiridos comercialmente. Os estudos publicados dos compostos avaliados são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Concentrações de fitoquímicos e ivermectina avaliadas em TDL

Composto	Concentração (ug/mL)
Ivermectina	1000; 10; 1; 0.1; 0.01; 0.001; 0.0001; 0.00001
Verapamil	1000; 100; 10; 1; 0.1
Alfa terpineno/Beta citronelol Beta pineno/Citronelal	1000; 100; 10; 1; 0.1; 0.01; 0.005
Limoneno/Mentol/Terpinoleno	3000; 300; 30; 3; 0.3; 0.03; 0.003
Epicatequina/Epigallocatequina Galocatequina/Quercetina	100; 10; 1; 0.1; 0.01; 0.001; 0.0001; 0.00001

3.2.1. Isolados de *Haemonchus contortus*

- *HcS*: isolado suscetível de *Haemonchus contortus*, denominado como RsHco1, mantida na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil (Amarante et al., 2017).
- *HcR*: isolado multirresistente de *H. contortus* (Almeida et al., 2010), denominado como SpHco2, e mantido na UNESP, campus de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil (Amarante et al., 2017).

Quatro cordeiros foram tratados com monepantel (ZolvixTM Novartis) com 2,5 mg/kg de peso vivo (PV) e levamisol (Ripercol® L 150 F Zoetis) a 1 mL/20 kg de PV para eliminar parasitas adquiridos por infecções naturais. Após a confirmação do *status* livre de parasitas por meio da contagem de ovos fecais (OPG), foram realizadas infecções artificiais com aproximadamente 4000 larvas de *H. contortus* de terceiro estágio (L3). Dois cordeiros foram infectados com isolado de *HcS* suscetível e dois cordeiros foram infectados com isolado de *HcR* resistente.

Os procedimentos e protocolos de manejo animal foram aprovados pelo Comitê de Ética em Bem-Estar Animal (CEUA-IZ) em Nova Odessa, São Paulo, Brasil e receberam o número de protocolo 257-18.

3.2.2. Teste de Desenvolvimento Larval (TDL)

O TDL foi realizado seguindo a metodologia de Hubert e Kerboeuf (1992) e Bizimenyera et al. (2006). O procedimento para recuperação dos ovos foi realizado de acordo com Coles et al. (1992).

Os compostos IVM, verapamil (VP) e os compostos fitoquímicos foram solubilizados em DMSO 0,5% e avaliados individualmente para obtenção dos valores de CL 50 e CL 90 (concentração letal média suficiente para matar 50% e 90% da população avaliada) de cada isolado de *H. contortus*. O VP foi utilizado neste estudo como controle positivo por representar uma classe de inibidores da PgP (Huber; Maruiama; Almeida, 2010). Os compostos e concentrações testados estão na Tabela 2.

As combinações foram determinadas a partir dos valores de CL 90 de cada composto (Tabela 3) onde a CL 90 de IVM foi adicionada à CL 90 de Verapamil e também a cada LC₉₀ de fitoquímicos para criar cada combinação.

Tabela 3. Concentrações letais (CL 50 e CL90 µg/mL-1) obtidas no Teste de Desenvolvimento Larval com isolado de *Haemonchus contortus* suscetível (HcS) e resistente (HcR) em resposta a compostos avaliados isolados e respectivos limites de confiança (LC)

Drogas e fitoquímicos	CL50 HcS	LC	CL90 HcS	LC	CL50 HcR	LC	CL90 HcR	LC
Ivermectina	0.001	0.0008 - 0.0015	0.01	0.007 - 0.013	0.01	0.005 - 0.022	0.4	0.218 - 0.994
Verapamil	4.10	1.52 - 6.70	43	29.7 - 59.6	7.26	5.68 - 8.75	30	25.3 - 39.1
Citronelal	0.33	0.10 - 0.66	8.4	5.10 - 16.2	3.67	1.11 - 9.07	41.9	12.0 - 407
Limoneno	242 .01	181.66 - 314.29	1568	1105 - 2511	256.33	189.65 - 354.99	1701	1061 - 3380
Mentol	48.28	18.72 - 82.43	579	386.6 - 1060	0.03	0.005 -0.068	0.36	0.22 - 0.65
Terpinoleno	26.72	15.68 - 38.57	1211	179.4 – 6278.7	188.48	153.25 - 233.57	598	444.8 - 923.2
Alfa Terpineno	13.49	7.04 - 21.13	142	88.3 - 290.9	2.87	0.677 - 5.63	30	16.5 - 99.6
Beta Citronelol	0.49	0.23 - 0.89	20	9.6 - 57.8	39.98	34.85 – 45.97	202	125.8 - 489.9
Beta Pineno	9.12	3.14 – 22.26	134	33.3- 1076	12.44	4.33 – 19.96	271	31.9 - 1850.9
Epicatequina	1.28	0.57 - 2.06	6.6	3.78 - 24.3	0.34	0.24 - 0.45	1.17	0.868 - 1.784
Epigallocatequina	5.24	2.77 - 11.84	29	12.83 - 275.2	12.54	9.64 - 16.50	45	31.2 - 84.2
Galocatequina	3.78	2.39 - 4.97	10	7.65 - 16.3	1.30	0.35 - 2.36	8	4.51 - 26.5
Pentagaloilglucose	60.11	50.06 - 81.81	128	91.1 - 284.2	41.45	32.82 - 53.44	117	84.3 - 206.0
Procianidina	10.38	8.41 - 12.80	27	21.2 - 42.0	9.38	7.38 - 11.96	24	17.7 - 38.5
Quercetina	0.41	0.28 - 0.45	110	0.26 - 225	0.005	0.002 - 0.009	0.08	0.045 - 0.223

Todos os compostos testados diminuíram as concentrações sempre pela metade até chegarmos a uma concentração em que as larvas tiveram seu pleno desenvolvimento.

Diluições seriadas dos fármacos e fitoquímicos foram feitas para serem aplicadas em 100 larvas L1 com seis repetições para cada concentração. Após 6 dias de incubação a 27°C e 80% de umidade relativa, as larvas L1 foram avaliadas em microscópio invertido para fazer uma contagem diferencial das larvas que atingiam, ou não, o estágio de desenvolvimento L3.

Os dados foram analisados pelo software estatístico SAS Probit para determinação de CL50 e CL90 de cada composto ou combinações como variáveis independentes (doses) após transformação logarítmica (log dose). Diferenças significativas entre as médias da concentração foram determinadas pelo teste de Tukey.

3.2.3. Teste de Motilidade de Adultos (TMA)

O TMA foi realizado seguindo a metodologia de Hounzangbe-Adote et al. (2005) com adaptações de O'Grady e Kotze (2004) para avaliar os efeitos do melhor resultado das associações obtidas no TDL.

Fêmeas adultas de *H. contortus* de ambos os isolados foram obtidas do abomaso de cordeiros infectados imediatamente após a eutanásia. Os parasitas foram lavados, mantidos em solução salina (37°C) e colocados em placas de 24 poços contendo meio de cultura (RPMI-1640, tampão Hepes, glicose, soro bovino, antibióticos e fungicida).

IVM, VP, limoneno, quercetina e respectivas combinações com IVM (compostos são os resultados mais promissores em TDL) foram solubilizados com DMSO (0,5%) e diluídos no meio de cultura.

A concentração de cada composto foi testada em ambos os isolados de *H. contortus*, em escala decimal decrescente. As dosagens foram estabelecidas de acordo com os resultados obtidos com o TDL. A IVM foi avaliada a 1000 (103) µg.mL⁻¹ e combinada com VP a 2000 µg.mL⁻¹, quercetina 4000 µg.mL⁻¹ e limoneno a 1000 µg.mL⁻¹. A concentração foi sempre determinada com base na IVM e na diminuição das concentrações nos potenciais (10³, 10², 10¹, 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵). As concentrações foram testadas em 6 repetições com 5 vermes/repetição. A motilidade foi verificada por observação em microscópio invertido após 24 horas de incubação a 37 °C.

Os dados foram analisados pelo software estatístico SAS Probit para determinação de CL₅₀ e CL₉₀ de cada composto ou combinações como variáveis independentes (doses) após

transformação logarítmica (log dose). Diferenças significativas entre as médias da concentração foram determinadas pelo teste de Tukey.

3.2.4. Análise da Expressão Gênica de *PgP-9* em Fêmeas Adultas Vivas de *H. contortus*

A expressão do gene *PgP-9* foi realizada com os melhores resultados observados para o ensaio de TMA (IVM + terpenos) com vermes sobreviventes expostos a fármacos a 10^1 a 10^{-5} g/ml. A *PgP-9* foi escolhida por causa de vários estudos que mostram uma forte interação entre esse gene e a ivermectina (Godoy et al., 2016). Outros genes, como o *PgP-2*, também são mencionados em estudos de resistência à IVM, no entanto, realizamos vários testes com Pgps (1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12 e 16) e comparamos a expressão gênica de todos esses Pgps entre cepas de *H. contortus* (sensível e multirresistente). Dentre todas as Pgps avaliadas, apenas a *Pgp-9* mostrou-se significativamente ($P < 0,05$) mais expressa na deformação resistente quando comparada à cepa sensível. (dados em fase de publicação).

As extrações de RNA foram obtidas a partir das amostras de diferentes tratamentos e concentrações testadas com o ensaio de TMA. Vermes vivos foram congelados a -96°C (nitrogênio líquido) para preservar o RNA. Amostras de RNA foram extraídas de um pool de 10 fêmeas adultas de *H. contortus* com três repetições biológicas ($n = 30$) para cada concentração de cada tratamento. IVM, IVM + VP e IVM + limoneno foram avaliados em 10^1 a 10^{-5} $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As extrações de RNA foram realizadas com reagente TRI (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, cat. N. T9424). Para a separação de fases (proteína, DNA e RNA), 1-bromo-3-cloropropano, isopropanol (2-propanol) e etanol a 75% foram utilizados para formar um pellet de RNA. A concentração e a pureza das amostras de RNA foram determinadas por espectrofotômetro BioDrop UV/VIS (Biochrom, www.analitica.com.br) e também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizado no DocTM XR + Gel System (equipamento Bio-Rad Laboratories), Hercules, CA, EUA). Todas as amostras foram ajustadas para a concentração final de 125 ng/ μL . A síntese de cDNA foi realizada com RNA previamente tratado com DNase em uma reação utilizando o kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade com inibidor de RNase (ref. No. 4374967, Applied Biosystems, CA, EUA).

A expressão gênica de *PgP-9* para cada concentração/tratamento foi analisada por RT-PCR quantitativa em um Rotor Gene Q (QIAGEN, Hilden, Alemanha) com HOT FIRE Pol Evagreen qPCR Supermix (Solis BioDyne, Tartu, Estônia) seguindo a recomendação do fabricante com cada amostra avaliada em duplicata. Os dados obtidos pela técnica de transcrição reversa, seguida da reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real

(RT-qPCR) foram analisados por um modelo linear misto com o software SAS "Mixed" (SAS Institute, Cary, NC), a fim de avaliar os níveis de expressão do gene da glicoproteína P desencadeado por diferentes interações. Os efeitos da dose foram testados dentro de cada tratamento e, para a comparação entre os tratamentos, cada dose foi analisada separadamente. As comparações das médias das alterações relativas na expressão gênica por grupos de tratamento (IVM, IVM+VP e IVM + limoneno) por concentração (10^1 - 10^{-5} $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney, e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3.3. Resultados

A CL50 para IVM, VP e cada fitoquímico avaliados individualmente e em combinações sob o desenvolvimento larval (TDL) de larvas sensíveis (HcS) e resistentes (HcR) a anti-helmínticos de *H. contortus* são mostradas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Concentrações letais (CL_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$) obtidas no Teste de Desenvolvimento Larval com isolado de *Haemonchus contortus* suscetível a anti-helmínticos (HcS) e resistente (HcR) em resposta a várias combinações com ivermectina (IVM).

IVM combinada com fitoquímicos	CL50 HcS	Limites de confiança 95%	CL50 HcR	Limites de confiança 95%
IVM + Verapamil	0.001	0.0004 - 0.002	0.002	0.001 - 0.003
IVM + Citronelal	0.08	0.01 - 13.14	0.02	0.012 - 0.018
IVM + Limoneno	0.00016	0.00001 - 0.0007	0.002	0.0009 - 0.004
IVM + Mentol	0.008	0.0002 - 0.010	0.04	0.026 - 0.060
IVM + Terpinoleno	6.55	0.2 - 10.6	0.030	0.021 - 0.043
IVM + Alfa Terpineno	0.02	0.004 - 0.06	0.02	0.009 - 0.042
IVM + Beta Citronelol	0.008	0.0004 - 0.01	0.03	0.020 - 0.036
IVM + Beta Pineno	0.0002	0.00008 - 0.0005	0.08	0.073 - 0.095
IVM + Epicatequina	0.05	0.006 - 3.232	0.034	0.031 - 0.037
IVM + Epigallocatequina	0.01	0.0009 - 0.01	0.03	0.034 - 0.045
IVM + Galocatequina	0.01	0.0006 - 0.01	0.013	0.011 - 0.014
IVM + Pentagaloilglucose	0.002	0.00116 - 0.00609	0.02	0.012 - 0.025
IVM + Procianidina	0.01	0.003 - 0.25	0.02	0.016 - 0.022
IVM + Quercetina	0.00002	0.00002 - 0.00005	0.002	0.001 - 0.004

Observou-se semelhança na responsividade das larvas de ambos os isolados ao limoneno, mentol e procianidina e pentagalactoglucose, demonstrando um padrão nos mecanismos de resposta para os respectivos isolados. A categorização em isolados suscetíveis ou resistentes é dada apenas com base em anti-helmínticos comerciais (Almeida et al., 2010; Amarante et al., 2017). A responsividade anti-helmíntica dos fitoquímicos pode ser diferente para cada isolado.

O monoterpeno mais eficiente no isolado suscetível foi o citrônalo, que apresentou CL50 de 0.33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. No isolado resistente o mais eficiente foi o alfa terpineno, que apresentou CL50 de 2.87 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em ambos os isolados o monoterpeno menos eficiente foi o limoneno que apresentou CL50 em *HcS*: 242.01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *HcR*: 256.33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A quercetina foi o fenólico mais eficaz, fornecendo uma CL50 de 0.41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em *HcS* e de 0.005 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em *HcR*. O fitoquímico menos eficiente foi o pentagalactoglucose (*HcS*: 160.33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *HcR*: 41.45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A procianidina demonstrou valores semelhantes de atividade anti-helmíntica em ambos os isolados (*HcR*: 9.38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *HcS*: 10.38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Quando testado em *HcR*, IVM apresentaram CL50 de 0.01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ enquanto em suscetível *HcS* apresentaram CL50 de 0.001 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Quando combinado com VP, IVM teve um aumento na sua eficácia em *HcR* (CL50: 0.002 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), confirmando o efeito inibitório da Pgp esperado da VP. Não houve aumento do efeito da IVM no isolado de *HcS* quando combinado com VP, como observado para o CL50 de IVM+VP em comparação com o IVM isolado.

A combinação de quercetina com IVM resultou no menor valor para CL50 (*HcS*: 0.002 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *HcR*: 0.002 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) demonstrando uma eficácia semelhante para o controle IVM + VP (0.002 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A galocatequina combinada com IVM mostrou um valor semelhante (0.01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) quando comparado com IVM testada isoladamente.

Quando a IVM foi combinada com limoneno e betapineno aumentou a eficácia da IVM no isolado de *HcS*. No entanto, no isolado de *HcR*, apenas a combinação IVM + limoneno foi capaz de aumentar a eficácia da IVM. Quaisquer outras combinações de IVM e fitoquímicos foram incapazes de aumentar a eficácia da IVM em qualquer isolado na primeira triagem usando o ensaio TDL.

Para o *screening* com vermes adultos (alvo final de nossos compostos testados), IVM, VP, limoneno, quercetina e suas respectivas combinações foram avaliados no Teste de Motilidade Adulta (TMA) para isolados resistentes a anti-helmínticos (*HcR*) e suscetíveis a anti-helmínticos (*HcS*) de fêmeas de *H. contortus* com os resultados apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Concentrações letais (CL50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtidas através do Teste de Motilidade com fêmeas adultas de *Haemonchus contortus* resistentes (Hc R) e suscetíveis (HcS) à ivermectina (IVM) e outros fármacos anti-helmínticos.

Drogas e fitoquímicos	CL50 HcS	Limites de confiança 95%	CL50 HcR	Limites de confiança 95%
IVM	0.067	0.016 - 0.295	164.94	70.71 - 399.63
VP	0.056	0.037 - 0.086	0.34	0.07 - 6.10
IVM+VP	0.050	0.025 - 0.110	0.17	0.07 - 0.35
Limoneno	1.063	0.670 - 1.736	7.36	4.95 - 11.10
IVM+Limoneno	0.048	0.029 - 0.081	0.028	0.017 - 0.043
Quercetina	*	*	*	*
IVM+Quercetina	0.295	0.169 - 0.599	1.39	0.444 - 4.720

* na dose mais elevada testada não foi eficaz (HcS: 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e HcR: 40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

IVM em HcS mostrou CL50 de 0,067 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ enquanto em HcR o CL50 foi de 164,94 $\mu\text{g} / \text{mL}$ em TMA. Em combinação com VP, observamos um aumento na eficácia do HcR (0,17 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O efeito da ivermectina é a paralisia nas estruturas musculares que leva os vermes à morte e isso poderia explicar a ampla faixa entre os limites superior e inferior.

VP isolado apresentou 0.056 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em HcS e 0.34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em HcR. Em ambos os isolados, a quercetina não foi eficaz, não sendo possível estimar sua CL50. No entanto, quando a IVM + quercetina foram combinadas, o aumento da eficácia da IVM foi tão bom quanto para a combinação IVM + VP, com CL50 de 0,295 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em HcS e 1,39 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em HcR (**Tabela 6**). Limoneno + IVM foram a melhor combinação em HcS e HcR com uma CL50 de 0,028 em HcR

Para detectar as interações genéticas entre fitoquímicos e IVM observadas no TMA, a expressão de *PgP* foi realizada nos mesmos vermes expostos a fitoquímicos e VP no ensaio de TMA (Figura 1).

Ao comparar as expressões genéticas de *PGP-9* em cada concentração fitoquímica e entre os tratamentos, o *PGP-9* foi significativamente ($p < 0,05$) mais expresso (ou regulado para cima) nas concentrações 10^1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10^0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 10^{-5} $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no tratamento da IVM quando comparada à IVM + VP (Figura 1). Essa maior expressão de IVM também foi observada em concentrações que também se mostraram superiores às concentrações

efetivas de limoneno, demonstrando o potencial do limoneno para atuar de forma semelhante à VP. Não foram observadas diferenças entre VP e limoneno em qualquer concentração.

Em relação à expressão do gene *PgP-9*, em geral, observou-se que o uso de IVM isoladamente resultou em regulação positiva da *PgP-9* quando comparado à sua expressão resultante de vermes fêmeas tratadas com fitoquímicos ou VP ($P < 0,05$). Em todas as concentrações, a IVM isoladamente apresentou maior expressão gênica quando comparada às combinações IVM + VP e IVM + limoneno (Figura 1). Embora a média geral de expressão gênica de IVM+VP tenha sido significativamente menor ($P < 0,05$) do que IVM + limoneno, essa diferença ($P < 0,10$) para cada concentração só foi observada nas concentrações de 0,1 e 10 μg (Figura 1).

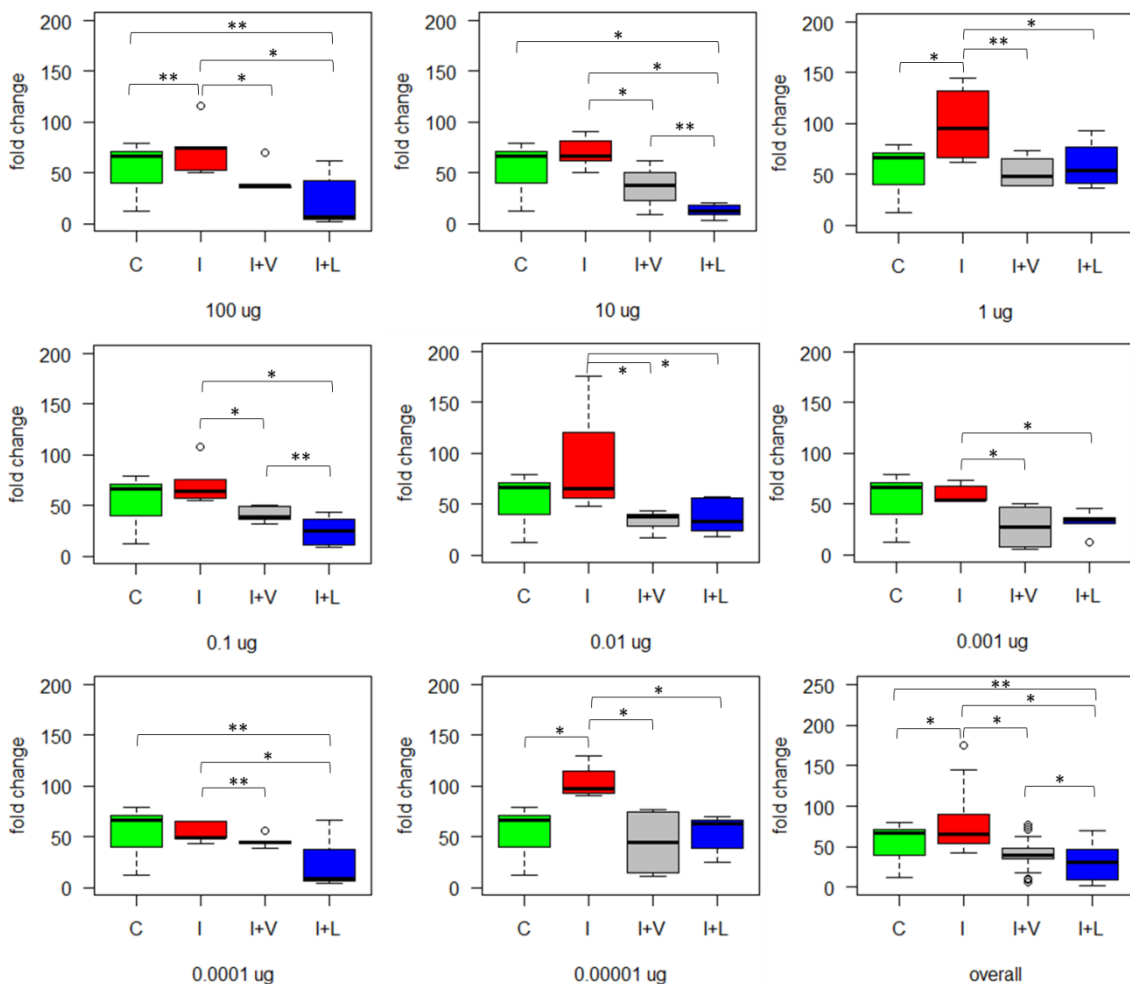


Figura 3.1. Nível de expressão gênica relativa de *PGP-9* analisado em *Haemonchu contortus* vivo tratado com Ivermectina (vermelho), Ivermectina + Verapamil (cinza) e Ivermectina + Limoneno (azul) entre as concentrações de 10^{-1} a 10^{-5} μg medida em amostras de RNA coletadas de fêmeas adultas e Controle (green). Comparações entre as diferentes concentrações foram feitas para cada tratamento. * = significativamente diferente em $P < 0,05$; ** = significativamente diferente em $P < 0,10$.

3.4. Discussão

No presente estudo foram avaliadas as combinações de IVM, VP e fitoquímicos no teste de desenvolvimento larval (TDL) e teste de motilidade de fêmeas adultas (TMA) de isolado suscetível (Hc S) e resistente (HcR) a anti-helmínticos e expressão gênica de PgP-9 de vermes expostos a IVM e combinações através de RT-PCR.

Observamos um aumento na eficácia da VP + IVM no TDL e No TMA em cepa resistente. Alguns autores obtiveram resultados semelhantes e atribuíram esse aumento ao potencial da VP para modular a atividade da PgP em testes *in vitro* de *H. contortus* (Molento; Prichard, 1999; Lespine et al., 2007; Bartley et al., 2009). No isolado suscetível não foi observado efeito, o CL₅₀ para IVM (0.001 ug.mL⁻¹) foi semelhante ao IVM + VP (0,001 ug.mL⁻¹) supostamente porque não havia resistência associada à PgP que pudesse sofrer a ação da VP.

Vários mecanismos estão relacionados à resistência anti-helmíntica a lactonas macrocíclicas em *H. contortus*, envolvendo beta tubulina (Baltrušis; Halvarsson; Höglund, 2020), enzimas relacionadas ao citocromo P450 (Kellerová et al., 2019) porém a superexpressão de transportadores ABC como a P-glicoproteína é o mecanismo mais citado devido ao seu envolvimento intrínseco com a resistência à ivermectina (Mate et al., 2022) sendo este o alvo do nosso estudo.

Um mecanismo de resistência à IVM em *H. contortus* altamente estudado é a glicoproteína P (PgP), uma proteína transmembrana que é um produto do gene Multiple Drug Resistance (MDR) e atua no efluxo de drogas e xenobióticos da célula nematoide (Lanusse et al., 2008). A atividade da PgP pode ser modulada usando VP, uma droga antiarrítmica que bloqueia os canais de cálcio e é amplamente utilizada para reverter a resistência à terapia antitumoral. Vários estudos têm demonstrado o potencial da VP para modular a atividade da PgP de *H. contortus* e reverter a resistência à IVM (Borges et al., 2011; Molento; Prichard, 2001).

Assim como o verapamil foi descoberto como modulador PgP, os fitoquímicos também estão sendo estudados na busca por um que também apresente essa ação. Os fitoquímicos avaliados em nosso trabalho foram previamente testados em estudos que investigaram o potencial desses fitocompostos para modular a atividade da PgP ou reverter a resistência a múltiplas drogas. Epicatequina, epigallocatequina, galocatequina, pentagalolil glucose (Kitagawa; Nabekura; Kamiyama, 2004), quercetina (Heckler et al., 2014; Mohana et al., 2016; Borges et al., 2020), epigallocatequina (Mohana et al., 2018), procianidina (Zhao et al., 2013),

α -terpineno, β -citronelol, β -pineno e citronelal (Yoshida et al., 2006), limoneno (Zhang; Lim, 2008), mentol (Eid et al., 2015) e terpinoleno (Calcabrini et al., 2004) foram previamente apresentados como moduladores de PgP.

Nem todas as combinações de fitoquímicos com ivermectina melhoraram os resultados como IVM + VP. Quando utilizado isoladamente, o limoneno apresentou baixa atividade na TDL em ambos os isolados. No entanto, em combinação com a IVM, foi uma das combinações que tiveram a melhor atividade anti-helmíntica em ambos os isolados. Na TMA os resultados foram semelhantes. O limoneno foi capaz de aumentar a eficácia da IVM em *HcS* e em *HcR* sendo considerado o mais promissor dos fitoquímicos avaliados. O potencial do limoneno para interferir no metabolismo de drogas foi objeto de um estudo com outras drogas, como o midazolam. O limoneno interferiu na hidroxilação do midazolam diminuindo sua metabolização (Zhang; Lim, 2008) e tem sido relatado para modular a função dos receptores nicotínicos de acetilcolina humana (Lozon et al., 2016).

Um estudo *in vitro* recente sobre o efeito de fitoquímicos associados ao levamisol no *Oesophagostomum dentatum* demonstrou que o óxido de limoneno inibiu poderosamente um receptor nicotínico de acetilcolina (Choudhary et al., 2019). Esses autores também mostraram que o óxido de limoneno e o carvacrol produziram uma inibição não competitiva do receptor de acetilcolina, indicando que a atividade desses compostos não envolve a ligação ao local de ligação do agonista para produzir efeitos. Recentemente relatou que uma combinação de limoneno com carvacrol mostrou atividade contra *Leishmania major* com CL50 variando de 5,8 a 19,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Carvalho et al., 2021).

Dentre os compostos fenólicos, a quercetina apresentou a melhor eficácia em ambos os isolados em TDL. A atividade anti-helmíntica da quercetina foi relatada anteriormente por Klongsiriwet et al. (2015) em TDL com *H. contortus*. No TMA não foi possível estimar a eficácia da quercetina devido à falta de eficácia anti-helmíntica na dose mais alta testada, confirmando resultados semelhantes de Borges et al. (2020). No entanto, a combinação de quercetina com IVM foi capaz de aumentar a eficácia da IVM em *HcR* e *HcS* em TDL e TMA.

Nas doses mais altas testadas, a quercetina isoladamente não teve efeito anti-helmíntico em isolados suscetíveis ou resistentes em TMA. No entanto, a IVM + Quercetina em suscetível apresentou CL50 menor que o isolado resistente. Embora, a categorização em isolados suscetíveis ou resistentes seja dada apenas com base em anti-helmínticos comerciais (Almeida et al., 2010; Amarante et al., 2017), a interação desse composto fenólico na resistência *Haemonchus contortus* precisa ser investigada para elucidar as peculiaridades com diferentes graus de resistência.

Essas diferenças encontradas nos dois testes TDL ou TMA, que avaliam o verme em diferentes estágios de desenvolvimento, podem ser explicadas com hipóteses que sugerem que a expressão da *PgP* em larvas em desenvolvimento pode ter maior afinidade pela quercetina do que as expressas em adultos, ou nenhuma afinidade pela quercetina (Borges et al., 2020). Além disso, os níveis de expressão de *PgP* podem variar de acordo com o estágio helmíntico de desenvolvimento (Dicker; Nisbet; Skuce, 2011; Sarai et al., 2013; Raza et al., 2015). Mecanismos de defesa adicionais, como sistemas enzimáticos e transportadores, podem ocorrer em adultos e com maior intensidade em isolados resistentes (Bartley et al., 2012). Todas essas informações explicam os resultados observados para a quercetina também em TMA.

Diferenças semelhantes observadas para o *Haemonchus contortus* tratado com a mesma combinação de fármaco/metabolito secundário em diferentes fases da vida também foram observadas por outros autores. Lespine et al. (2012) explicaram que pode haver uma especificidade nos mecanismos de efluxo que podem interferir na eficácia da IVM em alguns estágios do desenvolvimento de nematoides. Por outro lado, compostos como procianidina e pentagalactose, compostos capazes de se ligar seletivamente a membranas e proteínas (Okuda, 2005), através da saturação de proteínas solúveis e da ligação eficiente da membrana em comparação com outros compostos similares (Hofmann et al., 2006).

No entanto, a falta de atividade de compostos como a epicatequina, como visto aqui, pode estar relacionada à sua estrutura química, pois estudos mostraram que a metilação seria uma modificação razoável para melhorar sua atividade (Lee; Shim; Zhu, 2005). Os compostos epigallocatequina, epicatequina e galocatequina, embora amplamente utilizados como moduladores de *PgP* devido à sua baixa citotoxicidade em alguns relatos da literatura (Sano et al., 2001; Schauss et al., 2006) não aumentaram a eficácia da IVM neste caso. Estudos sugerem que a ação de compostos como os mencionados acima ocorre sinergicamente entre si, por isso seria prudente supor que seu uso combinado em animais produziria melhor bioatividade do que quando usado separadamente, por exemplo, as catequinas são muito concentradas no chá verde, principalmente epigallocatequina galato e epigallocatequina (Sano et al., 2001). O chá é relatado para ter vários benefícios para a saúde e catequinas que têm ácido gálico em sua estrutura são frequentemente relatadas para ter maior capacidade antioxidante e atividade bactericida (Schauss et al., 2006; Ferreira et al., 2010).

Embora existam alguns estudos envolvendo a atividade anti-helmíntica de fitoquímicos (Katiki et al., 2011; 2017), contra *H. contortus in vitro*, e alguns estudos *in vivo* (Squires et al., 2010; Silva et al., 2021), não encontramos estudos envolvendo o mecanismo exato de ação

desses fitoquímicos em *H. contortus*. No entanto, compostos como o limoneno foram relatados para modular a função dos receptores nicotínicos de acetilcolina humana (Lozon et al., 2016).

Um fato a ser destacado neste estudo é que os terpenos combinados com IVM seguiram o mesmo padrão observado para compostos fenólicos em ambos os isolados. Em combinação com a IVM, todos os terpenos aumentam a eficácia anti-helmíntica, o que era esperado devido ao efeito aditivo ou sinérgico da droga anti-helmíntica na combinação (Yoshida et al., 2006; Zhou et al., 2007).

No entanto, esses não são os únicos mecanismos que explicam esse aumento de eficácia. A atividade dos moduladores de PgP ocorre por meio de mecanismos relacionados à expressão do gene *PgP* ou por inibição competitiva com proteínas de membrana ou por fosforilação de proteínas de transporte. Estudos sobre o potencial de reversão de alguns fitoquímicos e reversão da resistência a múltiplas drogas em células tumorais têm mostrado que a atividade dos moduladores é dependente das combinações de dose e substrato (Wink, 2012; Eid et al., 2015).

As propriedades lipofílicas dos terpenóides óleos essenciais são responsáveis pela sua afinidade com a bicamada de fosfolipídios celulares (Dorman; Deans, 2000). O alvo dos terpenos óleos essenciais é a membrana, e esta é provavelmente a razão pela qual os óleos essenciais interferem na suscetibilidade do organismo a drogas (Nazzaro et al., 2013), como nos casos em que a tolerância ao medicamento está relacionada a bombas de efluxo localizadas dentro da membrana celular, como a PgPs.

A atividade anti-helmíntica da IVM em *H. contortus* avaliada por meio de TDL e TMA é amplamente discutida na literatura (Malik et al., 2020), embora existam poucos relatos sobre a atividade anti-helmíntica de fitoquímicos purificados combinados com a IVM. Portanto, esses resultados podem aumentar nossa compreensão sobre fitoquímicos para estudos futuros. Alguns dos fitoquímicos avaliados neste estudo demonstraram o potencial de aumentar a eficácia da IVM em TDL e em TMA. Embora seja um fato bem conhecido que as alterações estruturais presentes em diferentes estágios da vida dos nematoides de *H. contortus* podem interferir no processo de captação de drogas anti-helmínticas, como a difusão através de cutículas em estádios larvais e células intestinais em estágio adulto (Lifschitz; Lanusse; Alvarez, 2017), alguns estudos sugerem que a PgP está ativa e presente em todos os estágios de nematoides (Riou; Koch; Kerboeuf, 2005).

Em relação ao estudo de expressão gênica *PgP*, as associações IVM + VP e IVM + limoneno resultaram em menor expressão gênica em *H. contortus* resistente, em comparação com o tratamento IVM, em todas as concentrações avaliadas. O modo de ação pelo qual esses

fármacos podem reverter a multirresistência não foi totalmente estabelecido, porém a resistência à ivermectina pode ser aumentada com o uso de anti-helmínticos, um estudo mostrou que há uma mudança na frequência alélica com o aumento gradual da ivermectina que exerce pressão de seleção genética (Frota et al., 2017). Yusa e Tsuru (1989) mostraram em células cancerosas que a VP se liga diretamente à PgP, sugerindo que ela reverte a resistência inibindo competitivamente o local usado para o transporte de drogas. Estudos têm demonstrado que a VP aumentou significativamente o efeito anti-helmíntico da IVM e da moxidectina contra isolados selecionados de *H. contortus* em cobaias e gerbos (Xu et al., 1998, Molento; Prichard, 1999).

Na comparação das expressões gênicas de cada concentração e entre os tratamentos, o *PGP9* foi significativamente regulado positivamente ($p < 0,05$) em vermes tratados com IVM quando comparados ao IVM + VP. É possível selecionar vermes resistentes induzidos por IVM como monoterapia, estando essa resistência associada a níveis mais elevados de RNAm PgP do que isolados não selecionados (Xu et al., 1998), o que nos leva a sugerir que a superexpressão de *PgP* nesse parasita pode ser consequência da pressão seletiva causada pela IVM.

A hipótese levantada pelo nosso estudo corrobora um estudo anterior (Molento; Prichard, 1999) que descreveu a VP como um agente bloqueador de PgP em um isolado de *Haemonchus contortus* resistente à IVM. O gene PgP foi claramente mais expresso na cepa resistente à IVM e a VP não apenas interage com a PgP, mas também a bloqueia, aumentando o efeito da IVM. Em nosso estudo, o gene PgP-9 foi mais expresso na IVM e os resultados mostraram um aumento no efeito da IVM quando associado à VP e sugerem a interação isolada do composto com a PgP, embora os efeitos dessa droga sobre os canais de cálcio presentes nas estruturas musculares do parasita precisem ser mais investigados.

No entanto, isso também foi observado em combinação com limoneno (menor expressão gênica de PgP-9 em todas as concentrações avaliadas quando comparado à IVM), levando a mais questões sobre como os fitoquímicos agem na PgP como a VP, suprimindo a expressão de genes de resistência. Outros fitoquímicos foram estudados para este efeito sobre a expressão gênica (Kitagawa; Nabekura; Kamiyama, 2005) e os transportadores de hidrólise de ATP e substrato ABC são fortemente acoplados pela maioria dos compostos.

Observamos que o principal componente do óleo essencial de casca de *citros* (limoneno) apresentou um comportamento semelhante ao VP, de modo que um estudo *in vivo* deve ser realizado para validar o potencial bloqueio da PgP que levaria a um aumento da eficácia clínica da IVM promovida por sua associação com o limoneno.

Os estudos citados na literatura sobre a PgP em cepas suscetíveis concluíram que a diferença nos fatores de resistência pode refletir a forma como as cepas sensíveis e resistentes lidam com a exposição à IVM e as diferentes formas como a resistência foi selecionada nesses isolados, uma vez que o regime de tratamento tem se mostrado um fator importante na determinação das respostas fenotípicas ao tratamento anti-helmíntico (Bartley et al., 2009; Le Jambre et al., 1999; Sutherland; Brown; Leathwick, 2003).

Alguns dos moduladores fitoquímicos utilizados neste estudo apresentam potencial anti-helmíntico, como observado nos resultados dos testes com os isolados e que devem ser estudados no futuro. A combinação com moléculas anti-helmínticas, como a ivermectina, pode ser benéfica, pois cada composto pode atuar por diferentes mecanismos, atuando em diferentes locais do parasita ajudando na resistência (Lanusse et al., 2018).

A investigação sobre a cinética *in vivo* de fitoquímicos individualmente e combinada com a IVM, o aumento da eficácia da IVM alcançada neste estudo pode levar à melhora da eficácia da IVM contra *H. contortus* resistente, possibilitando a reversão da resistência relacionada ao mecanismo de efluxo da PgP é muito importante. Em combinação com a IVM, a eficácia do limoneno foi semelhante à observada para a combinação controle de IVM + VP no isolado resistente a anti-helmínticos de *H. contortus* (modulação esperada da atividade da PgP); no entanto, nenhuma eficácia foi observada para o limoneno quando usado isoladamente. Isso também sugere que poderíamos fazer um grande progresso se investirmos no emparelhamento de compostos naturais com drogas anteriormente eficazes, como a IVM, e investigarmos os efeitos anti-helmínticos dos fitoquímicos.

3.5. Conclusão

Em nosso estudo, ambos os testes *in vitro* realizados em *H. contortus* resistente a IVM, determinaram que a combinação de IVM + limoneno reverteu a tolerância à IVM em uma cepa de *H. contortus* resistente a medicamentos de forma semelhante à combinação controle de IVM + VP, embora nenhum efeito tenha sido observado quando o limoneno foi usado isoladamente. Assim, os benefícios de encontrar produtos naturais que possam sinergizar com a IVM ou reverter a tolerância à IVM em parasitas patogênicos é de enorme benefício para a saúde de seres humanos e animais em todo o mundo.

Referências

- Almeida, F. A. et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, p. 622-625, 2010.
- Alvarez, I. A. et al. Modulation of the Activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 598-617, 2010.
- Alvinerie, M. et al. Ketoconazole increases the plasma levels of ivermectin in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1-2, p. 117-122, 2008.
- Amarante, M. R. V. et al. PCR primers for straightforward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their hybrids. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 6, p. 757-761, 2017.
- Ambudkar, S. V. et al. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 361-398, 1999.
- Araújo, A. C. J. et al. In vitro and in silico inhibition of staphylococcus aureus: efflux pump nora by α -pinene and limonene. **Current Microbiology**, v. 78, p. 3388–3393, 2021.
- Azeredo, F. J.; Uchôa, F. T.; Costa, T. D. P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, p. 321-326, 2009.
- Ballent, M. et al. Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep: itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 3, p. 242-248, 2007.
- Baltrušis, P.; Halvarsson, P.; Höglund, J. Utilization of droplet digital PCR to survey resistance associated polymorphisms in the β tubulin gene of *Haemonchus contortus* in sheep flocks in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v. 288, art. 109278, 2020.
- Bartley, D. J. et al. Influence of pluronic 85 and ketoconazole on disposition and efficacy of ivermectin in sheep infected with a multiple resistant *Haemonchus contortus* isolate. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 464-472, 2012.
- Bartley, D. J. et al. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 136, p. 1081-1088, 2009.
- Bastos, M. L. et al. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 149, p. 1-123, 2015.
- Bizimenyera, E. S. et al. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 336-343, 2006.
- Borges, D. G. L. et al. Combination of quercetin and ivermectin: In vitro and in vivo effects against *Haemonchus contortus*. **Acta Tropica**, v. 201, p. 105-213, 2020.
- Borges, F. A. et al. Weak phenotypic reversion of ivermectin resistance in a field resistant isolate of *Haemonchus contortus* by verapamil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 731-736, 2011.

- Burg, R. W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, p. 361-367, 1979.
- Calcabrini, A. et al. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 2, p. 349-360, 2004.
- Campbell, W. C. Lessons from the history of Ivermectin and other antiparasitic agents. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 1-14, 2016.
- Carmichael, I. et al. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 58, n. 2, p. 53, 1987.
- Carvalho, R. D. C. V. et al. Limonene-carvacrol: A combination of monoterpenes with enhanced antileishmanial activity. **Toxicology in Vitro**, v. 74, art. 105158, 2021.
- Choudhary, S. et al. Menthol acts as a positive allosteric modulator on nematode levamisole sensitive nicotinic acetylcholine receptors. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 9, p. 44-53, 2019.
- Coles, G. C. C. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.
- David, M. et al. Structural model, functional modulation by ivermectin and tissue localization of *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-13. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, p. 145-157, 2018.
- Deferme, S.; Van Gelder, J.; Augustijns, P. Inhibitory effect of fruit extracts of P-glycoprotein-related efflux carriers: An in-vitro screening. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 1213-1219, 2002.
- Dicker, A. J.; Nisbet, A. J.; Skuce, P. J. Gene expression changes in a P-glycoprotein (Tci-pgp-9) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 935-942, 2011.
- Dolinská, M. et al. Detection of ivermectin resistance by a larval development test-back to the past or a step forward? **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 154-158, 2013.
- Dorman, H. J. D.; Deans, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.
- Dupuy, J. et al. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 4, p. 337-347, 2003.
- Eid, S. Y. et al. Natural products modulate the multifactorial multidrug resistance of cancer. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 6, art. 146, 2015.
- Ferreira, J. F. S. et al. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. **Molecules**, v. 15, p. 3135-3170, 2010.
- Geary, T. G. et al. *Haemonchus contortus*. Ivermectin-induced paralysis of the pharynx. **Experimental Parasitology**, v. 77, p. 88-96, 1993.

Gill, J. et al. Ivermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*: effects of ivermectin resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 463-470, 1995.

Godoy, P. et al. Characterisation of P-glycoprotein-9.1 in *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, art. 52, 2016.

Godoy, P. et al. *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-2: in situ localisation and characterisation of macrocyclic lactone transport. **International Journal for Parasitology**, v. 45, p. 85-93, 2015.

Hofmann, T. et al. Protein Binding and Astringent Taste of a Polymeric Procyanidin, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose, Castalagin, and Grandinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p. 9503-9509, 2006.

Hounzangbe-Adote, M. S. et al. In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 155-160, 2005.

Huber, P. C.; Maruiama, C. H.; Almeida, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, p. 2148-2154, 2010.

Hubert, J.; Kerboeuf, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v. 30, p. 442-446, 1992.

Katiki, L. M. et al. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 47-51, 2017.

Katiki, L. M. et al. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 103-108, 2011.

Kellerová, P. et al. Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in *Haemonchus contortus* female and male adults. **Veterinary Parasitology**, v. 273, p. 24-31, 2019.

Kerboeuf, D. et al. P-Glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 223, p. 332-346, 2003.

Kitagawa, S.; Nabekura, T.; Kamiyama, S. Inhibition of P-glycoprotein function by tea catechins in KBC2 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1001-1005, 2004.

Kitagawa, S. et al. Inhibition of P-glycoprotein function by tannic acid and pentagalloyl glucose. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 965-969, 2007.

Klongsiriwet, C. et al. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, p. 127-134, 2015.

Laing, R. et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-16, 2013.

Lanusse, C. et al. Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 34, p. 664-682, 2018.

- 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.
- Lee, W. J.; Shim, J. Y.; Zhu, B. T. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. **Molecular Pharmacology**, v. 68, p. 1018-1030, 2005.
- Lespine, A. et al. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: Structure–affinity relationship. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, p. 84-94, 2007.
- Lespine, A. et al. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 2, p. 58-75, 2012.
- Lifschitz, A.; Lanusse, C.; Alvarez, L. Host pharmacokinetics and drug accumulation of anthelmintics within target helminth parasites of ruminants. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 65, p. 176-184, 2017.
- Loo, T. W.; Clarke, D. M. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein mediated drug efflux. **The Journal of Membrane Biology**, v. 206, p. 173–185, 2005.
- Lozon, Y. et al. Inhibition of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors by cyclic monoterpene carveol. **European Journal of Pharmacology**, v. 776, p. 44-51, 2016.
- Malik, M. A. et al. Comparative efficacy of oral formulations of ivermectin and levamisole under in vitro conditions against *Haemonchus contortus*. **Pakistan Journal of Science**, v. 72, n. 1, p. 48-53, 2020.
- Martins, A. et al. Constituents of *Carpobrotus edulis* Inhibit P-Glycoprotein of MDR1-transfected Mouse Lymphoma Cells. **Anticancer Research**, v. 30, p. 829-836, 2010.
- Mate, L. et al. ABC-transporter gene expression in ivermectin-susceptible and resistant *Haemonchus contortus* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 302, art. 109647, 2022.
- Mohana, S. et al. Screening dietary flavonoids for the reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer. **Molecular BioSystems**, v. 128, p. 2458-2470, 2016.
- Mohana, S. et al. Flavonoids modulate multidrug resistance through wnt signaling in P-glycoprotein overexpressing cell lines. **BMC Cancer**, v. 18, p. 1-11, 2018.
- 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 isolates of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). **Parasitology Research**, v. 85, p. 1007-1011, 1999.
- Nabekura, T.; Kamiyama, S.; Kitagawa, S. Effects of dietary chemopreventive phytochemicals on P-glycoprotein function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 327, p. 866-870, 2005.
- Nazzaro, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451–1474, 2013.
- O'Grady, J.; Kotze, A. C. *Haemonchus contortus*: in vitro drug screening assays with the adult life stage. **Experimental Parasitology**, v. 106, p. 164-172, 2004.

Okuda, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012-2031, 2005.

Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J.; Santos-Buelga, C. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1822-1825, 2012.

Raza, A. et al. Effects of third generation P-glycoprotein inhibitors on the sensitivity of drug-resistant and susceptible isolates of *Haemonchus contortus* to anthelmintics in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 211, p. 80-88, 2015.

Rendic, S. P. Metabolism and interactions of Ivermectin with human cytochrome P450 enzymes and drug transporters, possible adverse and toxic effects. **Archives of toxicology**, v. 95, p. 1535-1546, 2021.

Reyes-Guerrero, D. E. et al. Comparative study of transcription profiles of the P-glycoprotein transporters of two *Haemonchus contortus* isolates: Susceptible and resistant to ivermectin. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 238, art. 111281, 2020.

Riou, M.; Koch, C.; Kerboeuf, D. Increased resistance to anthelmintics of *Haemonchus contortus* eggs associated with changes in membrane fluidity of eggshells during embryonation. **Parasitology Research**, v. 95, p. 266-272, 2005.

Sano, M. et al. Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **The Analyst**, v. 126, p. 816-820, 2001.

Sarai, R. S. et al. Acetylcholine receptor subunit and P-glycoprotein transcription patterns in levamisole-susceptible and resistant *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 3, p. 51-58, 2013.

Schauss, A. G. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8604-8610, 2006.

Silva, M. T. S. P. et al. Adverse reactions after orange essential oil administration to lambs. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 25, art. 100593, 2021.

Sutherland, I. A.; Brown, A. E.; Leathwick, D. M. The effect of anthelmintic capsules on the egg output and larval viability of drug-resistant parasites. **Veterinary Research**, v. 27, p. 149-157, 2003.

Squires, J. M. et al. Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 95-99, 2010.

Tülümen, E.; Borggreffe, M. Modulation of calcium handling: calcium-channel modulators. In: Martínez-Rubio, A.; Tamargo, J.; Dan, G. A. **Antiarrhythmic Drugs**. New York: Springer Cham, 2020. p. 233-264

Varma, M. et al. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 347-359, 2003.

Waruiru, R. M. et al. Multiple anthelmintic resistance on a goat farm in Kenya. **Veterinary Parasitology**, v. 75, p. 191-197, 1998.

Watanabe, T. et al. Induction of hepatic P-glycoprotein enhances biliary excretion of vincristine in rats. **Journal of Hepatology**, v. 23, p. 440-448, 1995.

Wen-Fu, T. et al. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European Journal of Pharmacology**, v. 17, p. 255-262, 2003.

Wink, M. Secondary metabolites from plants inhibiting ABC transporters and reversing resistance of cancer cells and microbes to cytotoxic and antimicrobial agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, art. 130, 2012.

Yang, J. H. et al. Inhibition of Lung Cancer Cell Growth by Quercetin Glucuronides via G2/M Arrest and Induction of Apoptosis. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, p. 296-304, 2005.

Xu, M. et al. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 327-335, 1998.

Yoshida, N. et al. Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by essential oils contained in herbal medicines and natural products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 12, p. 2033-2039, 2006.

Yusa, K.; Tsuru, T. Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasmamembrane of K562/ADM cells. **Cancer Research**, v. 49, p. 5002–5006, 1989.

Zhang, W.; Lim, L. Y. Effects of spice constituents on P-glycoprotein-mediated transport and CYP3A4-mediated metabolism in vitro. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, p. 1283-1290, 2008.

Zhao, B. X. et al. Grape seed procyanidin reversal of p-glycoprotein associated multi-drug resistance via down-regulation of NF- κ B and MAPK/ERK mediated YB-1 activity in A2780/T cells. **PloS One**, v. 8, art. 0071071, 2013.

Zhou, S. F. et al. Identification of drugs that interact with herbs in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 664-673, 2007.

4. Limoneno associado à ivermectina: eficácia anti-helmíntica e ação de reversão da resistência *in vivo*

Resumo

A verminose em ovinos é controlada principalmente com produtos químicos, e o uso indiscriminado acarreta no aumento do número de casos de resistência e o custo elevado deste problema levou à busca de alternativas do seu uso ou potencializar seu efeito. Nesse sentido, um experimento *in vivo* foi proposto para verificar a interação entre o limoneno fornecido no concentrado associado a uma dose de ivermectina oral em cordeiros artificialmente infectados. Vinte e quatro cordeiros Dorper com aproximadamente 5 meses de idade infectados artificialmente com uma isolado resistente de *Haemonchus contortus* foram agrupados em 4 tratamentos: CONTROLE (sem nenhum tratamento), LIMO (200 mg limoneno/kg/peso corporal (PC)/dia), LIVM (200 mg limoneno/kg/PC/dia e uma dose oral única de Ivermectina 1 mL/4kg PC), IVM (1 mL/4kg PC). O OPG foi feito continuamente para monitoramento e confirmação da infecção artificial confirmada no D-30, no D0 iniciou se o fornecimento de limoneno e 15 dias depois foi feita a administração da dose oral de ivermectina (D1), e seguiram as coletas de fezes em sete (D7) e quatorze dias (D14) após esta administração. Ao final dos 14 dias, os animais foram eutanasiados para contagem do total de vermes, medidas de comprimento de machos e fêmeas, fertilidade das fêmeas pela contagem dos ovos. Observamos que após 7 dias da administração da IVM os tratamentos LIVM e LIMO diferiram entre si e dos demais ($p < 0,005$), nesta coleta apenas o IVM foi igual ao CONTROLE. LIVM diferiu do CONTROLE e IVM, enquanto o tratamento LIMO não apresentou diferenças do controle ($p < 0,005$), LIVM e IVM. O tratamento IVM diferiu apenas do LIVM ($p < 0,005$). Não foram observadas diferenças nas contagens de vermes e comprimento de machos e fêmeas, entre tratamentos. No entanto, a fertilidade da fêmea foi afetada, sendo maior no grupo LIVM e CONTROLE. Em relação as variáveis hematológicas observamos que o grupo IVM apresentou os maiores índices de células vermelhas e hemoglobina enquanto os grupos LIMO e LIVM apresentaram os maiores índices de células brancas durante todo o período experimental. Apenas o grupo CONTROLE apresentou redução no GMD (ganho de peso médio diário), os outros apresentaram ganhos de até 70 g/animal/dia. O uso do Limoneno como fator de incremento de eficácia da ivermectina se mostrou uma promissora alternativa sendo importante ser investigado mais detalhadamente para validação do método.

Palavras-chave: ivermectina, ovinos, óleo, nutrição.

Abstract

The development of resistance to anthelmintics and the high cost of conventional anthelmintics led to the search for phytochemicals as an alternative source of anthelmintics. In this sense, an in vivo experiment was proposed to verify the interaction between limonene supplied in the diet with the concentrate and a deworming step with oral ivermectin in artificially infected lambs. Were evaluated twenty-four Dorper lambs at approximately 5 months of age artificially infected with a resistant strain of *Haemonchus contortus* grouped into 4 treatments: control, limo (limonene - 200 mg/kg/pv/day supply), livm (limonene plus ivermectin supply of 200 mg/kg/pv/day and a single oral dose of Ivermectin 1 mL/4kg BW), ivermectin (1 mL/4kg BW). FEC were performed for confirmation of artificial infection and 15 days before start limonene supply (D0), on the day of ivermectin administration (D1), seven (D7) and fourteen days (D14) after administration. At the end of the 14 days, the animals were euthanized for counting the total worms present in the abomasum, evaluating the measurements of males and females, evaluating the fertility of the females evaluated by counting the eggs present inside each female. The treatment LIVM and LIMO on D7, differed from each other and from the others ($p < 0.005$), in this collection only the IVM was equal to the CONTROL. LIVM differed from the control and IVM, while the LIMO treatment showed no differences from the control ($p < 0.005$), LIVM and IVM. The IVM treatment differed only from LIVM ($p < 0.005$). No differences were observed in the worm counts and length parameters of males and females, in the treatments. However, female fertility was affected, as we observed statistical differences between Control and LIMO ($p < 0.05$) and LIMO and LIVM ($p < 0.05$). About hematological parameters we observed statistical differences ($p < 0.05$) in WBC (white blood cell), RBC (red blood cell) and MCV (mean corpuscular volum). The parameters HGB (hemoglobin), HCT (hematocrit), MCH (mean corpuscular hemoglobin), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) and PLT (Platelet) not showed differences. The use of Limonene as a control alternative to the use of anthelmintics in livestock, it is important to emphasize that research must be conducted for validation.

Keywords: ivermectin, lambs, oil, nutrition.

4.1. Introdução

Em ovinos, o controle da verminose é realizado principalmente com produtos químicos, porém o uso indiscriminado acarreta o aumento do número de casos de resistência (FAO, 2003).

A resistência aos anti-helmínticos é um problema mundial que gera grande demanda por métodos alternativos de controle, pois ao longo dos anos, com o rápido surgimento de parasitas resistentes aos medicamentos, o método tradicional de controle com anti-helmínticos tornou-se ineficaz (Knox; Torres-Acosta; Aguilar-Caballero, 2006). A ivermectina faz parte do grupo de anti-helmínticos de amplo espectro denominado lactonas macrocíclicas (LM), que são agentes anti-helmínticos de amplo espectro de terceira geração para ruminantes, e os mecanismos exatos de resistência a esta classe parecem ser poligênicos, envolvendo vários ou muitos genes (Köhler, 2001).

Com o surgimento de isolados de nematoides que apresentam resistência múltipla, a busca por medidas que possam reverter o quadro de resistência pode constituir como alternativa para o controle dos endoparasitas. Essa situação serve para subsidiar pesquisas sobre estratégias de controle de parasitas, como vacinas, produtos biológicos, suplementos nutricionais, compostos bioativos, entre outros (Guo et al., 2016).

Segundo Jackson e Coop (2000), o sucesso da reversão depende da frequência de genes de resistência na população parasitária e a reversão da resistência pode ser alcançada através da diluição de genes resistentes, substituição total de populações, reversão natural ou uso de drogas moduladoras.

O primeiro gene associado à resistência a LM em *Haemonchus contortus* foi o PgP A um gene que codifica a glicoproteína P, uma glicoproteína de membrana integrante da família de transportadores ABC (*ATP binding cassette*) (Xu et al., 1998).

Essas glicoproteínas são produtos do gene MDR (resistência a múltiplas drogas) e atuam como uma bomba de efluxo para xenobióticos, removendo substratos da camada lipídica para o espaço extracelular (Molento; Prichard, 1999).

De modo que alterações no gene que codifica esta proteína é um fato associado à resistência, pois afetam o transporte de drogas como a ivermectina (Blackhall; Prichard; Beech, 2008) não alterando o alvo da droga, mas reduzindo a quantidade de droga que chega ao local alvo (James; Hudson; Davey, 2009).

Um conceito aplicado às células tumorais é a reversão da resistência múltipla por meio de drogas moduladoras. Esses moduladores atuam competindo com drogas de interesse

terapêutico por sítios de ligação à PgP, impedindo que sejam removidas da célula-alvo e/ou inibindo a hidrólise de ATP (Schwab et al., 2003).

Uma possibilidade que visa reverter a resistência aumentando a eficácia é a combinação com fitoquímicos para reduzir os mecanismos bioquímicos de resistência (Lespine et al., 2008). É possível encontrar na literatura avaliações do potencial anti-helmíntico de alguns fitoquímicos para ruminantes (Molan et al., 2003; Hoste; Torres-Acosta, 2011; Katiki et al., 2017; 2019). Vários compostos mostraram-se moduladores da atividade da P-gp (Ballent et al., 2005) e algumas combinações têm sido propostas para melhorar a biodisponibilidade sistêmica de drogas no hospedeiro, resultando em tratamentos eficazes contra parasitas e na reversão da resistência (Lifschitz et al., 2010; Lespine et al., 2012).

O limoneno é utilizado como substância ativa, como aditivo zootécnico para alimentação de ruminantes no intuito de avaliar as respostas de desempenho de bovinos em terminação confinados (Meschiatti et al., 2016) porém há poucas informações sobre outros potenciais uso deste óleo.

Objetivou-se com este estudo verificar a interação entre limoneno dietético fornecido com o concentrado e uma etapa de desparasitação com ivermectina oral em cordeiros infectados artificialmente com *H. contortus*.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Procedimentos com Animais

Animais: O estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos em experimentação animal, aprovados pelos Comitês de Ética protocolo número: 005-2020. Vinte e quatro cordeiros Dorper com aproximadamente 5 meses de idade foram alojados em baias individuais, medindo 1,0 m × 2,0 m. Antes do experimento, os animais foram vermifugados com o anti-helmíntico Monepantel (Zolvix® - dose 0,1 mL/kg peso corporal (PC)) e Levamisol (Ripercool® - dose 1 mL/kg PC).

Infecção artificial: A linha do tempo do período experimental está descrita na Figura 1. Os cordeiros foram infectados com duas doses de 8.000 larvas L3 de isolado multirresistente de *H. contortus* com resistência a moxidectina, closantel, triclorfon, fosfato de levamisol, albendazol e ivermectina (Almeida et al., 2010) com intervalo de 7 dias (-30d ou -35d, Figura 1). Os animais foram classificados de acordo com o FEC e distribuídos igualmente

para balancear cada tratamento, essa distribuição só foi realizada quando a infecção por *H. contortus* foi estabelecida, para isso foram realizados testes de OPG diariamente para monitorar a infecção.

Decorridos 15 dias (-15d, Figura 1) foi feito o exame de fezes para contagem dos ovos por grama de fezes (OPG) para agrupar os animais nos 4 tratamentos com 6 cordeiros em cada: CTL (Controle somente a infecção); LIM (Limoneno); LIVM (Limoneno e Ivermectina) e IVM (Ivermectina). Os animais do tratamento LIM passaram a receber 200 mg de limoneno/kg PC adicionado ao concentrado até o final do experimento. Após 15 dias de consumo com o limoneno, os grupos LIVM e IVM foram vermifugados com ivermectina por via oral na dose de 1 mL/4kg PC (considerado dia zero).

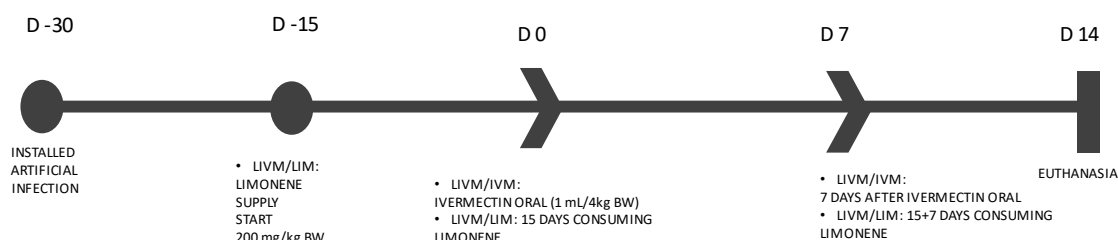


Figura 4.1. Linha temporal do período experimental.

Alimentação: A forragem utilizada como volumoso foi feno de *Cynodon* spp., tanto o feno quanto água foram oferecidos *ad libitum*. Todos os cordeiros foram alimentados com concentrado com 18% de proteína bruta. A alimentação foi ofertada em duas refeições diárias, uma às 8h e outra às 16h. O limoneno foi administrado apenas pela manhã, misturado ao concentrado, após o consumo deste foi fornecido o feno de *Cynodon*.

Tratamentos: O limoneno foi cedido pela Citrosuco (Matão/SP, Brasil). As análises por Cromatografia Gasosa–Espectrometria de Massas foram realizadas em um equipamento GC-MS modelo 7890A/5975C (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos).

As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna capilar de sílica fundida HP-5-MS (30 m × 0,250 mm i.d., 0,25 µm de espessura de filme) da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA) usando hélio como gás transportador com uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹. O programa do forno começou a uma temperatura inicial de 60°C que foi mantida por 1 min. Depois disso, foi aumentada a uma taxa de 4 °C min⁻¹ a 100 °C e mantida por 1 min,

depois aumentada novamente a 8 °C min⁻¹ a 160 °C, mantida por 1 min. Finalmente, a temperatura do forno foi aumentada a uma taxa de 35 °C min⁻¹ para 230 e mantida por 5,0 min.

Uma alíquota de 1 µL de cada amostra foi injetada no sistema GC/MS. A temperatura do injetor empregada foi de 280°C com uma razão de divisão de 1:20. As temperaturas da interface GC-MS e da fonte MS foram de 280 e 230 °C, respectivamente.

A ionização foi realizada pelo modo de impacto de elétrons (EI) a 70 eV e o MS foi operado em modo de varredura completa na faixa de m/z de 40 a 300. Os espectros de massa da biblioteca (NIST - US National Institute of Standards and Technology) foram usados para tentativa de identificação dos compostos. A proporção de cada composto foi estimada dividindo sua área média pela área total do cromatograma e expressa em porcentagem.

Os parâmetros de cromatografia gasosa-espectrometria de massa são descritos na tabela a seguir.

Tabela 1. Os principais constituintes do óleo de limoneno detectados por GC-MS.

LIMONENO		
Tempo de retenção (min)	Área %	Composto - Similaridade (%)
10,476	0,76	1R- α -Pineno (97%)
12,112	0,54	β -Felandreno (91%)
12,917	1,89	β -Pineno (91%)
13,362	0,07	α -Felandreno (80%)
13,580	0,20	3-Careno (97%)
14,621	95,22	Limoneno (94%)
17,203	0,41	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil (90%)
18,427	0,07	Limonene oxide, cis (90%)
18,606	0,07	7- Oxabicyclo[4.1.0]heptano, 1- metil-4-(1- metiletenil)- (53%)
20,427	0,38	3-Ciclohexeno - 1-metanol, alfa, alfa.4- trimetil (90%)
21,994	0,08	Methyltricyclo [2.2.1.0(2,6)] heptano (35%)
24,915	0,03	Copaeno (96%)
25,197	0,03	1H-Ciclopental [1,3] ciclopropa[1,2] benzene, octahidro-7- metil-3- metilene-4-(1- metiletil)-, [3aS- (3a.alfa.,3b.)] (87%)
25,767	0,02	Cariofileno (86%)
25,938	0,02	1H- Ciclopropa[a]naftaleno, 1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahidro- 1,1,7,7a-tetrametil-, [1aR- (1alfa,7alfa.,7alfa)] (87%)
27,00	0,17	Naftaleno, 1,2,3,5,6,7,8,8a- octahidro-1,8a- dimetil-7-(1- metiletenil)-, [1S- (1alfa,7alfa, 8 alpha)] (97%)
27,343	0,03	Naftaleno, 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7- dimetil-1-(1- metiletil)-, (1S-cis) (96%)
		Area total 99,99%

4.2.2. Procedimentos Laboratoriais

Análises laboratoriais

Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e teste de redução na contagem de ovos fecais (TRCOF): As fezes foram coletadas diretamente do reto uma vez por semana para realização do OPG de acordo com Ueno e Gonçalves (1998). Os animais foram eutanasiados no 14d (44 dias após a infecção). O abomaso foi removido para contagem total de vermes e os vermes foram separados em frascos por sexo com um estereoscópio microscópico. A redução na contagem de ovos fecais foi determinada de acordo com Coles et al. (1992):

$$\text{TRCOF} = \left[1 - \left(\frac{\text{grupo tratado com EPG}}{\text{grupo de controle EPG}} \right) \right] \times 100.$$

Medições de vermes: Cem vermes adultos machos e cem fêmeas (dez vermes escolhidos aleatoriamente de cada animal) de cada tratamento foram medidos com uma régua micrométrica.

Fecundidade de vermes fêmeas: A fecundidade também foi verificada em 100 fêmeas de cada tratamento (10 vermes escolhidos aleatoriamente de cada animal) que tiveram seus ovos internos quantificados. Para isso, cada fêmea foi colocada em um tubo plástico contendo 950 µL de uma solução de hipoclorito de sódio com 0,25% de cloro ativo. O tubo foi agitado em vórtex até que os fragmentos do parasita até a completa dissolução, seguido da adição de 50 µL de solução de tiosulfato de sódio a 1% (um neutralizador de cloro) para evitar a degradação do ovo. O número total de ovos em cada tubo foi estimado pela contagem de 10 gotas de 10 µL cada, o que permitiu o cálculo do número de ovos por fêmea (Kloosterman; Albers; Van Den Brink, 1978).

Perfil hematológico: O hemograma completo dos animais foi realizado com um analisador de sangue (POOCH-VET, Sysmex®) calibrado para a espécie ovina. Os leucócitos foram diferenciados contando 100 células de esfregaços de sangue corados com coloração panóptica.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições. As contagens de ovos por grama de fezes e vermes foram transformadas em $\log(x+1)$. Utilizamos o modelo PROC MIXED (SAS) Inst., Inc., Cary, NC) para variáveis tomadas mais de uma vez no tempo e o modelo PROC GLM para variáveis realizadas apenas uma vez, considerando o nível de significância de 5 %.

4.3. Resultados

Os resultados obtidos da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) são apresentados de acordo com o decorrer do período experimental na tabela 2. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,005$) entre os tratamentos nas coletas referentes a D-30 e D0. Houve efeito de tratamento, tempo e interação entre os dois.

O tratamento LIVM e LIMO no D7, diferiram entre si e dos demais ($p < 0,005$), nesta coleta apenas o IVM foi igual ao CONTROL. LIVM diferiu do controle e IVM, enquanto o tratamento LIMO não apresentou diferenças do controle ($p < 0,005$), LIVM e IVM. O tratamento IVM diferiu apenas do LIVM ($p < 0,005$).

Tabela 2. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) nos diferentes tratamentos controle (CONT), limoneno (LIMO), limoneno + ivermectina (LIVM) e ivermectina (IVM).

Tempo	Tratamentos					P		
	CONT	LIMO	LIVM	IVM	SE	Trat.	Temp	T x T
-15	3460	3662	3533	2900	1088	-	-	-
0	1283	1312	2575	1925	1088	-	-	-
7	1233 _a	625 _{ac}	91 _{ac}	5237 _b	1088	-	-	-
14	800	921	330	1870	1088	-	-	-
								0.1662
média	1694	1630	1632	2983	455	-	0.0053	-
TRCOF (%)	0	95.1	98.6	32	-	-	-	-

CONT: Controle; LIMO: Limoneno; IVM: Ivermectina; LIVM: Limoneno + Ivermectina; SE: Erro padrão; Trat: Tratamento; Temp: Tempo em que amostra foi coletada; TxT: Tempo versus Tratamento. TRCOF: Teste de redução da contagem de ovos nas fezes. P: valor de P. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p \leq 0,05$); letras diferentes minúsculas na mesma linha diferem umas das outras ($p \leq 0,05$).

Não foram observadas diferenças nas contagens de vermes e parâmetros de comprimento de machos e fêmeas, entre os tratamentos ($p > 0,05$). No entanto, observamos que houve maior fertilidade nos tratamentos CONTROLE e LIVM: Controle e LIMO ($p < 0,05$) e LIMO e LIVM ($p < 0,05$).

Tabela 3. Contagem média \pm S.D. de *Haemonchus contortus*, medidas corporais (cm) fecundidade (ovos/fêmea) dos parasitas recuperados do abomaso dos animais avaliados no experimento.

Variáveis	CONTROLE	LIMO	LIVM	IVM
Cont. Fêmeas	61.14 \pm 20.14	18.57 \pm 20.14	30.33 \pm 20.14	41.28 \pm 20.14
Cont. Machos	60.57 \pm 18.78	29.42 \pm 18.78	29.67 \pm 18.78	47.14 \pm 18.78
Cont. Total	121.71 \pm 38.63	47.99 \pm 38.63	60.00 \pm 38.63	88.42 \pm 38.63
Comp. Fêmeas	1.88 \pm 0.035	1.90 \pm 0.039	1.84 \pm 0.041	1.89 \pm 0.038
Comp. Machos	1.38 \pm 0.022	1.37 \pm 0.022	1.41 \pm 0.029	1.37 \pm 0.024
Ovos por fêmea	1669 ^a \pm 109	1304 ^b \pm 122	1742 ^a \pm 128	1456 ^{ab} \pm 118

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

Em relação aos parâmetros hematológicos observou-se diferenças ($p < 0,05$) na contagem de hemácias (glóbulos vermelhos), VCM (volume corpuscular médio) e nos leucócitos (glóbulos brancos). Ao final do experimento o grupo IVM apresentou os maiores índices de contagem de hemácias e hemoglobina, enquanto na contagem de glóbulos brancos os grupos que receberam limoneno apresentaram os maiores índices durante todo o período experimental (Figura 2).

As variáveis HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média) e PLT (plaquetas) não apresentaram diferenças.

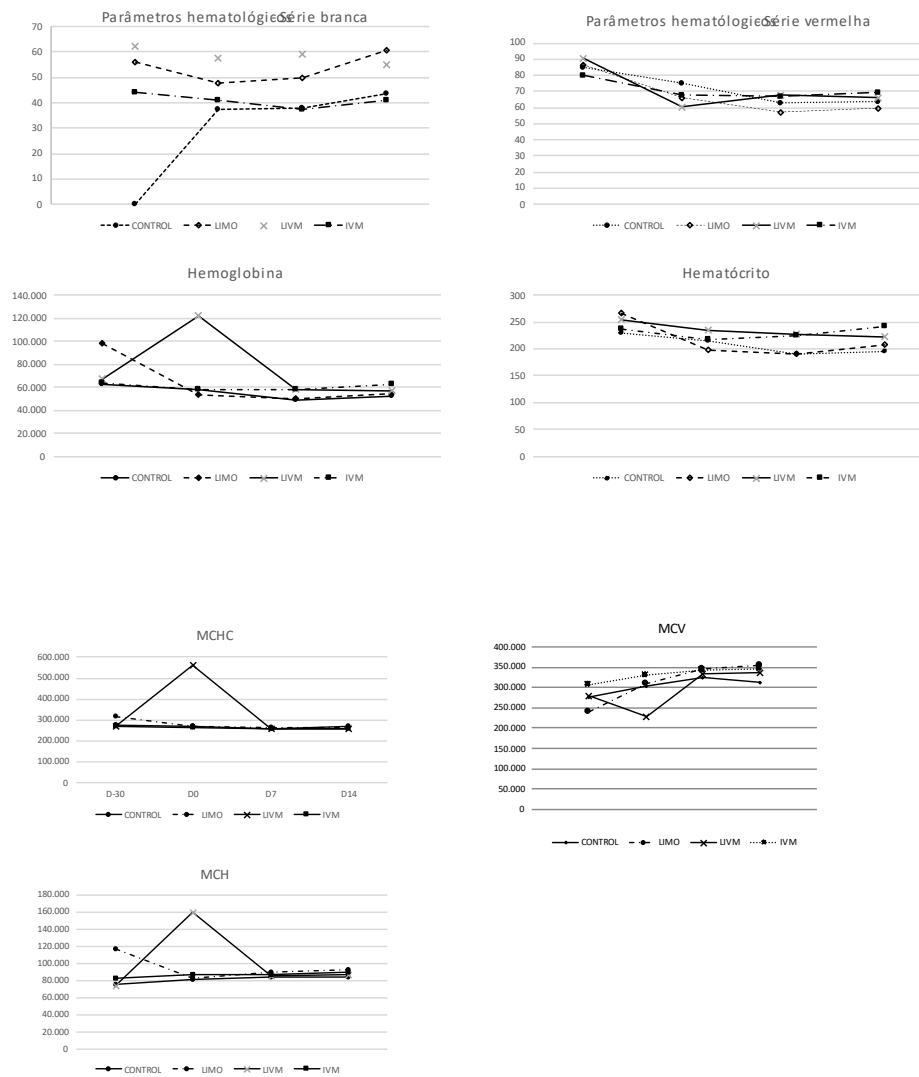


Figura 4.2. Parâmetros hematológicos: Série branca (glóbulos brancos), Série vermelha (glóbulos vermelhos), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média) e PLT (plaquetas).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos: Uréia, Creat (Creatinina), AST (Aspartato Amino Transferase), GGT (Gama glutamil transferase), BRB Total (Bilirrubina Total), BRB Direta (Bilirrubina direta), BRB Indireta (Bilirrubina Indireta) mg/dL.

TRAT.	TEMPO	UREIA	CREAT.	AST	GGT	BRB TOTAL	BRB DIRETA	BRB INDIRETA
CONTROLE	-15	42.40	1.26	105.80	59.20	0.34	0.19	0.15
	0	20.80	1.37	134.20	35.60	0.32	0.19	0.13
	7	35.60	1.22	122.80	47.60	0.30	0.14	0.15
	14	22.80	1.18	94.20	62.00	0.35	0.20	0.14
	Média	30.40	1.26	114.25	51.10	0.32	0.18	0.14
LIMO	-15	47.50	1.21	83.83	62.66	0.31	0.20	0.11
	0	20.00	1.26	101.67	25.00	0.32	0.20	0.12
	7	21.50	1.26	101.67	25.00	0.31	0.20	0.11
	14	27.50	1.27	97.33	57.83	0.30	0.20	0.10
	Média	29.12	1.15	96.12	42.62	0.31	0.20	0.11
LIVM	-15	41.50	1.28	78.66	67.16	9.851	0.26	0.13
	0	24.20	1.17	82.93	23.80	0.37	0.25	0.12
	7	34.60	1.11	80.20	55.00	0.36	0.23	0.13
	14	11.80	1.05	85.60	41.20	0.38	0.25	0.13
	Média	28.02	1.25	81.85	46.79	2.73	0.25	0.13
IVM	-15	44.83	1.21	87.83	52.00	0.27	0.14	0.13
	0	23.83	1.16	75.00	37.83	0.28	0.17	0.11
	7	26.00	1.13	83.00	37.83	0.28	0.17	0.11
	14	29.66	1.11	96.50	48.50	0.29	0.16	0.12
	Média	31.08	1.15	85.58	44.04	0.28	0.16	0.12
P	TxT	0.010	-	-	0.007	-	-	-
	Trat.	-	-	0.023	<.0001	-	0.007	-
	Tempo	<.0001	-	-	-	-	-	-

Foram observadas diferenças estatísticas entre coletas e entre tratamentos para Ureia e GGT; para Creatinina, Bilirrubina Total e Bilirrubina indireta não foram observadas diferenças estatísticas. Entre tratamentos foram observadas apenas para AST e Bilirrubina Direta.

Os animais dos grupos LIMO, LIVM e IVM apresentaram GMD - ganho médio diário de peso corporal de 50 g, 70 g e 50 g respectivamente e apenas os animais do grupo controle demonstrou redução no GMD (-30 g).

Tabela 8. Peso corporal médio (kg) dos ovinos nas diferentes datas e ganho em peso médio diário (GMD g/animal/dia) nos tratamentos Controle (control), Limoneno (LIMO), Limoneno + Ivermectina (LIVM), Ivermectina (IVM).

Variáveis	Tratamentos			
	CONTROL	LIMO	LIVM	IVM
-30	28.62	24.66	25.06	27.93
0	27.84	25.58	26.13	29.00
14	27.22	27.25	28.38	30.20
Média	27.89	25.83	26.52	29.04
GMD	-30	57	73	50

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p \leq 0,05$); letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem umas das outras ($p \leq 0,05$).

4.4. Discussão

O desenvolvimento da resistência e o alto custo dos anti-helmínticos convencionais levaram a pesquisa de fitoquímicos como fonte alternativa para incrementar a eficácia das drogas já existentes no mercado de saúde animal.

Neste sentido esse experimento foi proposto para verificar o potencial efeito de incremento de eficácia e reversão de resistência. Para analisar tais efeitos foram feitas coletas periódicas de sangue, fezes, peso e ao final do experimento o abate dos animais para análise dos parasitas do abomaso.

Na avaliação dos resultados, observamos redução na contagem de ovos fecais dos cordeiros dos grupos LIVM e LIMO. Alguns experimentos *in vivo* já demonstraram redução de 97,4% na contagem de ovos nas fezes de animais que receberam doses de 600 mg/kg/PC em óleos com 95% de limoneno (Squires et al., 2010) e 76,6% no OPG de animais que receberam doses de 500 mg/kg/PC de *Eucalyptus staigeriana* que tem o Limoneno como principal constituinte (28,82%) Macedo et al. (2010). No TRCOF (teste de redução da contagem de ovos nas fezes) observou-se redução de 95,1% do OPG nos animais que receberam doses de 200 mg/kg/PC/dia e redução do OPG de 98,6% nas doses de 200 mg/kg/PV/dia e dose única de IVM.

A baixa resposta ao tratamento com dose única oral de IVM (TRCOF: 32% no grupo IVM) provavelmente se deve à resistência anti-helmíntica da isolado utilizada para infecção artificial (Almeida et al., 2010). Este resultado corrobora com os dados encontrados por Melo et al. (2013) com reduções de OPG de 30,9% em caprinos e 24,6% em ovinos, assim como Pereira et al. (2008) que obtiveram reduções de 14,2% em caprinos e 20,7% em ovinos.

Este fato alerta para o avanço da resistência tendo em vista que o fármaco utilizado neste estudo é um produto comercial amplamente comercializado no Brasil e utilizado no controle de nematoides em muitas fazendas para pequenos ruminantes (Melo et al., 2013).

Após o período de avaliação dos tratamentos, os animais foram eutanasiados e o abomaso foi coletado para verificação de parâmetros morfométricos como contagem total de vermes, fertilidade de fêmeas e comprimento de machos e fêmeas. Diferenças significativas no parâmetro de fertilidade das fêmeas foram observadas entre CONTROL (1669±109) versus LIMO (1304±122) e LIMO (1304±122) versus LIVM (1456±118) alguns estudos associam o tamanho das fêmeas com fertilidade (Leignel; Cabaret, 2001) porém neste estudo essa correlação não foi possível, pois não foram encontradas diferenças significativas no comprimento dos nematoides, tanto machos quanto fêmeas. Sobre a contagem total, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Em relação ao OPG e TRCOF, os resultados desta pesquisa demonstram que o tratamento proposto com limoneno e dose única de ivermectina foi tão eficaz quanto o tratamento apenas com limoneno, porém é importante ressaltar que a manutenção do baixo OPG só foi observada em LIVM no 14º dia após a administração do IVM.

Naturalmente, a infecção pode oscilar após certo período devido a fatores como alimentação (Mendes et al., 2020), imunidade do animal (Freitas et al., 2022) mas a administração concomitante de Limoneno durante esses dias não permitiu que isso ocorresse nos animais do grupo LIVM. Este fato contrasta com o observado na administração de IVM apenas, em que a infecção não só retorna a níveis elevados, mas sequencialmente ao tratamento há um aumento do OPG, este fato pode ser explicado pela ameaça sentida pela espécie quando entra em contato com uma droga anti-helmíntica (Costa et al., 2011).

O limoneno é conhecido como um promotor de funções imunológicas, por exemplo, o limoneno demonstrou promover a apoptose celular em estudos que examinaram o índice de apoptose ou expressões de genes/proteínas relacionadas à apoptose em modelos de camundongos. Em dois estudos sobre mecanismos preventivos de câncer, descobriu-se que o limoneno poderia restaurar a capacidade antioxidante ou as funções imunológicas que foram prejudicadas pelo câncer. Esses resultados apoiaram a potencial aplicabilidade do limoneno na inibição do desenvolvimento do câncer (Zhou; Azrad; Kong, 2021; Stoner, 2020).

Além disso, o tratamento com limoneno pode induzir a infiltração leucocitária e aumentar a atividade de enzimas redox como glutatona, glutatona S-transferase, glutatona peroxidase e outras (Chaudhary et al., 2012), essas enzimas fazem parte do sistema de defesa enzimática antioxidante e são responsáveis por desintoxicantes de espécies reativas de oxigênio

(ERO). As EROs podem ser produzidas por neutrófilos e macrófagos em resposta imune a parasitas, não possuem ação específica contra o patógeno, causam a morte do parasita, mas também danos teciduais, por exemplo, danos na mucosa abomasal de cordeiros infectados por *H. contortus* (Machado et al., 2014).

A forma mais eficiente de avaliar a higidez do animal é através da obtenção da concentração de hemoglobina. Animais em estado de carência protéica apresentam alterações na biossíntese desta, resultando no desenvolvimento de anemia (Alvares, 2006). Tais condições podem ser observadas clinicamente em animais nos quais tenha havido uma perda de proteínas séricas considerável, ou inadequada ingestão ou digestão protéica (Szarfare et al., 1995).

A resposta imune é fundamental na defesa contra agentes infecciosos e no impedimento da ocorrência de altas infecções associadas a uma alta taxa de mortalidade do hospedeiro. Para que o animal esteja realmente protegido contra parasitas e microrganismos, é necessário que ele tenha um sistema imunológico atuando de forma eficiente e eficaz (Janeway, 2001), e o limoneno pode estar envolvido nas funções imunológicas dos cordeiros devido à sua capacidade de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes.

Durante o período experimental não houve efeitos colaterais nos animais tratados, portanto, apesar de seu uso ser sinalizado como alternativa de controle ao uso de anti-helmínticos na pecuária, é importante ressaltar que pesquisas relacionadas ao metabolismo ruminal também devem ser realizadas para ajuste de dosagem e para avaliação dos efeitos de toxicidade.

Os animais dos grupos que receberam o limoneno na dieta apresentaram GMD entre 50 g/animal/dia e 70 g/animal/dia enquanto os animais do grupo controle apresentaram redução de peso na média geral do grupo, esse incremento no peso pode estar relacionado ao fato de que a suplementação lipídica, com uso de óleos, é uma alternativa para prover aumento da densidade energética das rações (Lopez et al., 2007), a adoção desta prática, como forma de elevar a energia da ração, para animais em confinamento tem também a vantagem de não apresentar os inconvenientes distúrbios metabólicos digestivos, frequentemente causados por dietas ricas em amido com alta proporção em grãos neste caso poderíamos ter um efeito sobre a microbiota muito discutido quando se fala de óleos em dietas de ruminantes.

4.5. Conclusão

O limoneno associado à ivermectina mostrou-se uma alternativa para ser pontualmente implementada na dieta de pequenos ruminantes buscando aumentar a eficácia de ivermectina, maiores estudos acerca do uso de fitoquímicos para incremento de eficácia precisam ser estimulados e discutidos.

Referências

- Almeida, F. A. et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, n. 4, p. 622-625, 2010.
- Ballent, M. et al. Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: in vitro and in vivo assessments. **Drug metabolism and Disposition**, v. 34, n. 3, p. 457-463, 2006.
- Blackhall, W. J.; Prichard, R. K.; Beech, R. N. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1-2, p. 101-107, 2008.
- Chaudhary, S. et al. D-Limonene modulates inflammation, oxidative stress and Ras-ERK pathway to inhibit murine skin tumorigenesis. **Human & Experimental Toxicology**, v. 31, p. 798-811, 2012.
- Freitas, T. C. Et al. Avaliação de escore de condição corporal e farnha em ovelhas suffolk a pasto. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, art. e40311225860, 2022.
- Guo, Z. et al. Possible mechanisms of host resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep breeds native to the Canary Islands. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.
- Hoste, H.; Torres-Acosta, J. F. J. Controle não químico de helmintos em ruminantes: adaptando soluções para vermes mutantes em um mundo em mudança. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 144-154, 2011
- Jackson, F.; Coop, R. L. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Parasitology**, v. 120, n. 7, p. 95-107, 2000.
- James, C. E.; Hudson, A. L.; Davey, M. W. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 7, p. 328-335, 2009.
- Janeway, C. A. How the immune system protects the host from infection? **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1167-1171, 2001.
- Katiki, L. M. et al. Avaliação de anetol e carvona encapsulados em cordeiros infectados artificial e naturalmente com *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v. 197, p. 36-42, 2019.
- Katiki, L. M. et al. Interação sinérgica de dez óleos essenciais contra *Haemonchus contortus* *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 47-51, 2017.
- Kloosterman, A.; Albers, G. A. A.; Van Den Brink, R. Genetic variation among calves in resistance to nematode parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 4, n. 4, p. 353-368, 1978.

- Knox, M. R.; Torres-Acosta, J. F. J.; Aguilar-Caballero, A. J. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 385-393, 2006.
- Köhler, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 336-345, 2001.
- Leignel, V.; Cabaret, J. Massive use of chemotherapy influences life traits of parasitic nematodes in domestic ruminants. **Functional Ecology**, v. 15, p. 569-574. 2001.
- Lespine, A. et al. ABC modulação do transportador: uma estratégia para aumentar a atividade dos anti-helmínticos da lactona macrocíclica. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 293–298, 2008.
- Lespine, A. et al. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 2, p. 58-75, 2012.
- Lifschitz, A. et al. Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3-4, p. 291-298, 2010.
- Machado, V. Relationship between oxidative stress and pathological findings in abomasum of infected lambs by *Haemonchus contortus*. **Pathology-Research and Practice**, v. 12, p. 812-817, 2014.
- Melo, L. R. B. et al. Resistência anti-helmíntica em pequenos ruminantes do semiárido da Paraíba, Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 2, p. 104-108, 2013.
- Mendes, J. P. et al. *Haemonchus contortus* e Medidas Estratégicas de Controle para Ovinos. **Ensaios e Ciências**, v. 24, n. 2, p.105-110, 2020.
- Meschiatti, M. A. P. et al. Effects of essential oils and exogenous enzyme in feedlot finishing diets high in flint ground corn at different particle sizes during the adaptation period. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 758-758, 2016.
- Molan, A. L. et al. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1691-1698, 2003.
- 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, n. 12, p. 1007-1011, 1999.
- Pereira, R. H. M. A. et al. Diagnóstico da resistência dos nematóides gastrintestinais a anti-helmínticos em rebanhos caprino e ovino do Rio Grande do Norte. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, p. 16-19, 2008.
- Schwab, A. E. et al. Detection of benzimidazole resistance–associated mutations in the filarial nematode *Wuchereria bancrofti* and evidence for selection by albendazole and ivermectin combination treatment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 234-238, 2003.
- Squires, J. M. et al. Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 95-99, 2010.

Xu, M. 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.

Zhou, J.; Azrad, M.; Kong, L. Effect of limonene on cancer development in rodent models: a systematic review. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 407, art. 725077, 2021.