

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**REVERSÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA DE *Haemonchus placei* À
IVERMECTINA: AVALIAÇÃO *in vitro* DE OITO FÁRMACOS
MODULADORES DA GLICOPROTEÍNA-P**

Rafael Pereira Heckler

**CAMPO GRANDE, MS
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**REVERSÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA DE *HAEMONCHUS
PLACEI* A IVERMECTINA: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE OITO
FÁRMACOS MODULADORES DA GLICOPROTEÍNA-P**

Phenotypic reversal of resistance to ivermectin in *Haemonchus placei*: *in vitro*
evaluation of eight modulating drugs of p-glycoprotein

Rafael Pereira Heckler

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal.

Área de concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE, MS 2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu pai e minha mãe, Eugênio Heckler e Suely Lucas Pereira Heckler e minhas irmãs Karina Pereira Heckler e Katiúscia Pereira Heckler por estarem presentes em todas as etapas da minha vida e dispensam comentários pois são os pilares que dão sustentação a tudo que por mim foi realizado e principalmente na pessoa que hoje sou, Muito Obrigado Família.

Não menos importante está meu Orientador, Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges, por aceitar me orientar, ter paciência para tal feito, ou melhor, muita paciência, e principalmente a competência e a vontade pela qual tinha em passar seus vastos conhecimentos a mim. Ao amigo Fernando de Almeida Borges que mesmo com pouco tempo de convivência durante esses anos já se percebe a personalidade e caráter invejável que carrega. Meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas e amigos de Pós-graduação e laboratório Flávia, Ariany e Roosevelt pela amizade sincera e por compartilharem momentos inesquecíveis, enriquecedores e únicos nas reuniões semanais mesmo que vividas durante pequena parte dessa trajetória e Dyego, Letícia, Gabriel, Larissa, Juliana, Ramiro, Paula, Nicole, Neyliza, Nathália, Fernando, Isabel, Marcel, Daniel Feliz, Nilton e Gabriel Daltoé, peças fundamentais para a conclusão deste projeto, assim como a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT, pela bolsa e financiamento do projeto.

E aos meus amigos do peito Frederico, Viviane, Gilson, Gabriela, Murilo, Diego, Vinícius, Lucas, Leonardo, Marcel, ao meu tio Fernando Pereira e a todos aqueles que não são meus amigos porém me deram uma força em algum momento da minha vida para chegar onde estou e todos aqueles que futuramente participarão do meu crescimento pessoal e profissional. Obrigado.

“Busque sempre fazer as coisas com alegria, mesmo que sejam difíceis, dê o máximo de si, e acredite, isso muda o futuro.”

(Allan Rocha)

Dedico este trabalho à minha família, Eugênio, Suely, Karina e Katiúscia Heckler e amigos, pela presença, apoio e compreensão.

Resumo

HECKLER, R.P. Reversão fenotípica da resistência em *Haemonchus placei* à ivermectina: avaliação *in vitro* de oito fármacos moduladores da glicoproteína-P. 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

Desde sua produção na década de 80, a ivermectina (IVM) foi utilizada de forma indiscriminada e a pressão de seleção a que os nematodas gastrintestinais de bovinos foram expostos intensa o que ocasionou perdas econômicas consideráveis devido ao advento da resistência parasitária. Uma alternativa para o controle de parasitos, na atual era da resistência, é o uso de drogas moduladoras da gp-P, uma vez que uma das principais alterações bioquímicas que os parasitos resistentes a esta avermectina apresentam é o aumento da atividade desta proteína de membrana, responsável pelo efluxo de fármacos e xenobióticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar oito drogas com atividade moduladora da gp-P para potencializar a eficácia de IVM contra um isolado de campo de *Haemonchus placei* resistente, utilizando o teste de inibição da migração larval. Foi observado acréscimo de 5,1; 49,06; 76,42; 3,31; 28,85; 13,74; 45,64 e 43,61% na eficácia de ivermectina (10^{-4} M), na inibição da migração de larvas e diminuição da concentração efetiva média de ivermectina, de $4,381 \times 10^{-6}$ M, quando avaliada isoladamente, para $9,877 \times 10^{-8}$; $1,159 \times 10^{-7}$; $2,710 \times 10^{-7}$; $2,739 \times 10^{-7}$; $7,136 \times 10^{-7}$; $1,026 \times 10^{-6}$; $1,240 \times 10^{-6}$ e $1,651 \times 10^{-6}$ M quando associada a ciclosporina-A, trifluoperazina, quercetina, ceftriaxona, vimblastina, verapamil, dexametasona e aceturato de diminazene, respectivamente. Somente aceturato de diminazene não reduziu estatisticamente ($P > 0,05$) o número de larvas migrantes, quando associado à ivermectina. O efeito das drogas moduladoras de gp-P foi dependente da concentração de ivermectina, havendo maior efeito potencializador em concentrações mais baixas desta avermectina. A utilização dos fármacos trifluoperazina, dexametasona, quercetina, verapamil, ciclosporina A, vimblastina e ceftriaxona, associados à ivermectina, demonstraram capacidade *in vitro* de potencializar a eficácia de ivermectina contra um isolado de campo de *H. placei* resistente, visto pela ausência de motilidade larval, observadas em determinadas concentrações no teste de inibição da migração larval.

Palavras-chave: resistência, reversão química, lactonas macrocíclicas, gp-P.

Abstract

HECKLER, R.P. Phenotypic reversal of resistance to ivermectin in *Haemonchus placei*: *in vitro* evaluation of eight modulator drugs of P-glycoprotein. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

Since its production in the 80's, ivermectin (IVM) was used indiscriminately and the selection pressure that the bovine gastrointestinal nematodes were exposed was intense which caused considerable economic losses due to the advent of parasite resistance. An alternative for the control of parasites in the current era of resistance, is the use of drugs that modulate gp-P, since one of the main biochemical changes that parasites resistant to avermectin present, is the increased activity of this protein membrane, responsible for the efflux of drugs and xenobiotics. The aim of this study was to evaluate eight drugs modulating activity of gp-P to enhance the efficacy of IVM against a field isolate of *Haemonchus placei* resistant, using the larval migration inhibition test. It was observed increase of 5.1; 49.06, 76.42; 3.31; 28.85; 13.74, 45.64 and 43.61% in the efficacy of ivermectin (10^{-4} M), in inhibiting migrating larvae and reduced mean effective concentration of ivermectin from 4.381×10^{-6} M, when measured alone, to 9.877×10^{-8} ; 1.159×10^{-7} ; 2.710×10^{-7} ; 2.739×10^{-7} ; 7.136×10^{-7} ; 1.026×10^{-6} ; 1.240×10^{-6} to 1.651×10^{-6} M when associated with cyclosporin-A, trifluoperazine, quercetin, ceftriaxone, vinblastine, verapamil, dexamethasone and aceturato of diminazene, respectively. Only aceturato of diminazene not statistically reduced ($P > 0.05$) the number of larvae migrants, when combined with ivermectin. The effect of modulating drugs for gp-P was dependent of the concentration of ivermectin, with greater potentiating effect at lower concentrations of this avermectin. The use of drugs trifluoperazine, dexamethasone, quercetin, verapamil, cyclosporin A, vinblastine and ceftriaxone, associated with ivermectin, demonstrated *in vitro* ability to potentiate the efficacy of ivermectin against a field isolate *H. placei* resistant seen by the absence of larval motility observed at certain concentrations in the larval migration inhibition test.

Keywords: resistance, chemical reversion, macrocyclic lactones, P-gp.

LISTA DE ABREVIATURAS

A.D.: aceturato de diminazene

BZD: benzimidazol

CE50: concentração efetiva média

CEF: ceftriaxona

CLA: ciclosporina A

DEX: dexametasona

gp-P: glicoproteína-P

IVM: ivermectina

LEV: levamisol

LM: lactonas macrocíclicas

M: molar

MOX: moxidectina

QUE: quercetina

TIML: teste de inibição da migração larval

TRI: trifluoperazina

VER: verapamil

VIM: vimblastina

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 RELATOS DE RESISTÊNCIA DE HELMINTOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS ÀS LACTONAS MACROCÍCLICAS	2
2.2 MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA A IVERMECTINA.....	6
2.3 DROGAS MODULADORAS DA GLICOPROTEÍNA-P	13
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	17
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
Efeito de oito drogas moduladoras de glicoproteína-P na potencialização da eficácia de ivermectina contra <i>Haemonchus placei</i>	26
Resumo	26
1 Introdução.....	27
2 Material e métodos	30
2.1 Obtenção e isolamento da estirpe <i>Haemonchus placei</i> resistente à ivermectina – HPFAMEZ1	30
2.2 Teste de Inibição da Migração Larval (TIML).....	31
2.2.1 Fármacos utilizados	31
2.2.2 Avaliação da atividade potencializadora dos fármacos moduladores	31
2.2.3 Diluições de ivermectina	32
2.2.4 Teste de inibição da migração larval	32
2.3 Análise estatística	33
3 Resultados.....	34
4 Discussão.....	37
6 Referências bibliográfica.....	43

INTRODUÇÃO

O uso inadequado de anti-helmínticos tem ocasionado perdas econômicas e baixa produtividade dos animais (VÁSQUES et al., 2007), acarretando déficit no ganho de peso, diminuição da produção de carne/leite e, como consequência, baixa lucratividade. O grupo das lactonas macrocíclicas (LM), avermectinas e milbemicinas, foi desenvolvido em 1979 (BURG et al., 1979) e ainda é o mais difundido na pecuária nacional; possui eficácia terapêutica contra endo e ectoparasitos e apresenta largo espectro de ação, todavia, é uma das classes de anti-helmínticos sobre a qual mais se encontram relatos de resistência na literatura mundial.

As LM causam efeito letal em helmintos susceptíveis devido à paralisia flácida (FREEMAN et al., 2003), acarretando abertura dos canais de cloro de forma irreversível, mediados por substâncias ligantes (LGIC) como o glutamato e/ou o ácido gama amino butírico.

A resistência parasitária, definida como a habilidade de uma população de parasitos em tolerar doses de um composto químico que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população susceptível de uma mesma espécie (STONE, 1972), é um dos principais problemas enfrentados na bovinocultura, em todo o mundo (JAMES & DAVEY, 2009). Dessa forma, algumas medidas complementares, não químicas, baseadas no manejo de pastagens, controle biológico, nutrição, seleção de hospedeiros resistentes e fitoterapia (BIANCHIN & CATTO, 2008), estão sendo estudadas e terão espaço no controle das helmintíases gastrintestinais.

O desenvolvimento da resistência sofre influência de fatores como clima, prática de manejo e idade dos animais que são tratados. Os produtores utilizam, geralmente, apenas um composto químico durante períodos prolongados, subdosificados ou vários produtos com intervalos de tempo muito curtos para o controle de parasitos gastrintestinais, o que pode não controlar de forma eficiente os parasitas e desencadear assim a resistência aos produtos químicos (VÁSQUES et al., 2007).

A resistência estende-se para a mais importante classe de anti-helmínticos, as LM, e um dos mecanismos responsáveis pelo seu desenvolvimento, em nematodas gastrintestinais de bovinos, é a interação farmacológica direta ou indireta com a glicoproteína-P (gp-P). Esta proteína é responsável pela diminuição da concentração intracelular de fármacos, como ivermectina (IVM), das células do fígado, rins, cérebro e trato gastrintestinal, entretanto, a

influência de IVM na expressão de transporte ainda não está totalmente esclarecida (MÉNEZ et al., 2012).

Transportadores ABC (ATP Binding Cassete), como gp-P, tem sido implicados na resistência às LM e contribuem para a resistência à outros anti-helmínticos. Muitos fármacos são, comprovadamente, inibidores de gp-P e combinações apropriadas podem resultar em alta eficácia dos tratamentos contra parasitas e reversão da resistência. Entretanto, a depender desta associação, há uma necessidade de balanceamento contra possíveis incrementos de toxicidade nos hospedeiros (LESPINE et al., 2012).

O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos anti-helmínticos convencionais, especialmente às LM, são altamente relevantes na parasitologia veterinária. A sequência do genoma completo de *Caenorhabditis elegans* e outros helmintos permitem grandes avanços no estudo da biologia e melhoram o diagnóstico e controle de parasitas como *Haemonchus placei* (PRICHARD & TAIT, 2001).

Este trabalho objetiva apresentar uma revisão de literatura, confrontando aspectos atuais referentes a resistência de nematodas gastrintestinais de bovinos às LM, e a possibilidade de reversão fenotípica embasado em mecanismos moleculares de resistência e de drogas que atuam como substrato da gp-P.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RELATOS DE RESISTÊNCIA DE HELMINTOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS ÀS LACTONAS MACROCÍCLICAS

As LM apresentam papel fundamental no controle parasitário, uma vez que a mesma é utilizada massivamente em diversas regiões do Brasil e do mundo. Vários estudos demonstram a ineficácia de IVM no combate das helmintíases e os dados indicam, principalmente, o gênero *Cooperia* no envolvimento com a resistência às LM e a maior prevalência, entre os nematodas gastrintestinais de bovinos. Todavia, atualmente, nota-se uma certa tendência de inversão na intensidade parasitária dos mesmos, com aumento de frequência de *Haemonchus* spp. em relação à *Cooperia* spp., observada, provavelmente, devido ao potencial biótico de cada gênero. Preocupação esta que deve ser avaliada com cautela, uma vez que este nematoda apresenta elevada patogenicidade e, com o advento da resistência parasitária, se tornou de difícil controle.

Relatos de resistência em bovinos, se comparados a ovinos, são inferiores em quantidade, no entanto, não significam que os seus parasitas tenham menor diversidade

genética para a expressão da resistência, mas sim, possível menor frequência de tratamentos aos quais são submetidos quando comparados com ovinos (PAIVA et al., 2001).

No período de abril de 2002 a maio de 2004, 25 rebanhos bovinos foram avaliados na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, para determinar o grau de resistência anti-helmítica em bovinos naturalmente infectados com nematodas gastrintestinais. Os anti-helmínticos testados foram fosfato de levamisole, sulfóxido de albendazole, IVM e moxidectina (MOX), todos administrados em doses recomendadas pelos fabricantes. Em cada fazenda, novilhos foram separados em diferentes tratamentos e grupo controle (não tratados) baseados no OPG e, entre 7 e 10 dias pós-tratamento, amostras fecais foram coletadas de cada animal para a realização do OPG, além disso, culturas fecais de cada grupo foram também preparadas para a identificação larval. A redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) foi inferior a 90% em 23 fazendas depois do tratamento com IVM. Em 19 fazendas, foram observadas 100% de eficácia após o tratamento com MOX e, em seis restantes, variaram de 90 a 97,2%. Esses resultados demonstraram resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp., especialmente à IVM (SOUTELLO et al., 2007).

SOUZA et al. (2008) avaliaram focos de resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos à IVM, ao fosfato de levamisole e sulfóxido de albendazole em 39 propriedades localizadas no Planalto Catarinense. Em cada uma, foram coletadas 60 amostras de fezes de animais, com idade entre sete e dezoito meses, para avaliar o número de ovos por grama de fezes (OPG), o cultivo e a identificação de larvas. Entre as propriedades avaliadas, 82,1% apresentaram animais com helmintos resistentes à IVM, em apenas 10,3% das propriedades a eficácia de todos os anti-helmínticos foi superior a 95%, sendo os gêneros mais predominantes resistentes à IVM, *Cooperia* e *Haemonchus*.

Procurando investigar a possível resistência de nematodas gastrintestinais de bovinos à MOX, CONDI et al., (2009) realizaram um estudo no município de Castilho, São Paulo, através do teste de redução de contagem de ovos nas fezes (FECRT) e teste anti-helmíntico controlado. Os resultados demonstraram a presença de resistência à MOX após o tratamento. Do sétimo ao décimo quarto dia, o gênero *Cooperia* e *Oesophagostomum* mostraram resistência à MOX, baseado na identificação larval, os nematodas (L3) encontrados na cultura de fezes do grupo tratado foram: *Cooperia* (34%), *Oesophagostomum* (18,7 a 65,3%) e em alguns grupos tratados, larvas de *Haemonchus* spp. No teste anti-helmíntico controlado, os resultados mostraram resistência à MOX em *C. punctata*, *C. pectinata*, *O. radiatum* e *Trichuris* spp.

A resistência dos nematodas gastrintestinais de bovinos às principais formulações anti-helmínticas comerciais, entre elas o grupo das LM, está presente em rebanhos bovinos de corte no Estado de Mato Grosso do Sul, observado por FELIZ (2011), através da avaliação de dez rebanhos, mantidos em diferentes municípios desse Estado, utilizando o FECRT. O resultado médio na redução do OPG para IVM, MOX e doramectina (DOR) foram 14,97, 91,08 e 32,86%, respectivamente. Os gêneros mais frequentemente encontrados à coprocultura pré/pós-tratamento foram, em ordem decrescente, *Cooperia*, *Haemonchus* e *Oesophagostomum*.

A resistência de nematodas gastrintestinais de bovinos às avermectinas/milbemicinas na Argentina, assim como no Brasil, está altamente estabelecida em propriedades onde os animais são tratados com intervalos frequentes durante o ano. Foi observado que animais da raça Hereford de 9-11 meses de idade, tratados com IVM e IVM de longa ação, no teste de redução na contagem de ovos nas fezes, apresentaram 65 e 20% de eficácia, assim como 62,7 e 48% no teste anti-helmíntico controlado, respectivamente, para *C. oncophora* (FIEL et al., 2001).

Na província de Santa Fé, Argentina, os gêneros *Haemonchus* e *Cooperia*, apresentaram prevalência elevada. Nessa região, foi observado o primeiro caso de resistência de *Haemonchus* parasitando bovinos com resistência simultânea aos anti-helmínticos IVM e ricobendazole, observados através do teste de redução na contagem de ovos nas fezes que apresentou 92 a 95% de larvas deste nematoda em bovinos tratados com IVM, quando comparado com o grupo controle (ANZIANI et al., 2004).

Segundo SUAREZ & CRISTEL (2007), vários relatos de resistência de parasitos às drogas em bovinos foram descritos na Argentina. Vinte e cinco rebanhos de gado de corte, da Região Oeste Pampeana, foram examinados para avaliar a prevalência da resistência anti-helmíntica e espécies de nematodas envolvidos. A pesquisa envolveu engorda e sistemas de cria com uma média de 6.760 bovinos, em que se observou resistência parasitária, determinada através do teste de redução na contagem de ovos nas fezes. A resistência anti-helmíntica foi detectada em 16 (64%) rebanhos, sendo que à IVM, foi encontrada em 15. *Cooperia* spp. foi o nematoda predominante pós-tratamento em todos os rebanhos com resistência à IVM. Estes resultados demonstraram um alto nível deste fenômeno na região de engorda da Argentina.

Com a finalidade de comparar a eficácia de IVM em dois isolados sensíveis e resistentes de *C. oncophora*, obtidos no Reino Unido, NJUE & PRICHARD (2004)

realizaram o teste de redução na contagem de ovos nas fezes e observaram eficácia de 100% para os isolados sensíveis à IVM. Por outro lado, para o isolado resistente, a eficácia foi de 77,8%, no décimo quarto dia pós tratamento, indicando resistência anti-helmíntica.

Exemplos de resistência a anti-helmínticos, como avermectina/milbemicina, são frequentemente encontradas em bovinos parasitados com *Trichostrongylus colubriformis* ou *C. oncophora* (SANGSTER, 1999), esta última, possui alto grau de envolvimento em relatos de resistência às LM nos Estados Unidos (GEARY, 2005).

A resistência à IVM, também tem sido identificada no oeste dos Estados Unidos. À necropsia de alguns animais, com histórico de resistência, obtidos de propriedades localizadas no norte da Califórnia, mostraram resistência a duas classes de avermectinas: MOX, com redução de 88% na contagem de vermes *post-mortem* e IVM, que não proporcionou redução de indivíduos adultos de *Cooperia* spp. e não inibiu L4 de *O. ostertagi* (EDMONDS et al., 2010).

Evidências de resistência às LM, utilizando o teste de redução na contagem de ovos nas fezes, foram observadas em nematodas de bovinos criados na Nova Zelândia. Os resultados demonstram que eprinomectina e abamectina, foram eficazes apenas em *O. ostertagi*, *T. axei* e *C. punctata*, no entanto, a mesma característica não foi vista em *C. oncophora* e *T. longispicularis*, que apresentaram 72 e 79%, e 81 e 76% de eficácia, respectivamente (LOVERIDGE et al., 2003).

A avaliação da associação entre a presença de resistência anti-helmíntica e práticas de gestão em 62 propriedades com criação de bovinos de corte na Nova Zelândia, demonstrou que a resistência às LM, especialmente à IVM, está elevada, com uma frequência de 82% das fazendas visitadas (JACKSON et al., 2006). Estudo semelhante, proposto por WAGHORN et al. (2006), mostram que a resistência è comum nesta região, sendo o nematoda mais freqüente pertencente à população do gênero *Cooperia*.

DEMELER et al. (2009) demonstraram, em uma investigação realizada na Europa, sobre o desempenho de anti-helmínticos em bovinos, que a eficácia de IVM pode estar comprometida, principalmente quando relacionada ao parasita *Cooperia* spp. No levantamento realizado em 2006, *C. oncophora* foi a mais prevalente, sugerindo que a resistência à IVM esteja muito mais comum do que se esperava. Assim como EL-ABDELLATI et al. (2010a), que avaliaram a resistência anti-helmíntica na Bélgica e Alemanha e encontraram quantidades significativas apenas de *Cooperia* spp. em culturas de fezes, após o tratamento com IVM.

Durante quatro anos consecutivos, 2006 a 2009, EL-ABDELLATI et al. (2010b), monitoraram a evolução da resistência às LM em propriedades com criação de bovinos localizadas na Bélgica. Os resultados demonstraram que um isolado de *C. oncophora*, resistente à IVM, apresentou resistência lateral à MOX, sugerindo, portanto, que o uso de algum tipo de LM é desencorajado, uma vez que a resistência à IVM seja detectada.

Na zona subtropical do México, CANUL-KU et al. (2012), utilizando o teste de redução na contagem de ovos nas fezes, mostraram alta prevalência de bezerros com nematodas gastrintestinais de bovinos resistentes à IVM, em diferentes propriedades no estado de Yukatan (78%), sendo os gêneros resistentes à IVM: *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Cooperia* e *Trichostrongylus*.

2.2 MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA A IVERMECTINA

A resistência ocorre quando parasitas passam a suportar doses ou concentrações de um composto químico que usualmente os afetariam. Sendo esta característica herdável (SANGSTER, 1999). Os diferentes fatores responsáveis por este fenômeno podem ser classificados em internos e externos, os fatores externos, dependem de condições não relacionadas diretamente ao parasito, como o mecanismo de ação dos anti-helmínticos, eficácia, frequência dos tratamentos, doses, rotações de princípios ativos e forma de manejo dos animais; os fatores internos, dependem especificamente dos parasitas gastrintestinais através das características genéticas e potencial biótico, intervalo entre gerações, estágio exposto à droga e a proporção da população em refugia (VÁSQUES et al., 2007).

Estudos na seleção e genética da resistência a anti-helmínticos sugerem que a mesma é poligênica e que há três fases no processo de seleção: susceptível, intermediária, em que permanecem indivíduos resistentes na população, e homozigotos resistentes, em que indivíduos resistentes prevalecem na população. Por essa razão, a baixa eficácia dos tratamentos permite a sobrevivência de indivíduos heterozigotos resistentes, em contrapartida, regimes supressivos permitem a sobrevivência de indivíduos homozigotos resistentes (JACKSON, 1993).

As modificações genéticas que conferem resistência se traduzem em diferentes modificações bioquímico-moleculares tais como: trocas celulares que afetam a capacidade da droga para acumular-se intracelularmente, alterações de sistemas enzimáticos e/ou alterações de receptores celulares (MOTTIER & LANUSSE, 2001).

A resistência pode estar presente numa proporção de vermes na população com genótipo de resistência aumentado, na fase inicial, a resistência é geralmente reconhecida somente em testes laboratoriais e ocorrem antes que as falhas no campo sejam detectadas. Isso ocorre, porque as drogas que são comercializadas em doses que controlam espécies ou estágios são usadas em doses muito acima dos níveis de eficácia para a espécie alvo. É provável que os genes que conferem a resistência estejam presentes em muitas populações de vermes ou o processo como uma simples mutação de genes sejam responsáveis pela resistência (Quadro 1) (SANGSTER, 1999).

As LM são moléculas altamente lipofílicas e são substratos potentes para membros da superfamília de transportadores ABC (ATP-Binding Cassete), responsáveis pelo transporte de drogas através da membrana celular, como é o caso da gp-P, que pode regular a concentração da droga, tanto no hospedeiro quanto no parasita. Há evidências de que a IVM e, em menor grau, a MOX, selecionam certos alelos de genes que codificam a gp-P e outros genes de transportadores ABC, resultando na sobre-expressão de algumas glicoproteínas em nematodas. Os mecanismos de resistência às LM não são detectados facilmente através de marcadores SNPs devido à diversidade de transportadores ABC de nematodas. O possível envolvimento de genes que codificam transportadores ABC, como gp-P e beta tubulina na resistência de LM, fornecem um ponto de partida para a compreensão deste fenótipo e de marcadores para detecção de resistência em populações de campo de nematodas (PRICHARD & ROULET, 2007).

O desenvolvimento de isolados resistentes à IVM foi realizado por JAMES & DAVEY (2009), utilizando o modelo *C. elegans*, com exposições a doses crescentes de IVM; dessa forma, isolados apresentando essas características foram obtidos exibindo um fenótipo de resistência múltipla as drogas (RMD) com resistência cruzada à MOX, e observaram que a mesma foi associada com o aumento da expressão das proteínas relacionadas com a RMD e gp-P. Observou-se reversão da resistência à IVM pela co-administração com inibidores da biossíntese de glutatona, tripeptídeo requerido para transporte de drogas em proteínas envolvidas na RMD, dessa forma, confirmando o envolvimento dessas proteínas. A resistência, a baixos níveis de IVM (6 ng/ml), foi associada com o aumento da expressão de *Mrp-1e* e *Gp-p1e* diminuição da glutatona, enquanto em nível superior (10 ng/ml), foi principalmente associada com a expressão de gp-P. Pode-se observar claramente, portanto, que o envolvimento de proteínas de transporte na resistência à IVM, fornece um modelo para entender este fenômeno em medicamentos e a sua reversão.

A resistência às avermectinas tem sido correlacionada com mudanças em um gene que codifica a gp-P, que apresenta afinidade muito alta para a IVM, no entanto, a especificidade de substrato da gp-P é muito ampla e resistência aos benzimidazóis podem ser modulados por lectinas específicas para gp-P. Essas mudanças genéticas na gp-P, estão correlacionadas com a resistência aos benzimidazóis em nematodas, demonstrado por BLACKHALL et al.(2008), que apresentaram evidências genéticas de seleção em um locus da gp-P durante a seleção para resistência aos benzimidazóis em *H. contortus*.

Os canais de cloro glutamato dependentes, GluCl α , são membros da superfamília de canais de íons que estão envolvidos na resistência às LM. NJUE & PRICHARD (2004), utilizando técnicas de PCR com 2 cDNAs *GluCl*, que codificam GluCl α 3 e GluCl β , clonados de *C. oncophora*, observaram que as duas sequências apresentam alto grau de homologia para subunidades similares de outros nematodas, assim, a subunidade *GluCl α 3* de *C. oncophora* é mais estreitamente relacionada com a subunidade *GluCl α 3 β* de *H. contortus*. Estes mesmos autores, ao avaliarem os polimorfismos genéticos destes dois genes, analisada em um isolado de campo sensível e resistente de *C. oncophora*, observaram uma associação estatística entre o gene *GluCl α 3* de *C. oncophora* e resistência à IVM, já, o mesmo parâmetro não foi observado para o gene *GluCl β* de *H. contortus*.

A clonagem de um fragmento de uma subunidade α de GluCl de *H. contortus* foi estudada por BLACKHALL et al. (1998) com a finalidade de avaliar a variabilidade genética desse fragmento retirado de cinco isolados de *H. contortus*, 1- sem seleção (2 isolados), 2- seleção para IVM (2 isolados) e 3 – seleção para MOX (1 isolado). Observou-se que um alelo do gene dessa subunidade pareceu estar associado com a resistência às drogas aumentando em frequência nos cinco isolados. Outro alelo, pareceu estar associado com a susceptibilidade diminuindo em frequência nos três isolados selecionados para IVM e MOX quando comparado com os isolados não selecionados. Uma análise do gene da subunidade β , não apresentou diferenças significativas nas frequências alélicas entre as linhagens não selecionadas e selecionadas, sugerindo uma correlação entre as mudanças nas frequências alélicas do gene da subunidade α e resistência à IVM e MOX.

RAO et al. (2009) isolaram um novo gene de *H. contortus* (*Hcggr3*) íon seletivo e que possui similaridade com subunidade do canal de cloro. Análises de cDNA apresentaram supostos sítios de reconhecimento que podem ser importantes em relação ao desenvolvimento dessa subunidade e, utilizando RT-PCR de *Hcggr3*, foi observado que este é diferentemente expresso entre as diversas fases de vida seguindo a seguinte ordem de classificação para essa

expressão: ovos > fêmeas adultas > larvas > machos adultos. Foi encontrado um polimorfismo de nucleotídeo único que parece estar associado com a seleção para a resistência às LM, na região não traduzida 3' do gene *Ggr-3*, com diferença entre um isolado susceptível (PF23) e dois isolados resistentes às LM (IVF23 e MOF23) e observaram, que há a formação de um canal de ânion associado à dopamina, que é expresso predominantemente na papila cervical e está comumente envolvida na sensação tátil. Entretanto, o papel deste gene ainda não está totalmente esclarecido.

Muitas diferentes substituições de aminoácidos foram observadas em parasitas resistentes às LM, e, como em *C. oncophora*, somente a substituição L256F foi encontrada tendo algum efeito, tornando o canal menos sensível à IVM e reduzindo a afinidade do canal para a droga (NJUE & PRICHARD, 2004), assim como a substituição A169V no gene *Glc-5* em *H. contortus*, comprovando, desta forma, que substituições de aminoácidos individuais possuem a capacidade de alterar a resposta de canais individuais às LM (BEECH et al., 2011).

Utilizando *C. elegans* como nematoda modelo para avaliar a sensibilidade de IVM, mediado por genes que afetam a mesma pela família de genes *GluCl*, foi observado que a mutação simultânea nos genes *Avr-14*, *Avr-15* e *Glc-5* conferem alto nível de resistência a IVM (DENT et al., 2000).

BEECH et al. (2010) determinaram o genótipo de larvas e indivíduos adultos de *H. contortus* com relação aos genes *Glc-5* e *Igc-37* relacionados com resistência às LM, nesses mesmo indivíduos, foram aferidos a movimentação e alimentação, duas características alvo das drogas, e observaram que todos os genes estão relacionados com comportamento alterado na ausência da droga, evidenciando que a resistência genética pode estar associada com alterações na biologia do parasita.

Atualmente, marcadores moleculares que se correlacionam bem com a resistência anti-helmíntica estão disponíveis apenas para a detecção de resistência aos benzimidazóis, no entanto, apenas recentemente, um polimorfismo de nucleotídeo único foi encontrado em *GluCl* e que apresenta relevância funcional para determinação da resistência em LM. Um pré-requisito para o diagnóstico molecular no futuro serão testes fornecendo a quantificação confiável e exata de alelos de resistência relacionados com DNA extraído de um pool de parasitos (SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2006).

Investigando a expressão de moléculas transportadoras de drogas, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e RT-PCR, para avaliar a expressão de gp-Ps, em *Teladorsagia circumcicta* no Reino Unido, DICKER et al. (2011), observaram 11 sequências

parciais de gp-P, além disso, diferenças na expressão gênica dessas proteínas, foram particularmente marcadas em vários genes, entretanto, de forma mais notável em *Tci-pgp-9*, no isolado resistente, quando comparado ao susceptível, observado em todos os estágios do ciclo de vida com menor expressão em ovos, seguido de L1, L2, L3 e L4. Identificações parciais das sequências de nucleotídeos em *Tci-pgp-9* nos dois isolados, resistente e susceptível, foram observadas portando alto nível de polimorfismos. A maioria dos estudos tem investigado sítios alvos de mutações, relativamente pequena atenção tem sido dada para o papel das trocas das expressões gênicas e estes resultados, demonstram claramente que a expressão aumentada deste gene, associado com a sequência polimórfica aumentada, poderia desempenhar um papel na sobrevivência de *T. circumcicta* resistente a múltiplas drogas quando exposta à IVM.

Segundo EL-ABDELLATI et al. (2011), o gene *Avr-14*, codifica duas subunidades *Avr-14A* e *Avr-14B* e sugere-se que o último seja o alvo principal da IVM. O gene *Avr-14B*, nos isolados avaliados pelos mesmos de *C. oncophora* susceptíveis e resistentes, não mostraram polimorfismos especificamente envolvidos com a resistência à IVM, entretanto, uma diminuição do número de isoformas de *Avr-14* foi observado em isolados resistentes comparado com susceptíveis. A ausência de mutação em L256F no gene *Avr-14* do isolado resistente a IVM, usado neste estudo, sugere que a troca de aminoácidos foi talvez isolado-específico e que mesmo dentro de uma espécie de nematoda, diferentes isolados podem ter diferentes estratégias genéticas para tornarem-se resistentes a IVM. No entanto, estes resultados demonstram que o gene *Avr-14* está sob seleção neste isolado resistente a IVM de *C. oncophora*.

Com o objetivo de determinar se mutações nas subunidades *GluCl α 3* e *GluCl β* afetam a sensibilidade à IVM em isolados sensíveis e resistentes de *C. oncophora*, expressas isoladamente e em combinação com oocistos de *Xenopus laevis*, NJUE et al. (2004) observaram que mutações no primeiro causa modesta, porém significativa, perda da sensibilidade ao glutamato, ligante natural para receptores GluCl. Por outro lado, mutações na subunidade *GluCl β* do isolado resistente, aboliu esta sensibilidade e, dos três aminoácidos que distinguem essas subunidades, nos mesmos isolados, apenas um deles, o L256F, demonstrou diferenças na resposta sensível a IVM. As mudanças também ocorreram em outras subunidades *GluCl* de *C. oncophora*, tais como receptores GABA, que podem aumentar o efeito da mutação em L256F, e ajudar a elucidar os mecanismos de resistência a IVM.

Atualmente, há forte evidência que a resistência as LM está associada com trocas na expressão de gp-P, e alguns dados sugerem um envolvimento de polimorfismos em múltiplos genes ou diferenças devido a trocas na regulação da expressão de gp-P que afetam múltiplos genes simultaneamente. Alguns desses genes, como o *Hco-unc-3* e o *Hco-unc-5*, que codificam a subunidade dos canais de cloro glutamato dependentes, foram avaliados por WILLIAMSON et al. (2011), que encontraram níveis levemente reduzidos dos mesmos em um isolado resistente à BZD, LEV e IVM de *H. contortus*, e observaram que o tratamento *in vitro* de larvas deste parasito, produziu variáveis e inconsistentes trocas nos níveis de gp-P, assim como o aumento dos níveis dos genes *Hco-pgp-2* e *Hco-pgp-9* em 5,96 e 2,65 vezes no isolado resistente, respectivamente, quando comparado com o isolado sensível.

A resposta de um isolado triplamente resistente a drogas (fembendazole, levamisole e IVM) de *T. circumcincta*, exposta a IVM *in vitro*, foi avaliada por DICKER et al. (2011a), que observaram um aumento generalizado na produção de proteínas, dentre elas a gp-P, resultado da exposição a IVM, e, uma maneira dos parasitas tentarem sobreviver a esta exposição, poderia ser a parada ou a baixa regulação de alguns processos celulares não essenciais. Outros genes, como os da classe do citocromo P450, são, geralmente, expressos em níveis extremamente baixos, por isso, podem ter desaparecido.

Quadro 1. Relação de genes que codificam proteínas envolvidas no processo de resistência à ivermetina.

Genes	Proteína	Autor
<i>Glc-5</i>	GluCl	BEECH et al., 2011
<i>Lgc-37</i>	GluCl	BEECH et al., 2011
<i>Abcb1a*</i>	MDR-3	XU et al., 1998
<i>Mdr1, P-gp</i>	MDR-1	Van der HEYDEN et al., 2011
<i>Hg1</i>	GABA	LAUGHTON et al., 1994
<i>Mrp-1</i>	MRP-1	JAMES & DAVEY, 2009
<i>Pgp-1</i>	P-GP	JAMES & DAVEY, 2009
<i>Mdr-1 (Mdr1b)</i>	P-GP	MARTINEZ et al., 2008
<i>Mdr-2</i>	P-GP	MARTINEZ et al., 2008
<i>Mdr-3 (Mdr1a)</i>	P-GP	MARTINEZ et al., 2008
<i>MDR-1 (ABCB1)**</i>	P-GP	MARTINEZ et al., 2008
<i>MDR-3 (ABCB4)</i>	ABCB4	MARTINEZ et al., 2008
<i>ABCC1</i>	MRP-1	MARTINEZ et al., 2008
<i>MRP-2</i>	MRP-2	MARTINEZ et al., 2008
<i>ABCC2***</i>	MRP-2	MARTINEZ et al., 2008
<i>GluCla3</i>	GluCl	NJUE & PRICHARD, 2004
<i>GluCl</i>	GluCl	BLACKHALL, 1998
<i>PgpA</i>	P-GP	XU et al., 1998
<i>Pgp-1</i>	P-GP	Le JAMBRE et al., 1999
<i>Hcggr3</i>	GluCl	RAO et al., 2009
<i>Avr-14</i>	Glu/GABA	DENT et al., 2000
<i>Ggr-3</i>	Glu/GABA	DENT et al., 2000
<i>Avr-15</i>	Glu/GABA	DENT et al., 2000
<i>Glc-1</i>	Canais CL	DENT et al., 2000
<i>Tci-pgp-9</i>	P-GP	DICKER et al., 2011
<i>Hco-glc-3</i>	GluCl	WILLIAMSON et al., 2011
<i>Hco-glc-4</i>	GluCl	WILLIAMSON et al., 2011
<i>Hco-glc-5</i>	GluCl	WILLIAMSON et al., 2011
<i>Hco-pgp-1</i>	P-GP	WILLIAMSON et al., 2011
<i>Hco-pgp-2</i>	P-GP	WILLIAMSON et al., 2011

Sinônimos: *PGP, MDR3, P-GP, PGY3, ABCB4, EVI32, MDR1a, PGY3 ou MDR-3 **CLCS, MDR1, P-GP, PGY1, ABC20, CD243 ou GP170 ***DJS, MRP2, CMRP, ABC30 ou CMOAT

2.3 DROGAS MODULADORAS DA GLICOPROTEÍNA-P

Oncologistas foram os primeiros a observarem que o tratamento de câncer com múltiplas drogas tenderam para o desenvolvimento de resistência cruzada para muitos outros agentes citotóxicos que nunca haviam entrado em contato com as mesmas, eliminando a possibilidade de cura desses tumores com quimioterapia. Em muitos casos, culturas teciduais de tumores resistentes a drogas demonstraram padrão de resistência *in vitro* similar àqueles vistos *in situ*. Esta observação sugere que a resistência múltipla às drogas é em muitos casos, mas não todos, resultado de alterações hereditárias nas células cancerosas, causando mudanças nos níveis de proteína específica, ou proteínas mutantes que permitem a sobrevivência de células cancerígenas na presença de diversos agentes citotóxicos. Essa alteração genética, que confere resistência a drogas citotóxicas, pode afetar o ciclo dinâmico das células, susceptibilidade de células a apoptose, captação e efluxo de drogas, metabolismo celular, compartimentalização intracelular de drogas ou reparação de danos, usualmente o DNA, induzidos por drogas (AMBUDKAR et al., 1999).

Entre as drogas antiparasitárias que são amplamente utilizadas na terapêutica veterinária, há exemplos muito interessantes de interação farmacológica, com transportadores celulares como o grupo das LM (IVM e MOX) e a gp-P (BALLENT et al., 2005).

A co-administração *in vivo* de LM com drogas moduladoras da gp-P tem sido proposta como estratégia para melhorar a disponibilidade sistêmica de drogas (LIFSCHITZ et al., 2010b) assim como em células de adenocarcinoma pulmonar humano, confirmando a atuação de IVM na modulação da gp-P através do transporte de rodamina-123, semelhante ao valspodar, um análogo da ciclosporina, utilizado especialmente para bloquear a função da gp-P (LESPINE et al., 2006).

Embora a baixa resposta dos canais de cloro possa estar envolvida com a resistência às LM, a maior evidência disso está relacionada com a seleção genética em membros da superfamília de transportadores ABC, como gp-P (SILVA & RODRIGUES, 2010). Esta, é uma proteína com, em média, 170 KDa, codificada pelos genes humanos *MDR1* e *MDR3*, gene murino *Mdr1a*, *Mdr1b*, *Mdr2*, *P-gp1*, *P-gp2* e *P-gp3* (MUKAI et al., 2009), e age como bomba de efluxo ATP-dependente, transportando fármacos e xenobióticos para a parte externa das células do fígado, rins, cérebro e trato gastrintestinal, das células tumorais e das células das barreiras hematotéciduais (AZEREDO et al., 2009). Um dos mistérios desse sistema de transporte é como um simples sistema de transporte pode reconhecer tantos diferentes substratos (AMBUDKAR et al., 1999).

O fenômeno da resistência múltipla às drogas (RMD) representa um dos grandes problemas na terapia do câncer. O termo RMD é utilizado para descrever um fenômeno caracterizado pela capacidade de células tumorais apresentarem resistência simultânea a diferentes quimioterápicos funcionalmente e estruturalmente não relacionados, este fenômeno pode ser revertido através da utilização de substâncias que inibem o efluxo de drogas, potencializando seu efeito citotóxico com aumento de sua concentração intracelular (WAGNER-SOUZA et al., 2002).

O sistema ABC de transporte, compreende diversos grupos de proteínas que tem sido identificadas em todos os organismos, de bactérias a humanos. Testes *in vitro*, utilizando o parâmetro motilidade como indicador de susceptibilidade ou resistência, assim como a avaliação da contribuição do sistema ABC de transporte, como glicoproteína-P, associando drogas moduladoras com IVM, também foram avaliadas em nematoda *Brugia malayi*, e demonstram que a sensibilidade à IVM é potencializada quando a mesma é co-administrada com fármacos moduladores como verapamil, ciclosporina A e vimblastina (TOMPKINS et al., 2011).

A expressão diferenciada da gp-P, indica que a mesma apresenta um papel de proteção do organismo contra agentes xenobióticos, excretando estes componentes na bile, urina e no lúmen intestinal e também prevenindo sua acumulação no cérebro pois atua no processo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diferentes fármacos (AZEREDO et al., 2009).

Gp-P confere resistência contra um amplo espectro de substratos como drogas anti-cancerígenas (vincristina; vimblastina), outros agentes citotóxicos (brometo de etídio; puromicina), peptídeos cíclicos e lineares (gramicidina-D; valinomicina), inibidores da protease do HIV (ritonavir; indinavir) e outros compostos (rodamina-123; calcein-AM). Um grande número de compostos não-citotóxicos, sabidamente químico sensibilizantes, ou moduladores RMD, sensibilizam células resistentes para a ação das células citotóxicas (AMBUDKAR et al., 1999).

Estudos de gp-P mutantes tem sido um dos métodos mais amplamente empregados para elucidar o mecanismo de ação desta glicoproteína em humanos, geralmente, essas proteínas tem sido geradas por seleção de medicamentos *in vivo* ou através de técnica de mutagênese dirigida seguido pela caracterização bioquímica *in vivo* e *in vitro*. A mutação na gp-P de mamíferos são concentradas, predominantemente, em domínios transmembrana, mas também estão dispostas em todo o resto da molécula (AMBUDKAR et al., 1999).

Tanto dentro de uma única espécie ou através dos alvos das drogas como células cancerígenas, parasitas ou bactérias, a diversidade genética no gene que codifica para a gp-P pode influenciar na concentração das drogas e nas respostas terapêuticas, com esses efeitos, se torna difícil ignorar o impacto potencial que a variação entre indivíduos e intra indivíduos na gp-P pode ter na resposta à droga (MARTINEZ et al., 2008).

Muitos moduladores da gp-P inibem seu transporte através de mecanismos competitivos e não competitivos, como o verapamil, que se une aos sítios de ligação da gp-P inibindo o transporte de outros substratos de forma competitiva e a ciclosporina-A, que interfere tanto no reconhecimento de substratos como na atividade cíclica da gp-P (BALLENT et al., 2005) e são conhecidos como reversores de primeira geração. Um fator limitante no uso de reversores, são as elevadas doses necessárias para potencializar os efeitos dos quimioterápicos, resultando numa toxicidade muitas vezes inaceitável ao organismo, por isso, novas drogas, menos tóxicas e mais potentes, estão sendo produzidas, conhecidas como moduladores de segunda e terceira gerações (WAGNER-SOUZA et al., 2002).

BARTLEY et al. (2009) utilizaram rodamina 123, cloridrato de verapamil, quercetina e PLURONIC P85 (substratos da gp-P) com o objetivo de investigar a capacidade de vários compostos, que interferem na ação da mesma, para aumentar a eficácia de IVM em isolados sensíveis e resistentes de *T. circumcincta* e *H. contortus* através do teste de inibição da alimentação larval. Os resultados demonstraram, como esperado, que é necessário mais IVM para os isolados resistentes, quando comparados com os sensíveis para a inibição da alimentação completa, entretanto, vários estudos utilizando o verapamil em diferentes tipos de câncer, demonstraram cardiotoxicidade elevada, desencorajando o uso dessa substância como agente reversor na clínica (WAGNER-SOUZA et al., 2002).

Com a finalidade de determinar a afinidade de algumas lactonas com gp-P, KIKI-MVOUACA et al. (2010) avaliaram a contribuição da gp-P na disposição cinética *in vivo*, na cinética plasmática, concentração no cérebro e excreção intestinal de três estruturas diferentes de LM, ivermectina, eprinomectina e moxidectina, e concluíram que a disposição de eprinomectina em ratos é controlada principalmente pelo efluxo de gp-P, mais que a ivermectina, enquanto que a disposição de moxidectina parece ser a maioria gp-P independente, assim, observou-se que eprinomectina e ivermectina possuem maior afinidade com a gp-P em relação à moxidectina.

A resistência à ivermectina é, em partes, devido a mudanças na gp-P do parasito, o que pode ser demonstrado com o aumento significativo na eficácia de ivermectina e moxidectina,

quando associadas ao verapamil, através da redução da contagem de vermes *post mortem* (XU et al., 1998). Desta forma, a utilização de algumas LMs, como as citadas, associadas com drogas moduladoras de gp-P, como verapamil e CL347.099, aumentam o percentual de eficácia das mesmas, entretanto, quando associadas com ciclosporina A, alguns resultados mostram que os efeitos são variáveis no aumento desta (MOLENTO & PRICHARD, 1999).

BORGES et al. (2011) ao avaliarem a eficácia de ivermectina combinada com verapamil, em alta concentração, observaram que essa associação aumentou a eficácia de ivermectina, isoladamente, de 53,1 para 94,3% contra um isolado de campo de *H. contortus* resistente no teste de inibição da migração larval. Por outro lado, infecções experimentais em ovinos demonstraram um aumento de eficácia de 7,75%, ivermectina isoladamente, para 36,02% associada com verapamil.

Outra característica que pode ser observada, é a atuação de alguns flavonóides na modulação da gp-P, como é o caso de quercetina, que apresenta capacidade de alterar a disposição de cimetidine, *in vivo*, demonstrando assim, que estes compostos podem, sob determinadas condições, atuarem como potentes moduladores da gp-P (TAUR & RODRIGUEZ-PROTEAU, 2008).

LIFCHITZ et al. (2010a) comprovaram estes resultados ao utilizarem loperamida como agente reversor, *in vivo*, da resistência através da modulação da gp-P sobre a atividade anti-helmíntica em ovinos e observaram que a mesma induz a mudanças na concentração plasmática e eficácia de ivermectina e ainda, observaram altas concentrações de ivermectina no plasma após a co-administração com loperamida em comparação com ivermectina isoladamente. A meia vida de ivermectina foi prolongada na presença do modulador e aumentou a eficácia contra *H. contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* em 72,5 e 96,3%, respectivamente, na contagem de vermes *post mortem*. Estes mesmos autores, realizando uma comparação do efeito de loperamida na disposição cinética de ivermectina e moxidectina e eficácia contra nematodas resistentes de bovinos, observaram que a modulação *in vivo* da gp-P, também modificou o comportamento cinético e melhorou a eficácia de LMs em nematodas resistentes de bovinos, demonstrando que a modulação da gp-P, em condições de campo, pode ser uma abordagem farmacológica válida para melhorar a atividade e prolongar a vida útil dessas drogas (LIFSCHITZ et al., 2010b).

Numerosos compostos têm demonstrado serem inibidores da atividade da gp-P e, de reverterem o fenômeno da resistência a múltiplas drogas. Estes, pertencem a uma ampla variedade de classes químicas incluindo bloqueadores dos canais de cálcio, digitálicos,

quinolonas, ciclosporinas, surfactantes, hormônios e anticorpos. A interação da gp-P com fármacos reconhecidos como substratos, pode ser uma ferramenta farmacológica útil para incrementar a biodisponibilidade sistêmica de diversos fármacos, contribuindo a melhorar sua atividade farmacológica (BALLENT et al., 2005).

DUPUY et al. (2006) testaram a habilidade de dois compostos licenciados em Medicina Veterinária: fumagilina e diacetato de diminazene para aumentar a quantidade de moxidectina intracelular em hepatócitos de ratos e observaram que estes compostos, aumentam significativamente a quantidade de moxidectina em cultivo de hepatócitos de ratos em 44 e 65% para os tratamentos com diacetato de diminazene e fumagilina, respectivamente.

Estudando os efeitos de flavonóides como kaempferol, quercetina, naringenina, baicalein, miricetina, morina e fisetina, KITAGAWA et al. (2005), demonstraram que kaempferol e quercetina aumentaram o acúmulo de rodamina-123, dependendo de sua estrutura química. Isto foi possível através da análise por citometria de fluxo, que indicaram que o aumento no acúmulo do substrato foi devido à inibição do efluxo deste. BORSKA et al. (2010), realizaram um experimento com duas linhas de células de carcinoma pancreático humano, resistente e sensível (para comparação), em que células de ambas as linhas foram expostas a concentrações selecionadas de quercetina e daunorubicina, para então analisar a expressão e função de transporte da gp-P. O resultado deste estudo confirmou, através de imunocitoquímica e western-blooting, que quercetina afeta a expressão e função da gp-P, podendo ser um potencial modulador desta proteína.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos relatos encontrados na literatura, conclui-se que a resistência anti-helmíntica, especialmente às lactonas macrocíclicas, se tornou uma realidade entre os bovinos. Estudos de prevalência demonstram *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. como sendo os mais resistentes aos anti-helmínticos convencionais, dentre eles as LM. O entendimento das bases moleculares, envolvidas no mecanismo de resistência, pode auxiliar no diagnóstico precoce da mesma, desta forma, fornecendo subsídios necessários para iniciar um tratamento antecipado.

A reversão química da resistência está atualmente sendo muito estudada com a utilização de drogas com potente efeito inibitório da glicoproteína-P (gp-P); muitas dessas drogas, como o verapamil, possuem efeito modulador. No entanto, para atingir efeitos

desejáveis são necessárias doses extremamente tóxicas, por isso, novos trabalhos demonstrando a interação gp-P *versus* droga moduladora estão sendo realizados a fim de esclarecer ainda mais esse mecanismo de reversão e, dessa forma, prolongar a vida útil de antiparasitários.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ANZIANI, O.S. et al. Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Veterinary Parasitology**. v.122, p.303-306, 2004.

AZEREDO, F.J.; UCHÔA, F.T. & COSTA, T.D. Papel da glicoproteína-P na farmacocinética e nas interações medicamentosas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.90, p.321-326, 2009.

BALLENT, M. et al. Implicancias fisio-farmacológicas de La glicoproteína-P em animales domésticos. **Analecta Veterinária**. v.25, p.36-47, 2005.

BARTLEY, D.J. et al. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* an *Haemonchus contortus*. **Parasitology**. v.136, p.1081-1088, 2009.

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

BEECH, R.N. et al. Association of ion-channel genotype and macrocyclic lactone sensitivity traits in *Haemonchus contortus*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 171, p. 74-80, 2010.

BIANCHIN, I. & CATTO, J.B. Epidemiologia e alternativas de controle de helmintos em bovinos de corte na região central do Brasil. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2008, Curitiba.

BLACKHALL, W. J. et al. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology**. v. 152, p. 101-107, 2008.

BLACKHALL, W. J. et al. *Haemonchus contortus*: Selection of a Glutamate-Gated Chloride Channel Gene in Ivermectin and Moxidectin Selected Strains. **Experimental Parasitology**. v. 90, p. 42-48, 1998.

BORGES, F.A. et al. Reversão fenotípica da resistência à ivermectina em isolado de campo de *Haemonchus contortus* pelo verapamil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n. 9, 2011.

BORSKA, S. et al. Quercetin as a potential modulator of P-glycoprotein expression and function in cells of human pancreatic carcinoma line resistant to daunorubicin. **Molecules**. v.15, p.857-870, 2010.

BURG, R.W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.15, n.3, 1979.

CANUL-KU, H.L. et al. Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. **Veterinary Parasitology**. v.183, p.292-298, 2012.

CONDI, G.K.; SOUTELLO, R.G.V. & AMARANTE, A.F.T. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.161, p.213-217, 2009.

DEMELER, J. et al. Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. **Veterinary Parasitology**. v.160, p.109-115, 2009.

DENT et al. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.97, p.2674-2679, 2000.

DICKER et al. 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, 2011b.

DICKER et al. *Teladorsagia circumcincta*: The transcriptomic response of a multi-drug-resistant isolate to ivermectin exposure *in vitro*. **Experimental Parasitology**. v.127, p.351-356, 2011a.

DUPUY, J. et al. Fumagillin, a new P-glycoprotein-interfering agent able to modulate moxidectin efflux in rat hepatocytes. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**. v.29, p.489-494, 2006.

EDMONDS, M.D. et al. Anthelmintic resistance of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* to macrocyclic lactones in cattle from the western United States. **Veterinary Parasitology**. v.170, p.224-229, 2010.

EL-ABDELLATI, A. et al. Altered Avr-14B gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* e *Ostertagia ostertagi*. **International Journal of Parasitology**. v.41, p.951-957, 2011.

EL-ABDELLATI, A. et al. The use of a simplified faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy on Belgian and German cattle farms. **Veterinary Parasitology**. v.169, p.352-357, 2010.a

EL-ABDELLATI, A et al. Monitoring macrocyclic lactone resistance in *Cooperia oncophora* on a Belgian cattle farm during four consecutive years. **Veterinary Parasitology**. v.171, p.167-171, 2010.b

FELIZ, D. C. **Resistência a anti-helmínticos em nematodas gastrintestinais de bovinos de corte, no Mato Grosso do Sul, Brasil.** 2011. 41f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

FIEL, C.A. et al. Resistance of Cooperia to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. **Veterinary Parasitology.** v.97, p.211-217, 2001.

FREEMAN, A.S. et al. Amphidial structure of ivermectin-resistant and susceptible laboratory and field strains of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology.** v.110, p.217-226, 2003.

GEARY, T.G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **TRENDS in Parasitology.** v.21, n.11, 2005.

JACKSON, F. Anthelmintic resistance – the state of play. **British Veterinary Journal.** v.149, p.123, 1993.

JACKSON, R. et al. Anthelmintic resistance and management of nematode parasites on beef cattle-rearing farms in the North Island of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal.** v.54, p.289-96, 2006.

JAMES, C.E. & DAVEY, M.W. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology.** v. 39, p. 213-220, 2009.

KIKI-MVOUACA, S. et al. Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: a comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. **Drug metabolism and disposition.** v.38, p.573-580, 2010.

KITAGAWA, S. et al. Structure-activity relationships of the inhibitory effects of flavonoids on P-glycoprotein-mediated transport in KB-C2 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** v.28, p.2274-2278, 2005.

LAUGHTON, D.L. et al. Cloning of a putative inhibitory amino acid receptor subunit from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Receptors Channels**. v.2, p.155-63, 1994.

Le JAMBRE, L.F. et al. A hybridization technique to identify anthelmintic resistance genes in *Haemonchus*. **International Journal for Parasitology**. v.29, p.1979-1985, 1999.

LESPINE, A. et al. Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). **Chemico-Biological Interactions**. v.159, p. 169-179, 2006.

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: Drugs and Drug Resistance**. 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, p.291-298, 2010a.

LIFSCHITZ, A. et al. Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. **Experimental Parasitology**. v. 125, p. 172-178, 2010b.

LOVERIDGE, B. et al. Probable multigeneric resistance to macrocyclic lactone anthelmintics in cattle in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**. v.51, p.139-141, 2003.

MARTINEZ, M. et al. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 31, p. 285-300, 2008.

MÉNEZ, C. et al. Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line. **Biochemical Pharmacology**. v.83,p.269-278, 2012.

- MOLENTO, M.B. & PRICHARD, R. K. Verapamil and CL347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected satrins of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). **Parasitology Research**. v. 85, p. 1007-1011, 1999.
- MOTTIER, L. & LANUSSE, C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. **Revista de Medicina Veterinária**. v.82, p.74-85, 2001.
- MUKAI et al. Inhibition of P-glycoprotein Enhances the Suppressive Effect of Kaempferol on Transformation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.73, p.1635-1639, 2009.
- NJUE, A.I. et al. Mutation in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β subunits from ivermectina-resistant *Cooperia oncophora* affects agonist sensitivity. **Journal of Neurochemistry**. v.89, p.1137-1147, 2004.
- NJUE, A.I. & PRICHARD, R.K. Efficacy of ivermectin in calves against a resistance *Cooperia oncophora* field isolate. **Parasitology Research**. v.93, p.419-422, 2004.
- PAIVA, F. et al. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. **Hora Veterinária**. v.120, p.29-34, 2001.
- PRICHARD, R.K. & TAIT, A. The role of molecular biology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**. v.98, p.169-194, 2001.
- PRICHARD, R. K. & ROULET, A. ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. **Cambridge Journals**. v. 134, p. 1123-1132, 2007.
- RAO, V. T. S. et al. A dopamine-gated íon channel (HcGGR3) from *Haemonchus contortus* is expressed in the cervical papillae and is associated with macrocyclic lactone resistance. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 166, 54-61, 2009.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**. v. 136, p. 99-107, 2006.

SANGSTER, N.C. Anthelmintic resistance: past, present and future. **International Journal for parasitology**. v.29, p.115-124, 1999.

SILVA, M.E. & RODRIGUES, D.S. Resistência anti-helmíntica em ruminantes: realidade brasileira. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG**. n.79, 2010.

SOUTELLO, R.G.V.; SENO, M.C.Z. & AMARANTE, A.F.T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes northwestern São Paulo State, Brazil. **Science Direct**. v.148, p.360-364, 2007.

SOUZA, A.P. et al. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**. v.38, n.5, p.1363-1367, 2008.

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

SUAREZ, V.H. & CRISTEL, S.L. Anthelmintic resistance in cattle nematoda in the western Pampeana Region of Argentina. **Veterinary Parasitology**. v.144, p.111-117, 2007.

TAUR, J.S. & RODRIGUEZ-PROTEAU, R. Effects of dietary flavonoids on the transport of cimetidine via P-glycoprotein and cationic transporters in Caco-2 and LLC-PK1 cell models. **Xenobiotica**. v.38, p.1536-50, 2008.

TOMPKINS, J.B. et al. The role of *Brugia malayi* ATP-binding cassette (ABC) transporters in potentiating drug sensitivity. **Parasitology Research**. v.109, p.1311-1322, 2011.

Van der HEYDEN, S. et al. Expression of P-glycoprotein in the intestinal epithelium of dogs with lymphoplasmacytic enteritis. **Journal of Comparative Pathology**. v.145, p.199-206, 2011.

VÁSQUEZ, P.T.; SANMIGUEL, G.A.P. & LARA, D.M. Resistencia antihelmíntica en los nemátodos gastrointestinales del bovino. **Revista de Medicina Veterinária**. v.13, p.59-76, 2007.

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.

WAGHORN, T.S. et al. Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zeland. **New Zeland Veterinary Journal**. v.54, p.278-82, 2006.

WAGNER-SOUZA, K. et al. Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.49, p.103-112, 2003.

WILLIAMSON, S.M. et al. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequece polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v.180, p.99-105, 2011.

Efeito de oito drogas moduladoras de glicoproteína-P na potencialização da eficácia de ivermectina contra *Haemonchus placei*

R.P. Heckler¹; G.D. Almeida¹; L.B. Santos¹; D.G.L. Borges¹; J.P.L. Neves¹; M.K.V.

Onizuka¹; F.A. Borges¹

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil

* Fernando de Almeida Borges, PhD – Department of Veterinary Medicine/FAMEZ/UFMS. Av. Senador Felinto Muller, 2443, Bairro Ipiranga, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Caixa Postal 549 CEP: 79074-460. Phone number +55 (67) 33453612. fernando.borges@ufms.br

Resumo

Desde sua produção na década de 80, a ivermectina (IVM) está sendo utilizada de forma indiscriminada e a pressão de seleção a que os nematodas gastrintestinais de bovinos foram expostos foi intensa e ocasionou perdas econômicas consideráveis devido ao advento da resistência parasitária. Uma alternativa para o controle de parasitos, na atual era da resistência, é o uso de drogas moduladoras da gp-P, uma vez que uma das principais alterações bioquímicas que os parasitos resistentes a esta avermectina apresentam é o aumento da atividade desta proteína de membrana, responsável pelo efluxo de fármacos e xenobióticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar oito drogas com atividade moduladora da gp-P para potencializar a eficácia de IVM contra um isolado de campo de *Haemonchus placei* resistente, utilizando o teste de inibição da migração larval. Foi observado acréscimo de 5,1; 49,06; 76,42; 3,31; 28,85; 13,74; 45,64 e 43,61% na eficácia de ivermectina (10^{-4} M), na inibição da migração de larvas e diminuição da concentração efetiva média de ivermectina, de $4,381 \times 10^{-6}$ M, quando avaliada isoladamente, para $9,877 \times 10^{-8}$; $1,159 \times 10^{-7}$; $2,710 \times 10^{-7}$; $2,739 \times 10^{-7}$; $7,136 \times 10^{-7}$; $1,026 \times 10^{-6}$; $1,240 \times 10^{-6}$ e $1,651 \times 10^{-6}$ M quando associada a ciclosporina-A,

trifluoperazina, quercetina, ceftriaxona, vimblastina, verapamil, dexametasona e aceturato de diminazene, respectivamente. Somente aceturato de diminazene não reduziu estatisticamente ($P>0,05$) o número de larvas migrantes, quando associado à ivermectina. O efeito das drogas moduladoras de gp-P foi dependente da concentração de ivermectina, havendo maior efeito potencializador em concentrações mais baixas desta avermectina. A utilização dos fármacos trifluoperazina, dexametasona, quercetina, verapamil, ciclosporina A, vimblastina e ceftriaxona, associados à ivermectina, demonstraram capacidade *in vitro* de potencializar a eficácia de ivermectina contra um isolado de campo de *H. placei* resistente, visto pela ausência de motilidade larval, observadas em determinadas concentrações no teste de inibição da migração larval.

Palavras-chave: resistência, reversão química, lactonas macrocíclicas, nematoda

1 Introdução

A verminose gastrointestinal de bovinos é considerada um dos principais entraves responsáveis por perdas econômicas e baixa produtividade (Vásques et al., 2007), observadas pelo déficit no ganho de peso, diminuição da produção de carne e leite e, como consequência, baixa lucratividade. Em países tropicais, como o Brasil, os bovinos, em sua maioria, são criados extensivamente. Nestas regiões, são observadas condições ótimas de temperatura e umidade para desenvolvimento e sobrevivência de larvas infectantes no pasto, o que permite um aumento da carga parasitária e elevação dos prejuízos.

Dentre os principais nematodas gastrointestinais de bovinos encontrados no Brasil, destacam-se os gêneros *Cooperia*, com prevalência elevada (Santos et al., 2010), porém, reduzida patogenicidade e *Haemonchus*, helminto extremamente patogênico implicado em perdas diretas, relacionadas, principalmente, ao seu potencial hematófago, e indiretas, devido aos gastos oriundos da desverminação e mão de obra (Gennari et al, 2001).

A necessidade de se controlar esta enfermidade tornou a utilização de anti-helmínticos primordial. O grupo das lactonas macrocíclicas (LM) foi descoberto em 1979 (Burg et al., 1979) e é, ainda, o mais utilizado na pecuária brasileira pois apresenta eficácia terapêutica contra endo e ectoparasitos, segurança clínica elevada e amplo espectro de ação. Todavia, após mais de trinta anos de utilização, se tornou uma das classes de anti-helmínticos sobre a qual mais se encontram relatos de resistência na literatura mundial (Sutherland & Leathwick, 2011).

Em *Haemonchus placei*, a resistência a ivermectina (IVM) é um problema emergente em muitas partes do mundo (Anziani et al., 2004; Soutello et al., 2007; Souza et al., 2008; Feliz, 2011; Canul-Ku et al., 2012) e, mesmo que nesta espécie animal os relatos de resistência apresentem um desenvolvimento mais lento do que os observados em nematodas que infectam pequenos ruminantes, o número de casos relatados na literatura nos últimos cinco anos mostram o quanto este problema cresce de forma rápida em bovinos (Sutherland & Leathwick, 2011).

A ausência de eficácia a diversos princípios ativos com mecanismos de ação diferentes, Resistência Múltipla às Drogas, (RMD), descoberta durante a quimioterapia de neoplasias malignas em humanos, é um caso de resistência também observada em nematodas gastrintestinais de ruminantes (Kaplan, 2004). Esta característica pode estar relacionada a uma série de fatores que ainda não são totalmente compreendidos, entre eles e principal, o mecanismo de efluxo de fármacos através da membrana plasmática de células (Wagner-Souza et al., 2003; Huber et al., 2010; Gao et al., 2011), estando os transportadores ABC (ATP Binding Cassete), implicados na resistência às LM (Xu et al., 1998) e contribuem para resistência à vários outros anti-helmínticos (Lespine et al., 2012).

Desta forma, uma ferramenta atualmente estudada, com a finalidade de controlar a RMD em nematodas de ruminantes, é a potencialização da eficácia de IVM, por meio de

drogas moduladoras da gp-P. Esta proteína possui cerca de 170 KDa e está envolvida em processos intrínsecos de absorção, metabolismo, distribuição e efluxo de fármacos (Mealey, 2004), como IVM, ocasionando, em humanos, diminuição da concentração intracelular nas células do fígado, rins, cérebro e trato gastrointestinal (Ménez et al., 2012). Este efluxo de IVM, causado por gp-P, no caso de parasitos nematodas, impede a atuação deste fármaco no seu sítio de ligação (sistema nervoso de nematodas) e, conseqüentemente, em ineficácia terapêutica.

Mesmo que este provável mecanismo responsável pelo desenvolvimento de resistência às LMs ainda não esteja totalmente esclarecido (Xu et al., 1998; Beech et al., 2010), estudos *in vitro* (Molento & Prichard, 2001; Kitagawa, 2005; Dupuy et al., 2006; Borges et al., 2011; Tompkins et al., 2011) e *in vivo* (Marques-Santos et al., 1999; Taur & Rodriguez-Proteau, 2008; Lifschitz et al., 2010a; Lifschitz et al., 2010b) demonstraram claramente o êxito na reversão da resistência, mesmo que parcial, de alguns fármacos representantes desse grupo. Desta forma, numerosos compostos demonstraram serem moduladores da atividade de gp-P (Ballent et al., 2005) e combinações apropriadas têm sido propostas para melhorar a disponibilidade sistêmica de drogas, resultando em alta eficácia nos tratamentos contra parasitos e, conseqüentemente, na reversão deste fenômeno (Lifschitz et al., 2010a; Lespine et al., 2012).

Frente aos relatos de resistência observados em *H. placei* aos principais compostos anti-helmínticos, principalmente IVM, assim como o aumento da intensidade parasitária deste helminto no decorrer dos anos, se comparado à *Cooperia* spp. (Santos et al., 2010), sua alta patogenicidade e reduzida perspectiva para a introdução de novas moléculas anti-helmínticas eficazes contra este parasito no mercado, a presente pesquisa objetivou avaliar a eficácia de IVM, associada a oito fármacos moduladores da gp-P: trifluoperazina (TRI), aceturato de diminazene (AD), dexametasona (DEX), quercetina (QUE), verapamil (VER), ciclosporina A

(CLA), vimblastina (VIM) e ceftriaxona (CEF), contra um isolado de campo de *H. placei* resistente.

2 Material e métodos

2.1 Obtenção e isolamento da estirpe *Haemonchus placei* resistente à ivermectina – HPFAMEZ1

O isolado resistente à IVM, HPFAMEZ1, foi obtido em uma propriedade localizada no Município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, previamente caracterizada como resistente à IVM, que apresentou 0; 48 e 100% de redução na contagem de ovos nas fezes para os gêneros *Haemonchus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum*, respectivamente (FELIZ, 2011).

Amostras de fezes foram obtidas para a produção de larvas de terceiro estágio (L3) com a frequência de 53,6; 45 e 2,3% dos gêneros *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp., e *Oesophagostomum* sp., respectivamente, que foram inoculadas em um bezerro de quatro meses de idade, livre de parasitismo e mantido em baia individual de alvenaria (4m x 4m) com piso de concreto. A higienização das instalações foi realizada diariamente, com limpeza e desinfecção, com a utilização de detergente neutro e hipoclorito de sódio.

Para o isolamento da cultura pura de *H. placei*, este animal foi eutanasiado, 42 dias P.I., e exemplares fêmeas adultas foram recuperadas do abomaso e imediatamente transferidas para placas de Petri contendo solução salina a 36°C e mantidos em estufa por duas horas. Os ovos recuperados foram misturados em fezes equinas autoclavadas e mantidos em temperatura ambiente por sete dias, quando as larvas infectantes de terceiro estágio foram obtidas.

Dois bezerros, tratados com sulfóxido de albendazole (Ricobendazole® Ourofino Saúde Animal), por três dias consecutivos, na dose de 5mg/Kg para a eliminação da carga parasitária eventualmente presente, foram inoculados com 10.000 L3 de *H. placei* para a

manutenção do isolado. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFMS – protocolo número 200/11.

2.2 Teste de Inibição da Migração Larval (TIML)

2.2.1 Fármacos utilizados

Utilizou-se IVM, fornecida gentilmente por Intervet Schering-Plough Animal Health com 97,10% de pureza, quercetina diidratada $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$ (Sigma-Aldrich 6151-25-3), dexametasona $C_{22}H_{29}FO_5$ (Sigma-Aldrich 50-02-2), acetato de diminazene $C_{14}H_{15}N_7 \cdot 2C_4H_7NO_3$ (Sigma-Aldrich 908-54-3), trifluoperazina $C_{21}H_{24}F_3N_3S \cdot 2HCL$ (Sigma-Aldrich 440-17-5), ciclosporina A $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ (Sigma-Aldrich 59865-13-3), sulfato de vimblastina $C_{46}H_{58}N_4O_9 \cdot H_2SO_4$ (Sigma-Aldrich 143.67.9), verapamil $(CH_3O)_2C_6H_3CH_2CH_2N(CH_3)(CH_2)_3C[C_6H_3(OCH_3)_2][CH(CH_3)_2]CN \cdot HCL$ (Sigma-Aldrich 152-11-4), e ceftriaxona sódica (Ceftriax®) $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$ (Sigma-Pharma, Brasil).

2.2.2 Avaliação da atividade potencializadora dos fármacos moduladores

Os diluentes foram avaliados isoladamente para determinar as concentrações padrões que foram utilizadas nas respectivas diluições de cada fármaco (Tabela 1), sem que houvesse ação letal ou na redução na motilidade das larvas.

A avaliação da associação de cada fármaco com o anti-helmíntico foi realizada em duas etapas: 1) associações de IVM/CE50 com diferentes concentrações do fármaco modulador testado e 2) associações de diferentes concentrações de IVM com uma concentração padrão de modulador, concentração esta determinada na etapa 1.

Os critérios para a escolha da concentração de modulador, utilizada na segunda etapa, foram ausência de efeito nematocida, quando avaliado isoladamente, e o efeito potencializador da IVM.

Os diluentes e as concentrações das soluções estoques, utilizados nos TIML, foram etanol para DEX (10^{-3} M), QUE (10^{-3} M) e CLA (4 mM); água destilada para AD ($1,939 \times 10^{-1}$

M), VER (96 mM) e CEF ($1,8 \times 10^{-3}$ M) e DMSO para TRI (1 M), VIM (5 mM) e IVM (10^{-2} M).

2.2.3 Diluições de ivermectina

Foi preparada a solução estoque de 10^{-2} M em dimetil sulfóxido (DMSO P.A.) e armazenada a -20° C para posterior preparação das soluções de trabalho. Foram utilizadas, para as diferentes concentrações (Tabela 1), DMSO 2% e água destilada nas primeira e segunda etapas, respectivamente, e um grupo controle que recebeu apenas água destilada.

2.2.4 Teste de inibição da migração larval

Foram realizados 11 testes com o objetivo de padronizar as concentrações de IVM, para esta espécie de nematoda, e assim determinar a concentração efetiva média (CE50). A padronização descrita no presente estudo, foi conduzida seguindo métodos preconizados por D'Assonville et al. (1996), modificado por Molento & Prichard (2001), com algumas alterações.

As larvas utilizadas neste experimento foram desembainhadas, em solução de hipoclorito de sódio (0,08%) por 15 minutos, período este suficiente para que mais de 90% das larvas estivessem sem bainha, centrifugadas (404g/2 min) e lavadas com água destilada por três vezes para remoção de resíduos de hipoclorito. Posteriormente, foram realizadas três contagens de L3 e o volume de água destilada foi ajustado para que houvesse 400 L3 em cada 0,5 mL.

Foram utilizadas placas de 24 poços, em cujos poços foi adicionado 0,5 ml da solução contendo as larvas, já desembainhadas, 0,25 ml de IVM em diferentes concentrações e 0,25 ml de modulador. Cada linha correspondia a uma concentração de anti-helmíntico, sempre em triplicata, e ao final um grupo controle negativo, ao qual foi adicionada apenas água destilada.

As larvas ficaram em contato com a droga por um período de 6 horas em estufa à temperatura de 27°C.

Após esse período, a cada poço foi adicionado 1 ml de ágar 1,4% à temperatura de 45°C. Esta solução final, contendo larvas, ágar e droga, foi imediatamente transferida para uma placa de migração, constituída de duas telas sobrepostas com diferentes aberturas (uma tela com 38 µm e outra com abertura maior) e um anel de plástico, com 0,8 cm de altura e 3,0 cm de diâmetro, parcialmente imerso em 25 ml de água destilada que foi previamente congelada.

Todas as placas de migração foram deixadas em estufa tipo B.O.D. à temperatura de 27°C por 18 horas, na ausência de fonte luminosa. Desta forma, as larvas que sobreviveram ao contato prévio com a droga migraram pelo ágar, passaram pelas telas e permaneceram na porção aquosa da placa de migração. Toda fração líquida de cada placa de migração foi transferida para tubos de vidro e deixados em refrigeração durante 24 horas para sedimentação das larvas. Parte do sobrenadante foi retirado, deixando-se apenas uma alíquota de 10 ml, da qual foram retiradas três sub-alíquotas de 1 ml cada para quantificação de L3, em lupa, sempre de forma homogênea, com o auxílio de um aparelho vórtex, e ao fim de cada contagem, o resultado foi multiplicado por dez.

2.3 Análise estatística

Os valores das concentrações de IVM foram transformados logaritmicamente e as médias de contagens de larvas que migraram pela barreira ágar/filtro foram expressas como percentual (0 a 100%) de frequência (normalização). Foram construídas curvas sigmóides de regressão não linear da relação dose x resposta destes dados transformados e normalizados. Utilizando-se estes valores, foi calculada a concentração efetiva média (CE50) requerida para paralisar 50% das larvas por meio da seguinte equação: $Y=100(1+10^{((\text{LogCE50} - X)})$, em que: X= logaritmo (base 10) da concentração e Y= número de larvas. Para a comparação entre

as curvas, foi calculado o fator de inclinação (FI) e para avaliar a qualidade da curva, foi calculado o fator de determinação (R^2). Estas análises estatísticas foram realizadas empregando o programa GraphPad Prism.

O percentual de eficácia de cada fármaco, em diferentes concentrações, foi calculado por meio da seguinte fórmula (COLES et al., 1992): Eficácia %: $[(CL3 - TL3)/CL3] \times 100$, no qual CL3 e TL3 representam a contagem do número de L3 do grupo controle e a contagem do número de L3 do grupo tratado, respectivamente.

Para a comparação entre as médias de larvas que migraram após serem submetidas a diferentes tratamentos, foi utilizada a análise de variância considerando dois fatores (two way Anova), que comparou a média de larvas levando em consideração as drogas, as concentrações e a interação entre elas, seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. As médias de larvas em cada concentração de IVM foram comparadas às de IVM associada aos moduladores de gp-P.

3 Resultados

3.1 Avaliação da associação farmacológica entre anti-helmíntico (EC50), com diferentes concentrações de drogas moduladoras no TIML, contra o isolado HPFAMEZ1

Antes do início dos testes os diluentes foram avaliados isoladamente. DMSO (2%) não demonstrou efeito nematodocida. Etanol, avaliado nas concentrações 1,4; 3,5; 5,04; 7; 10,08; 15,04; 20,02 e 25,06%, não apresentou efeito letal de larvas até a concentração 7%. As concentrações acima desta, mataram 100% das larvas após 2 horas de incubação.

Os resultados da CE50, FI da curva dose x resposta e R^2 de IVM, isoladamente, e em concentrações crescentes contra o isolado HPFAMEZ1 estão apresentados na Tabela 3.

Não foi observado efeito nematodocida dos fármacos moduladores avaliados, quando testados isoladamente, com exceção de TRI (3×10^{-2}), VER (8 mM) e CEF ($3,6 \times 10^{-4}$ M), que apresentaram inibição de 19,79; 13,21 e 9,30% da migração larval, respectivamente.

A associação entre VER + IVM (CE50) e QUE + IVM (CE50) resultou em percentuais de eficácia próximos ou acima de 90%; VER nas concentrações 64, 32, 16, 8 e 4 mM, e QUE na maior concentração (5×10^{-5} M) (Tabela 2).

Houve aumento moderado da eficácia (<80%) das combinações entre IVM e QUE (10^{-5} , 5×10^{-6} , 10^{-6} , 5×10^{-7} , 10^{-7} , 5×10^{-8} , 10^{-8} M), IVM e DEX (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-9} M), IVM e TRI (5×10^{-2} , $4,5 \times 10^{-2}$, 4×10^{-2} , $3,5 \times 10^{-2}$, 3×10^{-2} , $2,5 \times 10^{-2}$, 2×10^{-2} , $1,5 \times 10^{-2}$ M) e IVM e AD ($1,9 \times 10^{-5}$; $1,9 \times 10^{-6}$; $1,9 \times 10^{-7}$ e $1,9 \times 10^{-8}$ M), quando comparados com IVM (EC50) isoladamente (Tabela 2).

Nas combinações entre IVM e AD ($1,939 \times 10^{-9}$ e $1,939 \times 10^{-10}$ M), IVM e DEX (10^{-8} M), IVM e CLA (256, 128, 64, 32, 16 e 8 μ M), IVM e VIM (32, 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5 μ M) e IVM e CEF ($3,6 \times 10^{-4}$; $1,8 \times 10^{-4}$; $9,01 \times 10^{-5}$; $3,6 \times 10^{-5}$; $1,8 \times 10^{-5}$; $9,01 \times 10^{-6}$; $3,6 \times 10^{-6}$ e $2,7 \times 10^{-6}$ M), foram observadas reduções da eficácia de IVM (EC50), observadas pelo aumento de larvas migrantes no TIML (Tabela 2).

3.2 Avaliação da associação farmacológica entre anti-helmíntico, em crescentes concentrações, e fármacos moduladores em concentrações fixas no TIML contra o isolado HPFAMEZ1

As curvas sigmóides da relação dose x resposta das concentrações fixas de AD, DEX, QUE, TRI, VER, CLA, VIM e CEF, associados a crescentes concentrações de IVM, estão apresentadas na Figura 1.

Todos os fármacos moduladores avaliados, combinados à IVM, apresentaram percentuais de eficácia superiores à IVM isolada, com exceção de CEF e VER, quando associados à IVM, nas concentrações 2×10^{-4} ; 10^{-5} M e 2×10^{-5} ; 10^{-5} M.

Os maiores incrementos no percentual de eficácia de IVM foram observados nas associações farmacológicas entre IVM e os seguintes fármacos moduladores nas respectivas concentrações de IVM: QUE, nas concentrações 2×10^{-4} , 10^{-4} , 2×10^{-5} e 10^{-5} M; TRI, nas concentrações 2×10^{-6} e 10^{-6} M; QUE, na concentração 2×10^{-7} M e VIM, na concentração 10^{-7} M.

QUE apresentou o maior percentual de redução na migração larval ao ser associada com IVM (10^{-4} M), com 83,45% de eficácia, enquanto CEF, VIM, CLA, VER, AD, DEX e TRI, quando associados a esta mesma concentração, apresentaram 48,87; 60,95; 49,73; 53,80; 67,93; 68,89 e 70,51% de eficácia, respectivamente.

Estes resultados evidenciam acréscimo de 76,42; 45,64; 43,61; 49,06; 13,74; 5,1; 28,85 e 3,31% na eficácia de IVM, na concentração 10^{-4} M, quando associada a QUE, DEX, AD, TRI, VER, CLA, VIM e CEF, respectivamente.

Em todas as associações farmacológicas, entre drogas moduladoras e IVM, foram observadas reduções da CE50, quando estas combinações foram comparadas com IVM isoladamente. Os maiores e menores valores de CE50, FI e R^2 de IVM foram observadas em CLA e AD ($9,877 \times 10^{-8}$ e $1,6 \times 10^{-6}$ M), CLA e DEX (0,27 e 0,66) e CEF e TRI (49,26 e 90,92) quando associados à IVM, respectivamente (Tabela 3).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as contagens dos números de larvas na associação de AD com IVM, quando comparada com a mesma isoladamente. Para os demais fármacos, tais diferenças foram observadas apenas nas concentrações 10^{-6} ($P < 0,001$), 2×10^{-7} ($P < 0,01$) e 10^{-7} M ($P < 0,01$) para TRI, 10^{-6} ($P < 0,05$) e 2×10^{-7} M ($P < 0,05$) para DEX, 2×10^{-7} ($P < 0,01$) e 10^{-7} M ($P < 0,01$) para QUE, 2×10^{-7} M ($P < 0,01$) para VER, 10^{-6} ($P < 0,05$),

2×10^{-7} (P<0,001) e 10^{-7} M (P<0,001) para CLA, 10^{-7} M (P<0,001) para VIM e 10^{-6} (P<0,05) e 10^{-7} M (P<0,01) para CEF (Figura 1).

Diferença altamente significativa (P<0,0001) foi observada na interação entre droga moduladora e concentração de IVM, ou seja, os valores de eficácia observados em cada associação sofreram forte influência, não apenas do tipo de droga moduladora, mas também, da concentração de IVM utilizada em cada tratamento. Efeito estatisticamente significativo das drogas moduladoras de gp-P foi observado somente quando associados a concentrações mais baixas de IVM.

4 Discussão

A utilização de diferentes fármacos moduladores, associados às LMs (IVM e MOX), estão sendo estudados e comprovam esta característica de reversão, tanto em ensaios *in vivo* quanto *in vitro*. No entanto, até o momento, não há publicações que demonstrem aumento de eficácia da IVM contra *H. placei*, por isso, o conhecimento do efeito de determinados fármacos moduladores, comprovadamente substratos de gp-P, para este parasito, ainda é desconhecido.

Este trabalho apresentou o primeiro estudo utilizando fármacos moduladores, buscando potencializar a eficácia de IVM contra um isolado de campo resistente de *H. placei*. Os resultados apresentados aqui, mostram que todos os fármacos moduladores avaliados, associados à IVM, apresentaram redução do FI da curva dose x resposta, quando comparado com a curva padrão de IVM isolada (0,92), ou seja, as curvas sigmóides, observadas nas combinações farmacológicas, foram mais superficiais à IVM padrão, desta forma, nota-se que houve relação direta entre a inclinação da curva sigmoide e o número de larvas migrantes no TIML. Entre os fármacos moduladores avaliados, o menor valor numérico para o FI da curva dose resposta, correspondente à maior diminuição da quantidade de larvas migrantes, foi

observado em CLA e o maior em DEX e por isso, apresentaram curvas mais superficial e íngreme, respectivamente.

Os fármacos moduladores QUE, nas concentrações 2×10^{-4} , 10^{-4} , 2×10^{-5} , 10^{-5} e 2×10^{-7} M; TRI, nas concentrações 2×10^{-6} e 10^{-6} M e VIM, na concentração 10^{-7} M de IVM, apresentaram os maiores percentuais de eficácia associados à esta LM. Entretanto, o aumento do percentual de eficácia, observados nestas concentrações de IVM avaliadas, não possui relação direta com a diminuição da CE50 e FI de IVM, uma vez que as maiores reduções da CE50 e FI de IVM não foram observadas nestas combinações supracitadas. Pode-se inferir, portanto, que a ausência de relação entre estes parâmetros foi devido à provável influência da interação farmacológica, do tipo de fármaco utilizado ou pela concentração testada em cada combinação.

Um exemplo de interação farmacológica em que foi observada ausência de relação entre os parâmetros eficácia, EC50 e FI, foi na combinação IVM/CLA, avaliada na concentração 10^{-4} M de IVM, a qual apresentou a maior diminuição dos valores de FI da curva dose x resposta e CE50 de IVM. Entretanto, mesmo sendo verificadas as maiores reduções na CE50 e FI da curva dose x resposta de IVM, esta combinação não proporcionou percentuais de eficácia superiores à combinação IVM/QUE, que apresentou percentuais de eficácia de 83,45% nessa mesma concentração.

Além disso, foi observado, para todas as combinações, com exceção de TRI/IVM e AD/IVM, nas oito diferentes concentrações de IVM, variações nos percentuais de eficácia entre as concentrações da mesma combinação, que não seguiram um padrão linear crescente, ou seja, algumas concentrações mais elevadas apresentaram percentuais de eficácia inferiores aos observados em algumas concentrações mais baixas.

Foi observado que a curva sigmóide da relação dose x resposta de IVM isoladamente, obteve alta qualidade ($R^2 = 0,85$) e se aproxima dos valores observados por Demeler et al.

(2010) que, em experimento utilizando diferentes isolados sensíveis e resistentes, observaram o valor 0,91 para um isolado *H. contortus* resistente à IVM,

A ação moduladora dos fármacos avaliados mostrou-se dependente da concentração de IVM, por isso, foram observadas diferenças estatísticas entre o número de larvas migrantes ($P < 0,0001$), submetidas à IVM isoladamente, em relação à IVM associada às drogas moduladoras, somente nas menores concentrações de IVM. Quando os moduladores de gp-P eram associados a altas concentrações de IVM, não houve diferença ($P > 0,05$) com IVM isoladamente (Figura 1).

A observação da viabilidade de larvas de terceiro estágio de *H. placei* resistente à IVM, quando em contato com os diluentes DMSO (2%) ou etanol (até 7%), isoladamente, utilizados nas diluições das respectivas soluções de IVM (soluções de trabalho) e alguns fármacos moduladores, foram avaliados por Molento & Prichard (2001) que, assim como na presente pesquisa, observaram ausência de efeitos nematocidas.

Em contraste com os resultados obtidos por Borges et al. (2011), que avaliaram a ação reversora *in vivo* e *in vitro* do VER sobre a resistência de *H. contortus* à IVM, e observaram que a CE50 de IVM, associada ao VER, permaneceu semelhante à da IVM isolada, neste experimento, houve redução da concentração efetiva média de IVM, quando associada ao VER de $4,381 \times 10^{-6}$ para $1,026 \times 10^{-6}$ M.

Alguns fármacos moduladores, como VER e CLA, exercem atividade competitiva com gp-P (Ballent et al., 2005) e apresentam um fator limitante quanto a sua utilização *in vivo*, pois ao serem combinados com outros fármacos, com a finalidade de potencializar os efeitos terapêuticos desejados, são necessárias altas doses, o que resulta numa toxicidade muitas vezes inaceitáveis ao organismo (Wagner-Souza et al., 2003). Com isso, a realização da técnica *in vitro* utilizada neste experimento, viabilizou a utilização e experimentação de diferentes concentrações desses fármacos moduladores, uma vez que a variável hospedeiro

não foi considerada, desta forma, possibilitou a avaliação criteriosa destas associações farmacológicas com a vantagem da ausência de toxicidade em hospedeiros.

O efeito reversor de algumas drogas utilizadas na presente pesquisa como CLA e TRI na modulação da gp-P, também foi observado após a análise de cromatografia de alta eficiência, HPLC, em tecidos cerebrais de ratos, em que foi observado aumento na concentração de IVM no encéfalo dos mesmos, quando precedida da administração de CLA e TRI, aumentando sobremaneira a toxicidade de IVM com a diminuição da biotolerância à esta LM (Marques-Santos et al., 1999).

A contribuição do sistema ABC de transporte, como gp-P, associando drogas moduladoras com IVM, também foram avaliadas em nematoda *Brugia malayi*, e foi demonstrado que a sensibilidade à IVM, como no presente trabalho, é potencializada quando a mesma é co-administrada com fármacos moduladores como VER, CLA e VIM (Tompkins et al., 2011).

VER, na concentração 8 mM, avaliado isoladamente na presente pesquisa, apresentou efeito nematodocida de 13,21%. Em contraste com resultados obtidos por Molento & Prichard (2001), ao avaliarem o aumento da eficácia de IVM e MOX através da associação de VER, CL347.099 e CLA, que observaram que VER, isoladamente, não apresentou efeito nematodocida na concentração até 100 mM.

A associação de IVM com AD não resultou em redução estatística no número de larvas migrantes no TIML, provavelmente, devido à ausência de habilidade em interferir na função das gp-Ps nos nematodas. Estudos *in vivo*, comprovam que este fármaco pode atuar através de outros mecanismos ainda não conhecidos ou interagir com outros transportadores ABC, assim como mostram Dupuy et al. (2006), que avaliaram a influência de fumagilina e AD na captação de MOX em culturas primárias de hepatócitos de ratos para verificar se as mesmas interferem na função de transporte de gp-P, através da acumulação de rodamina 123,

potente substrato fluorescente de gp-P, e observaram que fumagilina causa uma alteração nesta proteína, demonstrado no aumento de acumulação desta LM. A ausência de efeito na acumulação de rodamina 123 em AD, sugere que seus efeitos na acumulação de MOX não são mediados pela gp-P, demonstrando que o transporte das LMs pode ser mais complexo do que um único caminho de efluxo observado em gp-P.

A associação farmacológica de IVM com QUE, proporcionou aumento de eficácia, quando comparada com IVM isoladamente, em 76,42%. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos (Taur & Rodriguez-Proteau et al., 2008; Borska et al., 2010) que avaliaram a atuação de gp-P na diminuição ou aumento da concentração intracelular de alguns fármacos em culturas celulares, e comprovam que QUE afeta a expressão e função de gp-P, dependendo da concentração, servindo, portanto, como potenciais moduladores desta glicoproteína de membrana.

Os resultados da presente pesquisa, utilizando CEF na concentração fixa de $3,6 \times 10^{-4}$ M, evidenciou a atividade de modulação desta glicoproteína por este fármaco modulador, observado pela diminuição da CE50 da associação, quando comparada com IVM isolada. Essa característica de modulação, já foi comprovada, *in vitro*, por Gosland et al. (1989), que avaliaram a reversão da resistência em etoposide, doxorubicina e VIM, associadas a seis diferentes cefalosporinas; cefazolina, cefotetan, cephradina, ceftazidime, cefoperazona e CEF, e observaram que cefoperazona e CEF, foram os únicos fármacos antibióticos com efeito modulador (inibição) de gp-P, ambos na concentração de 10^{-3} M.

Resultados satisfatórios, *in vivo*, também foram observados sobre o efeito de loperamida na disposição cinética de IVM e MOX e eficácia contra nematodas de bovinos resistentes. A modulação da gp-P, modificou o comportamento cinético e melhorou a eficácia das LMs contra os gêneros *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Cooperia*, *Trichostrongylus* e

Oesophagostomum. Em condições de campo, esta pode ser uma abordagem farmacológica válida para melhorar a atividade e prolongar a vida útil dessas drogas (Lifchitz et al., 2010b).

Todavia, em DEX, a interação *in vivo* existente sobre a eficácia de IVM e o tratamento com este glicocorticoide sintético mostram, em contraste com o esperado pela presente pesquisa, em que foi observado potencialização da eficácia de IVM, visto pela diminuição da CE50 de IVM no TIML, que esta combinação farmacológica não proporciona aumento, mas diminuição significativa dos níveis plasmáticos de IVM em bovinos experimentalmente infectados por *Cooperia oncophora* e *Ostertagia ostertagi* (Areskog et al., 2012).

Neste estudo, foi observada potencialização da eficácia de IVM, contra o isolado resistente de *H. placei*, quando esta LM foi associada a cada um dos oito fármacos moduladores de gp-P avaliados no TIML. Esta potencialização não atingiu níveis máximos de eficácia (100%) nas associações farmacológicas entre anti-helmíntico e fármacos moduladores. Esta característica pode ser explicada, devido à participação de outros mecanismos no desenvolvimento deste fenômeno, ou seja, a resistência de *H. placei* a este antiparasitário, pode não ocorrer somente por via de genes que codificam a expressão de gp-P, causando o efluxo deste anti-helmíntico, mas também, de mecanismos tais como trocas celulares que afetam a capacidade da droga em acumular-se intracelularmente, alterações de sistemas enzimáticos e/ou alterações de receptores celulares (Mottier & Lanusse, 2001), metabolismo de citocromo P450, que pode estar associado com gp-P e limite a passagem de fármacos, como IVM, através dos enterócitos (Azeredo et al., 2009), alteração da permeabilidade da membrana, inibição da proteína cinase C (PKC), visto que a ativação de PKC leva a ativação de gp-P (Wagner-Souza et al., 2003), ausência da capacidade dos fármacos moduladores avaliados na presente pesquisa, nas concentrações determinadas, em interagir e, conseqüentemente, inibir a ação de gp-P ou outros mecanismos ainda não conhecidos.

Nota-se que as interações farmacológicas produzidas entre fármacos substratos dos transportadores ABC, como a gp-P, podem gerar alternativas terapêuticas para o controle de enfermidades, como a verminose bovina (Ballent et al., 2005), através da potencialização da eficácia, no caso de fármacos anti-helmínticos, como IVM, de uma população de nematodas gastrintestinais de bovinos resistente genotipicamente.

A utilização de QUE, DEX, TRI, VER, CLA, VIM e CEF, associadas à IVM, demonstraram capacidade *in vitro* de potencializar a eficácia de IVM contra um isolado de campo de *H. placei* resistente a esta LM, visto pela ausência de motilidade larval, observadas em determinadas concentrações, no TIML.

5 Agradecimento

FUNDECT – bolsa de mestrado (termo de outorga) e auxílio a pesquisa (Termo de outorga 0134/09)

6 Referências bibliográfica

- Anziani, O.S., Suarez, V., Guglielmone, A.A., Warnke, O., Grande, H. & Coles, G.C. Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Veterinary Parasitology**. v.122, p.303-306, 2004.
- Areskog, M., Samson-Himmelstjerna, G., Sutra, J. & Höglund, J. Dexamethasone treatment interferes with the pharmacokinetics of ivermectin in young cattle. **Veterinary Parasitology**. Doi:10.1016/j.vetpar.2012.07.011, 2012.
- Azeredo, F.J.; Uchôa, F.T.; & Costa, T.D. Papel da glicoproteína-P na farmacocinética e nas interações medicamentosas. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v.90, p.321-326, 2009.
- Ballent, M.; Lifschitz, A.; Virkel, G. & Lanusse, C. Implicancias fisio-farmacológicas de La glicoproteína-P en animales domésticos. **Analecta Veterinaria**. v.25, p.36-47, 2005.

Beech, R.N.; Levitt, N.; Cambos, M.; Zhou, S. & Forrester, S.G. Association of ion-channel genotype and macrocyclic lactone sensitivity traits in *Haemonchus contortus*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 171, p. 74-80, 2010.

Borges, F.A.; Rossini, J.B.; Velludo, P.P; Buzullini, C.; Costa, G.H.; Molento, M.B. & Costa, A.J. Reversão fenotípica da resistência à ivermectina em isolado de campo de *Haemonchus contortus* pelo verapamil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n. 9, 2011.

Borska, S.; Sopol, M.; Chmielewska, M.; Zabel, M. & Dziegiel, W. Quercetin as a potential modulator of P-glycoprotein expression and function in cells of human pancreatic carcinoma line resistant to daunorubicin. **Molecules**. v.15, p.857-870, 2010.

Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hartman, R., Kong, Y., Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J.B., Wallick, H., Stapley, E.O., Ōiwa, R. & Ōmura, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 361-367, 1979.

Canul-Ku, H.L., Rodríguez-Vivas, R.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Pérez-Cogollo, L.C. & Ojeda-Chi, M.M. Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. **Veterinary Parasitology**. v.183, p.292-298, 2012.

Coles, G.C.; Bauer, C.; Borgsteede, F.H.M.; Geerts, S.; Klei, T.R.; Taylor, M.A. & Waller, P.J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v.136, p.167-185, 1992.

D`Assonville, J.A.; Janovsky, E. & Verster, A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**. v.61, n.1-2, p.73-80, 1996.

Demeler, J.; Küttler, U.; El-Abdellati, A.; Stafford, K.; Rydzik, A.; Varady, M.; Kenyon, F.; Goles, G.; Höglund, J.; Jackson, F.; Vercruyse, J. & Samson-Himmelstjerna, G.

Standardization of larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**. v. 174, p. 58-64, 2010.

Dupuy, J.; Lespine, A.; Sutra, J.F. & Alvinerie, M. Fumagillin, a new P-glycoprotein-interfering agent able to modulate moxidectin efflux in rat hepatocytes. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**. v.29, p.489-494, 2006.

Feliz, D.C. **Resistência a anti-helmínticos em nematodas gastrintestinais de bovinos de corte, no Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2011. 41f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

Gao, A.; Liang, H.; Wang, X.; Zhang, X.; Jing, M.; Zhang, J. Yan, Y. & Xiang, W. Reversal effect of two new milbemycin compounds on multidrug resistance in MSF-7/adr cells *in vitro*. **European Journal of Pharmacology**. v.659, p.108-113, 2011.

Gennari, S.M., Vieira Bressan, M.C.R., Rogero, J.R., MacLean, J.M. & Duncan, J.L. Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. **Veterinary Parasitology**. v.38, p.163-172, 1991.

Gosland, M.P.; Lum, B.L. & Sikic, B.I. Reversal by cefoperazone of resistance to etoposide, doxorubicin, and vinblastine in multidrug resistant human sarcoma cells. **Cancer Research**. v.49, p.6901-6905, 1989.

Huber, P.C., Maruiama, C.H. & Almeida, W.P. Glicoproteína-P, resistência à múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**. v.33, n.10, p.2148-2154, 2010.

Kaplan, M.R. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**. v.20, n,10, 2004.

Kitagawa, S.; Nabekura, T.; Takahashi, T.; Nakamura, Y.; Sakamoto, H.; Tano, H.; Hirai, M. & Tsukahara, G. Structure-activity relationships of the inhibitory effects of flavonoids on P-

glycoprotein-mediated transport in KB-C2 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.28, p.2274-2278, 2005.

Lespine, A.; Ménez, C.; Bourguinat, C. & Prichard, R.K. P-glycoprotein on other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v.2, p.58-75, 2012.

Lifschitz, A.; Entrocasso, C.; Alvarez, L.; Lloberas, M.; Ballent, M.; Manazza, G.; Virkel, G.; Borda, B. & Lanusse, C. Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. **Veterinary Parasitology**. v.172, p.291-298, 2010a.

Lifschitz, A.; Suarez, V.H.; Sallovitz, J.; Cristel, S.L.; Imperiale, F.; Ahoussou, S.; Schiavi, C. & Lanusse, C. Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. **Experimental Parasitology**. v.125, p.172-178, 2010b.

Marques-Santos, F.L.; Bernardo, R.R.; Paula, E.F. & Rumjanek, V.M. Cyclosporin A and trifluoperazine, two resistance-modulating agents, increase ivermectin neurotoxicity in mice. **Pharmacology & Toxicology**. v.84, p.125-129, 1999.

Mealey, K.L. Therapeutic implications of the *MDR-1* gene. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. 27:257-264, 2004

Ménez, C.; Mselli-Lakhal, L.; Foucaud-Vignault, M.; Balaguer, P.; Alvinerie, M. & Lespine, A. Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line. **Biochemical Pharmacology**. v.83,p.269-278, 2012.

Molento, M. B. & Prichard, R.K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 21, n. 3, p. 117-121, 2001.

- Mottier, L. & Lanusse, C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. **Revista de Medicina Veterinária**. v.82, p.74-85, 2001.
- Narang, V.S.; Fraga, C.; Kumar, N.; Shen, J.; Throm, S.; Stewart, C.F. & Waters, C.M. Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the blood-brain barrier. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. v.295, p.440-450, 2008.
- Santos, T.R.; Lopes, W.D.Z.; Buzulini, C.; Borges, F.A.B.; Sakamoto, C.A.M.; Lima, R.C.A.; Oliveira, G.P. & Costa, A.J. Helminths fauna of bovines from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil. **Ciência Rural**. v.40, n.4, p.934-938, 2010.
- Soutello, R.G.V., Seno, M.C.Z. & Amarante, A.F.T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.148, p.360-364, 2007.
- Souza, A.P., Ramos, C.I., Bellato, V., Sartor, A.A. & Schelbauer, C.A. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**. v.38, n.5, p.1363-1367, 2008.
- Sutherland, I.A. & Leathwick, D.M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends in Parasitology**. v.27, n.4, p.176-81, 2011.
- Taur, J.S. & Rodriguez-Proteau, R. Effects of dietary flavonoids on the transport of cimetidine via P-glycoprotein and cationic transporters in Caco-2 and LLC-PK1 cell models. **Xenobiotica**. v.38, p.1536-50, 2008.
- Tompkins, J.B.; Stitt, L.E.; Morrisette, A.M. & Ardelli, B.F. The role of *Brugia malayi* ATP-binding cassette (ABC) transporters in potentiating drug sensitivity. **Parasitology Research**. v.109, p.1311-1322, 2011.
- Vásquez, P.T.; Sanmiguel, G.A.P. & Lara, D.M. Resistencia antihelmíntica en los nemátodos gastrointestinales del bovino. **Revista de Medicina Veterinária**. v.13, p.59-76, 2007.

Xu, M.; Molento, M.B.; Blackhall, W.; Ribeiro, P.; Beech, R. & Prichard, R. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 91, p. 327-335, 1998.

Wagner-Souza, K.; Melletti-de-oliveira, M.C.; Maia, R.C. & Rumjanek, V.M. Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.49, p.103-112, 2003.

Tabela 1. Concentrações dos fármacos avaliados no teste de inibição da migração larval (TIML) para o isolado HPFAMEZ1 em triplicata

Tratamentos	IVM (M)	A.D. (M)	DEX (M)	QUE (M)	TRI (M)	VER (M)	CLA (M)	VIM (M)	CEF (M)
A	2×10^{-4}	$1,939 \times 10^{-5}$	10^{-5}	5×10^{-5}	5×10^{-2}	64×10^{-3}	256×10^{-6}	32×10^{-6}	$3,6 \times 10^{-4}$
B	10^{-4}	$1,939 \times 10^{-6}$	10^{-6}	10^{-5}	$4,5 \times 10^{-2}$	32×10^{-3}	128×10^{-6}	16×10^{-6}	$1,8 \times 10^{-4}$
C	2×10^{-5}	$1,939 \times 10^{-7}$	10^{-7}	5×10^{-6}	4×10^{-2}	16×10^{-3}	64×10^{-6}	8×10^{-6}	$9,01 \times 10^{-5}$
D	10^{-5}	$1,939 \times 10^{-8}$	10^{-8}	10^{-6}	$3,5 \times 10^{-2}$	8×10^{-3}	32×10^{-6}	4×10^{-6}	$3,6 \times 10^{-5}$
E	2×10^{-6}	$1,939 \times 10^{-9}$	10^{-9}	5×10^{-7}	3×10^{-2}	4×10^{-3}	16×10^{-6}	2×10^{-6}	$1,8 \times 10^{-5}$
F	10^{-6}	$1,939 \times 10^{-10}$	-	10^{-7}	$2,5 \times 10^{-2}$	2×10^{-3}	8×10^{-6}	1×10^{-6}	$9,01 \times 10^{-6}$
G	2×10^{-7}	-	-	5×10^{-8}	2×10^{-2}	1×10^{-3}	-	$0,5 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-6}$
H	10^{-7}	-	-	10^{-8}	$1,5 \times 10^{-2}$	-	-	-	$2,7 \times 10^{-6}$

*Molar (M), ivermectina (IVM), aceturato de diminazene (A.D.), dexametasona (DEX), quercetina (QUE), trifluoperazina (TRI), verapamil (VER), ciclosporina A (CLA), vimblastina (VIM) e ceftriaxona (CEF).

Tabela 2. Diluições e percentagem de eficácia de aceturato de diminazene, dexametasona, quercetina, trifluoperazina, verapamil, ciclosporina A, vimblastina e ceftriaxona, observados no teste de inibição da migração larval (TIML), associadas à ivermectina (CE50), contra o isolado HPFAMEZ1

Aceturato de diminazene		Dexametasona		Quercetina		Trifluoperazina		Verapamil		Ciclosporina A		Vimblastina		Ceftriaxona	
Diluição (M)	Eficácia (%)	Diluição (M)	Eficácia (%)	Diluição (M)	Eficácia (%)	Diluição (M)	Eficácia (%)	Diluição (M)	Eficácia (%)	Diluição (M)	Eficácia (%)	Diluição (M)	Eficácia (%)	Diluição (M)	Eficácia (%)
1,939x10⁻⁵	54,79	10 ⁻⁵	67,63	5x10 ⁻⁵	89,81	5x10 ⁻²	68,03	64x10 ⁻³	96,10	256x10 ⁻⁶	37,43	32x10 ⁻⁶	26,35	3,6x10 ⁻⁴	32,7
1,939x10⁻⁶	57,57	10 ⁻⁶	60,98	10 ⁻⁵	53,32	4,5x10 ⁻²	59,01	32x10 ⁻³	96,56	128x10 ⁻⁶	28,59	16x10 ⁻⁶	17,86	1,8x10 ⁻⁴	29,28
1,939x10⁻⁷	54,90	10 ⁻⁷	70,90	5x10 ⁻⁶	57,91	4x10 ⁻²	59,24	16x10 ⁻³	96,54	64x10 ⁻⁶	25,99	8x10 ⁻⁶	21,02	9,01x10 ⁻⁵	21,96
1,939x10⁻⁸	48,14	10 ⁻⁸	40,36	10 ⁻⁶	56,87	3,5x10 ⁻²	62,23	8x10 ⁻³	91,49	32x10 ⁻⁶	25,47	4x10 ⁻⁶	18,49	3,6x10 ⁻⁵	31,47
1,939x10⁻⁹	41,89	10 ⁻⁹	65,41	5x10 ⁻⁷	59,23	3x10 ⁻²	59,88	4x10 ⁻³	87,13	16x10 ⁻⁶	23,04	2x10 ⁻⁶	19,09	1,8x10 ⁻⁵	37,54
1,939x10⁻¹⁰	43,52			10 ⁻⁷	57,61	2,5x10 ⁻²	54,08	2x10 ⁻³	80,44	8x10 ⁻⁶	22,87	1x10 ⁻⁶	36,68	9,01x10 ⁻⁶	38,44
				5x10 ⁻⁸	48,31	2x10 ⁻²	54,51	1x10 ⁻³	69,25			0,5x10 ⁻⁶	21,52	3,6x10 ⁻⁶	26,17
				10 ⁻⁸	53,32	1,5x10 ⁻²	50,00							2,7x10 ⁻⁶	39,25

Tabela 3. Valores de coeficiente de determinação (R^2), concentração efetiva média (CE50), fator de inclinação da curva (hillslope) e intervalo de confiança (95%) para ivermectina isoladamente e associada ao aceturato de diminazena, dexametasona, quercetina, trifluoperazina, verapamil, ciclosporina A, vimblastina e ceftriaxona contra o isolado HPFAMEZ1

	IVM	AD + IVM	DEX + IVM	QUE + IVM	TRI + IVM	VER + IVM	CLA + IVM	VIM+ IVM	CEF + IVM
CE50(M)	4,381x10 ⁻⁶	1,651x10 ⁻⁶	1,240x10 ⁻⁶	2,710x10 ⁻⁷	1,159x10 ⁻⁷	1,026x10 ⁻⁶	9,877x10 ⁻⁸	7,136x10 ⁻⁷	2,739x10 ⁻⁷
I.C.95% (μ M)	2.636 a 7.279x10 ⁻⁶	9.515x10 ⁻⁷ a 2.863x10 ⁻⁶	6.193x10 ⁻⁷ a 2.481x10 ⁻⁶	9.498x10 ⁻⁸ a 7.734x10 ⁻⁷	5,854x10 ⁻⁸ a 2,294x10 ⁻⁷	1,788x10 ⁻⁷ a 5,888x10 ⁻⁶	1,477x10 ⁻⁸ a 6,604x10 ⁻⁷	1,448x10 ⁻⁷ a 3,517x10 ⁻⁶	3,541x10 ⁻⁸ a 2,119x10 ⁻⁶
FI	0,9208	0,5835	0,6600	0,4159	0,4703	0,2873	0,2742	0,3595	0,2998
I.C.95%	1.287 a 0.5551	0.7676 a 0.3994	0.9506 a 0.3693	0.6128 a 0.2190	0,6222 a 0,3183	0,4782 a 0,0963	0,4228 a 0,1257	0,6027 a 0,1163	0,5111 a 0,0885
R^2	0,8501	0,8757	0,8057	0,7697	0,9092	0,5140	0,6194	0,5481	0,4926

*Molar (M), ivermectina (IVM), aceturato de diminazena (A.D.), dexametasona (DEX), quercetina (QUE), trifluoperazina (TRI), verapamil (VER), ciclosporina-A (CLA), vimblastina (VIM) e ceftriaxona (CEF).

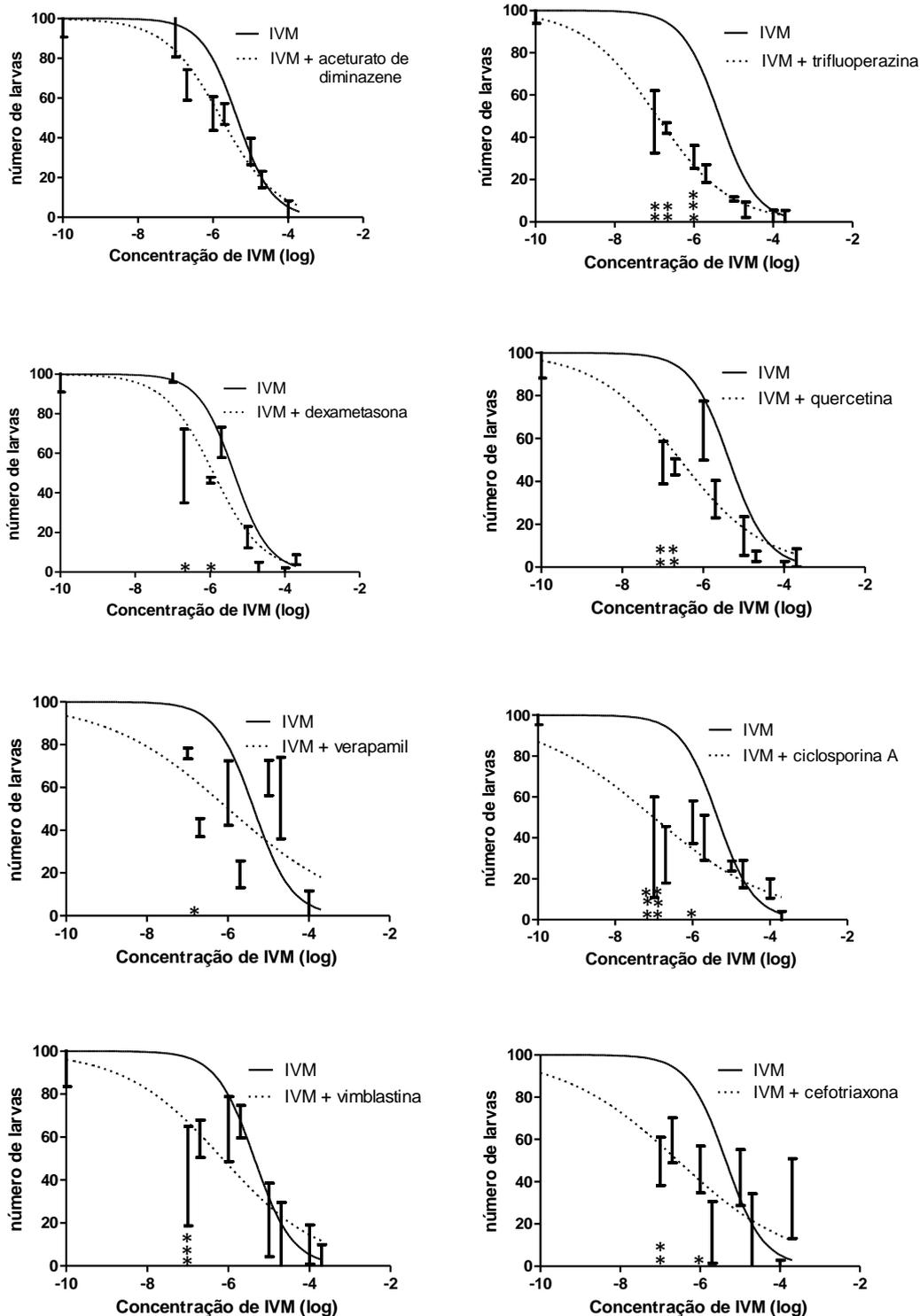


Figura 1. Curvas sigmóides da relação dose x resposta de ivermectina isoladamente e associada à dexametasona (10^{-5} M), aceturato de diminazene ($1,939 \times 10^{-6}$ M), quercetina (5×10^{-5} M), trifluoperazina (3×10^{-2} M), verapamil (8 mM), ciclosporina A (256 μM), vimblastina (32 μM) e ceftriaxona ($3,6 \times 10^{-4}$ M), respectivamente, utilizadas na segunda etapa do TIML para o isolado HPFAMEZ1

* Diferença significativa ($P < 0,05$), ** altamente significativa ($P < 0,01$) ou *** extremamente significativa ($P < 0,001$) na quantidade de larvas encontradas nos diferentes moduladores, associados à IVM, comparado com a mesma isoladamente, pelo teste de Bonferroni.