

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

Ação potencializadora de quercetina associada à ivermectina sobre *Haemonchus contortus*:  
influências químicas e biológicas

Dyego Gonçalves Lino Borges

Campo Grande-MS

2018

|      |   |        |
|------|---|--------|
| 2018 | Ação potencializadora de quercetina associada à ivermectina sobre <i>Haemonchus contortus</i> : influências químicas e biológicas | Borges |
|------|---|--------|

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

Ação potencializadora de quercetina associada à ivermectina sobre *Haemonchus contortus*:  
influências químicas e biológicas

Dyego Gonçalves Lino Borges

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Mato grosso do Sul, como requisito à  
obtenção do título de Doutor em Ciência  
Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa  
Maryene Beatriz Souz Molina Borges,  
minha fiel e paciente companheira.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me concedeu conforto, ânimo, paciência, fé e força quando todas as minhas atitudes pareciam inúteis e meus objetivos muito distantes. Obrigado meu Senhor pela oportunidade de concluir mais essa etapa em minha vida, o doutorado. Aos meus familiares, minha esposa Maryene Beatriz Souza Molina Borges, meus pais Moacir e Vera, meus irmãos Moacir e Viviany, meus avós Eduardo e Marina (*in memorian*), Adão (*in memorian*) e Maria, meus padrinhos Vitor e Lucimara e meus sogros Wanderlei e Maria Sebastiana, pessoas que tiveram papéis especiais em minha vida durante todo esse período. Agradeço também ao Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges pela paciência e dedicação como orientador e aos professores Prof. Dr. Adrian Lifschitz, Prof. Dr. Carlos Carollo, meus coorientadores. Aos professores Prof. Dr. Fernando Paiva, Prof. Dr. Ricardo Lemos e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Carollo, amigos e conselheiros e ao Prof. Dr. Alessandro F. T. do Amarante, que gentilmente nos cedeu amostras de parasitos. Agradeço também ao Dr. Marcelo Araújo e aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFMS: Ramiro, Mário, Mariana, Juliane, Zelina, Jessica, Rodrigo, Matheus e Flávia, pelo auxílio durante as atividades práticas do projeto. A todos esses, meu sincero agradecimento.

## Resumo

BORGES, D. G. L. Ação potencializadora de quercetina associada à ivermectina sobre *Haemonchus contortus*: influências químicas e biológicas. 2018. xx f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

Quercetina é um flavonoide que em avaliações *in vitro* tem demonstrado potencializar o efeito de ivermectina sobre larvas de *Haemonchus* sp. Avaliações farmacológicas *in vivo* de quercetina demonstram que é viável constituir associações com anti-helmínticos no intuito de controlar populações de helmintos resistentes. Apesar dos resultados já observados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o efeito anti-helmíntico de associações contendo quercetina ainda precisa ser comprovado. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação anti-helmíntica de ivermectina associada à quercetina, administrados por via intra-abomasal, em ovinos naturalmente infectados por isolado de *Haemonchus contortus* resistente a ivermectina. Adicionalmente, avaliou-se, pela primeira vez, a influência do estágio de desenvolvimento e do nível de resistência de *H. contortus* sobre a capacidade de potencialização da quercetina em larvas e adultos desse parasito. Foram realizados dois experimentos: experimento A - teste anti-helmíntico controlado para avaliar os seguintes tratamentos via intra-abomasal: grupo I (Ivermectina, Ivomec® oral), grupo II (Ivermectina, Ivomec® oral; quercetina Sigma-Aldrich®) e grupo III (quercetina); experimento B - teste de inibição da migração larval e de motilidade de adultos, com isolados com diferentes perfis de resistência (susceptível; resistente e muito resistente à ivermectina). A associação farmacológica não influenciou nas contagens de OPG ( $p>0,05$ ), assim como não reduziu a carga parasitária ( $p>0,05$ ) em ovinos infectados. No teste de inibição da migração larval, a adição de diferentes concentrações de quercetina não reduziu significativamente a concentração efetiva média (EC50) para ivermectina no isolado sensível e no isolado com maior fator de resistência, porém reduziu significativamente a EC50 para ivermectina no isolado com fator de resistência intermediário (de FR=3,15 para FR=0,33). No teste de motilidade de adultos, quercetina não reduziu significativamente a EC50 de ivermectina sobre os adultos em nenhum dos isolados testados. A ação potencializadora de quercetina foi influenciada pelo nível de resistência e pelo estágio de desenvolvimento do parasito.

**Palavras-chave:** moduladores, *Haemonchus*, flavonoides, ivermectina, ruminantes

## Abstract

BORGES, D. G. L. Potentiating action of quercetin associated with ivermectin against *Haemonchus contortus*: chemical and biological influences. 2018. xx f. Thesis (Doctorate) - School of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

Quercetin is a flavonoid that in *in vitro* evaluations has been shown to potentiate the effect of ivermectin on larvae of *Haemonchus* sp. *In vivo* pharmacological assessments of quercetin demonstrate that it is feasible to form associations with anthelmintics in order to control populations of resistant helminths. Despite the already observed results, both *in vitro* and *in vivo*, the anthelmintic effect of quercetin-containing associations still needs to be proven. The objective of the present study was to evaluate the anthelmintic action of ivermectin associated with quercetin, administered intra-abomasal, in naturally infected sheep of *Haemonchus contortus* isolate resistant to ivermectin. Additionally, the influence of the developmental stage and the level of resistance of *H. contortus* on the potency of quercetin in larvae and adults of this parasite was evaluated for the first time. Two experiments were carried out: experiment A - controlled anthelmintic test to evaluate the following intra-abomasal treatments: group I (Ivermectin, Ivomec® oral), group II (Ivermectin, Ivomec® oral, quercetin Sigma-Aldrich®) and group III (quercetin); experiment B - inhibition test of larval migration and adult motility, with isolates with different resistance profiles (susceptible, resistant and very resistant to ivermectin). The pharmacological association did not influence the OPG counts ( $p > 0.05$ ), nor did it reduce the parasite load ( $p > 0.05$ ) in infected sheep. In the larval migration inhibition test, the addition of different concentrations of quercetin did not significantly reduce the mean effective concentration (EC50) for ivermectin in the susceptible isolate and the isolate with the highest resistance factor, but significantly reduced the EC50 for ivermectin in the isolate with factor of intermediate resistance (from FR = 3.15 for FR = 0.33). In the adult motility test, quercetin did not significantly reduce the EC 50 of ivermectin over adults in any of the isolates tested. The potentiating action of quercetin was influenced by the level of resistance and by the development stage of the parasite.

Key words: modulators, *Haemonchus*, flavonoids, ivermectin, ruminants

## Sumário

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introdução .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Flavonoides como agentes moduladores de glicoproteína-P .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>Resultados <i>in vitro</i> versus <i>in vivo</i>: qual a relação prática? .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>Expressão de glicoproteína-P nas diferentes fases do ciclo de vida de nematodas .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>Referências bibliográficas .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>(Artigo I) Ação potencializadora de quercetina associada à ivermectina sobre<br/>Haemonchus contortus: influências químicas e biológicas.....</b> | <b>18</b> |
| <b>Introdução .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>Material e métodos .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>Resultados.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>Discussão.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>Conclusão.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>Referências .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>Considerações finais .....</b>  | <b>44</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

2 A resistência a anti-helmínticos torna as atividades de controle da verminose muito  
3 mais difíceis. Por isso, processos adequados para combater parasitos resistentes são urgentes.  
4 A utilização de fármacos que possuem a capacidade de interagir com os mecanismos de  
5 resistência, expressos nos parasitos, e que possam ser utilizados em combinação com anti-  
6 helmínticos, é uma ferramenta muito promissora. Inúmeros trabalhos apontam para diversos  
7 fármacos que, *in vitro*, conseguem restaurar a susceptibilidade de diferentes espécies de  
8 parasitos, dentre esses, os flavonoides, que são substâncias muito ativas e com elevado índice  
9 de segurança clínica. No entanto, frequentemente os resultados obtidos *in vitro* não se repetem  
10 em estudos de comprovação do efeito modulador em modelos *in vivo*, o que pode representar  
11 um obstáculo aos avanços na pesquisa com antiparasitários (Bartley et al., 2012; Askerog et  
12 al., 2012).

13 As razões pelas quais se verifica a incompatibilidade entre resultados *in vitro* e *in*  
14 *vivo* nem sempre são claras e podem estar associadas à falta de informações sobre a própria  
15 substância que é analisada, sobre a metodologia e o organismo com os quais se trabalha.  
16 Portanto, objetivou-se com esse trabalho reunir informações sobre a utilização de flavonoides  
17 como moduladores de resistência, sobre a relação entre testes *in vitro* e *in vivo* e sobre fatores  
18 que podem influenciar essa relação.

### 20 Flavonoides como agentes moduladores de glicoproteína-P

21 Glicoproteína-P (P-gp) é uma adenosina trifosfatase, proteína dependente de energia,  
22 que está ligada à membrana celular de grande variedade de células e que realiza atividade de  
23 efluxo, retirando do citoplasma xenobióticos que podem representar ameaça. É encontrada em  
24 organismos simples, como bactérias, e em organismos mais complexos como seres humanos,  
25 e pertence à família ABC de transportadores. Em nematodas, atuam nos mecanismos de  
26 resistência aos anti-helmínticos, por isso, possuem elevada importância para a sobrevivência  
27 desses organismos (Ardelli et al., 2013; Gupta et al., 2014).

28 A modulação da atividade da glicoproteína-P representa uma estratégia possível de  
29 ser utilizada para o controle de populações de nematodas resistentes aos anti-helmínticos que  
30 atuam como substratos de P-gp, como as lactonas macrocíclicas (ivermectina, doramectina,  
31 eprinomectina, abamectina e moxidectina) (Lifschitz et al., 2010a; Lifschitz et al., 2010b). O  
32 derivado opióide loperamida, considerado substrato da P-gp, quando utilizado em associação  
33 com ivermectina e moxidectina foi capaz de aumentar a biodisponibilidade, elevando,  
34 consequentemente, a eficácia *in vivo* de ambas as drogas frente a isolados de *Cooperia* sp. e

35 *Ostertagia* sp. resistentes. Verapamil e CL347,099 foram eficientes em bloquear P-gp em  
36 *Haemonchus contortus* elevando a eficácia *in vitro* de ivermectina e moxidectina em isolados  
37 resistentes, assim como vimblastina, dexametasona, ciclosporina A, trifluoperazina,  
38 ceftriaxona, verapamil e o flavonoide quercetina potencializaram o efeito *in vitro* de  
39 ivermectina sobre *Haemonchus placei* resistente (Molento et al., 2001; Heckler et al., 2014).

40 Flavonoides são hábeis em modular P-gp (Chieli et al., 1995). Podem se ligar a  
41 diferentes sítios de ligação nos domínios intracitoplasmáticos da P-gp de forma competitiva,  
42 não competitiva ou alostericamente, interferindo com a hidrólise de ATP, alterando a  
43 integridade lipídica de membranas celulares e reduzindo a expressão de P-gp (Lespine et al.,  
44 2012; revisado por Gupta et al., 2014). São também conhecidos como moduladores  
45 bifuncionais pela capacidade de sobrepor aos sítios de ligação ao ATP e de ligação a  
46 antiprogesterona RU 486, um esteroide sintético (Conseil et al., 1998). O resultado da  
47 interação entre flavonoides e P-gp é a redução da atividade da glicoproteína.

48 A interferência dos flavonoides sobre a P-gp é relacionada não somente com a  
49 concentração do flavonoide, mas também ao tipo do substrato utilizado e da afinidade que  
50 este substrato possui pela P-gp. Dessa forma, o efeito modulador pode ser relacionado com a  
51 redução do efluxo do substrato ou mesmo o efeito inverso pode ser observado (Chieli et al.,  
52 1995). Flavonoides como a quercetina, kaempferol e galangina foram relacionados com o  
53 aumento da taxa de efluxo de adriamicina em células de câncer de cólon HCT-15. Essas  
54 discrepâncias quanto à ação moduladora podem também ser atribuídas à presença de diversos  
55 sítios de ligação no mesmo transportador (revisado por Di Pietro et al., 2002).

56 A afinidade dos flavonoides pelos sítios de ligação da P-gp é associada à estrutura  
57 química e molecular dessas substâncias. O número de hidroxilas, a estrutura planar e a  
58 consequente hidrofobicidade são fundamentais para definir o grau de interação com P-gp  
59 (Kitagawa et al., 2005). A afinidade de ligação aos sítios de ATP é aumentada pela adição de  
60 moléculas hidrofóbicas ao flavonoide (prenilação), e o mesmo ocorre com relação aos sítios  
61 esteroides (revisado por Di Pietro et al., 2002).

62 A atividade inibitória sobre P-gp e a segurança clínica dos flavonoides os tornam  
63 candidatos a moduladores (Kitagawa et al., 2005), e grande interesse tem sido despertado para  
64 a utilização dos mesmos em associações farmacológicas com anti-helmínticos para o controle  
65 de populações de campo de helmintos resistentes, sobretudo à lactonas macrocíclicas.

66 Quercetina foi avaliada preliminarmente como agente modulador de P-gp em  
67 associação com moxidectina em ovinos (Dupuy et al., 2003) e aumentou significativamente a

68 área sobre a curva concentração plasmática-tempo para essa lactona. O efeito anti-helmíntico  
69 da associação ainda não foi avaliado.

70 O efeito *in vivo* de fármacos moduladores deve ser avaliado com cautela e alguns  
71 pontos práticos devem ser considerados durante os testes de validação, como: curta  
72 persistência de alguns fármacos (alguns flavonoides) quando comparados com lactonas  
73 macrocíclicas, a presença de resíduos na carne e no leite e, finalmente, custos (Lespine et al.,  
74 2008).

75 Quercetina, por exemplo, possui baixa biodisponibilidade oral em monogástricos  
76 (Penalva et al., 2017). Em humanos a biodisponibilidade é de 44,8% (Guo et al., 2015). Em  
77 ruminantes a biodisponibilidade deve ser ainda menor quando comparado com monogástricos  
78 devido à fermentação ruminal (Berger et al., 2012). Estas características relacionadas ao  
79 metabolismo do hospedeiro podem contribuir para a subestimação do potencial modulador de  
80 muitos flavonoides em avaliações *in vivo*, em detrimento aos resultados obtidos *in vitro* e, por  
81 isso, essas condições devem ser ajustadas durante a determinação de metodologias adequadas  
82 para a avaliação criteriosa de associações farmacológicas envolvendo esses moduladores.

83

#### 84 **Resultados *in vitro* versus *in vivo*: qual a relação prática?**

85 Testes *in vitro* são conduzidos em laboratório, onde as condições experimentais são  
86 controladas e, acima de tudo, o estudo é limitado à interface droga/parasito. A condição básica  
87 que atende as exigências para a realização desses estudos é o controle de variáveis que  
88 possam interferir em qualquer etapa das avaliações, o que é desejável e fundamental para  
89 estudos *in vitro*, que são preliminares e indicados como básicos e de caráter obrigatório  
90 durante a avaliação de drogas moduladoras. Da mesma forma, testes *in vivo* seguem os  
91 mesmos padrões de controle, porém, a presença do hospedeiro animal representa fator  
92 complicador em decorrência da interação droga/hospedeiro/parasito e das variações  
93 individuais de resposta do próprio hospedeiro em relação aos parâmetros farmacocinéticos da  
94 droga administrada. A relação entre resultados *in vitro* e o potencial *in vivo* de anti-  
95 helmínticos, frequentemente não é clara (O'Grady & Kotze, 2004) e o mesmo é válido para o  
96 estudo com moduladores de resistência, dentre esses, os flavonoides. Cetoconazol,  
97 modulador de glicoproteína-P com atividade comprovada *in vitro* induzindo à potencialização  
98 da eficácia de ivermectina (IVM) sobre isolados resistentes, por sua vez, quando avaliado *in*  
99 *vivo*, aumentou a concentração plasmática de IVM, no entanto, isso não se refletiu em  
100 aumento de eficácia (Bartley et al., 2012). Dexametasona, outra droga moduladora, quando  
101 avaliada *in vivo* produziu efeito contrário ao observado em sistemas *in vitro*, reduziu a

102 eficácia de IVM, condição atribuída à indução do metabolismo de IVM com eliminação mais  
103 rápida e menor concentração plasmática da droga (Askerog et al., 2012). Situações como a  
104 verificada para o cetoconazol sugerem que a concentração do anti-helmíntico no hospedeiro  
105 não é o único fator envolvido no aumento da eficácia, mas efeitos ainda não determinados e  
106 que ocorrem especificamente nas proteínas transportadoras (mecanismos de resistência) nos  
107 nematodas podem também ocorrer *in vivo* na presença de alguns moduladores (Bartley et al.,  
108 2012).

109 A ausência de relação estreita entre resultados obtidos em testes *in vitro* e *in vivo*,  
110 para uma mesma droga, pode ser atribuída às diferenças no tempo de exposição à droga,  
111 concentração do fármaco, indução concomitante de diferentes vias metabólicas (no  
112 hospedeiro e no parasito) e da extensão da inibição dos mecanismos de resistência no parasito  
113 (Ballent et al., 2006). Resultados subestimados ou superestimados para ações biológicas de  
114 fármacos podem ser observados em avaliações de triagem *in vitro* e isso se deve a  
115 possibilidade de se manter os vermes por longos períodos em contato com elevadas  
116 concentrações de droga, muito maiores do que as encontradas no sítio de infecção. Além  
117 disso, no hospedeiro, concentrações de fármacos que atingem o sítio de infecção podem  
118 rapidamente se tornar indisponíveis para os parasitos, isso em se tratando principalmente de  
119 fármacos administrados por via oral, pois podem se ligar as partículas do alimento, e  
120 moverem-se com os mesmos para porções mais aborais do trato digestivo, podendo ainda ser  
121 degradados por microrganismos intestinais ou inviabilizados em faixas específicas de pH  
122 encontradas em alguns dos segmentos digestivos (O'Grady & Kotze, 2004).

123 Além disso, qualquer ensaio *in vitro* poderá falhar em identificar o potencial anti-  
124 helmíntico de uma associação entre um anti-helmíntico e um modulador se forem examinados  
125 sobre estádios de vida do parasito que não são relevantes para estratégias de controle a campo  
126 (O'Grady & Kotze, 2004). Portanto, avaliações *in vitro* representam uma etapa importante, e  
127 quando realizadas de forma inadequada podem produzir resultados sem qualquer relação com  
128 testes *in vivo*. Por outro lado, a escolha de técnicas que se mostram melhor relacionadas com  
129 as técnicas *in vivo*, como a técnica do intestino invertido para avaliação de parâmetros  
130 farmacológicos (Ballent et al., 2006), possuem maior eficiência em identificar drogas ativas,  
131 de modo que as atividades de pesquisa podem ser concluídas em menor espaço de tempo e os  
132 resultados podem ser mais confiáveis.

133

134 **Expressão de glicoproteína-P nas diferentes fases do ciclo de vida de nematodas**

135 A maioria das técnicas *in vitro* avaliam os efeitos de fármacos sobre estádios de vida  
136 livre de helmintos. Isso ocorre por uma razão bem simples, esses estádios podem ser  
137 facilmente obtidos e mantidos por períodos razoáveis em laboratório.

138 No entanto, estádios de vida livre possuem fisiologia e bioquímica diferentes de  
139 estádios parasitários em relação ao potencial de detoxificação, o que é muito relevante para a  
140 ação de anti-helmínticos (revisado por O'Grady & Kotze, 2004) e moduladores de resistência,  
141 pois muitos desses mecanismos representam formas de escape dos parasitos aos tratamentos  
142 com substâncias nematicidas. Dentre esses mecanismos de escape, encontra-se a  
143 glicoproteína-P, o principal e mais estudado mecanismo de resistência à lactonas  
144 macrocíclicas (revisado por Lespine et al., 2012). Diferenças fisiológicas e bioquímicas  
145 podem estar relacionadas ao modo de vida de cada estágio e a quantidade de substâncias  
146 tóxicas as quais cada estágio é submetido. Por essa razão que as células intestinais de  
147 parasitos são ricas em P-gp. Sendo assim, pode-se dizer que houve evolução  
148 caracteristicamente conservada para genes que codificam esses mecanismos de defesa entre os  
149 nematodos (revisado por Ardelli, 2013). Dessa maneira, espera-se que estádios de vida livre  
150 estejam expostos à variedade muito maior de substâncias nocivas, o que justifica eventuais  
151 diferenças que podem ser observadas entre formas parasitárias e de vida livre. Portanto, as  
152 diferenças quanto à expressão de mecanismos de resistência também contribuem para a  
153 incompatibilidade de resultados entre testes *in vitro* e *in vivo*, entretanto, optou-se pela  
154 discussão em separado devido a maior riqueza de detalhes apresentados na literatura.

155 Em *Teladorsagia circumcincta*, diferenças foram observadas nos níveis de expressão  
156 de P-gp entre os diferentes estádios de vida do parasito. Nesse caso, P-gp9 apresentou de  
157 forma mais notável, maiores níveis de expressão em ovos e larvas de terceiro e quarto  
158 estádios nos isolados resistentes à ivermectina (Dicker et al., 2011).

159 Em um isolado de *Haemonchus contortus* resistente à ivermectina, diferentes níveis  
160 de expressão de glicoproteína-P foram observados entre larvas e adultos. Hco-pgp-9, por  
161 exemplo, foi expressa em maiores níveis em larvas de terceiro estágio (Sarai et al., 2013).

162 Em outro relato, com *H. contortus*, larvas de terceiro estágio apresentaram menor  
163 sensibilidade ao efeito de ivermectina, associada com moduladores de terceira geração do que  
164 larvas de primeiro e segundo estádios (Raza et al., 2015). Moduladores de terceira geração são  
165 os fármacos mais modernos dessa classe de medicamentos e com maior potência e  
166 especificidade por P-gp e, além disso, não apresentam interação farmacocinética com  
167 quimioterápicos (revisado por Huber et al., 2010). Segundo Raza et al. (2015), o efeito dos  
168 moduladores pode variar de acordo com o próprio modulador, com o nível de resistência dos

169 isolados (expressão de fatores de resistência), com o anti-helmíntico avaliado e com a técnica  
170 utilizada, no entanto, também sugeriram a existência de diferenças nos níveis de expressão de  
171 P-gp entre larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios de isolados sensíveis e resistentes, o  
172 que está em concordância com os resultados apresentados por Dicker et al. (2011) quando  
173 estudaram *T. circumcicta*. Em *Caenorhabditis elegans*, P-gp12 é expressa em maiores  
174 concentrações em células do sistema excretório de todos os estádios de vida; P-gp13 é  
175 pobremente expressa no intestino anterior de indivíduos adultos; P-gp14 é expressa na porção  
176 mais anterior da faringe até a metade do primeiro bulbo faringeano e a P-gp15 é expressa em  
177 neurônios da região anterior (cabeça) e da cauda (Zhao et al., 2004).

178 De fato, diferentes níveis de expressão de P-gp têm sido observados entre diferentes  
179 estádios de vida e tecidos de nematodas, no entanto, são muitos os tipos de P-gps; porém sem  
180 identificação de quais são responsáveis pelo caráter de resistência para uma determinada  
181 lactona (Raza et al., 2015). Isso pode ser explicado pela aparente especificidade de  
182 mecanismos de efluxo, em nível de transportadores de membrana (P-gp), em tecidos de  
183 nematodas parasitos. Essa hipótese está embasada em diferenças entre moléculas de uma  
184 mesma família em termos de sua capacidade de interagir com P-gp de mamíferos, o que  
185 também pode ocorrer com P-gp de parasitos. Um exemplo prático são as lactonas  
186 macrocíclicas, há diferença de afinidade por P-gp entre os membros dessa família de anti-  
187 helmínticos e ivermectina é considerada o substrato com um dos maiores níveis de afinidade  
188 (Lespine et al., 2012).

189 Em consequência do nível de expressão da glicoproteína-P entre os diferentes  
190 estádios do ciclo de vida de nematodas, e de sua relação com a resistência à anti-helmínticos,  
191 que pode variar entre um isolado e outro, são necessários mais estudos com os nematodas, no  
192 intuito de se avaliar o comportamento de anti-helmínticos e moduladores no organismo do  
193 parasito. Isolados muito resistentes podem manifestar comportamento diferente em relação à  
194 atuação de drogas moduladoras, pois podem apresentar um arsenal de mecanismos de escape  
195 que podem atuar de forma compensatória, quando necessário (Bartley et al., 2012). Portanto,  
196 o nível de resistência pode ser um fator muito importante e que deve ser levado em  
197 consideração, quando drogas moduladoras estão sendo estudadas.

198 Em resumo, moduladores de resistência, quando são avaliados, estão sujeitos à  
199 influência do nível de expressão das diferentes P-gp. Sendo assim, a utilização de isolados  
200 com diferentes níveis de resistência e de mais de um estádio de desenvolvimento, em testes *in*  
201 *vitro*, podem ser práticas desejáveis para se obter resultados mais condizentes com o real  
202 potencial de um agente modulador e possíveis de reprodução em modelos *in vivo*.

203 **Referências bibliográficas**

- 204 Ardelli, B. F. Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action  
205 and resistance in nematodes. *Parasitology International*, v. 62, p. 639–646, 2013.  
206
- 207 Areskog, M., Von Samson-Himmelstjerna, G., Alvinerie, M., Sutra, J., Höglund, J.  
208 Dexamethasone treatment interferes with the pharmacokinetics of ivermectin in young  
209 cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 190, p. 482–488, 2012.  
210
- 211 Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Lanusse, C. Modulation of the p-  
212 glycoprotein-mediated intestinal secretion of Ivermectin: in vitro and in vivo assessments.  
213 *Drug Metabolism and Disposition*, v. 34, n°3, p. 457-463, 2006.  
214
- 215 Bartley, D. J., Morrison, A. A., Dupuy, J., Bartley, Y., Sutra, J. F., Menez, C., Alvinerie, M.,  
216 Jackson, F., Devin, L., Lespine, A. Influence of Pluronic 85 and ketoconazole on  
217 disposition and efficacy of ivermectin in sheep infected with a multiple resistant  
218 *Haemonchus contortus* isolate. *Veterinary Parasitology*, v. 187, p. 464–472, 2012.  
219
- 220 Berger, L. M., Wein S., Blank R., Metges CC., Wolfram S. Bioavailability of the  
221 flavonolquercetin in cows after intraruminal application of quercetinaglycone and rutin.  
222 *Journal Dairy Science* 95: 5047–5055, 2012.  
223
- 224 Chieli, E., Romiti, N., Cervelli, F., Tongiani, R. Effects of flavonols on P-glycoprotein  
225 activity In cultured rat hepatocytes. *Life Sciences*, v. 57, n°. 19, p. 1741-1751, 1995.  
226
- 227 Conseil, G., Baubichon-cortay, H., Dayan, G., Jault, J., Barron, D., Di Pietro, A. Flavonoids:  
228 A class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites  
229 on mouse P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Science*, V.95, p. 9831–  
230 9836, 1998.  
231
- 232 Dicker, A. J., Nisbet, A. J., Skuce, P. J. Gene expression changes in a P-glycoprotein (Tci-  
233 pgp-9) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*.  
234 *International Journal for Parasitology*, v. 41, p. 935–942, 2011.  
235
- 236 Di Pietro, A., Conseil, G., Pérez-Victoria, J. M., Dayana, G., Baubichon-Cortay, H.,  
237 Trompier, D., Stein-fels, E., Jault, J. –M., Wet, H., Maitrejean, M., Comte, G., Boumendjel,  
238 A., Mariotte, A. –M., Dumontet, C., McIntosh, D. B., Goffeau, A., Castanys, S., Gamarro, F.,  
239 Barron, D. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein  
240 and related ABC transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59, p. 207-322, 2002.  
241
- 242 Dupuy, J., Larrieu G., Sutra, J. F., Lespine A., Alvinerie, M. Enhancement of moxidectin  
243 bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Veterinary Parasitology*, 112: 337-  
244 347, 2003.  
245
- 246 Guo, Y. & Bruno, R. S. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability.  
247 *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 26, p. 201–210, 2015.  
248
- 249 Gupta, V. K., Bhalla, Y., Jaitak, V. Impact of ABC transporters, glutathione conjugates in  
250 MDR and their modulation by flavonoids: an overview. *Medicinal Chemistry Research*, v.23,  
251 p. 1–15, 2014.  
252

- 253 Heckler R.P., Almeida G.D., Santos L.B., Borges D.G.L., Neves J.P.L., Onizuka M.K.V.,  
 254 Borges F.A. P-gp modulating drugs greatly potentiate the in vitro effect of ivermectin against  
 255 resistant larvae of *Haemonchus placei*. *Veterinary Parasitology*, 205, 638-645, 2014.  
 256
- 257 Huber, P. C., Maruiama, C. H., Almeida, W. P. Glicoproteína-p, resistência a múltiplas  
 258 drogas (mdr) e relação estrutura-atividade de moduladores. *Química Nova*, v. 33, nº.10, p.  
 259 2148-2154, 2010.  
 260
- 261 Kitagawa, S., Nabekura, T., Takahashi, T., Nakamura, Y., Sakamoto, H., Tano, H., Hirai, M.,  
 262 Tsukahara, G. Structure–Activity Relationships of the Inhibitory Effects of Flavonoids on P-  
 263 Glycoprotein-Mediated Transport in KB-C2 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.  
 264 28, p. 2274-2278, 2005.  
 265
- 266 Lespine, A., Alvinerie, M., Vercruyse, J., Prichard, R. K., Geldhof, P. ABC transporter  
 267 modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends in*  
 268 *Parasitology*, v. 24, nº7, p. 293-298, 2008.  
 269
- 270 Lespine, A., Ménez, C., Bourguinat, C., Prichard, R. K. P-glycoproteins and other multidrug  
 271 resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing  
 272 transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and*  
 273 *Drug Resistance*, v. 2, p. 58–75, 2012.  
 274
- 275 Lifschitz, A., Entrocasso, C., Alvarez, L., Lloberas, M., Ballent, M., Manazza, G., Virkel, G.,  
 276 Borda, B., Lanusse, C. Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against  
 277 adult resistant nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 172, p. 291–298, 2010 a.  
 278
- 279 Lifschitz, A., Suarez, V. H., Sallovitz, J., Cristel, S. L., Imperiale, F., Ahoussou, S., Schiavi,  
 280 C., Lanusse, C. Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: Comparative effects of P-  
 281 glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and  
 282 moxidectin. *Experimental Parasitology*, v. 125, p. 172–178, 2010 b.  
 283
- 284 Molento, M. B. & Prichard, R. K., Effect of multidrug resistance modulators on the activity of  
 285 ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae.  
 286 *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, nº3, p.117-121, 2001.  
 287
- 288 O’Grady, J. & Kotze, A. C. *Haemonchus contortus*: in vitro drug screening assays with the  
 289 adult life stage. *Experimental Parasitology*, v. 106, p. 164–172, 2004.  
 290
- 291 Penalva, R., González-Navarro, C. J., Gamazo, C., Esparza, I., Irache, J. M. Zein  
 292 nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-  
 293 inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. *Nanomedicine: Nanotechnology,*  
 294 *Biology, and Medicine*, v.13, p. 103–110, 2017.  
 295
- 296 Raza, A., Kopp, S. R., Jabbar, A., Kotze, A. C. Effects of third generation P-glycoprotein  
 297 inhibitors on the sensitivity of drug-resistant and -susceptible isolates of *Haemonchus*  
 298 *contortus* to anthelmintics in vitro. *Veterinary Parasitology*, v. 211, p. 80–88, 2015.  
 299
- 300 Sarai, R. S., Kopp, S. R., Coleman, G. T., Kotze, A. C. Acetylcholine receptor subunit and P-  
 301 glycoprotein transcription patterns in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus*

302 *contortus*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 3, p. 51–58,  
303 2013.

304

305 Zhao, Z., Sheps, J. A., Ling, V., Fang, L. L., Baillie, D. L. Expression Analysis of ABC  
306 Transporters Reveals Differential Functions of Tandemly Duplicated Genes in  
307 *Caenorhabditis elegans*. Journal of Molecular Biology, v. 344, p. 409–417, 2004.

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349 **Ação potencializadora de quercetina associada à ivermectina sobre *Haemonchus***  
350 ***contortus*: influências químicas e biológicas**

351  
352 Dyego G. L. Borges<sup>1\*</sup>, Fernando A. Borges<sup>1</sup>

353  
354 <sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do  
355 Sul

356 \* Autor para correspondência

357 Programa de Pós-graduação em Ciência Animal/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

358 Avenida Senador Filinto Müller 2443, Ipiranga, Caixa Postal 549

359 CEP: 79074-460, CampoGrande-MS, Brasil

360 Tel. 3345-3612

361 [dyegoborges@hotmail.com](mailto:diegoborges@hotmail.com)

362  
363 **Potentiating action of quercetin associated with ivermectin against *Haemonchus***  
364 ***contortus*: chemical and biological influences**

365 **Abstract:** Quercetin is a flavonoid that in in vitro evaluations has been shown to potentiate  
366 the effect of ivermectin on larvae of *Haemonchus* sp. *In vivo* pharmacological assessments of  
367 quercetin demonstrate that it is feasible to form associations with anthelmintics in order to  
368 control populations of resistant helminths. Despite the already observed results, both *in vitro*  
369 *and in vivo*, the anthelmintic effect of quercetin-containing associations still needs to be  
370 proven. The objective of the present study was to evaluate the anthelmintic action of  
371 ivermectin associated with quercetin, administered intra-abomasal, in naturally infected sheep  
372 of *Haemonchus contortus* isolate resistant to ivermectin. Additionally, the influence of the  
373 developmental stage and the level of resistance of *H. contortus* on the potency of quercetin in  
374 larvae and adults of this parasite was evaluated for the first time. Two experiments were  
375 carried out: experiment A - controlled anthelmintic test to evaluate the following intra-  
376 abomasal treatments: group I (Ivermectin, Ivomec® oral), group II (Ivermectin, Ivomec®  
377 oral, quercetin Sigma-Aldrich®) and group III (quercetin); experiment B - inhibition test of  
378 larval migration and adult motility, with isolates with different resistance profiles  
379 (susceptible, resistant and very resistant to ivermectin). The pharmacological association did  
380 not influence the OPG counts ( $p > 0.05$ ), nor did it reduce the parasite load ( $p > 0.05$ ) in  
381 infected sheep. In the larval migration inhibition test, the addition of different concentrations  
382 of quercetin did not significantly reduce the mean effective concentration (EC50) for  
383 ivermectin in the susceptible isolate and the isolate with the highest resistance factor, but  
384 significantly reduced the EC50 for ivermectin in the isolate with factor of intermediate  
385 resistance (from FR = 3.15 for FR = 0.33). In the adult motility test, quercetin did not  
386 significantly reduce the EC 50 of ivermectin over adults in any of the isolates tested. The  
387 potentiating action of quercetin was influenced by the level of resistance and by the  
388 development stage of the parasite.

389  
390  
391 **Keywords:** Parasites; modulation; resistance; flavonoids, ruminants

---

392 **Resumo:** Quercetina é um flavonoide que em avaliações *in vitro* tem demonstrado  
 393 potencializar o efeito de ivermectina sobre larvas de *Haemonchus* sp. Avaliações  
 394 farmacológicas *in vivo* de quercetina demonstram que é viável constituir associações com  
 395 anti-helmínticos no intuito de controlar populações de helmintos resistentes. Apesar dos  
 396 resultados já observados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o efeito anti-helmíntico de associações  
 397 contendo quercetina ainda precisa ser comprovado. O objetivo do presente trabalho foi avaliar  
 398 a ação anti-hemíntica de ivermectina associada à quercetina, administrados por via intra-  
 399 abomasal, em ovinos naturalmente infectados por isolado de *Haemonchus contortus* resistente  
 400 a ivermectina. Adicionalmente, avaliou-se, pela primeira vez, a influência do estágio de  
 401 desenvolvimento e do nível de resistência de *H. contortus* sobre a capacidade de  
 402 potencialização da quercetina em larvas e adultos desse parasito. Foram realizados dois  
 403 experimentos: experimento A - teste anti-helmíntico controlado para avaliar os seguintes  
 404 tratamentos via intra-abomasal: grupo I (Ivermectina, Ivomec® oral), grupo II (Ivermectina,  
 405 Ivomec® oral; quercetina Sigma-Aldrich®) e grupo III (quercetina); experimento B - teste de  
 406 inibição da migração larval e de motilidade de adultos, com isolados com diferentes perfis de  
 407 resistência (susceptível; resistente e muito resistente à ivermectina). A associação  
 408 farmacológica não influenciou nas contagens de OPG ( $p>0,05$ ), assim como não reduziu a  
 409 carga parasitária ( $p>0,05$ ) em ovinos infectados. No teste de inibição da migração larval, a  
 410 adição de diferentes concentrações de quercetina não reduziu significativamente a  
 411 concentração efetiva média (EC50) para ivermectina no isolado sensível e no isolado com  
 412 maior fator de resistência, porém reduziu significativamente a EC50 para ivermectina no  
 413 isolado com fator de resistência intermediário (de FR=3,15 para FR=0,33). No teste de  
 414 motilidade de adultos, quercetina não reduziu significativamente a EC50 de ivermectina sobre  
 415 os adultos em nenhum dos isolados testados. A ação potencializadora de quercetina foi  
 416 influenciada pelo nível de resistência e pelo estágio desenvolvimento do parasito.

417  
 418

419 **Palavras-chave:** Parasitos; modulação; resistência; flavonoides; ruminantes

## 420 1.0.Introdução

421 Quercetina é um flavonoide amplamente encontrado em diferentes espécies de  
 422 plantas que são utilizadas como alimento para humanos e animais de produção (Besle et al.  
 423 2010) e, desta forma, compreende parte da base alimentar dessas espécies. Possui inúmeras  
 424 atividades biológicas (Rice-Evans 2001, Havsteen 2002, Spencer et al. 2004), dentre elas a  
 425 capacidade de atuar na reversão bioquímica da resistência à ivermectina em *Haemonchus* spp.  
 426 (Bartley et al. 2009; Heckler et al. 2014). O efeito de reversão da resistência à ivermectina  
 427 tem sido atribuído à modulação da glicoproteína-P (P-gp), que é o principal mecanismo  
 428 associado à resistência anti-helmíntica à lactonas macrocíclicas (revisado por Lespine et al.,  
 429 2012). Flavonoides como a quercetina são promissores para a reversão da resistência múltipla  
 430 às drogas (Miron et al., 2017), pois podem interagir eficientemente com transportadores ABC  
 431 (Gupta et al., 2015).

432 O mecanismo de ação da quercetina, que resulta na inibição da P-gp ainda não é  
 433 completamente esclarecido, no entanto, sugere-se que a ligação da quercetina a sítios de  
 434 substratos, ao sítio de hidrólise do ATP, à região de interação com esteroides ou a sítios  
 435 alostéricos determine a modulação da função de bombeamento desta glicoproteína (Miron et  
 436 al., 2017).

437 Avaliações *in vivo* da quercetina como agente reversor da resistência a anti-  
 438 helmínticos são escassas em ruminantes, apesar dos promissores resultados já demonstrados

439 com metodologias *in vitro* (Bartley et al. 2009; Heckler et al. 2014). Há somente um estudo *in*  
440 *vivo* em que quercetina foi avaliada como agente modulador de P-gp. Apenas a combinação  
441 de moxidectina com quercetina (via subcutânea) foi estudada em ovinos (Dupuy et al., 2002),  
442 porém, nesse estudo, o efeito anti-helmíntico da combinação não foi avaliado e somente a  
443 influência da quercetina sobre os parâmetros farmacocinéticos de moxidectina foram  
444 determinados. Nesse caso, quercetina foi responsabilizada por aumento significativo da área  
445 sob a curva para moxidectina. Nesse estudo, conclui-se que quercetina pode apresentar duas  
446 formas de atuação: a primeira no hospedeiro, aumentando a biodisponibilidade dos anti-  
447 helmínticos, o que, em consequência, permite que o parasito entre em contato com  
448 concentrações maiores do antiparasitário; a segunda, no parasito, inibindo os mecanismos de  
449 resistência aos fármacos que são expressos nos indivíduos resistentes.

450 A relação entre os resultados observados em avaliações anti-helmínticas *in vitro* e o  
451 potencial *in vivo*, frequentemente não é clara. No modelo animal, a concentração do fármaco  
452 que atinge o sítio de infecção (trato digestivo para nematodas gastrintestinais) pode tornar-se  
453 rapidamente indisponível para o parasito, isso porque o fármaco pode se ligar a partículas de  
454 alimento, pode ser degradado por microrganismos do trato digestivo, ou ainda ser  
455 inviabilizado por influência das diferentes faixas de pH do trato digestivo (O'Grady & Kotze,  
456 2004).

457 Outros parâmetros, como a biodisponibilidade e tempo de vida médio, influenciam  
458 sobremaneira a ação do mesmo fármaco no organismo animal e são responsáveis por garantir  
459 que o princípio ativo atinja a concentração adequada e permaneça pelo tempo mínimo  
460 necessário no sítio de ação. Portanto, fármacos considerados eficazes quando avaliados a  
461 partir de técnicas *in vitro*, não necessariamente têm a eficácia comprovada *in vivo* (O'Grady  
462 & Kotze, 2004).

463 Quercetina possui baixa biodisponibilidade oral em monogástricos (Penalva et al.,  
464 2016). Em humanos a biodisponibilidade oral é de 44,8% (Guo et al., 2015) e o tempo de vida  
465 médio depois de administrada por via intravenosa em suínos é de 17,2h. Quercetina é  
466 rapidamente degradada, oito horas depois da administração há predomínio de metabólitos  
467 circulantes e com 24 horas não é possível detectar quercetina ou metabólitos circulantes no  
468 plasma (Ader et al., 2000). Assume-se que a biodisponibilidade de quercetina fornecida por  
469 via oral deve ser menor em ruminantes quando comparada com monogástricos devida à  
470 extensa fermentação ruminal. A biodisponibilidade oral em bovinos é de 0,1% e, assim como  
471 em monogástricos, a metabolização é extremamente rápida. Quercetina e seus metabólitos são  
472 completamente eliminados do organismo de bovinos oito horas após a administração oral e  
473 seis horas após a administração intravenosa (Berger et al., 2012). O tempo de vida médio em  
474 bovinos é de 3,3 horas, resultado de rápida degradação hepática (Gohlke et al., 2013).

475 Em consequência das características farmacocinéticas de quercetina e das  
476 particularidades fisiológicas dos bovinos, tem-se buscado alternativas que permitam o  
477 aumento da biodisponibilidade e a redução da degradação do fármaco nessa espécie. Nesse  
478 sentido, a administração de quercetina por via duodenal é responsável por concentração  
479 plasmáticas 10 vezes maior do que a alcançada com a via intraruminal (Gohlke et al., 2013).

480 Além disso, outro fator que pode influenciar no efeito modulador da quercetina é o  
481 estágio de vida do parasito. Estágios de vida livre são bioquímica e fisiologicamente  
482 diferentes de estágios parasitários em muitos aspectos relevantes para o potencial de  
483 metabolização de drogas. Essas diferenças também podem estar relacionadas à observação de  
484 incompatibilidades entre resultados obtidos por metodologias *in vitro* e *in vivo* para um  
485 mesmo fármaco. Portanto, testes com adultos devem ser considerados como um passo  
486 importante no processo de triagem de atividade moduladora ou nematicida de fármacos  
487 (revisado por O'Grady & Kotze, 2004).

488 Portanto, quercetina é um agente modulador de glicoproteína-P com potencial para a  
489 reversão bioquímica da resistência anti-helmíntica frente à lactonas macrocíclicas em  
490 nematodas gastrintestinais de ruminantes. No entanto, sua ação *in vivo* precisa ser avaliada.  
491 Diante da necessidade de provar o efeito modulador *in vivo* da quercetina em ruminantes,  
492 levando em consideração as características farmacológicas desse flavonoide e as  
493 particularidades fisiológicas desses poligástricos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a  
494 ação anti-helmíntica de ivermectina associada à quercetina, administrados por via intra-  
495 abomasal, em ovinos naturalmente infectados por isolado de *Haemonchus contortus* resistente  
496 à ivermectina. Adicionalmente, avaliou-se, pela primeira vez, a influência do estágio de  
497 desenvolvimento e do nível de resistência de *H. contortus* sobre a capacidade de  
498 potencialização da quercetina no efeito de ivermectina em larvas e adultos desse parasito.  
499

## 500 2. MATERIAL E MÉTODOS

501

502 O estudo foi dividido em dois experimentos: no primeiro (experimento A), avaliou-se  
503 se a ação anti-helmíntica da associação de ivermectina com quercetina, administrados por via  
504 intra-abomasal, em ovinos naturalmente infectados com *H. contortus* resistente a ivermectina;  
505 no segundo (experimento B), avaliou-se, *in vitro*, a influência do estágio de desenvolvimento  
506 (larvas de terceiro estágio e adultos) e do nível de resistência (definido pelo cálculo do fator  
507 de resistência) de *H. contortus* sobre a ação da quercetina como agente potencializador do  
508 efeito anti-helmíntico de ivermectina.  
509

### 510 2.1. Experimento A: Avaliações coproparasitológicas e necropsia parasitológica dos 511 tratamentos realizados por via intra-abomasal

512

#### 513 2.1.1. Animais e área experimental

514

515 Dezoito ovinos, machos, com idade entre 5 e 8 meses, naturalmente infectados por  
516 um isolado misto com mais de 95% de *Haemonchus contortus*. foram selecionados de acordo  
517 com a contagem de OPG, dentre outros animais de um rebanho comercial da região de Campo  
518 Grande, MS. O referido isolado era resistente à ivermectina, uma vez que em avaliação  
519 anterior, o percentual de redução da contagem de ovos por grama de fezes foi menor que  
520 80%.

521 Os animais selecionados (OPG>300) foram transferidos para as baias de isolamento  
522 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso  
523 do Sul (FAMEZ), onde foram mantidos durante período de adaptação de 10 dias e por todo o  
524 período experimental (nove dias) recebendo silagem de milho (2% do peso vivo em matéria  
525 seca, por dia) e água *ad libidum*.

526 As técnicas coproparasitológicas (OPG e coproculturas) foram realizadas dois dias  
527 antes do tratamento (D-2), um dia antes do tratamento (D-1) e no dia do tratamento (D0). No  
528 D0, os animais foram classificados em ordem crescente de acordo com a contagem média de  
529 OPG. Em seguida, divididos em blocos de três animais e distribuídos, por sorteio, entre os  
530 grupos experimentais, um animal para cada grupo.

531 Uma vez formados os grupos, os mesmos foram sorteados entre os diferentes  
532 tratamentos (quercetina, ivermectina e ivermectina+quercetina), de modo que os animais do  
533 grupo I (Ivermectina, Ivomec® apresentação de uso oral) receberam 0,008mg/kg de  
534 ivermectina; os animais do grupo II (Ivermectina, Ivomec® apresentação de uso oral;  
535 quercetinaSigma-Aldrich®) receberam 0,008mg/kg de ivermectina e 120 mg/kg de quercetina  
536 e os animais do grupo III (quercetina) receberam 120 mg/kg de quercetina. A administração  
537 dos tratamentos foi realizada por via cirúrgica. A dosagem adotada para ivermectina levou em

538 consideração a concentração luminal de ivermectina no fluido abomasal, que é atingida após a  
539 administração oral da dosagem terapêutica do fármaco (Lloberas et al. 2012).

540

#### 541 2.1.2. Fármacos utilizados

542

543 Quercetina: Quercetina Sigma-Aldrich® a 6% foi diluída em ácido oléico (Sigma-  
544 Aldrich®) e ácido linoléico (Sigma-Aldrich®) em uma relação de 6:4, dando origem a uma  
545 suspensão. A suspensão de quercetina em óleo foi utilizada visando aumentar o tempo de  
546 permanência da associação de fármacos no abomaso e a liberação mais lenta de quercetina  
547 para o fluido abomasal.

548

549 Ivermectina: Solução comercial de Ivomec Solução Oral – Merial Saúde Animal®  
550 (Partida: EA905/15).

551

#### 552 2.1.3. Administração dos tratamentos por via intra-abomasal

553

554 Inicialmente, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 18 horas e hídrico  
555 de seis horas, sendo posteriormente pesados em balança móvel previamente calibrada  
556 (Coimma®, ICM – 300). Os animais foram sedados com cloridrato de xilazina (Calmun®)  
557 0,1mg/kg, por via intramuscular e após constatado o estado de sedação, realizou-se tricotomia  
558 da metade anterior da parede abdominal direita. Lidocaína (Lidovet®, 10 mL/animal) foi  
559 administrada por via subcutânea e intramuscular na linha de incisão (linha reta de 10 cm de  
560 comprimento com origem a 5 cm posterior a cartilagem xifoide e 3 cm acima da origem da  
561 prega umbilical), após a antisepsia local. Individualmente, os animais foram mantidos em  
562 decúbito lateral esquerdo.

563 Divulcionou-se o músculo reto abdominal seguido da abertura do peritônio,  
564 permitindo acesso ao abomaso que foi então tracionado para o exterior da cavidade  
565 abdominal, de forma a facilitar a administração dos fármacos diretamente no lúmen com o  
566 auxílio de seringa de 60mL e agulha 40x12mm. Após a administração dos fármacos o  
567 abomaso foi reposicionado e a musculatura e o peritônio foram suturados com fio absorvível  
568 sintético, número 0 (Vicryl®). A pele foi suturada com fio não absorvível de nylon, número  
569 2-0.

570 A higienização pós-cirúrgica da ferida foi realizada com solução de iodo a 1%, uma  
571 vez ao dia e antibioticoterapia a intervalos de dois dias com penicilina benzatina  
572 30000UI/kg/IM (Multibiótico®, Ourofino) em um total de três aplicações. A terapia com anti-  
573 inflamatórios foi realizada com flunixin-meglumine na dose de 1,1mg/kg/IM (Banamine®,  
574 Ourofino) por cinco dias consecutivos. Esses fármacos foram escolhidos por não serem  
575 considerados substratos da glicoproteína-P.

576

#### 577 2.1.4. Avaliações coproparasitológicas e necropsia parasitológica

578

579 Foram realizados exames coprológicos para avaliação do efeito dos medicamentos na  
580 redução das contagens de ovos de nematodas (OPG) nos dias 3, 5, 7 e 9 pós-tratamento (DPT)  
581 utilizando-se a técnica McMaster modificada com sensibilidade de 1: 25 e coproculturas  
582 (Robert & Sullivan 1950). A classificação das larvas de terceiro estágio foi realizada como  
583 preconizado por Ueno & Gonçalves (1998).

584 No D9, os animais foram eutanasiados em ambiente tranquilo e adequado, longe de  
585 outros animais e do alojamento dos mesmos. Conforme preconizado pelas Diretrizes da  
586 Prática de Eutanásia do conselho nacional de controle de experimentação animal (CONCEA).

587 Todos os procedimentos pré-eutanásia foram cuidadosos para minimizar o  
 588 sofrimento, o medo, a ansiedade e a apreensão. Os animais foram submetidos à pré-anestesia  
 589 com cloridrato de detomidina a 1%, por via intramuscular, 0,3mg/kg e posteriormente foram  
 590 anestesiados com Tiopental Sódico a 25%, por via intravenosa, na dose de 15mg/kg. A  
 591 eutanásia foi realizada a partir da administração de solução saturada de Cloreto de Potássio,  
 592 por via intravenosa, na dose de 40 ml/animal.

593 Após a eutanásia, o abomaso foi separado por meio de ligaduras duplas e todo o  
 594 conteúdo foi tamisado (0,297 mm / tyler 48) e a parte sólida fixada em álcool 70%. A  
 595 recuperação de formas adultas ou imaturas embebidas na mucosa abomasal foi realizada por  
 596 meio de digestão em solução de ácido clorídrico 3%, a 36°C durante 24 horas(Wood et al.,  
 597 1995; Vercruyssen et al, 2001).

598 Utilizou-se o conteúdo total de cada abomaso para exame e quantificação da  
 599 intensidade parasitária (helmintos). A coleta, contagem e identificação genérica dos helmintos  
 600 foram efetuadas em microscópio estereoscópico (Optika SZR-10) e a identificação específica  
 601 (Costa 1982), em microscópio de luz (Nikon eclipse E100).

602

## 603 **2.2. Experimento B: Influência do estágio de desenvolvimento e do nível de resistência** 604 **de *H. contortus* sobre a ação moduladora de quercetina**

605

### 606 2.2.1. Parasitos

607 No presente estudo foram utilizados três isolados de *H. contortus*:

608 (i) RsHco1: isolado mantido na Universidade Estadual Paulista Professor Júlio de  
 609 Mesquita Filho, campus de Botucatu-SP, e gentilmente cedido pelo Dr. Alexandre F. T. do  
 610 Amarante; susceptível a ivermectina (Amarante et al., 2017).

611 (ii) FAMEZHco1: isolado de campo mantido na Universidade Federal de Mato  
 612 Grosso do Sul, Campo Grande-MS; isolado massivamente exposto a diferentes anti-helmintos  
 613 por mais de oito anos; resistente a ivermectina.

614 (iii) ROHco1: isolado de campo obtido em uma propriedade do Estado de Rondônia  
 615 (RO); isolado resistente a ivermectina.

616

### 617 2.2.2. Fármacos

618 Foram utilizados ivermectina (Sigma-Aldrich) e quercetina (Xi'na Frankherb  
 619 BiotchCo., Ltd.,) grau técnico. Para cada fármaco, uma solução estoque foi preparada a  $10^{-2}$ M  
 620 em DMSO (dimetilsulfóxido). As soluções foram divididas em alíquotas, congeladas e  
 621 mantidas a -20°C até a realização dos testes.

622

### 623 2.2.3. Teste de inibição da migração larval

624

#### 625 Obtenção de larvas

626

627 Para a manutenção dos isolados, seis ovinos foram estabelecidos em baias de alvenaria  
 628 com piso de concreto, devidamente preparadas, onde permaneceram durante todo o período  
 629 experimental. Os animais recebiam silagem de milho como alimento, 2,5% do peso vivo em  
 630 base de matéria seca, sal mineral apropriado e água *ad libitum*. Em seguida a estabilização, os  
 631 animais foram desverminados com sulfóxido de albendazole 10mg/kg via oral  
 632 (Ricobendazole®, Ourofino Saúde Animal) combinado com levamisole 10mg/kg também por  
 633 via oral (Ripercol®, Zoetis) por cinco dias consecutivos. Ao final desses cinco dias, os  
 634 animais foram submetidos à avaliação da contagem de ovos nas fezes (OPG) pela técnica  
 635 McMaster (Gordon & Whitlock, 1939) com sensibilidade 1: 25. Nenhuma forma parasitária  
 636 foi encontrada nas fezes. Os animais foram avaliados por mais 15 dias e permaneceram com

637 OPG nulo durante todo esse período e dessa forma foram considerados livres de infecção por  
638 helmintos. Nesse momento, os animais foram divididos em três grupos (n=2) e então cada  
639 grupo foi inoculado com um dos isolados de *H. contortus* (10.000 larvas de terceiro estágio  
640 por animal) e 30 dias após a inoculação, amostras fecais passaram a ser coletadas diariamente  
641 visando à obtenção de larvas de terceiro estágio.

642 Culturas fecais foram realizadas de acordo com Robert & Sullivan (1950).  
643 Permaneceram incubadas por sete dias a 27°C, quando foram extraídas. As larvas coletadas  
644 foram transferidas para tubos tipo Falcon com capacidade para 45mL, e armazenadas em  
645 geladeira (5 a 8°C) por mais sete dias, até a realização dos testes.

646

647 Teste de migração

648

649 A habilidade de ivermectina sozinha ou combinada a quercetina de inibir a migração  
650 de larvas de *H. contortus* foi determinada usando o teste de inibição da migração larval  
651 (TIML), descrito por Demeler et al. (2010), com modificações. Foram realizados dois  
652 experimentos para cada isolado, o experimento C, para a determinação da concentração  
653 efetiva média (EC50) para ivermectina, e o experimento D, para determinação da EC50 da  
654 ivermectina em combinação com quercetina. As larvas das culturas fecais foram submetidas à  
655 técnica de Baermann com peneira de abertura de 25µm, para garantir que apenas as larvas  
656 viáveis fossem usadas. Então, as larvas viáveis foram coletadas do aparato de Baermann e  
657 quantificadas, de modo que, a suspensão de larvas foi padronizada em 100 larvas de terceiro  
658 estágio em 20µL de solução fisiológica. Placas de 24 poços foram utilizadas para o teste.  
659 Foram adicionados em cada poço (seis poços, replicas, por tratamento), solução fisiológica  
660 (1690µL), 20µL de suspensão de larvas e a solução de fármacos (90µL para ivermectina no  
661 experimento C e 45µL de ivermectina e 45µL de quercetina quando utilizados em  
662 combinação, experimento D), totalizando o volume final de 1800µL por poço. As  
663 concentrações de ivermectina ( $10^{-5}$ M a  $10^{-9}$ M para RsHco1 e  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  para FAMEZHco1 e  
664 ROHco1) utilizadas no experimento C e D e de quercetina ( $10^{-5}$ M para ambos isolados)  
665 utilizada no experimento D, foram obtidas de acordo com Demeler et al. (2010), no entanto,  
666 utilizou-se solução fisiológica a 0,9% em lugar de água destilada.

667 Controle com quercetina sozinha na concentração de  $10^{-5}$ M foi incluído no  
668 experimento D. As larvas foram incubadas com a droga por 24 horas. Placas de migração de  
669 24 poços foram previamente preenchidas com 400µL de ágar 1,4% e após o arrefecimento do  
670 ágar, as larvas foram transferidas das placas de incubação para placas de migração e  
671 permaneceram migrando por 24 horas. Após o período de migração, larvas migrantes e não  
672 migrantes foram quantificadas nas próprias placas de migração com auxílio de microscópio de  
673 luz invertido.

674

675 2.2.4. Teste de motilidade fêmeas de *H. contortus*

676

677 Recuperação de adultos

678

679 Quatro borregos previamente inoculados, dois animais inoculados com RsHco1, um  
680 com FAMEZHco1 e um com ROHco1, apresentando  $OPG \geq 4000$  foram eutanasiados. A  
681 cavidade abdominal foi aberta, ligaduras foram colocadas na transição entre omaso e abomaso  
682 e na porção inicial do duodeno. O abomaso foi imediatamente retirado e acondicionado em  
683 caixa térmica apropriada para evitar o resfriamento do órgão e, em seguida levado para o  
684 laboratório. O órgão foi seccionado ao longo de sua curvatura maior e em seguida imerso em  
685 solução fisiológica (NaCl a 0,9%) aquecida a 37°C. As fêmeas foram recuperadas em placas

686 de Petri, lavadas e mantidas em solução fisiológica. Em seguida foram levadas para estufa,  
687 onde permaneceram acondicionadas a 37°C até a realização dos ensaios de motilidade.

688  
689 Teste de motilidade

690

691 A habilidade de ivermectina sozinha ou combinada a quercetina em inibir a  
692 motilidade de fêmeas de *H. contortus* foi determinada usando o teste de motilidade (TMA)  
693 descrito por Demeler et al. (2014) com modificações. Foram realizados dois experimentos  
694 para cada isolado, o experimento E, para a determinação da EC50 para ivermectina, e o  
695 experimento F, para determinação da EC50 da combinação de quercetina com ivermectina.  
696 Placas de 24 poços foram utilizadas para o teste. Foram adicionados em cada poço (sete  
697 poços, replicas, por tratamento), solução fisiológica a 0,9% (1710µL), três fêmeas e a solução  
698 de fármacos (90µL para ivermectina no experimento E e 45µL de ivermectina e 45µL de  
699 quercetina quando utilizados em combinação, experimento F), totalizando o volume final de  
700 1800µL por poço. As concentrações de ivermectina ( $10^{-5}$ M a  $10^{-9}$ M para RsHco1 e  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$   
701 para FAMEZHco1 e ROHco1) utilizadas nos experimentos E e F e de quercetina ( $10^{-5}$ M para  
702 ambos isolados) utilizada no experimento F, foram obtidas de acordo com Demeler et al.  
703 (2010), no entanto, utilizou-se solução fisiológica a 0,9% em lugar de água destilada.

704 Controle com quercetina na concentração de  $10^{-5}$ M foi incluído no experimento F.  
705 As fêmeas foram incubadas com os fármacos por oito horas. Quando se completaram quatro  
706 horas de incubação a motilidade das fêmeas foi avaliada sob estereomicroscópio. Novas  
707 avaliações foram realizadas após seis e oito horas de incubação. A avaliação da motilidade foi  
708 realizada por poço, de forma que as fêmeas contidas em cada poço foram avaliadas durante  
709 um minuto de forma ininterrupta. A motilidade foi classificada em três níveis: um (ausência  
710 de motilidade); dois (movimentos lentos) e três (movimentos rápidos) (Tabela 1).

711

## 712 2.3. Análise estatística

713

### 714 2.3.1. Experimento A

715

716 Os valores de OPG foram transformados na base Log (y+1) e normalizados  
717 (apresentados como frequência, de 0 a 100%). Em seguida foram submetidos a análise de  
718 variância considerando dois fatores, tempo e tratamento, com  $\alpha=0,05$ .

719 As contagens de helmintos foram submetidas ao teste de normalidade de  
720 Kolmogorov-Smirnov, com  $\alpha=0,05$ . Como não possuíam distribuição normal foram então  
721 transformados na base de Log (y+1), normalizados e em seguida, submetidos à análise de  
722 variância considerando apenas um fator, o tratamento, com  $\alpha=0,05$ . Para as análises  
723 estatísticas foi utilizado o GraphPadPrism versão 5.03 para Windows.

724 A eficácia do tratamento, quanto à redução na contagem de ovos nas fezes, se deu  
725 pela seguinte fórmula:  $((\text{Média pré tratamento} - \text{Média pós tratamento}) / \text{Média pré}$   
726  $\text{tratamento}) \times 100$  e a eficácia quanto à redução na contagem de helmintos foi calculada pela  
727 seguinte fórmula:  $(\text{Média geométrica do controle (quercetina)} - \text{Média geométrica dos}$   
728  $\text{tratamentos}) / \text{Média geométrica do controle (quercetina)} \times 100$ .

729

### 730 2.3.2. Experimento B

731

732 Teste de inibição da migração larval

733

734 As concentrações de ivermectina foram transformadas em log (x) e as contagens de  
735 larvas migrantes, sobreviventes ao tratamento, foram normalizadas e expressas em forma de

736 frequência (0-100%). A frequência foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:  
 737 Percentual de larvas migrantes=((n° de larvas migrantes/(n° de larvas migrantes + n° de larvas  
 738 não migrantes)\*100).

739 Os dados foram submetidos à análise de regressão não linear, obtendo-se a EC50 e  
 740 uma curva sigmóide da relação dose-resposta. A EC50 foi calculada usando a seguinte  
 741 equação:  $Y = 100 / (1 + 10^{((\text{Log EC50} - X) * \text{HillSlope}))}$ , onde  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} -$   
 742  $\text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{Log EC50} - X) * \text{HillSlope}))}$ , na qual  $X = \log$  da concentração,  $Y =$   
 743 larvas migrantes (%),  $\text{Bottom} =$  percentual mínimo de migração,  $\text{Top} =$  percentual máximo de  
 744 migração, e  $\text{HillSlope} =$  a inclinação da curva dose-resposta. Após a determinação das EC50  
 745 para os isolados (RsHco1, FAMEZHco1 e ROHco1), calculou-se o fator de resistência (Paiva  
 746 et al., 2001) para FAMEZHco1 e ROHco1 através da seguinte fórmula:  $\text{FR} = (\text{EC50 de}$   
 747  $\text{FAMEZHco1 ou ROHco1} / \text{EC50 de RsHco1})$ . Para avaliação do potencial da quercetina,  
 748 quando utilizada sozinha, para inibir a migração de larvas de terceiro estágio de *H. contortus*,  
 749 os percentuais de migração desse tratamento foram comparados com os percentuais de  
 750 migração para o controle (DMSO a 0,5%) utilizando-se o teste Tukey para comparação de  
 751 médias com  $\alpha=0,05$ .

752

753 Teste de motilidade de adultos

754

755 O número de vermes de cada escore de motilidade dos poços com ivermectina, com a  
 756 associação e dos poços controle foram expressos como percentual do número total de vermes  
 757 no poço (índice de motilidade por poço para cada escore). Então, os índices de motilidade 3  
 758 de cada poço, em relação ao índice médio de motilidade 3 do controle, foram utilizados para o  
 759 cálculo da EC50 e para gerar a curva sigmóide, como realizado para o teste de inibição da  
 760 migração larval. As concentrações de ivermectina foram transformadas em  $\log(x)$ . Para o  
 761 cálculo da EC50, foi considerada a avaliação no tempo seis horas. Após a determinação das  
 762 EC50 para ambos isolados (RsHco1, FAMEZHco1 e ROHco1), calculou-se o fator de  
 763 resistência (Paiva et al., 2001) para FAMEZHco1 e ROHco1 através da seguinte fórmula:  
 764  $\text{FR} = (\text{EC50 de FAMEZHco1 ou ROHco1} / \text{EC50 de RsHco1})$ . Para avaliação do potencial da  
 765 quercetina, quando utilizada sozinha, para inibir a motilidade de adultos de *H. contortus*, os  
 766 índices de motilidade 3 de cada poço desse tratamento foram comparados com os índices de  
 767 motilidade 3 obtidos para o controle (DMSO a 0,5%) utilizando-se o teste Tukey para  
 768 comparação de médias com  $\alpha=0,05$ .

769 A realização do presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de  
 770 Animais da UFMS, estando de acordo com todos princípios éticos previstos legalmente,  
 771 certificado no protocolo n° 475/2012.

772

### 773 3.0. RESULTADOS

774

#### 775 3.1. Experimento A

776

##### 777 3.1.1. Pós operatório

778

779 No pós-operatório, os animais não manifestaram qualquer anormalidade associada à  
 780 administração dos fármacos, e a única alteração relatada à necropsia parasitológica foi o  
 781 acúmulo pontual de pequena quantidade de material amorfo de coloração amarelada entre a  
 782 mucosa e a submucosa abomasal, em dois animais. O material era compatível com quercetina,  
 783 e provavelmente foi depositado acidentalmente durante a administração do fármaco, e não foi  
 784 absorvido.

785

786 3.1.2. Teste de redução da contagem de ovos nas fezes em animais tratados por via intra-  
787 abomasal

788

789 A eficácia de ivermectina na redução da contagem de ovos nas fezes oscilou entre 0,00  
790 e 24,00% atingindo eficácia máxima no quinto dia após o tratamento (24; IC95% = 0-90)  
791 (Tabela 2). Não houve diferença significativa entre os percentuais de eficácia calculados para  
792 D3, D5, D7 e D9 pós-tratamento. A eficácia da associação de ivermectina com quercetina  
793 variou entre 0,00 e 59,00%, atingindo eficácia máxima no D7 (59; IC95% = 0-84). As  
794 contagens de OPG foram consideradas semelhantes entre os grupos em todas as datas de  
795 avaliação, de forma que, não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, em  
796 relação à redução na contagem de ovos ( $p>0,05$ ), assim como não foi verificada a presença de  
797 interação entre as variáveis tempo e tratamento ( $p>0,05$ ). *Haemonchus contortus* foi o  
798 nematoda mais encontrado nas coproculturas (95 – 100%).

799

800 3.1.3. Teste anti-helmíntico controlado em animais tratados por via intra-abomasal

801

802 Redução de 8,17% na contagem de helmintos foi verificada nos animais que  
803 receberam o tratamento com IVM, no entanto, a contagem média de helmintos não diferiu  
804 estatisticamente dos grupos que receberam quercetina ou quercetina associada com IVM  
805 ( $p=0,7878$ ) (Tabela 3). Nos animais dos grupos que receberam quercetina ou IVM associada  
806 com quercetina não houve redução na contagem de helmintos. Todos os indivíduos adultos  
807 recuperados do abomaso foram identificados como *Haemonchus contortus*.

808

809 3.2.0. Experimento B

810

811 3.2.1. Efeito da quercetina sobre a migração de larvas e a motilidade de adultos

812

813 Os percentuais de migração observados para quercetina a  $10^{-5}M$  não diferiram dos  
814 percentuais de migração observados para o controle ( $p=0,3350$ ). Quercetina também não teve  
815 influência sobre a motilidade de adultos de *H. contortus* ( $p=0,1885$ ) e, por isso, pode-se  
816 considerar que quercetina utilizada sozinha a  $10^{-5}M$  não reduz a viabilidade de larvas e  
817 adultos de *H. contortus*.

818

819 3.2.2. Efeito de ivermectina e da associação de ivermectina com quercetina sobre larvas de  
820 *H. contortus*

821

822 A curva que descreve o efeito dose-resposta para ivermectina nos diferentes isolados  
823 (RsHco1, ROHco1 e FAMEZHco1) é apresentada na Fig. 1. Quercetina não reduziu  
824 significativamente a EC50 para ivermectina nos isolados ROHco1 (Fig. 2a) e RsHco1 (Fig.  
825 2c), porém reduziu significativamente a EC50 para ivermectina no isolado FAMEZHco1 (Fig.  
826 2b). Quercetina potencializou o efeito de ivermectina sobre FAMEZHco1 reduzindo o FR de  
827 3,15 para 0,33. Os dados referentes às ECs50 de ivermectina e da associação de ivermectina  
828 com quercetina, assim como os intervalos de confiança calculados para cada EC50  
829 encontram-se apresentados na Tabela 4.

830

831 3.2.3. Efeito de ivermectina e da associação de ivermectina com quercetina sobre adultos de  
832 *H. contortus*

833

834 Quercetina não alterou significativamente a EC50 dos isolados RsHco1, ROHco1 e  
835 FAMEZHco1, embora tenha aumentado numericamente a EC50 de FAMEZHco1 e

836 diminuído a EC50 de RsHco1 (Tabela 4). O FR de FAMEZHco1 foi elevado em mais de seis  
 837 vezes. O cálculo para a determinação da EC50 da associação de ivermectina com quercetina  
 838 para o isolado ROHco1 não foi realizado devido à inadequação do modelo de regressão não  
 839 linear em descrever o comportamento da variável percentual de adultos com motilidade 3  
 840 ( $R^2=0,05$ ). A resposta observada para adultos expostos à associação de ivermectina com  
 841 quercetina teve forte tendência linear (Figura 3). O percentual de indivíduos com motilidade 3  
 842 variou entre os momentos de avaliação (quatro, seis e oito horas de incubação), como  
 843 demonstrado para o grupo controle de ambos isolados (Fig. 4), com redução gradativa ao  
 844 longo do tempo desse percentual para FAMEZHco1 e ROHco1. Percentuais de indivíduos  
 845 com motilidade 3 após oito horas de incubação foram menores do que 50% para ambos  
 846 isolados. A EC50 para indivíduos adultos foi sempre menor do que a de larvas.

847

#### 848 4. DISCUSSÃO

849 No presente estudo a associação farmacológica de ivermectina com quercetina, via  
 850 intra-abomasal, apresentou eficácia nula sobre a redução da contagem adultos de *Haemonchus*  
 851 *contortus* e modesta redução da contagem de ovos nas fezes de animais infectados (não houve  
 852 diferença estatística entre animais tratados e não tratados com a associação), resultado  
 853 diferente do que foi observado por Bartley et al. (2009) e por Heckler et al. (2014) em testes  
 854 *in vitro* com larvas de terceiro estágio de *H. contortus* e *H. placei*, respectivamente.

855 Essa diferença entre testes *in vitro* e o ensaio *in vivo* realizados no presente trabalho,  
 856 em relação à atividade da quercetina como fármaco modulador de resistência, pode ser  
 857 atribuída, à interação quercetina/hospedeiro e quercetina/parasito.

858 Considerando a interação quercetina/hospedeiro, quando o fármaco é administrado  
 859 pela via intra-abomasal, propriedades ácido-base da quercetina em soluções aquosas podem  
 860 influenciar sobre atuação do fármaco como agente modulador de resistência nos parasitos. De  
 861 acordo com Chebotarev & Snugur (2015) a distribuição das formas ion-moleculares de  
 862 quercetina ocorre de forma diferente de acordo com as faixas de pH (1-13). Em soluções com  
 863 pH abaixo de 3 as formas protonadas carregadas positivamente ( $H_6A^+$ ) são encontradas em  
 864 maior concentração. À medida que o pH aumenta, o próton é destacado do grupo carbonila  
 865 protonado ( $H_6A^+$ ) e então há a formação da molécula neutra de quercetina ( $H_5A$ ). Moléculas  
 866 neutras são usualmente solúveis em lipídeos e podem se difundir através de membranas  
 867 celulares. Contrariamente, moléculas protonadas são usualmente impedidas de penetrar a  
 868 membrana lipídica por causa de sua baixa lipofilicidade (Benet et al., 1990). O pH da solução  
 869 de quercetina com ivermectina, solubilizados em DMSO e solução fisiológica, que é utilizada  
 870 para testes *in vitro*, nos quais quercetina mostrou-se ativa, permanece próximo a 5,0 (dados  
 871 não publicados) e permite a ocorrência de quercetina em sua forma neutra (Chebotarev &  
 872 Snugur, 2015), altamente lipofílica que interage com a membrana das células dos parasitos  
 873 bloqueando mecanismos de resistência a anti-helmínticos como a P-gp. Por outro lado, no  
 874 abomaso, o pH do fluido encontrado na região fúndica é próximo a 1 e no conteúdo (digesta)  
 875 abomasal o pH é mantido ao redor de 3 (Reece, 2006), assim as formas protonadas  
 876 predominam. Como possuem baixa lipofilicidade, apresentam menor capacidade de interagir  
 877 com membranas plasmáticas e, por isso, o efeito modulador da quercetina não pode ser  
 878 observado no abomaso após a administração intra-abomasal.

879 Diversos testes de redução da contagem de ovos nas fezes de ovinos naturalmente  
 880 infectados por *Haemonchus contortus* foram conduzidos com a associação de ivermectina  
 881 com quercetina, previamente à realização deste estudo (dados não publicados). Nesses testes,  
 882 ivermectina foi avaliada em associação com quercetina pelas vias subcutânea, endovenosa e  
 883 oral em diferentes concentrações, intervalos de administração e até mesmo por infusão  
 884 contínua por 12 horas ininterruptas. A ocorrência de resultados diversos (eficácias de 0,0 a

885 62%, porém sem significância estatística) sobre a redução da contagem de OPG em animais  
886 tratados com associações de ivermectina com quercetina, foi determinante para a realização  
887 do ensaio utilizando a via intra-abomasal, no intuito de se esclarecer a existência ou não do  
888 efeito potencializador da quercetina na eficácia de ivermectina, para tratamento de animais  
889 infectados por *Haemonchus contortus*.

890 Quercetina é um fármaco com comprovada capacidade de reversão bioquímica da  
891 resistência a anti-helmínticos em nematodas parasitos de ruminantes, quando avaliada *in vitro*  
892 (Bartley et al., 2009; Heckler et al., 2014). A utilização *in vivo* desse modulador pode, no  
893 entanto, ser limitada em razão da rápida e eficiente metabolização hepática e excreção renal  
894 no hospedeiro, o que determina reduzida biodisponibilidade do fármaco. Além disso, em  
895 ambiente ruminal, quercetina é quase totalmente degradada pela microbiota local (Berger et  
896 al. 2012). A baixa biodisponibilidade oral da quercetina também pode ser atribuída às suas  
897 características lipofílicas e a afinidade por bombas de efluxo e ao citocromo P-450, os quais  
898 estão presentes no epitélio intestinal (Penalva et al., 2016), e ao próprio muco, recentemente  
899 descrito como barreira à absorção de flavonoides (Gonzales et al., 2016). Portanto, a ausência  
900 ou mesmo o reduzido efeito modulador de quercetina nos experimentos preliminares com  
901 ovinos infectados pode ser atribuída às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas  
902 desse fármaco.

903 Em decorrência da baixa biodisponibilidade da quercetina, diferentes metodologias  
904 têm sido utilizadas com sucesso para aumentar a biodisponibilidade desse fármaco como  
905 microemulsões, dispersão em polivinilpolirrolidona, complexação à lecitina, ciclodextrina,  
906 nanocristais (Gonzales et al., 2016) e a associação com partículas lipídicas (Penalva et al.,  
907 2016), porém, essas estratégias permanecem restritas a monogástricos e pesquisas são  
908 necessárias em ruminantes.

909 Em virtude dos desafios farmacocinéticos e farmacodinâmicos da utilização da  
910 quercetina, a via intra-abomasal foi escolhida para o presente estudo como alternativa para  
911 garantir condição na qual quercetina e ivermectina estivessem em contato direto com o  
912 parasito, dentro do organismo animal (sítio de infecção) e, portanto, sujeitos às influências  
913 químicas e físicas do organismo do hospedeiro, em um mesmo momento.

914 Considerando a interação quercetina/parasito, dois fatores a serem analisados são a  
915 ação da quercetina sobre as diferentes fases dos parasitos e a influência do nível de resistência  
916 dos parasitos sobre a ação desse fármaco modulador. O efeito modulador de quercetina foi  
917 descrito para formas adultas pela primeira vez no presente trabalho, assim como, pela  
918 primeira vez, quercetina foi avaliada em larvas (L<sub>3</sub>) e adultos de isolados com diferentes  
919 perfis de resistência à ivermectina.

920 No presente estudo, quercetina quando associada à ivermectina (IVM) foi eficiente  
921 em potencializar o efeito desse anti-helmíntico sobre larvas de *H. contortus* (isolado  
922 FAMEZHco1, FR=3,15), no entanto, não demonstrou nenhum efeito sobre adultos do mesmo  
923 parasito. O efeito de quercetina sobre larvas de *Haemonchus* sp. já tem sido relatado (Bartley  
924 et al. 2009; Heckler et al. 2014), o que demonstra que nossos resultados concordam com a  
925 literatura. Um fato interessante observado no presente trabalho, foi a ausência do efeito  
926 potencializador da quercetina sobre a ação de IVM em larvas de RsHco1 que é sensível a  
927 IVM e em larvas de ROHco1, que se mostrou com elevado fator de resistência para  
928 ivermectina (FR=24,35). Esse resultado difere do observado por Demeler et al. (2013), que  
929 observaram o aumento de eficácia de Ivermectina contra isolados sensíveis e resistentes,  
930 quando associada ao verapamil, outra droga moduladora de P-gp. Da mesma forma, Bartley et  
931 al. (2009) observaram que quercetina também foi eficiente em aumentar a susceptibilidade de  
932 larvas de primeiro estágio de isolados sensíveis a IVM de *H. contortus* e *Teladorsagia*  
933 *circuncincta* e capaz de restaurar a susceptibilidade em isolados resistentes. Por outro lado,  
934 elacridar e zosuquidar, moduladores de terceira geração, não foram eficientes em aumentar a

935 susceptibilidade de larvas de terceiro estágio de *H. contortus* susceptível a IVM. Isso sugere  
936 que os mecanismos de efluxo com os quais elacridar e zosuquidar interagem são menos ativos  
937 em larvas susceptíveis do que em larvas resistentes, o que deve ter contribuído para a  
938 ocorrência desse efeito (Raza et al., 2015).

939 Em relação ao principal mecanismo de efluxo com o qual quercetina interage, a  
940 glicoproteína-P (P-gp) (revisado por Di Pietro et al., 2004), há evidências de diferenças nos  
941 níveis de expressão entre P-gps nos diversos estágios de desenvolvimento de nematodas  
942 parasitos (Dicker et al., 2011; Sarai et al., 2013; Raza et al., 2015) e sugere-se que essa  
943 diferença seja presente entre isolados sensíveis e resistentes (Raza et al., 2015). Dessa forma,  
944 as diferenças nos níveis de expressão de P-gps poderiam explicar a atuação de quercetina no  
945 aumento da susceptibilidade a IVM em larvas L<sub>1</sub> sensíveis (Bartley et al., 2009) e ao não  
946 aumento da susceptibilidade em L<sub>3</sub> de *H. contortus* sensíveis, como no presente estudo, assim  
947 como o efeito significativo na potencialização do efeito de IVM em L<sub>3</sub> resistente de  
948 FAMEZHco1. A ausência de efeito modulador em larvas de terceiro estágio do isolado  
949 ROHco1, também pode sugerir a ocorrência de mecanismos de resistência adicionais (Bartley  
950 et al., 2012) e que podem ter sido muito importantes nesse caso.

951 Adultos de *H. contortus* mostraram-se mais sensíveis à atuação de IVM do que larvas  
952 em todos os isolados, o que pode ser evidenciado pela EC50. A menor potência de IVM sobre  
953 L<sub>3</sub>, segundo Demeler et al. (2014), pode ser devido a uma série de fatores, dentre eles, a  
954 expressão de receptores, a estrutura cuticular da larva, o fato de larvas não se alimentarem, as  
955 condições de incubação e finalmente as metodologias de estudo *in vitro*.

956 A ação potencializadora de quercetina sobre o efeito de IVM não foi verificada sobre a  
957 motilidade de indivíduos adultos de *H. contortus*, independentemente se eram sensíveis ou  
958 resistentes. A razão para a ocorrência desse resultado não é clara, no entanto, algumas  
959 hipóteses poderiam ser mencionadas. Primeiramente, as diferenças nos níveis de expressão de  
960 P-gp que ocorrem entre estágios de desenvolvimento (Dicker et al., 2011; Sarai et al., 2013;  
961 Raza et al., 2015) poderiam ser suficientes para explicar. Secundariamente, somada aos  
962 diferentes níveis de expressão de P-gp, a especificidade sugerida por Lespine et al. (2012)  
963 para mecanismos de efluxo, poderia contribuir com a ineficiência de quercetina. Levando em  
964 consideração essas duas hipóteses, P-gps expressas em L<sub>3</sub> teriam maior afinidade por  
965 quercetina, e as expressas em adultos não teriam ou manifestariam menor afinidade pela  
966 quercetina. Uma terceira hipótese seria a expressão de mecanismos de defesa adicionais como  
967 outros transportadores e enzimas em adultos, e em maior intensidade em indivíduos  
968 resistentes (Bartley et al., 2012) como nos isolados FAMEZHco1 e ROHco1, sobretudo em  
969 resposta a presença de moduladores, o que não seria observado em larvas. Esta última  
970 hipótese também explicaria o aumento numérico da EC50 em FAMEZHco1 e ROHco1 em  
971 relação a EC50 de RsHco1. Em resumo, quercetina não potencializou o efeito de IVM sobre a  
972 motilidade de adultos de *H. contortus*. Além disso, sua ação em larvas foi influenciada pelo  
973 nível de resistência dos isolados. Isolados sensíveis ou muito resistentes (ROHco1 com  
974 FR=24,35) não foram sensíveis à ação de quercetina como agente modulador de P-gp.

975 A avaliação da motilidade em escores, principalmente quando analisa o percentual de  
976 indivíduos que decrescem do nível de motilidade 3 para os níveis menores é bastante sensível  
977 (Kotze et al., 2012). Essa sensibilidade ocorre pelo efeito de IVM na motilidade de adultos.  
978 IVM não mata, mas reduz a motilidade na região central do corpo do nematoda, o suficiente  
979 para que adultos decresçam no nível de motilidade, 3 para 2 ou para 1, por exemplo (Kotze et  
980 al., 2012). Dessa forma a diminuição da motilidade de níveis elevados (3) para níveis  
981 inferiores é razoavelmente mais importante do que a detecção de indivíduos imóveis, e por  
982 isso foi utilizada neste trabalho. Outro fator considerado foi o momento da avaliação, em  
983 horas de incubação. Determinamos que após seis horas de incubação deveríamos coletar os  
984 dados que seriam utilizados para as avaliações estatísticas. Esse momento foi determinado

985 porque o tempo quatro horas poderia representar um período de incubação muito curto e no  
 986 tempo oito horas a viabilidade dos adultos decrescia bastante, como evidenciado no isolado  
 987 FAMEZHco1.

988 Novos ensaios com quercetina devem priorizar a avaliação da influência de  
 989 modificações estruturais da molécula de quercetina sobre a biodisponibilidade do fármaco em  
 990 ruminantes, resistência à degradação pela microbiota ruminal, propriedades ácido-básicas em  
 991 soluções aquosas e efeito dessas modificações sobre a modulação da resistência a anti-  
 992 helmínticos.

993

## 994 5. CONCLUSÃO

995 A combinação de ivermectina com quercetina, quando administrada por via intra-  
 996 abomasal, não foi eficiente em reduzir o OPG e nem a carga parasitária de ovinos  
 997 naturalmente infectados por *Haemonchus contortus* resistente a ivermectina. A ação  
 998 potencializadora de quercetina associada a ivermectina sobre a motilidade de larvas e adultos  
 999 de *Haemonchus contortus* foi influenciada pelo nível de resistência e também pelo estágio de  
 1000 desenvolvimento do parasito.

1001

## 1002 6. CONFLITOS DE INTERESSE

1003

1004 Os autores alegam que não há conflitos de interesse.

1005

## 1006 7. AGRADECIMENTOS

1007

1008 Parte do presente estudo foi financiado pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento  
 1009 do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), a quem os  
 1010 autores agradecem. Os autores também agradecem ao Professor Doutor Alessandro Francisco  
 1011 Talamine do Amarante (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de  
 1012 Botucatu-São Paulo), que gentilmente cedeu amostras do isolado sensível a ivermectina  
 1013 RsHco1.

1014

## 1015 8. REFERÊNCIAS

1016 Ader, P. Wessmann, A. Wolfram, S., 2000. Bioavailability and metabolism of the flavonol  
 1017 quercetin in the pig. *Free Radical Biology & Medicine*. 28, 1056–1067.

1018

1019 Amarante, M. R. V., Santos, M. C., Bassetto, C. C., Amarante, A. F. T., 2017. PCR primers  
 1020 for traight forward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their  
 1021 hybrids. *Journal of Helminthology*, v. 91, p. 757–761.

1022

1023 Bartley, D. J., McAllister H., Bartley Y., Dupuy J., Ménez C., Alvinerie M., Jackson F.,  
 1024 Lespine A., 2009. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in  
 1025 ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus*  
 1026 *contortus*. *Parasitology*. 136, 1081–1088.

1027

1028 Bartley, D.J., Morrison, A.A., Dupuy, J., Bartley, Y., Sutra, J.F., Menez, C., Alvinerie, M.,  
 1029 Jackson, F., Devin, L., Lespine, A., 2012. Influence of Pluronic 85 and ketoconazole on  
 1030 disposition and efficacy of ivermectin in sheep infected with a multiple resistant  
 1031 *Haemonchus contortus* isolate. *Veterinary Parasitology*, v. 187, p. 464–472, 2012.

1032

- 1033 Benet, L. Z., Mitchell, J. R., Sheiner, L. B. Pharmacokinetics: The dynamics of drug  
1034 absorption, distribution, and elimination. In: Gilman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor,  
1035 P., 1990. Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. Eight edition,  
1036 Health Professions Division, McGraw-Hill, 1811 pp.  
1037
- 1038 Berger, L. M., Wein S., Blank R., Metges CC., Wolfram S., 2012. Bioavailability of the  
1039 flavonolquercetin in cows after intraruminal application of quercetinaglycone and  
1040 rutin. *Journal Dairy Scienc.* 95, 5047–5055.  
1041
- 1042 Besle, J. M., Viala, D., Martin, B., Pradel, P., Meunier, B., Berdagué, J. L., Fraisse, D.,  
1043 Lamaison, J. L., Coulon, J. B., 2010. Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to  
1044 forage polyphenols. *Journal Dairy Science.* 93, 2846–2856.  
1045
- 1046 Chebotarev, A. N., Snigur, D. V., 2015. Study of the AcidBase Properties of Quercetin in  
1047 Aqueous Solutions by Color Measurements. *JournalofAnalyticalChemistry.* 70, 55–59.  
1048
- 1049 Costa, A. J., 1982. Diagnóstico laboratorial em Parasitologia: I. Helmintologia. FCAV-  
1050 UNESP, Jaboticabal, 89 pp.  
1051
- 1052 Demeler, J., Gill, J.H., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2013. The in vitro  
1053 assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids.  
1054 *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 3, 109–118.  
1055
- 1056 Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzike, A., Varady, M., Kenyong, F.,  
1057 Coles, G., Höglunde, J., Jacksong, F., Vercruyse, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2010.  
1058 Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to  
1059 ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology.* 174, 58–64.  
1060
- 1061 Demeler, J., Von Samson-himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2014. Measuring the effect of  
1062 avermectins and milbemycins on somatic muscle contraction of adult *Haemonchus contortus*  
1063 and on motility of *Ostertagia circumcincta* in vitro. *Parasitology*, v. 141, p. 948-956.  
1064
- 1065 Di Pietro, A., Conseil, G., Pérez-Victoria, J.M., Dayana, G., Baubichon-Cortay, H., Trompier,  
1066 D., Stein-fels, E., Jault, J.–M., Wet, H., Maitrejean, M., Comte, G., Boumendjel, A., Mariotte,  
1067 A.–M., Dumontet, C., McIntosh, D.B., Goffeau, A., Castanys, S., Gamarro, F., Barron, D.,  
1068 2002. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and  
1069 related ABC transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59, p. 207-322.  
1070
- 1071 Dicker, A.J., Nisbet, A.J., Skuce, P.J., 2011. Gene expression changes in a P-glycoprotein  
1072 (*Tci-pgp-9*) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*.  
1073 *International Journal for Parasitology*, v. 41, p. 935–942.  
1074
- 1075 Dupuy, J., Larrieu G., SutraJF., Lespine A., Alvinerie, M., 2003. Enhancement of moxidectin  
1076 bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Veterinary Parasitology.* 112, 337-  
1077 347.  
1078
- 1079 Gayoso, L. C., Moreno, I., Puerta, E., Suárez-Santiago, J. E., Santos-Magalhães, N. S.,  
1080 Ramirez, M. J., Irache, J. M., 2017. Effect of the oral administration of  
1081 nanoencapsulatedquercetin on amouse model of Alzheimer's disease. *International Journal*  
1082 *of Pharmaceutics.* 517, 50–57.

- 1083  
1084 Gohlke , A., Ingelmann, C. J., Nürnberg, G., Starke, A., Wolfram, S., Metges, C. C., 2013.  
1085 Bioavailability of quercetin from its aglycone and its glucorhamnoside rutin in lactating dairy  
1086 cows after intraduodenal administration. *Journal of Dairy Science*. 96, 2303–2313.  
1087  
1088 Gonzales, G. B., Camp, J. V., Smaghe, G., Raes, K., Mackie, A., 2016. Flavonoid–  
1089 gastrointestinal mucus interaction and its potential role in regulating flavonoid bioavailability  
1090 and mucosal biophysical properties. *Food Research International*. 88, 342–347.  
1091  
1092 Gordon, H. McL., Whitlock, A. V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in  
1093 sheep feces. *Journal Council Scientific Industry Research Australia*, v. 12, p. 50–52.  
1094  
1095 Guo, Y. & Bruno, R. S., 2015. Endogenous and exogenous mediators of quercetin  
1096 bioavailability. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 26, 201–210.  
1097  
1098 Gupta, P., Garg, T., Tanmay, M., Arora, S., 2015. Polymeric Drug-Delivery Systems: Role in  
1099 P-gp Efflux System Inhibition. *Therapeutic Drug Carrier Systems*. 32, 247–275.  
1100  
1101 Havsteen, B. H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids.  
1102 *Pharmacology Therapy*. 96, 67–202.  
1103  
1104 Heckler R.P., Almeida G.D., Santos L.B., Borges D.G.L., Neves J.P.L., Onizuka M.K.V.,  
1105 Borges F.A., 2014. P-gp modulating drugs greatly potentiate the in vitro effect of ivermectin  
1106 against resistant larvae of *Haemonchus placei*. *Veterinary Parasitology*. 205, 638–645.  
1107  
1108 Kim, M. K., Kim, Y., Choo, H., Chong, Y., 2017. Quercetin-glutamic acid conjugate with a  
1109 non-hydrolysable linker; a novel scaffold for multidrug resistance reversal agents  
1110 through inhibition of P-glycoprotein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 25, 1219–1226.  
1111  
1112 Kotze, A.C., Hines, B.M., Ruffell, A.P., 2012. A reappraisal of the relative sensitivity of  
1113 nematode pharyngeal and somatic musculature to macrocyclic lactone drugs. *International*  
1114 *Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 2, p. 29–35.  
1115 Lespine, A., Ménez, C., Bourguinat, C., Prichard, R. K., 2012. P-glycoproteins and other  
1116 multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for  
1117 reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology:*  
1118 *Drugs and Drug Resistance*. 2, 58–75.  
1119  
1120 Lloberas M., Alvarez L., Entrocasso C., Virkel G., Lanusse C., Lifschitz A., 2012.  
1121 Measurement of ivermectin concentrations in target worms and host gastrointestinal tissues:  
1122 Influence of the route of administration on the activity against resistant *Haemonchus contortus*  
1123 in lambs. *Experimental Parasitology*. 131, 304–309.  
1124  
1125 Miron, A., Aprotosoie, A. C., Trifan, A., Xiao, J., 2017. Flavonoids as modulators of  
1126 metabolic enzymes and drug Transportes. *Annals of the New York Academy of Sciences*.  
1127 1398, 152–167.  
1128  
1129 O’Grady, J. & Kotze, A. C., 2004. *Haemonchus contortus*: in vitro drug screening assays with  
1130 the adult life stage. *Experimental Parasitology*. 106, 164–172.  
1131

- 1132 Paiva, F., Sato, M. O., Acuña, A. H., Jensen, J. R., Bressan, M. C. R. V., 2001. Resistência a  
 1133 ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. Hora  
 1134 Veterinária, v.120, p.29-34.  
 1135
- 1136 Patra, M., Mukherjee, R., Banika, M., Dutta, D., Begum, N. A., Basua, T., 2017. Calcium  
 1137 phosphate-quercetin nano composite (CPQN): A multi-functional nanoparticle having pH  
 1138 indicating, highly fluorescent and anti-oxidant properties. Colloids and Surfaces B:  
 1139 Biointerfaces. 154, 63–73.  
 1140
- 1141 Penalva, R., González-Navarro, C. J., Gamazo, C., Esparza, I., Irache, J. M., 2017. Zein  
 1142 nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-  
 1143 inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. Nanomedicine: Nanotechnology,  
 1144 Biology, and Medicine. 13, 103–110.  
 1145
- 1146 Raza, A., Kopp, S.R., Jabbar, A., Kotze, A.C., 2015. Effects of third generation P-  
 1147 glycoprotein inhibitors on the sensitivity of drug-resistant and -susceptible isolates of  
 1148 *Haemonchus contortus* to anthelmintics in vitro. Veterinary Parasitology, v. 211, p. 80–88.  
 1149
- 1150 Reece, W. O., 2006. Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos. 12. ed. Editora Guanabara  
 1151 Koogan, Rio de Janeiro, 946 pp.  
 1152
- 1153 Rice-Evans C., 2001. Flavonoid antioxidants. Current Medicinal Chemistry. 8, 797–807.  
 1154
- 1155 Roberts FHS., Sullivan PJ., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles  
 1156 infecting the gastro-intestinal tract of cattle. Australian Journal of Agriculture Research. 1, 99-  
 1157 102.  
 1158
- 1159 Sarai, R.S., Kopp, S.R., Coleman, G.T., Kotze, A.C., 2013. Acetylcholine receptor subunit  
 1160 and P-glycoprotein transcription patterns in levamisole-susceptible and -resistant  
 1161 *Haemonchus contortus*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v.  
 1162 3, p. 51–58.  
 1163
- 1164 Spencer JPE., Abd El Mohsen MM., Rice-Evans C., 2004. Cellular uptake and metabolism of  
 1165 flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. Archieve of Biochemistry  
 1166 and Biophysics 423, 148–161.  
 1167
- 1168 Ueno H., Gonçalves PC., 1998. Manual paradiagnóstico das helmintoses de Ruminantes.  
 1169 JICA. 4ª ed., Japão, 166 pp.
- 1170 Vercruysse J., Holdsworth P., Letonja T., Barth D., Conder G., Hamamoto K., Okano K.,  
 1171 2001. International harmonisation of anthelmintic efficacy guidelines. Veterinary  
 1172 Parasitology. 96, 171-193.  
 1173
- 1174 Wen, X., Walle, T., 2006. Methylated Flavonoids Have Greatly Improved Intestinal  
 1175 Absorption and Metabolic Stability. Drug Metabolism and Disposition. 34, 1786-1792.  
 1176
- 1177 Wood IB., Amaral NK., Bairden K., Duncan JL., Kassai T., Malone JR., Pankavich, JA.,  
 1178 Reinecke RK., Slocombe O., Taylor SM., Vercruysse J., 1995. World Association for the  
 1179 Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for  
 1180 evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). Veterinary  
 1181 Parasitology. 58, 181-213.

1182 Tabela 1. Sistema de classificação da motilidade de fêmeas de *H.contortus*, expostas ou  
 1183 não a ivermectina e/ou a combinação de ivermectina com quercetina por escores de  
 1184 motilidade

| Escore de motilidade | Descrição  |
|----------------------|--|
| 1                    | Nenhum movimento.  |
| 2                    | Movimento limitado (<75% do corpo se movendo: movimento de uma ou de ambas extremidades do corpo e a região central do corpo enrolada ou mesmo distendida, mas imóvel). Corpo enrolado em forma de bobina independente do grau de movimento. Movimento mínimo, movimentos de menor intensidade observado somente nas extremidades do corpo, <10% de movimento. |
| 3                    | Movimento rápido e sinusoidal envolvendo todo o corpo do indivíduo, >90% do corpo em movimento. Movimento signficante: espalhado por mais que 75% do corpo.  |

1185 Fonte: Adaptado de Kotze et al. (2012).

1186

1187 Tabela 2. Médias de OPG, desvio padrão e eficácias de redução das contagens de ovos nas  
 1188 fezes de ovinos submetidos a tratamentos por via intra-abomasal com ivermectina,  
 1189 ivermectina associada a quercetina e quercetina, nos dias 0, 3, 5, 7 e 9 pós-tratamento.  
 1190 Experimento I.

| Parâmetros   | Ivermectina              |                     |                     |                     |                      |
|--------------|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
|              | Dia 0                    | Dia +3              | Dia +5              | Dia +7              | Dia +9               |
| Média        | 579,17 <sup>a</sup>      | 750,00 <sup>a</sup> | 441,67 <sup>a</sup> | 783,33 <sup>a</sup> | 1640,00 <sup>a</sup> |
| Desvpad      | 893,49                   | 1471,73             | 805,09              | 1711,48             | 2958,81              |
| Eficácia (%) |                          | 0,00 (0-85)         | 24,00 (0-90)        | 0,00 (0-86)         | 0,00 (0-67)          |
| Parâmetros   | Ivermectina + quercetina |                     |                     |                     |                      |
|              | Dia 0                    | Dia +3              | Dia +5              | Dia +7              | Dia +9               |
| Média        | 454,17 <sup>a</sup>      | 208,33 <sup>a</sup> | 258,33 <sup>a</sup> | 187,50 <sup>a</sup> | 358,33 <sup>a</sup>  |
| Desvpad      | 290,73                   | 148,88              | 124,16              | 171,57              | 230,58               |
| Eficácia (%) |                          | 54,13 (0-80)        | 43,12 (0-71)        | 59,00 (0-84)        | 21,10 (0-64)         |
| Parâmetros   | Quercetina               |                     |                     |                     |                      |
|              | Dia 0                    | Dia +3              | Dia +5              | Dia +7              | Dia +9               |
| Média        | 430,56 <sup>a</sup>      | 241,67 <sup>a</sup> | 225,00 <sup>a</sup> | 487,50 <sup>a</sup> | 375,00 <sup>a</sup>  |
| Desvpad      | 218,12                   | 119,02              | 198,12              | 626,00              | 325,96               |

1191 Letras iguais, nas linhas e colunas, demonstram que as médias de OPG para os diferentes  
 1192 grupos e datas de avaliação não diferiram estatisticamente.

1193

1194

1195

1196 Tabela 3. Contagem de helmintos recuperados a necropsia em ovinos submetidos a três  
 1197 diferentes tratamentos por via intra-abomasal (quercetina, IVM e a associação de IVM com  
 1198 quercetina). Experimento I.

| Tratamento  | Média               | Méd. geo. | Desvpad | Eficácia |
|-------------|---------------------|-----------|---------|----------|
| Ivermectina | 174,50 <sup>a</sup> | 84,92     | 248,04  | 8,17     |
| Iver+querc. | 157,67 <sup>a</sup> | 125,30    | 99,34   | 0,00     |
| Querc.      | 100,33 <sup>a</sup> | 92,48     | 39,98   | -        |

1199 Letras iguais nas colunas demonstram que as médias de contagem de helmintos, para os  
 1200 diferentes grupos, não diferiram estatisticamente.

1201 Tabela 4. EC50 de ivermectina e da associação de ivermectina com quercetina na migração de larvas de terceiro estágio e na motilidade de  
 1202 adultos de três isolados de *H. contortus*, RsHco1 (sensível a ivermectina), FAMEZHco1 e ROHco1 (resistentes à ivermectina).

| Ensaio realizado                                  | Tratamento/<br>experimento | RsHco1                  |   | FAMEZHco1               |  | FR    | ROHco1                 |   | FR     |
|---|----------------------------|-------------------------|---|-------------------------|--|-------|------------------------|---|--------|
|   |                            | EC50 M                  | 95% IC  | EC50 M                  | 95% IC   |       | EC50 M                 | 95% IC  |        |
| Teste de inibição da<br>migração larval<br>(TIML) | Ivermectina/<br>C          | $5,966 \times 10^{-6}$  | $4,076 \times 10^{-6} - 8,734 \times 10^{-6}$   | $1,874 \times 10^{-5}$  | $1,016 \times 10^{-5} - 3,457 \times 10^{-5}$  | 3,15  | $1,453 \times 10^{-4}$ | $4,057 \times 10^{-5} - 5,202 \times 10^{-4}$ | 24,35  |
|   | Iver +<br>querc./D         | $6,234 \times 10^{-6}$  | $4,640 \times 10^{-6} - 8,375 \times 10^{-6}$   | $1,980 \times 10^{-6}$  | $1,457 \times 10^{-6} - 2,690 \times 10^{-6}$  | 0,332 | $1,909 \times 10^{-4}$ | $4,140 \times 10^{-5} - 8,807 \times 10^{-4}$ | 32     |
| Teste de motilidade com<br>adultos (TMA)          | Ivermectina/<br>E          | $4,557 \times 10^{-10}$ | $1,2557 \times 10^{-10} - 1,652 \times 10^{-9}$ | $5,274 \times 10^{-10}$ | $1,225 \times 10^{-11} - 2,271 \times 10^{-8}$ | 1,15  | $5,007 \times 10^{-8}$ | $5,520 \times 10^{-9} - 4,542 \times 10^{-7}$ | 109,87 |
|   | Iver +<br>querc./F         | $1,375 \times 10^{-11}$ | $1,474 \times 10^{-13} - 1,288 \times 10^{-9}$  | $2,938 \times 10^{-9}$  | $1,505 \times 10^{-10} - 5,736 \times 10^{-8}$ | 6,45  | -                      | -   | -      |

1203 EC50: concentração efetiva média; IC: intervalo de confiança; FR: fator de resistência.

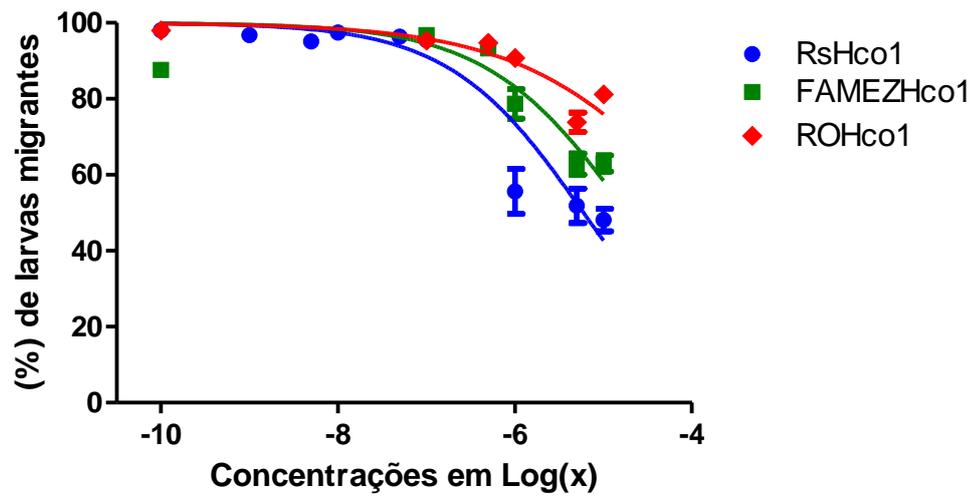
1204

1205

1206

1207

1208

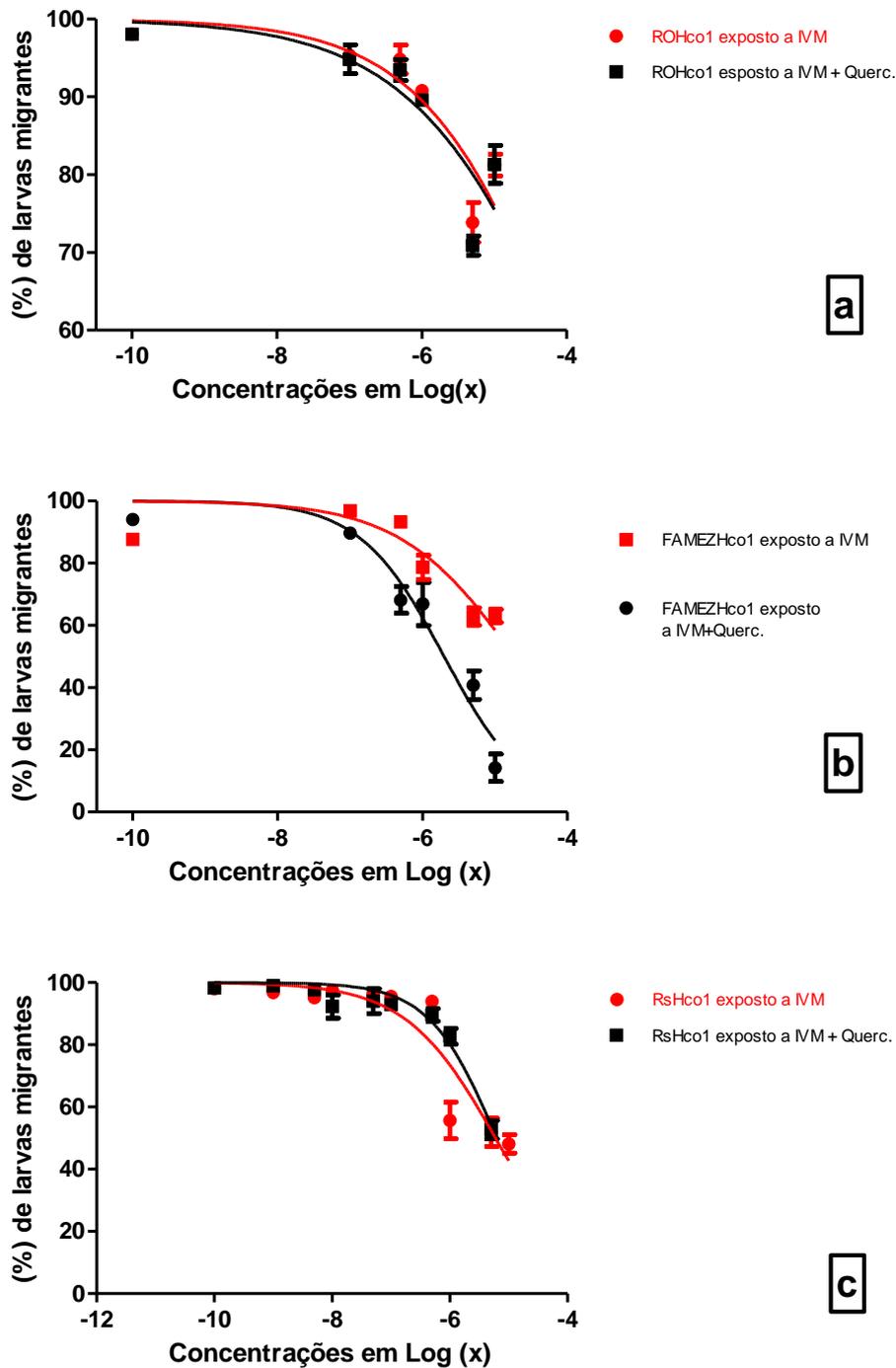


1209

1210 Figura 1. Curva dose-resposta para ivermectina nos isolados RsHco1, FAMEZHco1 e  
1211 ROHco1 no teste de inibição da migração larval.

1212

1213

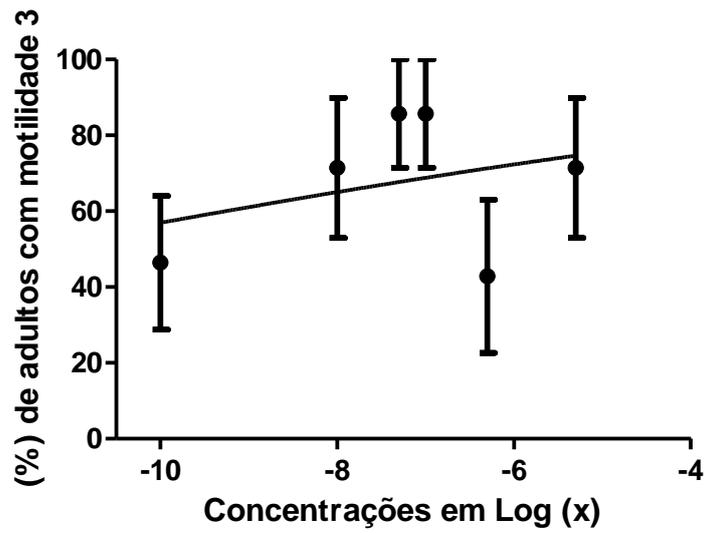


1214

1215 Figura 2. Efeito de ivermectina e da associação de ivermectina com quercetina sobre a  
 1216 migração de larvas de terceiro estágio de três isolados de *H. contortus*: isolado muito  
 1217 resistente ROHco1 (a); isolado resistente FAMEZHco1 (b) e isolado sensível RsHco1 (c).

1218

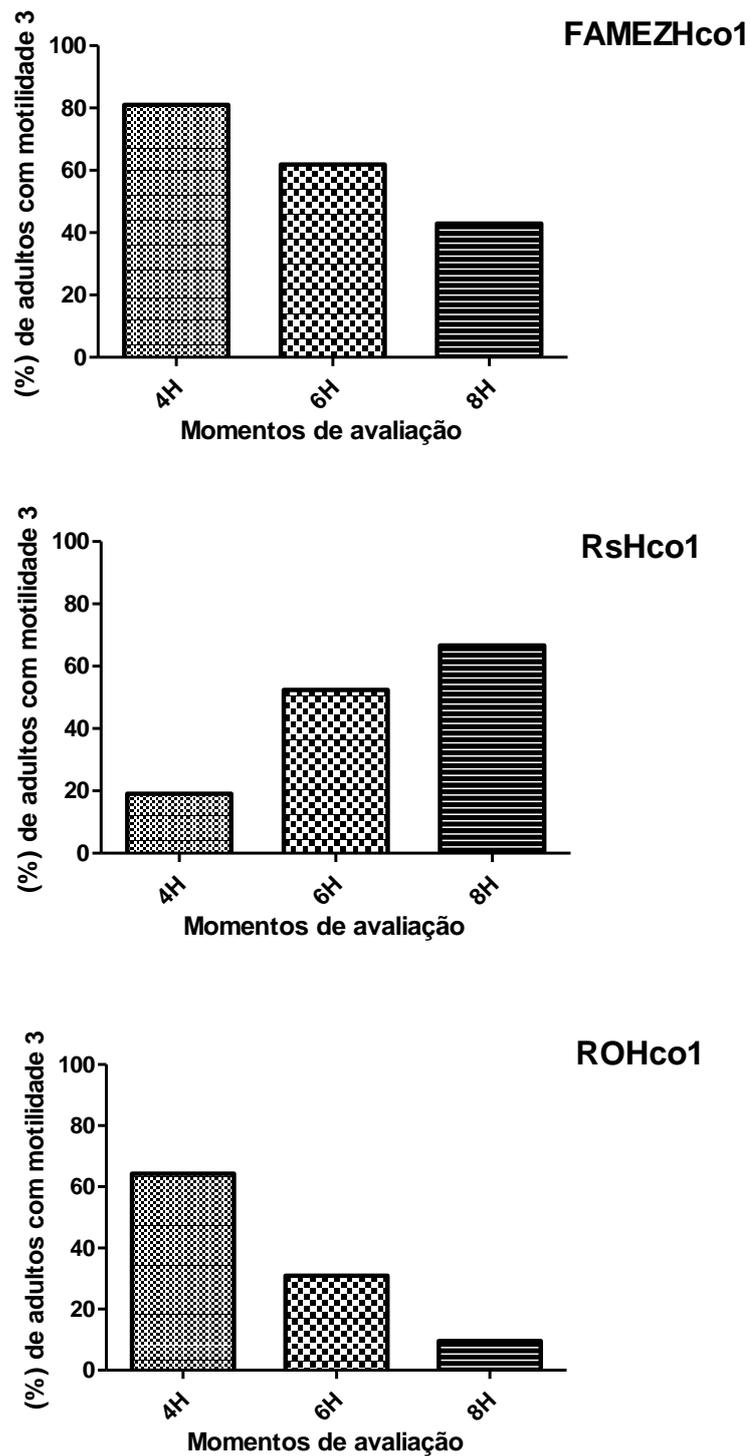
1219



1220

1221 Figura 3. Efeito da associação de ivermectina com quercetina sobre a motilidade de adultos de  
1222 *H. contortus*, isolado ROHco1.

1223



1224

1225 Figura 4. Distribuição da frequência de escores de motilidade para adultos de *H. contortus* dos  
 1226 isolados FAMEZHco1, RsHco1 e ROHco1 não submetidos a tratamento (controle). Cada  
 1227 coluna representa o percentual médio (média de 7 réplicas ou poços com 3 indivíduos adultos  
 1228 por poço) de indivíduos com motilidade 3 em cada momento de avaliação (4, 6 e 8 horas).

1229

1230

1231 **Considerações finais**

1232           Flavonoides devem ser avaliados com cautela, principalmente em testes *in vivo*, pois  
1233 sua farmacocinética é diferente da observada para os anti-helmínticos que estão presentes no  
1234 mercado. As incompatibilidades, entre resultados de testes *in vitro* e *in vivo*, são frequentes e  
1235 estão relacionadas ao comportamento farmacológico das drogas. As diferenças, quanto à  
1236 expressão de P-gp, entre as diferentes fases do ciclo de vida dos nematodas, também são fonte  
1237 de divergência entre resultados de avaliação *in vitro* e *in vivo* de moduladores e anti-  
1238 helmínticos. Para solucionar essa questão, testes *in vitro* devem ser realizados de forma que os  
1239 fármacos possam ser avaliados sobre diferentes estádios do parasito e contra isolados com  
1240 diferentes níveis de resistência.  
1241