



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**



**ASSOCIAÇÃO ENTRE LACTONAS MACROCÍCLICAS
CONTRA *HAEMONCHUS CONTORTUS***

MATHEUS TAKEMI MUCHON NAKATANI

**Campo Grande – MS
2020**

MATHEUS TAKEMI MUCHON NAKATANI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE LACTONAS MACROCÍCLICAS
CONTRA *HAEMONCHUS CONTORTUS***

Association among macrocyclic lactones against Haemonchus contortus

Matheus Takemi Muchon Nakatani

Orientador: Fernando de Almeida Borges

Coorientador: Dyego Gonçalves Lino Borges

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Campo Grande – MS
2020**

*“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,
porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.”*

Salmos 23:4

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas provações e por me permitir concluir este trabalho, iluminando meu caminho e me dando forças para seguir em frente quando nada estava à vista.

Agradeço aos meus pais, minha mãe Maria de Lourdes Muchon por sempre se preocupar e me apoiar em todos os momentos de minha vida, preocupando-se mais com meu bem estar e saúde do que com o dela própria, minha heroína! Meu pai Edson Mitio Nakatani por sempre me prover tudo, por me apoiar sob todas as circunstâncias e por me ensinar a andar com minhas próprias pernas. Vocês são meu exemplo e minha inspiração, amo muito vocês!

Agradeço ao meu irmão Miguel Takeo Muchon Nakatani por sempre estar ao meu lado, ser um grande exemplo, me ensinar a ser uma pessoa melhor e me dedicar ao trabalho e a família. Você é o meu melhor amigo.

Agradeço a minha noiva Nilce Maria Braum por ser meu amparo e meu estímulo, sempre disposta a ouvir, conversar e acolher no calor dos seus braços, agradeço ainda mais pelo nosso filho que está por vir, a maior alegria da minha vida! Você é a mulher da minha vida, amo muito você e nosso filho, meus maiores tesouros.

Agradeço, *in memoriam*, aos meus avós, meu avô Luis Takeo Nakatani, por sempre conversar, aconselhar e me apoiar na caminhada acadêmica. Minha avó Ana Michiko Iga Nakatani, por ser um exemplo de vida e superação, sempre alegre e dedicada, me ensinou o valor da honestidade e humildade. Ditian e batian sempre irei me esforçar ao máximo, “ganbatte”! Meu avô Miguel Muchon, o qual não tive a oportunidade de conhecer, mas ensinou o valor do trabalho e da honestidade para minha mãe, que os repassou para mim. Minha avó Catarina Muchon, por ser um exemplo de amor, benevolência e superação, sempre fazia o bem sem olha a quem. Estejam onde estiverem, sei que todos vocês iluminam meus passos todos os dias.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges, e meu coorientador, Dyego Gonçalves Lino Borges. Obrigado pela paciência, pela dedicação e pelo esforço. Agradeço também por me mostrarem o caminho do equilíbrio entre arte e ciência, sempre aguçando minha curiosidade sobre o universo da ciência e pesquisa, confiando e dando liberdade na execução deste trabalho. Vocês são meus exemplos no âmbito pessoal e profissional.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo, pelo auxílio no delineamento experimental e análise dos dados deste trabalho. Sua ajuda foi fundamental.

Agradeço aos membros do LADPAR, companheiros e amigos, Mário Henrique Conde, Mariana Green de Freitas, Antonio Jacinto Ramiro, Zelina dos Santos Freire, Juliane Tutija, Vinícius Duarte Rodrigues e Guilherme Henrique Reckziegel, pelo auxílio na limpeza das baias, pelas considerações sobre o trabalho, pelo auxílio nos testes, pelas conversas e pelas risadas durante essa fase da minha vida.

Agradeço a todos aqueles que não foram citados, que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

Este trabalho não é só meu, mas sim de todos nós! Muito obrigado a todos que colaboraram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
CAPÍTULO 1	8
Introdução.....	8
Objetivos	11
Revisão de literatura.....	12
Lactonas macrocíclicas.....	12
Mecanismos moleculares de resistência.....	14
Lactonas macrocíclicas x mecanismos moleculares de resistência.....	18
Moduladores de resistência anti-helmíntica.....	19
Referências.....	21
CAPÍTULO 2	30
Resumo.....	30
1. Introdução.....	31
2. Materiais e métodos.....	33
2.1. <i>Haemonchus contortus</i> : manutenção, produção e cultivo larval.....	33
2.2. Substâncias	34
2.3. Teste de inibição da migração larval (TIML).....	34
2.4. Delineamento e avaliação das associações.....	34
2.5. Estatística	35
2.5.1. Concentrações efetivas 50.....	35
2.5.2. Associações.....	36
3. Resultados.....	36
3.1. Concentrações efetivas 50.....	36
3.2. Associações.....	37
4. Discussão.....	41
5. Conclusões.....	44
6. Referências	44
ANEXO 1. Resolução de aprovação de projeto de mestrado	49
ANEXO 2. Certificado da comissão de ética no uso de animais	50

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l	Microlitros
ABA	Abamectina
ABC	ATP-dependente
AH	Anti-helmíntico
AKR	Aldo-ceto Redutase
AVM	Avermectina
CE50	Concentração Efetiva sobre 50% da população
Cl ⁻	Ion Cloreto
Coef.	Coeficientes de Regressão de Resposta Ajustado
CYP	Citocromo P450
DMSO	Dimetil sulfóxido
DOR	Doramectina
DP	Desvio Padrão
EP	Erro Padrão
EPR	Eprinomectina
Glu	Glutamato
GST	Glutathione S-transferase
HillSlope	Inclinação da Curva de Dose-resposta
IC	Intervalo de Confiança
IVM	Ivermectina
L3	Larva Infectante
LM	Lactonas Macroclícica
MBN	Milbemicina
MOX	Moxidectina
NGIs	Nematodas Gastrointestinais
P-gp	Glicoproteína-P
R ²	Coeficiente de Determinação
RA	Resistência Anti-helmíntica
RMD	Resistência à Múltiplas Drogas
SDR	Desidrogenases de Cadeias Curtas
SEL	Selamectina
TIML	Teste de Inibição da Migração Larval
Tween 80	Polisorbato 80
UDP-GT	Uridina Difosfato Glicuronil Transferase
VIF	Fator de Inflação da Variância

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração efetiva sobre 50% da população, inclinação da curva dose-resposta, coeficiente de determinação e intervalos de confiança das quatro lactonas macrocíclicas, contra isolado sensível e resistente a ivermectina.....37

Tabela 2. Análise de variância dos termos do modelo cúbico especial e quadrático de experimento de mistura simplex-centroid.....39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Delineamento das associações pelo modelo cúbico especial e quadrático de experimento de mistura simplex-centroid.....35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Configurações moleculares e radicais substituintes de diferentes lactonas macrocíclicas.....14

Figura 2. Esquema do metabolismo intracelular de xenobióticos.....15

Figura 3. Curvas dose-resposta de inibição da migração larval.....37

Figura 4. Gráficos ternários de contorno de misturas otimizado do delineamento experimental das quatro lactonas macrocíclicas.....38

Figura 5. Gráfico de traço de resposta COX.....40

Resumo

NAKATANI, M.T.M. Associação entre lactonas macrocíclicas contra *Haemonchus contortus*. 2020. 51p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

A resistência de nematodas gastrointestinais (NGIs) aos anti-helmínticos (AHs) químicos é um problema de caráter global, não havendo métodos alternativos suficientemente efetivos. Frente a isso, há a associação de diferentes AHs e o uso de moduladores de resistência. Porém, a associação de diferentes AHs pode ser inefetivo em situações de resistência à múltiplas drogas, enquanto que o uso de moduladores ainda é limitado pela alta variabilidade de resposta clínica, toxicidade e diferença de farmacocinética entre o modulador e a droga. Posto isso, outra alternativa que pode possibilitar o aumento de eficácia contra NGIs resistentes é associação de moléculas pertencentes ao mesmo grupo químico. Possível efeito aditivo, sinérgico ou antagônico, pode ser observado nas associações, sendo resultado das distintas farmacocinéticas, farmacodinâmicas e interações com mecanismos moleculares de resistência. No entanto, a metodologia estatística normalmente empregada pode limitar a observação dos efeitos, isso, considerando apenas o uso da média simples da eficácia obtida, compara a média simples esperada, de acordo com a associação das moléculas em uma única proporção. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo verificar se há efeito aditivo, antagônico ou sinérgico, da associação de diferentes lactonas macrocíclicas (LMs) contra *Haemonchus contortus*. Larvas infectantes (L3) de dois isolados, caracterizados como sensível (R_{SHco1}) e resistente (FAMEZHco1) à ivermectina, foram utilizados no teste de inibição da migração larval (TIML). Após estimada a concentração efetiva sobre 50% da população (EC₅₀) de abamectina (ABA), eprinomectina, (EPR), ivermectina (IVM) e moxidectina (MOX), para ambos os isolados, as associações foram delineadas pelo modelo cúbico especial e quadrático de experimento de mistura simplex-centroid. Efeito sinérgico foi observado na associação EPR+MOX contra o isolado sensível e nas associações EPR+MOX e IVM+MOX contra o isolado resistente, sendo também observado efeito antagônico da associação EPR+IVM+MOX. No isolado sensível foi verificado aumento de inibição em proporções maiores de EPR e em proporções menores das demais drogas, comparada à mistura de referência (mistura das quatro LMs em igual proporção – 0,25:1), enquanto que para o isolado resistente inibição superior à da mistura de referência foi observada em maiores proporções de IVM e em menores proporções de MOX e EPR. O efeito sinérgico de EPR+MOX, contra o isolado sensível, de ABA+IVM, EPR+MOX e IVM+MOX, contra o isolado resistente, e o efeito antagônico de EPR+IVM+MOX, são dependentes da associação de drogas com diferentes potências e das proporções utilizadas, sendo EPR e IVM as moléculas de maior impacto nesses efeitos.

Palavras-chave: resistência anti-helmíntica, *in vitro*, sinergismo

Abstract

The resistance of gastrointestinal nematodes (NGIs) to chemical anthelmintics (AHs) is a global problem, with no sufficiently effective alternative methods. Faced with this, there is the association of different AHs and the use of resistance modulators. However, the association of different AHs can be ineffective in situations of resistance to multiple drugs, while the use of modulators is still limited by the high variability of clinical response, toxicity and pharmacokinetic difference between the modulator and the drug. That said, another alternative that can enable increased efficiency against resistant NGIs is the association of molecules belonging to the same chemical group. Possible additive, synergistic or antagonistic effect, can be observed in the associations, resulting from the different pharmacokinetics, pharmacodynamics and interactions with molecular mechanisms of resistance. However, the statistical methodology normally used can limit the observation of effects, this, considering only the use of the simple average of the obtained efficiency, compares the simple average expected, according to the combination of the molecules in a single proportion. Therefore, the present study aimed to verify whether there is an additive, antagonistic or synergistic effect, of the combination of different macrocyclic lactones (MLs) against *Haemonchus contortus*. Infectious larvae (L3) from two isolates, characterized as sensitive (RsHco1) and resistant (FAMEZHco1) to ivermectin, were used in the larval migration inhibition test (TIML). After estimating the effective concentration on 50% of the population (EC50) of abamectin (ABA), eprinomectin, (EPR), ivermectin (IVM) and moxidectin (MOX), for both isolates, the combinations were outlined by the special cubic and quadratic model simplex-centroid mixing experiment. Synergistic effect was observed in the EPR + MOX combination against the sensitive isolate and in the EPR + MOX and IVM + MOX combinations against the resistant isolate, and an antagonistic effect of the EPR + IVM + MOX combination was also observed. In the sensitive isolate, an increase of inhibition was observed in higher proportions of EPR and in smaller proportions of the other drugs, compared to the reference mixture (mixture of the four LMs in equal proportion - 0.25: 1), whereas for the resistant isolate superior inhibition that of the reference mixture was observed in higher proportions of IVM and in lower proportions of MOX and EPR. The synergistic effect of EPR + MOX, against the sensitive isolate, of ABA + IVM, EPR + MOX and IVM + MOX, against the resistant isolate, and the antagonistic effect of EPR + IVM + MOX, are dependent on the association of drugs with different potencies and proportions used, with EPR and IVM being the molecules with the greatest impact on these effects.

Keywords: anthelmintic resistance, *in vitro*, synergism

CAPÍTULO 1

Introdução

A rentabilidade da atividade pecuária está fortemente ligada ao controle de nematodas gastrintestinais (NGIs), que pode ser realizado de duas principais formas: a primeira, realizada com o uso de anti-helmínticos químicos, enquanto a segunda, utiliza métodos alternativos sem o uso de quimioterápicos. Esse último, engloba o manejo de pastagem; controle biológico; suplementação nutricional; vacinação e seleção genética de animais resistentes aos NGIs (STEAR et al., 2006). Contudo, nenhum método alternativo ao controle químico, atualmente disponível, é suficientemente efetivo no controle de NGIs (WOLSTENHOLME et al., 2004). Segundo Jackson e Miller (2006), além da limitada eficácia, os métodos alternativos podem possuir elevado custo de aplicação e dificuldades de aplicação, acesso e disponibilidade de materiais e procedimentos.

Assim, os quimioterápicos se mantêm como principal método de controle. Entretanto, o tratamento massivo, a elevada frequência de tratamento e o regime de utilização de uma única droga foram alguns fatores que favoreceram o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica (RA) aos principais grupos químicos, representando um sério risco à produtividade (SHALABY, 2013). A RA pode ser resultado de diferentes processos: (i) modificação da estrutura molecular do alvo de ação da droga, tornando-a inefetiva; (ii) alteração de metabolismo que inativa ou remove a droga; (iii) mudança de distribuição da droga no organismo alvo, impossibilitando a droga de acessar seu local de ação ou (iv) o aumento da expressão de genes responsáveis pela regulação de mecanismos que reduzem a ação da droga (WOLSTENHOLME et al., 2004).

A baixa disponibilidade de drogas eficazes, aliada às limitações dos métodos alternativos e à ausência de perspectiva de desenvolvimento de novas moléculas, resultaram na demanda por pesquisa e desenvolvimento de métodos que potencializem a ação, retardem o desenvolvimento da RA ou recuperem a eficácia dos anti-helmínticos (AHs) disponíveis contra populações de NGIs resistentes. De acordo com Lanusse e Lifschitz (2014), as principais estratégias farmacológicas no uso de AHs, se baseiam na otimização farmacocinética (aumento de exposição do

34 parasita) e combinação de diferentes grupos químicos (diferentes níveis de
35 resistência, locais e modos de ação). A combinação de drogas pertencentes a
36 diferentes classes é uma boa opção para aumentar a eficácia e retardar o
37 desenvolvimento de RA, prolongando a vida útil das drogas (LEATHWICK, 2012).
38 A lógica do uso de combinações se baseia no fato de que indivíduos de uma
39 população podem ter menor grau de resistência a formulações de múltiplos
40 componentes, comparado a formulações de uma única molécula, no entanto, as
41 limitadas informações disponíveis não são claras sobre os potenciais efeitos
42 aditivos ou sinérgicos da coadministração de duas ou mais moléculas (LANUSSE
43 & LIFSCHITZ, 2014).

44 Desse modo, além do aumento de eficácia sobre indivíduos de uma
45 população de NGIs resistente, através dos diferentes modos de ação de cada
46 classe de moléculas, há a possibilidade de atuação sinérgica de diferentes drogas
47 sobre um mesmo receptor alvo e/ou mecanismo de detoxificação. As proteínas de
48 resistência a múltiplas drogas (RMD), descobertas na metade da década de 1970,
49 estão presentes em praticamente todos os organismos vivos (SARKADI et al.,
50 2006). E elas funcionam como uma barreira de permeabilidade transmembranar,
51 expulsando ativamente xenobióticos para fora das células (LESPINE et al., 2009),
52 e estão envolvidas no processo de RA por limitarem a eficácia dos quimioterápicos
53 (PRICHARD et al., 2012). O melhor entendimento da relação entre os mecanismos
54 moleculares de resistência e a falha terapêutica, resultou, também, na pesquisa e
55 desenvolvimento de substâncias com efeito modulador, sendo essas, associadas a
56 quimioterápicos já ineficazes, com a finalidade de restituir a eficácia da droga. No
57 entanto, até o presente momento, resultados observados *in vitro* não puderam ser
58 reproduzidos *in vivo*, isso, devido a toxicidade do modulador; elevada variabilidade
59 da resposta clínica; distinta farmacocinética e aumento da toxicidade do
60 quimioterápico utilizado (SHUKLA et al., 2008).

61 No contexto da combinação entre moléculas com efeito anti-helmíntico e/ou
62 moduladores de resistência contra NGIs resistentes, a associação de moléculas
63 pertencentes a mesma classe, com semelhante modo de ação, necessita também
64 ser explorada. Exemplo disso é a existência de uma única formulação comercial de
65 ivermectina + abamectina, disponível para bovinos, que apresentou maior eficácia
66 anti-helmíntica do que a ivermectina não associada, havendo também diferenças
67 na farmacocinética e na farmacodinâmica das moléculas quando associadas,

68 comparadas a ivermectina e abamectina não-associadas (BORGES et al., 2007;
69 BORGES et al., 2008; BALLENT et al., 2019). No caso das lactonas macrocíclicas
70 (LMs), as diferenças e semelhanças, relacionadas ao arranjo molecular,
71 farmacocinética e afinidade pelos mecanismos de resistência de cada
72 representante, podem possibilitar uma associação mais segura, estável e eficaz,
73 comparadas às associações atualmente disponíveis.

74 Assim, evidências, *in vitro* e *in vivo*, descritas na literatura (DIDIER e LOOR,
75 1996; SMITH e PRICHARD, 2002; BORGES et al., 2007; LESPINE et al., 2007;
76 BORGES et al., 2008; LLOBERAS et al., 2013; KOTZE et al., 2014; GODOY et al.,
77 2015a; GODOY et al., 2015b GODOY et al., 2016; BALLENT et al., 2019),
78 corroboram com a possibilidade de aumento de eficácia por efeito aditivo ou
79 sinérgico, mediante a associação de diferentes moléculas pertencentes a mesma
80 classe de anti-helmínticos, contra populações de NGIs resistentes, podendo ainda
81 haver um possível efeito modulador sobre os mecanismos moleculares de
82 resistência. Essa última possibilidade, além de estender a viabilidade das LMs e de
83 outros grupo químico existentes, e pode também, definir uma nova aplicação para
84 essas moléculas.

85 Objetivos

86

87 O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito, *in vitro*, de diferentes
88 associações entre abamectina, eprinomectina, ivermectina e moxidectina, contra
89 *Haemonchus contortus*.

90 Revisão de Literatura

91

92 Lactonas macrocíclicas

93

94 As LMs são um grande grupo de compostos hidrofóbicos, estruturalmente
95 semelhantes, amplamente utilizados em animais, humanos e para o controle de
96 pragas em plantações (LESPINE et al., 2009; PRICHARD et al., 2012).
97 Desenvolvidas na década de 1980, as LMs revolucionaram o controle químico
98 parasitário (MCKELLAR e BENCHAOUI, 1996), sendo os antiparasitários mais
99 utilizados em animais nos últimos 30 anos (LLOBERAS et al., 2013), devido sua
100 segurança clínica, elevado espectro de ação e facilidade de utilização (BURG et
101 al., 1979; MCKELLAR e BENCHAOUI, 1996; PRICHARD et al., 2012). O excelente
102 espectro de ação, contra endo e ectoparasitas, resultou na criação do termo
103 “endectocida” para designar essa classe de moléculas (MCKELLAR e
104 BENCHAOUI, 1996).

105 As LMs possuem diversos representantes, que podem ser de origem
106 biossintética, obtidas a partir de processos fermentativos de espécies de
107 actinobactérias do solo ou semissintética, produzidas a partir de modificações
108 estruturais de moléculas biossintéticas, utilizando processos físico-químicos. Além
109 disso, são subdivididas em avermectinas (AVMs) e milbemicinas (MBNs), de
110 acordo com a espécie de actinobactéria utilizada, assim, as AVMs são derivadas
111 da espécie *Streptomyces avermitilis*, enquanto as MBNs são provenientes das
112 espécies *S. hygroscopicus* e *S. cyaneogriseus* (BURG et al., 1979; DAVIES e
113 GREEN, 1986; SHOOP et al., 1995; PRICHARD et al., 2012).

114 Dentre as AVMs mais conhecidas, abamectina (ABA) e doramectina (DOR)
115 são biossintéticas, porém, a DOR é produzida a partir de uma cepa mutante de *S.*
116 *avermililis*, enquanto que eprinomectina (EPR), ivermectina (IVM) e selamectina
117 (SEL) são semissintéticas (PRICHARD et al., 2012; KIM et al., 2017). No caso das
118 MBNs, milbemicina oxima é produzida pela espécie *S. hygroscopicus*, enquanto
119 que a moxidectina (MOX) é uma molécula semissintética, produto da nemadectina,
120 produzida pela espécie *S. cyaneogriseus* (PRICHARD et al., 2012; KIM et al.,
121 2017).

122 Estruturalmente, as LMs são intimamente relacionadas à classe dos
123 antibacterianos macrolídeos, devido à presença de um anel macrocíclico de lactona
124 com 16 átomos (MISHIMA et al., 1975; FISHER e MROZIK, 1984; MCKELLAR e
125 BENCHAOUI, 1996), fundido, em um arranjo tridimensional, aos grupos espirocetal
126 e benzofurano (PRICHARD et al., 2012). Apesar da estrutura semelhante à dos
127 macrolídeos, as LMs não são usualmente agrupadas a essa classe, por não
128 apresentarem ação antibacteriana e nem antifúngica (BLIZZARD et al., 1990).

129 As semelhanças estruturais entre AVMs e MBNs se restringem à presença
130 do anel macrocíclico. As AVM se caracterizam pela presença de um dissacarídeo
131 na posição carbono 13 (C-13), ausente nas MBNs, enquanto as AVMs apresentam
132 radicais butil ou isopropil no C-25, as MBNs possuem radicais metil ou etil, além
133 disso, AVMs podem apresentar um ligação simples ou dupla entre C-22 e C-23, ao
134 passo que MBN apresentam uma ligação simples (BURG et al., 1979; TAKIGUCHI
135 et al., 1980; SHOOP et al., 1995), (Figura1).

136 As AVMs são produto da mistura de oito diferentes configurações
137 denominados A_1a , A_1b , A_2a , A_2b , B_1a , B_1b , B_2a e B_2b . Nessa nomenclatura, o
138 componente “A” representa um grupo metoxilo em C-5, enquanto “B” possui um
139 grupo hidroxila; o componente “1” apresenta uma dupla ligação entre C-22 e C-23,
140 enquanto que em “2” há uma ligação simples e uma hidroxila em C-23; e o
141 componente “a” representa um radical butil em C-25, enquanto “b” apresenta um
142 radical isopropil (SHOOP et al., 1995), (Figura 1).

143 A nomenclatura utilizada para designar as diferentes configurações de MBNs,
144 segue um padrão semelhante ao das AVMs, no entanto, inicialmente havia 13
145 diferentes configurações (α 1-10 e β 1-3), subdivididas entre A, B e C (SUNAZUKA
146 et al., 2002), posteriormente foram desenvolvidas as configurações D, E, F, G e H.
147 Basicamente as configurações “ α ” possuem um anel tetraidropirano fundido ao anel
148 macrocíclico (verdadeiros análogos das AVMs), enquanto que nas configurações
149 “ β ” o anel está ausente (DAVIES e GREEN, 1986), (Figura 1). Diferenças nos
150 radicais incluem grupos metoxila ou hidroxila na posição C-5, grupos etil, metil ou
151 propil em C-25 (DAVIES e GREEN, 1986; SHOOP et al., 1995), (Figura 1).

152

	AVERMECTINAS		MILBEMICINAS					
	X	R1(A)	R1(B)	R2(a)	R2(b)	R3	R1	R2
Ivermectina	CH ₂ - CH ₂	OCH ₃	OH	BUT	ISO	OH	-	-
Abamectina	CH = CH	OCH ₃	OH	BUT	ISO	OH	-	-
Doramectina	CH = CH	OCH ₃	OH	CICLOHEXANO		OH	-	-
Eprinomectina	CH = CH	OCH ₃	OH	BUT	ISO	NHCOCH ₃	-	-
Moxidectina	-	-	-	-	-	-	OH	DIMETIL- BUTIL
Milbemicina	-	-	-	-	-	-	OH	CH ₃ ou C ₂ H ₅
Milbemicina D	-	-	-	-	-	-	OH	CH(CH ₃) ₂
Milbemicina oxima	-	-	-	-	-	-	=NOH	CH ₃ ou C ₂ H ₅

153

154 **Figura 1.** Configurações moleculares e radicais substituintes de diferentes lactonas macrocíclicas.
 155 Butil – BUT e isopropil – ISO.

156

157 O potencial acaricida, inseticida e anti-helmíntico das LMs é devido ao
 158 aumento de permeabilidade da membrana plasmática aos íons cloreto (Cl⁻), através
 159 da interação das LMs com canais de Cl⁻ mediado pelo glutamato (GluCl),
 160 encontrados apenas em invertebrados, o influxo de Cl⁻ interrompe a ação inibitória
 161 ou excitatória muscular, levando a paralisia e consequente morte por inanição ou
 162 eliminação do parasito (ARENA et al., 1992; CULLY et al, 1994; CULLY et al, 1996;
 163 CLELAND, 1996). Adicionalmente, as LMs, em altas concentrações, podem atuar
 164 de forma secundária sobre canais mediados pelo ácido gama-aminobutírico (FENG
 165 et al., 2002), além da possível atuação sobre canais relacionados a histamina,
 166 dopamina, tirosina e serotonina (PRICHARD et al. 2012).

167

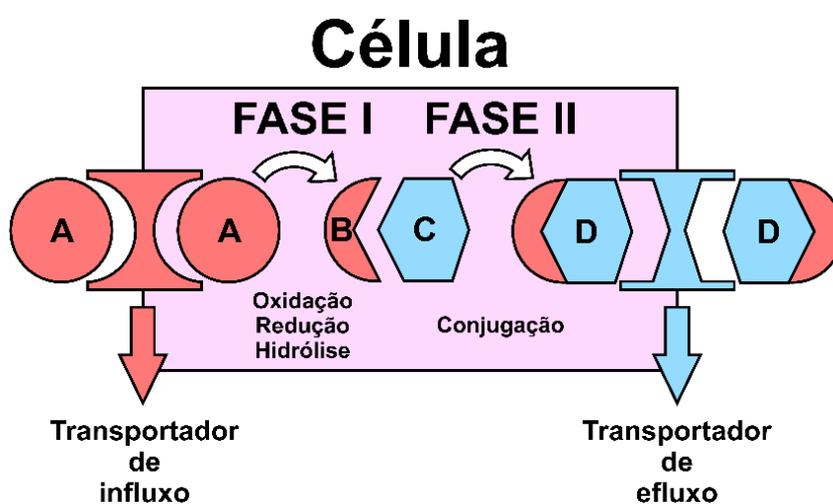
168 Mecanismos moleculares de resistência

169

170 Resistência à droga é definida como uma mudança de frequência gênica de
171 uma população, podendo ser espontânea ou resultado da seleção produzida pela
172 própria droga, na qual, uma quantidade maior de droga é necessária para produzir
173 o mesmo efeito antes da seleção (SHOOP, 1993). A ocorrência da resistência se
174 tornou o maior problema para o controle parasitário em animais de produção e está
175 globalmente difundida, tornando prioritária a pesquisa e identificação de mutações
176 gênicas relacionadas a esse fenômeno (GILLEARD, 2013).

177 Em todos os organismos, as enzimas biotransformadoras servem como uma
178 eficiente defesa contra a ação negativa dos xenobióticos, desativando e facilitando
179 sua excreção, em helmintos, pode causar redução de eficácia de AH (VOKŘÁL et
180 al., 2010). De acordo com Matoušková et al. (2016), em helmintos, a metabolização
181 intracelular de xenobióticos ocorrem em duas fases, na primeira fase ocorre a
182 oxidação, redução e hidrólise do xenobiótico, levando a exposição ou inserção de
183 porções hidrofílicas reativas na estrutura da molécula, na segunda fase, a droga ou
184 seus metabólitos são conjugados a compostos endógenos, possibilitando e/ou
185 facilitando o transporte ativo para fora da célula (Figura 2). Na primeira fase de
186 metabolização, os principais grupos enzimáticos responsáveis por esse processo
187 são: citocromo P450 (CYP); aldo-ceto redutase (AKR) e desidrogenases de cadeias
188 curtas (SDR), enquanto que na segunda fase, as enzimas responsáveis são:
189 glutiona S-transferase (GST) e uridina difosfato glicuronil transferase (UDP-GT)
190 (MATOUŠKOVÁ et al., 2016).

191



192

193 **Figura 2.** Esquema do metabolismo intracelular de xenobióticos. Droga (A), metabólito da droga
194 (B), composto endógeno (C) e conjugado metabólito-composto endógeno (D).

195

196 CYP é um grande grupo de enzimas encontradas em quase todos os
197 organismos vivos, sendo uma das mais importantes no metabolismo de
198 xenobióticos (Nelson et al., 1993). Aumento de efeito *in vitro* e/ou expressão genica
199 foi verificado em *Cooperia oncophora*; *Haemonchus contortus*; *Ostertagia ostertagi*
200 e *Trichostrongylus colubriformis* (KOTZE et al., 2006; ALGUSBI et al., 2014; LAING
201 et al., 2015), quando submetidos aos diferentes grupos de AH associados ou não
202 ao butóxido de piperonila, que é um inibidor do CYP.

203 Além do CYP, outros importantes grupos enzimáticos, relacionadas ao
204 metabolismo de primeira fase, também podem exercer grande influência sobre a
205 RA. De acordo com Penning (2015), os grupos enzimáticos AKR e SDR,
206 responsáveis pela redução de aldeídos e cetonas, realizam reações de
207 conformação funcional, sendo que, as AKR estão presentes em quase todos os
208 filos, representadas por proteínas oxidoredutases monoméricas, dependentes de
209 nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) e nicotinamida adenina
210 dinucleotídeo (NADH), possuem ampla especificidade de substrato e podem
211 transformar açúcares, aldeídos lipídicos, cetoesteróides, ceto-prostaglandinas e
212 agentes carcinogênicos.

213 As enzimas conjugadoras UDP-GT e GST, em *H. contortus*, além de
214 demonstrarem aumento significativo de atividade *in vitro*, quando expostos ao
215 albendazole e ao flubendazole, também demonstram menor atividade em cepa
216 sensível, comparado a cepas resistentes, sendo sua atividade dependente do
217 estresse oxidativo durante a ação da droga sobre o parasito, isso contribui para sua
218 sobrevivência e conseqüente desenvolvimento de resistência (VOKŘÁL et al.,
219 2010; VOKŘÁL et al., 2012; VOKŘÁL et al., 2013).

220 Além dos processos metabólicos, a resistência a múltiplas drogas (RMD),
221 está altamente correlacionada a proteínas de transporte de efluxo. As proteínas de
222 RMD, descobertas na metade da década de 1970, pertencem ao grupos das
223 proteínas ATP-dependentes (ABC) e estão presentes em praticamente todos os
224 organismos vivos (SARKADI et al., 2006). Em humanos, as três maiores ABC-RMD
225 incluem membros dos subgrupos *ABCB*, *ABCC* e *ABCG* (SARKADI et al., 2006).
226 Dentre as proteínas relacionada à RMD, a P-gp, principal representante do
227 subgrupo *ABCB*, expressa pelo gene *ABCB1* (*MDR1*), é a mais conhecida e
228 estudada. Enquanto proteínas *ABCB* possuem maior afinidade por grande
229 moléculas hidrofóbicas, proteínas *ABCC* e *ABCG* podem transportar moléculas

230 hidrofóbicas e grandes moléculas aniônicas (SARKADI et al., 2006). Portanto, a
231 competição de diferentes moléculas pelos sítios de ligação em *ABCC* e *ABCG*
232 reduz a participação dessas proteínas no desenvolvimento da resistência a
233 determinados quimioterápicos.

234 A glicoproteína-P (P-gp) foi a primeira ABC-RMD a ser relatada, funcionando
235 como uma barreira de permeabilidade transmembranar, expulsando ativamente
236 xenobióticos para fora das células (MEALEY, 2004; LESPINE et al., 2009). Nos
237 mamíferos são encontradas em vários órgãos atuando como barreira de proteção,
238 porém, também limitam a eficácia dos quimioterápicos, envolvidos na RA, devido à
239 baixa disposição das drogas no sítio de ação (KERBOEUF e GUÉGNARD, 2011;
240 PRICHARD et al., 2012). *Caenorhabditis elegans*, nematoda de vida livre
241 normalmente utilizado como modelo de análise, possui 14 genes homólogos de P-
242 gp, sendo encontrados 10 em *Haemonchus contortus*, dos quais, dois (*pgp-16* e
243 *pgp-17*) são isolados apenas em *H. contortus*, a P-gp é presente em todos os
244 estágios de desenvolvimento, de ovo à adulto (RIOU et al., 2005; LAING et al.,
245 2011; LAING et al., 2013). Através do uso da eletroforese, da imunofluorescência
246 e da imunomarcção com ouro, é possível verificar a presença e a localização da
247 P-gp nos tecidos dos diferentes estágios de desenvolvimento. Em adultos de *H.*
248 *contortus*, a P-gp está predominantemente presente nos tecidos do trato digestivo,
249 onde ocorrem altos níveis de transporte de membrana, particularmente
250 concentrada dentro da faringe, na localização das glândulas faríngeanas dorsal e
251 subventral (SMITH e PRICHARD, 2002; GODOY et al., 2015a). Em fêmeas adultas
252 é também observada elevada quantidade no tecido uterino (GODOY et al., 2016).
253 Sendo que na fase adulta há nível muito superior de transcrição de *pgp-16*,
254 comparado aos demais estágios evolutivos (ISSOUF et al., 2014). Nos ovos de *H.*
255 *contortus* é observada a presença de P-gp em diversas camadas da casca, estando
256 presente também no intestino e em diversas camadas das cutículas dos estádios
257 L1, L2 e L3, além da presença na bainha de L3, sendo que a distribuição de P-gp
258 nos ovos e nos adultos é mais uniforme, enquanto que nos estágios larvais há mais
259 concentrações pontuais, porém, no estágio L1 e L2 há concentrações maiores de
260 P-gp, comparado ao estágio L3 e aos adultos de *H. contortus* (RIOU et al., 2005).
261 As variações na localização e concentração de P-gp, nos diferentes estágios de
262 desenvolvimento, se deve a variação de ambiente de desenvolvimento e hábito
263 alimentar inerente a cada estágio.

264

265 Lactonas macrocíclicas x mecanismos moleculares de resistência

266

267 A eficácia das diferentes LMs é dependente da configuração molecular,
268 apresentando maior ou menor nível de interação com seus respectivos receptores
269 e proteínas de transporte (LESPINE et al., 2009). As diferentes configurações
270 moleculares das LMs também afetam a pressão de seleção de resistência,
271 segurança clínica e flexibilidade no uso das formulações (PRICHARD et al., 2012).
272 Diferenças de eficácia de LMs já foram demonstradas, utilizando diferentes
273 métodos *in vitro* e *in vivo*, contra NGIs de ovinos e bovinos (LIFSCHITZ et al., 2010;
274 De GRAEF et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013; KOTZE et al., 2014), sendo
275 verificada maior eficácia da MOX, comparado às AVMs.

276 De acordo com Pohl et al. (2011), a base molecular da resistência às LMs
277 ainda não é totalmente compreendida, porém, em alguns nematodas e artrópodes
278 a insensibilidade de canais GluCl é associada à resistência à IVM (DENT et al.,
279 2000; McCAVERA et al., 2009; KWON et al., 2010), enquanto que em artrópodes,
280 a resistência às LMs é também associada ao metabolismo oxidativo e hidrolítico
281 (SCOTT, 1989; ARGENTINE et al., 1992). Dentre os mecanismos
282 biotransformadores a CYP, responsável principalmente pelos processos oxidativos,
283 é o mecanismo mais estudado e que pode representar maior relevância na
284 resistência às LMs (ALVINERIE et al., 2001; KOTZE et al., 2006; KELLEROVÁ et
285 al., 2019; YILMAZ et al., 2019). Porém, para nematodas, não há informação
286 disponível sobre os demais mecanismos biotransformadores que precedem a
287 eliminação das LMs por ABC-MRDs.

288 Grande volume de informações sobre a relação de ABC-MRDs e a RA está
289 disponível. Nesse aspecto as distintas LMs apresentam significativas diferenças na
290 farmacocinética e no nível de afinidade com a P-gp, dependendo do tecido e do
291 estágio de desenvolvimento do nematoda, porém, utilizando diferentes métodos de
292 análise, a P-gp demonstra maior afinidade da pelas AVMs, comparadas a MOX
293 (LESPINE et al., 2007; LIFSCHITZ et al., 2010; GODOY et al., 2015a; GODOY et
294 al., 2015b; DAVID et al., 2016; GODOY et al., 2016). Essa diferença é muito
295 evidente no caso da *pgp-16*, a qual demonstra pouquíssima interação com a MOX,
296 comparado às AVMs, resultando em menor eliminação e conseqüente maior
297 eficácia contra *H. contortus*, devido ao prolongamento do período de permanência

298 e de ligação com os receptores alvo (GODOY et al., 2015b). A principal razão para
299 essas diferenças é o distinto coeficiente de partição (logP), tornando as molécula
300 mais ou menos hidrofóbicas, conseqüentemente alterando a capacidade de
301 absorção, período de permanência, velocidade de eliminação da droga e nível de
302 interação com a P-gp (LESPINE et al., 2009).

303 Nas AVMs a presença do dissacarídeo em C-13 reduz o logP dessas
304 moléculas, tornando-as menos hidrofóbicas comparado às MBNs, de forma
305 semelhante, porém menos marcante, funciona a dupla ligação entre C-22 e C-23,
306 presentes na ABA e EPR (LESPINE et al., 2009; KERBOEUF e GUÉGNARD, 2011;
307 GODOY et al., 2015b). As estruturas moleculares impactam diretamente na
308 afinidade da P-gp pelas LMs, sendo a presença do dissacarídeo fator determinante
309 na elevada afinidade da P-gp pelas AVMs, havendo afinidade de duas a três vezes
310 maior por ABA, DOR, EPR, IVM e SEL, comparas à IVM aglicona (ivermectina sem
311 o dissacarídeo em C-13) e a MOX (LESPINE et al., 2007; DAVID et al., 2016). Além
312 disso, MOX apresenta uma cadeia lateral olefínica em C-25 e um grupo metoxima
313 em C-23, sendo essas duas últimas estruturas específicas da MOX, não estando
314 presente em outras AVMs ou MBNs comerciais, porém, o impacto desses
315 substituintes nas propriedades físico-químicas ainda necessita ser determinado
316 (KERBOEUF e GUÉGNARD, 2011; PRICHARD et al., 2012; PRICHARD e GEARY,
317 2019). Essas características demonstram a elevada relação das LMs com a P-gp,
318 portanto, pode ser considerada o maior alvo de modulação, visando o aumento de
319 concentração das drogas (LESPINE et al., 2007).

320

321 Moduladores de resistência anti-helmíntica

322

323 Desde a descoberta da mediação de transportadores ABC na resistência a
324 quimioterápicos, esforços contínuos tem sido destinados ao desenvolvimento de
325 terapias que possibilitem bloquear ou inativar esses transportadores, aumentando
326 a concentração da droga no sítio de ação (KATHAWALA et al., 2015). A partir dessa
327 possibilidade, o termo “modulador de resistência” começou a ser utilizado.

328 A possibilidade de controle da atividade de transportadores ABC, foi
329 inicialmente verificada por Tsuruo et al. (1981), que observaram aumento na
330 eficácia de quimioterápicos utilizados no tratamento da leucemia (vincristina e
331 vimblastina), associados ao verapamil, contra células resistentes ao tratamento.

332 Posteriormente, diversas substâncias, com a capacidade controlar a atividade
333 desses transportadores, foram testadas.

334 Atualmente os moduladores de resistência são divididos em três gerações.
335 A primeira inclui verapamil, cyclosporina A e quinina (KATHAWALA et al., 2015),
336 substâncias utilizadas com outras finalidades, porém, atuam também como
337 substrato inibidor da P-gp (SRIVALLI e LAKSHMI, 2012). A segunda geração,
338 moléculas pertencentes a primeira, porém, com algumas modificações estruturais,
339 tornando-as mais eficazes e menos tóxicas, é representado pelo dexverapamil,
340 valsopodar e biricodar (SHUKLA et al, 2008; SRIVALLI e LAKSHMI, 2012;
341 KATHAWALA et al., 2015). A terceira geração é representada pelo tariquidar,
342 elacridar e mitotano, moléculas profundamente modificadas e com grande aumento
343 de potência, utilizando métodos quantitativos de relação estrutura-atividade e
344 triagem de alto rendimento, de acordo com parâmetros obtidos das duas primeiras
345 gerações (SHUKLA et al, 2008; SRIVALLI e LAKSHMI, 2012; KATHAWALA et al.,
346 2015).

347 Apesar do potencial modulador, as gerações atualmente disponíveis
348 apresentam limitações de aplicação, principalmente relacionadas a baixa eficácia
349 terapêutica e elevada toxicidade, portanto, novas abordagens e compostos com
350 potencial modulador estão sendo pesquisados e desenvolvidos (MOHAMMAD et
351 al., 2018). Toda a informação obtida das três primeiras gerações, aliada ao melhor
352 entendimento dos mecanismos de resistência, estão sendo utilizados visando o
353 desenvolvimento de uma quarta geração de moduladores de resistência.

354 De acordo com Lespine et al. (2007), as AVMs apresentam grande potencial
355 na reversão da RMD. Aumento de potência, *in vitro*, de quimioterápicos
356 antineoplásicos é verificado sobre células cancerígenas, quando associado a IVM,
357 sendo que a IVM possui elevada capacidade de inibir a atividade da P-gp, além
358 disso podem também inibir a atividade da ATPase da P-gp, levando a uma
359 exaustão energética pelo aumento de atividade (DIDIER e LOOR, 1996; ENEROTH
360 et al., 2001; LESPINE et al., 2007). Portanto o aumento de potência é,
361 possivelmente, resultado da ligação da IVM com proteínas de transporte,
362 responsáveis pela detoxificação celular, impedindo ou reduzindo a eliminação de
363 quimioterápicos. Porém, segundo Lespine et al. (2007), as diferentes LMs (ABA,
364 EPR, DOR, MOX e SEL) possuem distintos potenciais de inibição da P-gp. Essa
365 pode ser uma característica desejável ou indesejável, dependendo da formulação

366 e da combinação de drogas utilizadas. A capacidade das LMs em bloquear o sítio
367 de ligação, reduzir a atividade da P-gp e também causar exaustão energética, são
368 características altamente desejáveis nos moduladores de resistência. Além disso,
369 a elevada segurança clínica, as semelhanças e diferenças na farmacocinética e no
370 nível de interação com os mecanismos moleculares de resistência, tornam as LMs
371 fortes candidatas à uma nova classe de moduladores de resistência com atividade
372 anti-helmíntica.

373

374 Referências

375

376 AIGUSBI, S., KRÜCKEN, J., RAMÜNKE, S., von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.,
377 DEMELER, J. (2012). Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance
378 mechanisms in gastrointestinal nematodes of cattle. **Int. J. for Parasitol.**, v. 44, n.
379 9, p. 647-658.

380 ALMEIDA, G. D., FELIZ, D. C., HECKLER, R. P., BORGES, D. G., ONIZUKA, M.
381 K., TAVARES, L. E., PAIVA, F., BORGES, F. A. (2013). Ivermectin and moxidectin
382 resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of
383 *Cooperia* spp. in beef cattle, Mato Grosso do Sul, **Brazil. Vet. Parasitol.**, v. 191, p.
384 59–65.

385 ALVINERIE, M., DUPUY, J., EECKHOUTTE, C., SUTRA, J.F., KERBOEUF, D.
386 (2001). In vitro metabolism of moxidectin in *Haemonchus contortus* adult stages.
387 **Parasitol. Res.**, v. 87, n. 9, p. 702–704.

388 ARDELLI, B. F. (2013). Transport proteins of the ABC systems superfamily and their
389 role in drug action and resistance in nematodes. **Parasitol. Int.**, v. 62, n. 6, p. 639-
390 646.

391 ARENA, J. P., LIU, K. K., PARESS, P. S., SCHAEFFER, J. M., CULLY, D. F. (1992).
392 Expression of a glutamate-activated chloride current in *Xenopus* oocytes injected
393 with *Caenorhabditis elegans* RNA: evidence for modulation by avermectin. **Mol.**
394 **Brain Res.**, v. 15, p. 339-348.

395 ARGENTINE, J. A., CLARK, J. M., LIN, H. (1992). Genetics and Biochemical
396 Mechanisms of Abamectin Resistance in Two Isogenic Strains of Colorado Potato
397 Beetle. **Pest. Biochem. and Physiol.**, v. 44, p. 191-207.

398

399 BALLENT, M., CANTON, C., DOMINGUEZ, P., BERNAT, G., LANUSSE, C.,
400 VIRKEL, G., LIFSCHITZ, A. (2019). Pharmacokinetic-pharmacodynamic
401 assessment of the ivermectin and abamectin nematocidal interaction in cattle. **Vet.**
402 **Parasitol.**, Available online, 109010.

403 BLIZZARD, T., FISHER, M. H., MROZIK, H., SHIH, T. L. (1990). In **Recent**
404 **Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotics**; LUKACS, G., OHNO,
405 M.,Eds.; Springer-Verlag: New York, v. 1, p. 65-102.

406 BORGES, D. G. L., BORGES, F. A. (2016). Plants and their medicinal potential for
407 controlling gastrointestinal nematodes in ruminants. **Nemat.**, v. 3, p. 1-15, 2016.

408 BORGES, F. A., CHO, H. S., SANTOS, E., OLIVEIRA, G. P., COSTA, A. J. (2007).
409 Pharmacokinetics of a new long acting endectocide formulation containing 2.25%
410 ivermectin and 1.25% abamectin in cattle. **J. vet. Pharmacol. Therap.** v. 30, p. 62-
411 67.

412 BORGES, F. A., SILVA, H. C., BUZZULINI, C., SOARES, V. E., SANTOS, E.;
413 OLIVEIRA, G. P., COSTA, A. J. (2008). Endectocide activity of a new long-action
414 formulation containing 2.25% ivermectin + 1.25% abamectin in cattle. **Vet.**
415 **Parasitol.**, v. 155, p. 299–307.

416 BURG, R. W., MILLER, B. M., BAKER, E. E., BIRNBAUM, J., CURRIE, S. A.,
417 HARTMAN, R., KONG, Y-L., MONAGHAN, R. L., OLSON, G., PUTTER, I., TUNAC,
418 J. B., WALLICK, H., STAPLEY, E. O., OIWA, R., OMURA, S. (1979). Avermectins,
419 New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation.
420 **Antimic. Agents and Chemot.**, v. 15, n. 3, p. 361-367.

421 BYGARSKI, E. E., PRICHARD, R. K., ARDELLI, B. F. (2014). Resistance to the
422 macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P
423 glycoproteins: implications for control of of drug resistant parasitic nematodes. **Int.**
424 **J. Parasitol. Drugs Drug Res.**, v. 4, p. 143–151.

425 CLELAND, T. A. (1996). Inhibitory glutamate receptor channels. **Mol. Neurobiol.**,
426 v. 13, p. 97-136.

427 CULLY, D. F., PARESS, P. S., LIU, K. K., SCHAEFFER, J. M., ARENA, J. P. (1996).
428 Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel
429 sensitive to the antiparasitic agent avermectin. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 33, p.
430 20187-20191.

431

432 CULLY, D. F., VASSILATIS, D. K., LIU, K. K., PARESS, P. S., VAN der PLOEG, L.
433 H. T., SCHAEFFER, J. M. and ARENA, J. P. (1994). Cloning of an avermectin
434 sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. **Nat.**,
435 371:707-711.

436 DAVID, M., ANDRÉ, F., HASHEM, S., PRICHARD, R.K., ORLOWSKI, S.,
437 LESPINE, A. (2016). *In silico* analysis of the binding of anthelmintics to
438 *Caenorhabditis elegans* P-glycoprotein 1. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Res.**, v. 6,
439 n. 3, p. 299–313.

440 DAVID, M., LEBRUN, C., DUGUET, T., TALMONT, F., BEECH, R., ORLOWSKI,
441 S., ANDRÉ, F., PRICHARD, R.K., LESPINE, A. (2018). Structural model, functional
442 modulation by ivermectin and tissue localization of *Haemonchus contortus* P
443 glycoprotein-13. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Res.**, v. 8, p. 145–157.

444 DAVIES, H. G., GREEN, R. H. (1986). Avermectins and milbemycins. **Nat. Prod.**
445 **Rep.**, v. 3, p. 87-121.

446 De GRAEF, J., DEMELER, J., SKUCE, P., MITREVA, M., von SAMSON
447 HIMMELSTJERNA G., VERCRUYSSSE, J., CLAEREBOUT, E., GELDHOFF, P.
448 (2013). Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant *Cooperia*
449 *oncophora* isolate following in vivo and in vitro exposure to macrocyclic lactones.
450 **Parasitol.**, v. 140, n. 4, p. 499–508.

451 De GRAEF, J., SARREA, C., MILLS, B. J., MAHABIR, S., CASAERT, S., De WILDE,
452 N., Van WEYENBERG, M., GELDHOFF, P., MARCHIONDO, A., VERCRUYSSSE, J.,
453 MEEUS, P., CLAEREBOUT, E. (2012). Assessing resistance against macrocyclic
454 lactones in gastro-intestinal nematodes in cattle using the faecal egg count
455 reduction test and the controlled efficacy test. **Vet. Parasitol.**, v. 189, p. 378-382.

456 DENT, J. A., McHARDY, M. S., VASSILATIS, D. M., AVERY L. (2000). The genetics
457 of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Proce. of the Nat. Acad. of**
458 **Scie. of the USA**, v. 97, p. 2674–979.

459 DIDIER, A., LOOR, F. (1996). The abamectin derivative ivermectin is a potent P
460 glycoprotein inhibitor. **Anticancer Drugs.**, v. 7, p. 745–751.

461 ENEROTH, A., ASTROM, E., HOOGSTRAATE, J., SCHRENK, D., CONRAD, S.,
462 KAUFFMANN, H.M., GJELLAN, K. (2001). Evaluation of a vincristine resistant
463 Caco-2 cell line for use in a calcein AM extrusion screening assay for P-glycoprotein
464 interactio. **Europ. J. Pharm. Sci.**, v. 12, p. 205–214.

465 FENG, X. P., HAYASHI, J., BEECH, R. N., PRICHARD, R. K., (2002). Study of the
466 nematode putative GABA type-A receptor subunits: evidence for modulation by
467 ivermectin. **J. Neurochem.**, v. 83, p. 870-878.

468 FISHER, M. H., MROZIK, H. (1989). In **I ivermectin and Abamectin**; CAMPBELL,
469 W.C., Eds.; Springer-Verlag New York Inc., v. 1, p.1-23.

470 GILLEARD, J. S. (2013). *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study
471 anthelmintic drug resistance. **Parasitol.**,v. 140, n. 12, p. 1506-1522.

472 GODOY, P., CHE, H., BEECH, R.N., PRICHARD, R.K. (2015b). Characterization of
473 *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-16 and its interaction with the macrocyclic
474 lactone anthelmintics. **Mol. & Biochem. Parasitol.**, v. 204, p. 11-15.

475 GODOY, P., CHE, H., BEECH, R.N., PRICHARD, R.K. (2016). Characterisation of
476 P-glycoprotein-9.1 in *Haemonchus contortus*. **Paras. & Vect.**, v. 9, p. 52.

477 GODOY, P., LIAN, J., BEECH, R.N., PRICHARD, R.K. (2015a). *Haemonchus*
478 *contortus* Pglycoprotein 2: In situ localisation and characterisation of macrocyclic
479 lactone transport. **Int. J. Parasitol.**, v. 45, p. 85–93.

480 ISSOUF, M., GUÉGNARD, F., KOCH, C., Le VERN, Y., BLANCHARD-LETORT,
481 A., CHE, H., BEECH, R. N., KERBOEUF, D., NEVEU, C. (2014). *Haemonchus*
482 *contortus* P-glycoproteins interact with host eosinophil granules: a novel insight into
483 the role of ABC transporters in host-parasite interaction. **PLoS One.**, v. 9, n. 2,
484 e87802.

485 JACKSON, F., MILLER, J. (2006). Alternative approaches to control—Quo vadit?
486 **Vet. Parasitol.**, v. 139, p. 371–384.

487 KATHAWALA, R.J. GUPTA, P. ASHBY Jr., C.R. CHEN, Z.S. (2015). The
488 modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of
489 the past decade, **Drug Res. Updat.**, v. 18, p. 1–17.

490 KELLEROVÁ, P., MATOUŠKOVÁ, P., LAMKA, J., VOKŘÁL, I., SZOTÁKOVÁ, B.,
491 ZAJÍČKOVÁ, M., PASÁK, M., SKÁLOVÁ, L. (2019). Ivermectin-induced changes in
492 the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in *Haemonchus*
493 *contortus* female and male adults. **Vet. Parasitol.**, v. 273, p. 24-31.

494 KERBOEUF, D. & GUÉGNARD, F., 2011. Anthelmintics Are Substrates and
495 Activators of Nematode P Glycoprotein. **Antimic. Agents and Chemot.**, v. 55, n. 5,
496 p. 2224–2232.

497 KIM, M-S., CHO, W-J., SONG, M.C., PARK, S-W, KIM, K., KIM, E., LEE, N., NAM,
498 S-J., OH, K-H., YOON, Y. J. (2017). Engineered biosynthesis of milbemycins in the

499 avermectin high-producing strain *Streptomyces avermitilis*. **Microb. Cell Fact.**, v.
500 16, p. 9.

501 KOTZE, A. C., Le JAMBRE, L. F., O'GRADY, J. (2006). A modified larval migration
502 assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*,
503 and drug screening with Trichostrongylidae parasites. **Vet. Parasitol.**, v. 137, n. 3-
504 4, p. 294–305.

505 KOTZE, A.C., RUFFELL, A.P., KNOX, M.R., KELLY, G.A. (2014). Relative potency
506 of macrocyclic lactones in in vitro assays with larvae of susceptible and drug
507 resistant Australian isolates of *Haemonchus contortus* and *H. placei*. **Vet.**
508 **Parasitol.**, v. 203, p. 294–302.

509 KWON, D. H., YOON, K. S., CLARK, J. M., LEE, S. H. (2010). A point mutation in a
510 glutamated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted
511 spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. **Insect. Mol. Biol.**, v. 19, p. 583–591.

512 LAING, R., BARTLEY, D. J., MORRISON, A. A., REZANSOFF, A., MARTINELLI,
513 A., LAING, S. T., GILLEARD, J. S. (2015). The cytochrome P450 family in the
514 parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Int. J. Parasitol.**, v. 45, n. 4, p. 243-51.

515 LAING, R., HUNT, M., PROTASIO, A.V., SAUNDERS, G., MUNGALL, K., LAING,
516 S., JACKSON, F., QUAIL, M., BEECH, R., BERRIMAN, M., GILLEARD, J.S.,
517 (2011). Annotation of two large contiguous regions from the *Haemonchus contortus*
518 genome using RNA-seq and comparative analysis with *Caenorhabditis elegans*.
519 **PLoS One**, v. 6, n. 8, e23216.

520 LAING, R., KIKUCHI, T., MARTINELLI, A., TSAI, I. J., BEECH, R. N., REDMAN, E.,
521 HOLROYD, N., BARTLEY, D. J., BEASLEY, H., BRITTON, C., CURRAN, D.,
522 DEVANEY, E., GILABERT, A., HUNT, M., JACKSON, F., JOHNSTON, S. L.,
523 KRYUKOV, I., LI, K., MORRISON, A. A., REID, A. J., SARGISON, N., SAUNDERS,
524 G. I., WASMUTH, J. D., WOLSTENHOLME, A., BERRIMAN, M., GILLEARD, J. S.,
525 COTTON, J. A. (2013). The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*,
526 a key model parasite for drug and vaccine discovery. **Gen. Bio.**, v. 14, n. 8, R88.

527 LANUSSE, C.E., ALVAREZ, L., LIFSCHITZ, A. (2014). Pharmacological knowledge
528 and sustainable anthelmintic therapy in ruminants. **Vet. Parasitol.**, v. 204, p. 18-33.

529 LEATHWICK, D.M. (2012). Modelling the benefits of a new class of anthelmintic in
530 combination. **Vet. Parasitol.**, v. 186, p. 93-100.

531 LESPINE, A., DUPUY, J., ALVINERIE, M., COMERA, C., NAGY, T., KRAJCSI, P.,
532 ORLOWSKI, S. (2009). Interaction of macrocyclic lactones with the multidrug

533 transporters: the bases of the pharmacokinetics of lipid-like drugs. **Curr. Drug**
534 **Metab.**, v. 10, p. 272 – 288.

535 LESPINE, A., MARTIN, S., DUPUY, J., ROULET, A., PINEAU, T., ORLOWSKI, S.,
536 ALVINERIE, M. (2007). Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein:
537 structure–affinity relationship. **Europ. J. of Pharm. Sci.**, v. 30, p. 84–94.

538 LIFSCHITZ, A., SUAREZ, V.H., SALLOVITZ, J., CRISTEL, S.L., IMPERIALE, F.,
539 AHOUSSOU, S., SCHIAVI, C., LANUSSE, C. (2010). Cattle nematodes resistant to
540 macrocyclic lactones: comparative effects of P-glycoprotein modulation on the
541 efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. **Exp. Parasitol.** v.
542 125, p. 172–178.

543 LLOBERAS, M., ALVAREZ, L., ENTROCASSO, C., VIRKEL, G., BALLENT, M.,
544 MATE, L., LANUSSE, C., LIFSCHITZ, A. (2013). Comparative tissue
545 pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs
546 infected with resistant nematodes: Impact of drug treatments on parasite P
547 glycoprotein expression. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Res.**, v. 3, p. 20-27.

548 LLOBERAS, M., ALVAREZ, L., ENTROCASSO, C., VIRKEL, G., BALLENT, M.,
549 MATÉ, L., LANUSSE, C., LIFSCHITZ, A. (2012). Comparative tissue
550 pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs
551 infected with resistant nematodes: impact of drug treatments on parasite P
552 glycoprotein expression. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Res.**, v. 3, p. 20-27.

553 MATOUŠKOVÁ, P., VOKŘÁL, I., LAMKA, J., SKÁLOVÁ, L. (2016). The Role of
554 Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in
555 Helminths. **Trends Parasitol.**, v. 32, n. 6, p. 481-491.

556 McCAVERA, S., ROGERS, A. T., YATES, D. M., WOODS, D. J.,
557 WOLSTENHOLME, A. J. (2009). An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated
558 Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. **Mol.**
559 **Pharmacol.**, v. 75, n. 6, p. 1347–1355.

560 McKELLAR, Q. A., BENCHAOUI, H. A. (1996). Avermectins and milbemycins. **J.**
561 **Vet. Pharmacol. Therap**, v. 19, n. 5, p. 331-351.

562 MEALEY, K. L. (2004). Therapeutic implications of the MDR-1 gene. **J. Vet.**
563 **Pharmacol. Ther.**, v. 27, p. 257-264.

564 MISHIMA, H., KURABAYASHI, M., TAMURA, C., SATO, S., KUWANO, H., SAITO,
565 A. (1975). Structures of milbemycin B1, B2, and B3. **Tetrah. Letters**, v. 16, n. 10, p.
566 711-714.

567 MOHAMMAD, I. S., HE, W., YIN, L. (2018). Understanding of human ATP binding
568 cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR.
569 **Biomed. Pharmacother.**, v. 100, p. 335-348.

570 NELSON, D. R., KAMATAKI, T., WAXMAN, D. J., GUENGERICH, F.,
571 ESTABROOK, R. W., FEYEREISEN, R., GONZALEZ, F. J., COON, M. J.,
572 GUNSALUS, I. C., GOTOH, O., (1993). The P450 superfamily: update on new
573 sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes,
574 and nomenclature. **DNA Cell Biol.**, v. 12, p, 1-51.

575 PENNING, T. M. (2015). The aldo-ketoreductases (AKRs): overview. **Chem. Biol.**
576 **Interact.**, v. 234, p. 236–246.

577 POHL, P. C., KLAFKE, G. M., CARVALHO, D. D., MARTINS, J. R., DAFFRE, S.,
578 VAZ Jr., I. S., MASUDA, A. (2011). ABC transporter efflux pumps: A defense
579 mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Int. J. for**
580 **Parasitol.**, v. 41, p. 1323–1333.

581 PRICHARD, R. K., GEARY, T. G. (2019). Perspectives on the utility of moxidectin
582 for the control of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic
583 resistance. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Res.**, v. 10, p. 69-83.

584 PRICHARD, R., MÉNEZ, C., LESPINE, A. (2012). Moxidectin and the avermectins:
585 Consanguinity but not identity. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Res.**, v. 2, p. 134-153.

586 RIOU, M., KOCH, C., DELALEU, B., BERTHON, P., KERBOEUF, D. (2005).
587 Immunolocalisation of an ABC transporter, P-glycoprotein, in the eggshells and
588 cuticles of free-living and parasitic stages of *Haemonchus contortus*. **Parasitol.**
589 **Res.**, v. 96, p. 142–148.

590 SARKADI, B., HOMOLYA, L., SZAKACS, G., VARADI, A. (2006). Human multidrug
591 resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense
592 system. **Physiol. Rev.** 86:1179–1236.

593 SCOTT, J. G. (1989). Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in
594 pyrethroid resistant strains of house flies. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 34, p. 27-
595 31.

596 SHALABY, H. A. (2013). Anthelmintics Resistance; How to Overcome it? **Iranian J.**
597 **Parasitol.**, v. 8, n. 1, p. 18-32.

598 SHOOP, W. L. (1993). Ivermectin Resistance. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 5, p. 154-
599 159.

600

601 SHOOP, W. L., MROZIK, H., FISHER, M. H. (1995). Structure and activity of
602 avermectins and milbemycins in animal health. **Vet. Parasitol.**, v. 59, n. 2, p. 139-
603 156.

604 SHUKLA, S., WU, C-P, AMBUDKAR, S. V. (2008). Development of inhibitors of
605 ATP-binding cassette drug transporters – present status and challenges. **Expert**
606 **Opin. Drug Metab. Toxicol.**, v. 4, n. 2, p. 205-223.

607 SMITH, J. M., PRICHARD, R. K. (2002). LOCALIZATION OF P-GLYCOPROTEIN
608 mRNA IN THE TISSUES OF *HAEMONCHUS CONTORTUS* ADULT WORMS AND
609 ITS RELATIVE ABUNDANCE IN DRUG-SELECTED AND SUSCEPTIBLE
610 STRAINS. **J. Parasitol.**, v. 88, n. 3, p. 612–620.

611 SRIVALLI, K. M. R., LAKSHMI, P. K. (2012). Overview of P-glycoprotein inhibitors:
612 a rational outlook. **Brazil. J. of Pharm. Scie.**, v. 48, n. 3.

613 STEAR, M. J., DOLIGALSKA, M., DONSKOW-SCHMELTER, K. (2006).
614 Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. **Parasitol.**, v.
615 134, p. 139-151.

616 SUNAZUKA, T., OMURA, S., IWASAKI, S., ÔMURA, S. (2002). Chemical
617 Modifications of Macrolides. In: ÔMURA, S. Macrolids Antibiotics: chemistry, biology
618 and practice, second edition. **The well-being of farm animals: challenges and**
619 **solutions**. California, USA: Elsevier Science, p.99-165.

620 TAKIGUCHI, Y., MISHIMA, H., OKUDA, M., TERAÔ, M. (1980). Milbemycins, a new
621 family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical
622 properties. **The J. of Antib.**, v. 33, n. 10, p. 1120-1127.

623 TSURUO, T., LIDA, H., TSUKAGOSHI, S., SAKURAI, Y. (1981). Overcoming of
624 vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced
625 cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. **Cancer Res.**, v. 41, n. 5, p.
626 1967-1972.

627 VOKŘÁL, I. BÁRTÍKOVÁ, H., PRCHAL, L., STUHLÍKOVÁ, L., SKÁLOVÁ, L.,
628 SZOTÁKOVÁ, B., LAMKA, J., VÁRADY, M., KUBÍČEK, V. (2012). The metabolism
629 of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in
630 *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics.
631 **Parasitol.**, v. 139, p. 1309-1316.

632 VOKŘÁL, I., JIRÁSKO, R., STUHLÍKOVÁ, L., BÁRTÍKOVÁ, H., SZOTÁKOVÁ, B.,
633 LAMKA, J., VÁRADY, M., SKÁLOVÁ, L. (2013) Biotransformation of albendazole

634 and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains
635 susceptible and resistant to anthelmintics. **Vet. Parasitol.**, v. 196, p. 373–381.

636 VOKŘÁL, I., KRÍZOVÁ, V, LAMKA, J., KUBÍČEK, V., SZOTÁKOVÁ, B., VÁRADY,
637 M., NOBILIS M., SKÁLOVÁ, L. (2010). Effect of flubendazole on biotransformation
638 enzymes activities in *Haemonchus contortus*. **Open Parasitol. J.**, v. 4, p. 24-28.

639 WOLSTENHOLME, A. J., FAIRWEATHER, I., PRICHARD, R., SAMSON
640 HIMMELSTJERNA, G. SANGSTER, N. C. (2004). Drug resistance in veterinary
641 helminths. **Trends in Parasitol.**, v. 20, n. 10, p. 469-476.

642 YILMAZ, E., GERST, B., DEMELER, J. M., KRÜCKEN, J. (2019). Minimal
643 modulation of macrocyclic lactone susceptibility in *Caenorhabditis elegans* following
644 inhibition of cytochrome P450 monooxygenase activity. **Expe. Parasitol.**, v. 200, p.
645 61-66.

CAPÍTULO 2

Associação entre lactonas macrocíclicas contra *Haemonchus contortus*

Matheus Takemi Muchon Nakatani^{1*}, Dyego Gonçalvez Lino Borges¹, Carlos Alexandre Carollo², Fernando de Almeida Borges¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

* Autor correspondente

+5544998697492

matheus_takemi@hotmail.com

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

Avenida Senador Filinto Müller 2443, Ipiranga, Caixa Postal 549, CEP: 79074-460, Campo Grande-MS

Normatizado segundo o periódico: Veterinary Parasitology

<https://www.elsevier.com/journals/veterinary-parasitology/0304-4017/guide-for-authors>

Resumo

A resistência de nematodos gastrointestinais (NGIs) aos anti-helmínticos (AHs) químicos é um problema de caráter global, não havendo métodos alternativos suficientemente efetivos. Frente a isso, há a associação de diferentes AHs e o uso de moduladores de resistência. Porém, a associação de diferentes AHs pode ser inefetivo em situações de resistência à múltiplas drogas, enquanto que o uso de moduladores ainda é limitado pela alta variabilidade de resposta clínica, toxicidade e diferença de farmacocinética entre o modulador e a droga. Posto isso, outra alternativa que pode possibilitar o aumento de eficácia contra NGIs resistentes é associação de moléculas pertencentes ao mesmo grupo químico. Possível efeito aditivo, sinérgico ou antagônico, pode ser observado nas associações, sendo resultado das distintas farmacocinéticas, farmacodinâmicas e interações com mecanismos moleculares de resistência. No entanto, a metodologia estatística normalmente empregada pode limitar a observação dos efeitos, isso, considerando apenas o uso da média simples da eficácia obtida, compara a média simples esperada, de acordo com a associação das moléculas em uma única proporção. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo verificar se há efeito aditivo, antagônico ou sinérgico, da associação de diferentes lactonas macrocíclicas (LMs) contra *Haemonchus contortus*. Larvas infectantes (L3) de dois isolados, caracterizados como sensível (RsHco1) e resistente (FAMEZHco1) à ivermectina, foram utilizados no teste de inibição da migração larval (TIML). Após estimada a concentração efetiva sobre 50% da população (EC50) de abamectina (ABA), eprinomectina, (EPR), ivermectina (IVM) e moxidectina (MOX), para ambos

684 os isolados, as associações foram delineadas pelo modelo cúbico especial e quadrático de experimento de
685 mistura simplex-centroid. Efeito sinérgico foi observado na associação EPR+MOX contra o isolado sensível
686 nas associações EPR+MOX e IVM+MOX contra o isolado resistente, sendo também observado efeito
687 antagônico da associação EPR+IVM+MOX. No isolado sensível foi verificado aumento de inibição em
688 proporções maiores de EPR e em proporções menores das demais drogas, comparada à mistura de referência
689 (mistura das quatro LMs em igual proporção – 0,25:1), enquanto que para o isolado resistente inibição superior
690 à da mistura de referência foi observada em maiores proporções de IVM e em menores proporções de MOX e
691 EPR. O efeito sinérgico de EPR+MOX, contra o isolado sensível, de ABA+IVM, EPR+MOX e IVM+MOX,
692 contra o isolado resistente, e o efeito antagônico de EPR+IVM+MOX, são dependentes da associação de drogas
693 com diferentes potências e das proporções utilizadas, sendo EPR e IVM as moléculas de maior impacto nesses
694 efeitos.

695 **Palavras-chave: resistência anti-helmíntica, *in vitro*, sinergismo.**

696

697 **1. Introdução**

698

699 O controle de nematodas gastrintestinais (NGIs) é realizado principalmente de forma
700 química. Porém, o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica (RA), representa um risco
701 à sustentabilidade dessa forma de controle (Shalaby, 2013). A combinação de drogas
702 pertencentes a diferentes grupos químicos é uma alternativa válida para retardar o avanço da
703 RA e estender a vida útil dos anti-helmínticos (AHs) disponíveis (Anderson et al., 1988;
704 Smith, 1990; Lanusse et al., 2018). A combinação de diferentes drogas pode resultar em
705 efeito aditivo, antagônico ou sinérgico (Entrocasso et al., 2008; Fouquier e Guedj, 2015). O
706 efeito aditivo ocorre quando o efeito de duas drogas combinadas é igual à soma de suas
707 atividades independentes, enquanto que o efeito sinérgico ocorre quando a combinação
708 resulta em efeito superior ao aditivo (Entrocasso et al., 2008; Bartram et al., 2012). De acordo
709 com Bartram et al. (2012), inúmeros trabalhos indicam efeito aditivo de combinações de
710 moléculas anti-helmínticas pertencentes a diferentes grupos químicos, porém, apenas dois
711 (Anderson et al., 1991; Miller e Craig, 1996) reportam a possibilidade de efeito sinérgico. A
712 escassez de trabalhos com associações que demonstram efeito sinérgico é, aparentemente,
713 devido à baixa sensibilidade dos métodos de delineamento e análise utilizados. Além da
714 dificuldade de determinar o tipo de efeito observado, a combinação de diferentes AHs, pode
715 eventualmente se tornar inefetiva em caso de resistência a múltiplas drogas (RMD).

716 No combate à RMD, uma alternativa química é a atuação sobre transportadores ATP-
717 dependentes (ABC) responsáveis pela expulsão de quimioterápicos. A glicoproteína-P (P-
718 gp), dentre as ABC-RMD, é representante mais importante e maior alvo de modulação para

719 AHs (Lespine et al., 2007). Diversos trabalhos *in vitro*, utilizando moduladores de P-gp,
720 demonstram aumento de eficácia dos quimioterápicos, no entanto, esses resultados não
721 foram reproduzidos *in vivo*, devido a elevada toxicidade, elevada variabilidade da resposta
722 clínica e distinta farmacocinética entre droga e modulador (Shukla et al., 2008; Kathawala
723 et al., 2015; Borges, et al. 2020).

724 Frente a esses obstáculos, uma alternativa, que necessita ser melhor explorada e que
725 pode unir o efeito positivo da combinação de diferentes moléculas e da modulação da P-gp,
726 é associação de moléculas pertencentes a mesma classe de AHs. Nesse contexto, trabalhos
727 *in vivo*, utilizando uma formulação comercial ou a aplicação concomitante de formulações
728 separadas de duas lactonas macrocíclicas (LMs) (abamectina (ABA) + ivermectina (IVM)),
729 demonstraram aumento de eficácia e alterações de farmacológicas significativas,
730 comparadas aos princípios ativos não associados (Borges et al., 2007; Borges et al., 2008;
731 Ballent et al., 2019). Segundo Ballent et al. (2019), há possível efeito sinérgico da associação
732 de ABA+IVM contra NGIs.

733 As LMs são antiparasitários, estruturalmente semelhantes, subdivididos em
734 avermectinas (AVMs) e milbemicinas (MBNs), amplamente utilizados em animais e
735 humanos (Lespine et al., 2009; Prichard et al., 2012). Esses antiparasitários possuem elevada
736 segurança clínica e apresentam capacidade de modulação de atividade da P-gp, em distintos
737 níveis de acordo com a afinidade de cada molécula (Didier e Loor, 1996; Lespine et al.,
738 2007; Lloberas et al., 2013). Maior afinidade da P-gp pelas diferentes AVMs é observada,
739 comparada a moxidectina (MOX), uma MBN e a mais potente LM comercialmente
740 disponível (Lespine et al., 2007; David et al., 2016). A principal razão para as diferenças de
741 afinidade pela P-gp é o distinto coeficiente de partição (logP), tornando as moléculas mais
742 ou menos hidrofóbicas, alterando a capacidade de absorção, período de permanência,
743 velocidade de eliminação da droga e nível de interação com a P-gp (Lespine et al., 2009).
744 Nas AVMs a presença do dissacarídeo em C-13 reduz o logP dessas moléculas, tornando-as
745 menos hidrofóbicas comparado às MBNs, de forma semelhante, funciona a dupla ligação
746 entre C-22 e C-23, presentes na ABA e EPR (Lespine et al., 2009; Kerboeuf e Guégnard,
747 2011; Godoy et al., 2015b). A presença do dissacarídeo é fator determinante na afinidade da
748 P-gp pelas AVMs, havendo afinidade de duas a três vezes maior por abamectina,
749 doramectina, eprinomectina, ivermectina e selamectina, comparadas à ivermectina aglicona
750 (dissacarídeo ausente em C-13) e a MOX (Lespine et al., 2007; David et al., 2016). Além
751 disso, MOX apresenta uma cadeia lateral olefínica em C-25 e um grupo metoxima em C-23,

752 no entanto, o impacto desses substituintes nas propriedades físico-químicas ainda necessita
753 ser determinado (Kerboeuf e Guégnard, 2011; Prichard et al., 2012; Prichard e Geary, 2019).

754 O possível efeito sinérgico e modulação da P-gp, produzido pela associação de
755 diferentes LMs, pode prolongar a vida útil e estabelecer uma nova aplicação para esse grupo
756 químico como moduladores de resistência. Considerando a necessidade de definir o tipo de
757 efeito produzido pela associação de LMs já existente, e também de outras associações ainda
758 não consideradas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o tipo de efeito, *in vitro*, de
759 diferentes associações entre abamectina, eprinomectina, ivermectina e moxidectina, contra
760 *Haemonchus contortus*.

761

762 **2. Material e métodos**

763

764 2.1. *Haemonchus contortus*: manutenção, produção e cultivo larval

765 Foram utilizados dois isolados de *H. contortus*, mantidos sob criopreservação no
766 Laboratório de Doenças Parasitárias (LADPAR) na Universidade Federal de Mato Grosso
767 do Sul (UFMS), previamente caracterizados como sensível e resistente à ivermectina:

768 Isolado laboratorial RsHco1, gentilmente cedido pelo Professor Doutor Alessandro
769 Francisco Talamini do Amarante (Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho,
770 Botucatu, São Paulo), caracterizado como sensível à ivermectina por Borges et al. (2020).
771 Sensibilidade confirmada mediante teste de inibição de migração larval (CE50: $8,84 \times 10^{-5}$);

772 Isolado de campo FAMEZHco1, caracterizado fenotipicamente como resistente à
773 ivermectina por Borges et al. (2020), através de teste de redução de contagem de ovos por
774 gramas de fezes e de teste de inibição da migração larval. Resistência confirmada mediante
775 teste de inibição de migração larval (CE50: $3,92 \times 10^{-4}$).

776 Para a manutenção e produção de larvas infectantes (L3) de ambos os isolados, foram
777 utilizados dois ovinos, entre oito e doze meses de idade, sem raça definida, pesando 25 kg
778 cada, livres de infecção, confirmada mediante a realização da técnica de Willis no D+3, D+5,
779 D+7, D+14, D+21 e D+30 após o tratamento dos animais no D0 com triclorfon via oral
780 (Neguvon® - Bayer Saúde Animal – 100mg/kg), seguido de tratamento via oral no D+3 com
781 a associação de monepantel (Zolvix® - Novartis Saúde Animal – 2,5mg/kg) + closantel
782 (Closan® - Agener União – 5mg/kg) + fenbendazole (Panacur® - MSD Saúde Animal -
783 5mg/kg). Os animais foram mantidos isolados em baias separadas, higienizadas diariamente
784 com detergente e hipoclorito de sódio a 1%, recebiam alimento em forma de silagem a base
785 de milho, 5kg/animal/dia e possuíam acesso *ad libitum* à água.

786 Os animais foram experimentalmente infectados, por via oral, com 500 L3/kg, sendo
787 após 30 dias, realizadas coletadas de fezes diárias, diretamente da ampola retal, utilizadas
788 para o cultivo larval, seguindo o descrito por Roberts e O'Sullivan (1950). As L3s, extraídas
789 das coproculturas e utilizadas no teste, foram mantidas sob refrigeração a 10°C, por período
790 de sete dias, sendo a pureza dos isolados confirmada mediante identificação genérica, de
791 acordo com chave de identificação de Ueno e Gonçales (1998).

792

793 2.2. Substâncias

794 Todas as substâncias utilizadas eram em grau analítico de pureza, sendo elas ABA
795 (abamectina, Merck Sharp & Dohme Saúde Animal Ltda.), IVM (ivermectina, Merck Sharp
796 & Dohme Saúde Animal Ltda.), EPR (eprinomectina, KONO CHEM Co., Ltd.), MOX
797 (moxidectina, Zoetis Industria de Produtos Veterinários Ltda.), DMSO (dimetilsulfóxido,
798 Neon Comercial Ltda.) e Tween 80 (polisorbato 80, Neon Comercial Ltda.) .

799

800 2.3. Teste de inibição da migração larval (TIML)

801 Previamente ao teste, foi realizada a seleção das L3 viáveis com capacidade de
802 migração, utilizando o método de Baermann-Moraes, com tela de nylon de 25 µm de
803 abertura, por período de 12 horas. Após a seleção, apenas as L3s viáveis foram utilizadas no
804 teste de inibição da migração larval (TIML), adaptada por Demeler et al. (2010), com
805 modificações. Nos poços foram adicionados 1690 µl de solução fisiológica misturada com
806 Tween 80 a 1%, 90 µl de droga diluída em DMSO e 20 µl de suspensão larval, contendo de
807 90 a 100 L3, em solução fisiológica, perfazendo o volume final 1800 µl. As placas foram
808 incubadas a 27°C, em estufa BOD por 24 horas.

809 Todos os testes foram realizados com ambos os isolados de *H. contortus*, de modo
810 pareado e em triplicata, em conjunto ao controle negativo (DMSO - 0,5% + Tween 80 - 1%)
811 e positivo (L3 aquecidas a 60°C durante 10 minutos), utilizando placas de cultivo celular
812 com 24 poços.

813 Para a preparação das soluções estoque, os princípios ativos foram pesados e diluídos
814 em DMSO 100%, até a concentração de 10⁻² molar (M), sendo posteriormente congelados a
815 -5°C, utilizadas em até 30 dias após o preparo. A partir da diluição da solução estoque, foram
816 obtidas, de forma seriada, dez diferentes concentrações (10⁻⁴; 5x10⁻⁵; 10⁻⁵; 5x10⁻⁶; 10⁻⁶; 5x10⁻
817 ⁷; 10⁻⁷; 5x10⁻⁸; 10⁻⁸ e 5x10⁻⁹M) nos poços, com concentração final de DMSO a 0,5%.

818

819 2.4. Delineamento e avaliação das associações

820 Para a avaliação das associações pelo TIML foram utilizadas as concentrações
 821 efetivas sobre 50% da população (CE50), de cada molécula, estimadas no primeiro teste *in*
 822 *vitro* (Tabela 1). As proporções de drogas nas associações foram planejadas utilizando
 823 modelo cúbico especial e quadrático de experimento de mistura simplex-centroid da
 824 ferramenta de planejamento de mistura do programa Minitab® 18 (Quadro 1).
 825

Quadro 1. Delineamento das associações pelo modelo cúbico especial e quadrático de experimento de mistura simplex-centroid. Quantidade de abamectina (ABA), eprinomectina (EPR), ivermectina (IVM) e moxidectina (MOX) na mistura, de acordo com a CE50 de cada molécula, expressas em porcentagem.

Princípios ativos	ABA	EPR	IVM	MOX
Não associados	100%			
		100%		
			100%	
				100%
Associados	50%	50%		
	50%		50%	
	50%			50%
		50%	50%	
		50%		50%
			50%	50%
	33%	33%	33%	
	33%	33%		33%
	33%		33%	33%
		33%	33%	33%
	25%	25%	25%	25%
	62,5%	12,5%	12,5%	12,5%
	12,5%	62,5%	12,5%	12,5%
	12,5%	12,5%	62,5%	12,5%
12,5%	12,5%	12,5%	62,5%	

826

827 2.5. Estatística

828

829 2.5.1. Concentrações efetivas 50%

830 Curvas dose-resposta foram construídas, para cada princípio ativo, através de uma
 831 regressão não-linear de declive variável, seguindo a transformação logarítmica das
 832 concentrações ($X = \log X$) e normalização da resposta, expressa em porcentagem pela
 833 seguinte fórmula: % de inibição da migração larval = n° de larvas não-migrantes / n° de
 834 larvas não-migrantes + n° de larvas migrantes * 100. As CE 50 foram calculadas através da
 835 seguinte equação: $Y = 100 / (1 + 10^{((\text{LogCE50} - X) * \text{Hill Slope}))}$, no qual $Y = \text{Bottom} +$
 836 $(\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{Log EC50} - X) * \text{Hillslope}))}$, na qual $X = \log$ da concentração,
 837 $Y =$ larvas não migrantes (%), $\text{Bottom} =$ percentual mínimo de inibição, $\text{Top} =$ percentual
 838 máximo de inibição, e $\text{Hillslope} =$ inclinação da curva dose-resposta.

839 Foi calculado o coeficiente de determinação (R^2) de cada teste, para a avaliação da
840 qualidade de ajuste do modelo. Após a obtenção da CE50 de cada molécula, contra cada
841 isolado, foi calculado o fator de resistência de acordo com a seguinte fórmula: fator de
842 resistência = CE50 isolado resistente / CE50 isolado sensível. A significância das CE50 e
843 dos Hillslopes entre drogas e isolados foram avaliados pela ausência de sobreposição de
844 intervalos de confiança (IC).

845 O cálculo das CE50 e a construção gráfica das curvas dose-resposta foram realizadas
846 utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 8.

847

848 2.5.2. Associações

849 O delineamento das associações foi construído utilizando o planejamento simplex-
850 centroid para os modelos matemáticos cúbico especial e quadrático (Cornell, 2002). Foram
851 utilizados 19 pontos experimentais (Quadro 1), reproduzidos em duplicata, sendo a soma dos
852 componentes de cada ponto igual a 100%, de acordo com a CE50 das moléculas. A inibição
853 da migração larval, em porcentagem, foi utilizada como variável dependente na análise e
854 simulação das respostas. Após a análise de regressão, os modelos cúbico especial e
855 quadrático foram utilizados para simular as respostas dos componentes da mistura e
856 determinar a proporção teórica ótima da EC50 das moléculas.

857 O efeito das associações no TIML, comparado ao das drogas não associadas foi
858 avaliado pela análise de variância dos coeficientes de regressão de resposta ajustados (Coef)
859 das médias de inibição da migração larval das réplicas, com nível de significância menor
860 que 0,05. Coefs positivos com $p < 0,05$ demonstram efeito sinérgico entre os componentes
861 das associações, enquanto que Coefs negativos com $p < 0,05$ demonstram efeito antagônico.

862 O software Minitab® 18 (Minitab Inc., State College, PA, EUA) foi usado para
863 definir o delineamento experimental, realizar a análise estatística e construir os gráficos de
864 contorno ternários de mistura e traços de resposta COX.

865

866 3. Resultados

867

868 3.1. Concentrações efetivas 50

869 Na análise dos IC das CE50 (Tabela 1) de cada molécula, contra os isolados sensível
870 e resistente, foram observadas sobreposições dos IC da CE50, em ambos os isolados, entre
871 as drogas significativamente mais potentes, ABA e MOX, assim como entre as menos
872 potentes, EPR e IVM. Na comparação entre isolados, houve sobreposição de IC apenas para

873 ABA. Portanto, na comparação das CE50, entre isolados, EPR, IVM e MOX demonstram
 874 CE50 significativamente menores contra o isolado sensível. Os fatores de resistência,
 875 calculados a partir das CE50, apresentado pelo isolado resistente, comparado ao sensível,
 876 para ABA, MOX, IVM e EPR, foram respectivamente: 1,48; 1,61; 4,43 e 5,33.

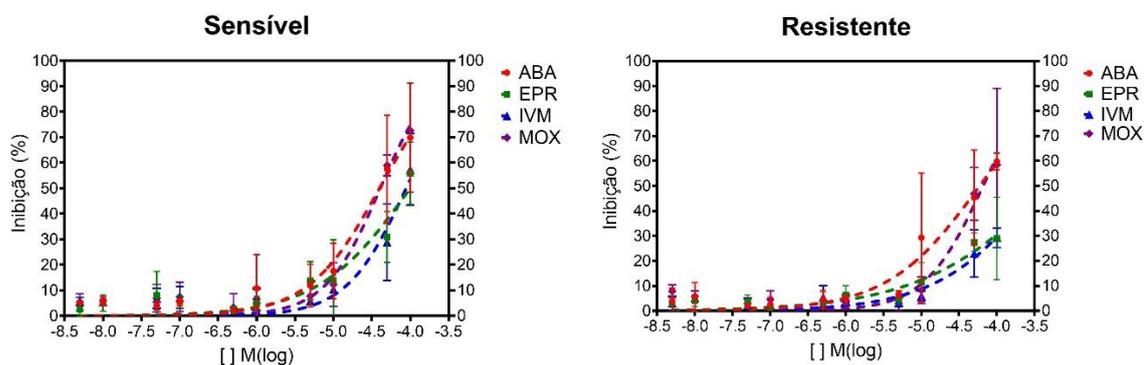
877

Tabela 1. Concentração efetiva sobre 50% da população (CE50), inclinação da curva dose-resposta (Hillslope), coeficiente de determinação (R²) e intervalos de confiança (IC) de abamectina (ABA), e moxidectina (MOX), ivermectina (IVM) e eprinomectina (EPR), contra isolado sensível e resistente.

Variáveis	Sensível				Resistente			
	ABA	MOX	IVM	EPR	ABA	MOX	IVM	EPR
EC50	3,98x10 ⁻⁵	4,07x10 ⁻⁵	8,84x10 ⁻⁵	9,98x10 ⁻⁵	5,90x10 ⁻⁵	6,56x10 ⁻⁵	3,92x10 ⁻⁴	5,32x10 ⁻⁴
	2,82x10 ⁻⁵	3,39x10 ⁻⁵	6,97x10 ⁻⁵	6,80x10 ⁻⁵	3,94x10 ⁻⁵	4,89x10 ⁻⁵	2,12x10 ⁻⁴	2,25x10 ⁻⁴
IC	~	~	~	~	~	~	~	~
	5,72x10 ⁻⁵	4,87x10 ⁻⁵	1,31x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁴	1,01x10 ⁻⁴	9,35x10 ⁻⁵	1,17x10 ⁻³	2,71x10 ⁻³
Hillslope	0,9384	1,205	1,12	0,7224	0,7124	1,121	0,6372	0,4915
	0,6434	0,9661	0,6863	0,4681	0,4977	0,7496	0,4303	0,3213
IC	~	~	~	~	~	~	~	~
	1,369	1,521	2,105	1,164	1,010	1,722	0,9410	0,7489
R ²	0,8315	0,9362	0,8015	0,7796	0,8023	0,7960	0,8002	0,7211

878

879 Na inclinação das curvas dose-resposta (Hillslope), ausência de sobreposição de IC
 880 foi verificada apenas entre MOX e EPR no isolado sensível (Tabela1). Nas curvas dose-
 881 resposta (Figura 3) ABA e MOX, em ambos os isolados, demonstraram maior deslocamento
 882 à esquerda (maior capacidade de inibição sob as mesmas concentrações) comparadas a IVM
 883 e EPR.



884

885 **Figura 3.** Curvas dose-resposta de inibição da migração larval de abamectina (ABA), eprinomectina (EPR),
 886 ivermectina (IVM) e moxidectina (MOX), contra o isolado sensível e resistente.

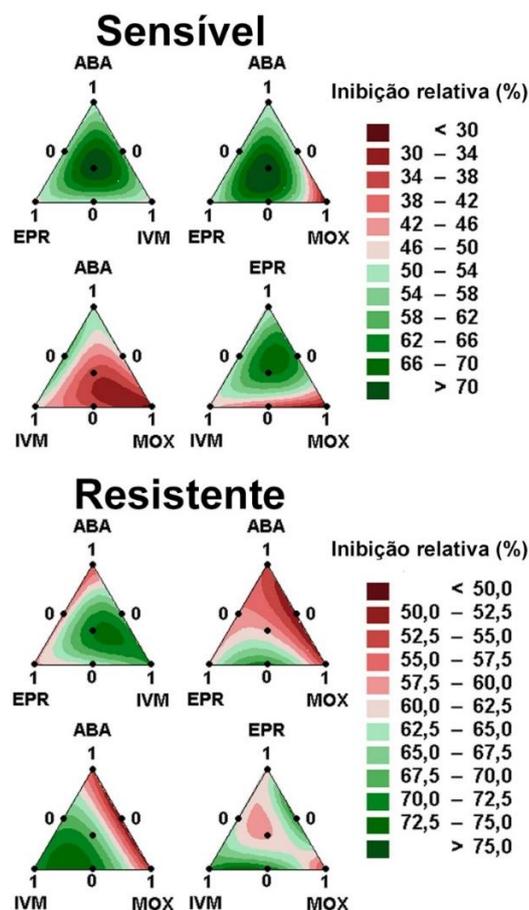
887

888 3.2. Associações

889 De acordo com os gráficos ternários de contorno de mistura (Figura 4), a área que
 890 engloba maior inibição da migração larval relativa contra o isolado sensível, no contorno
 891 ABA-EPR-IVM, apresenta pequeno deslocamento em direção a maiores proporções de
 892 ABA e IVM. No contorno ABA-EPR-MOX a área de maior inibição está deslocada em

893 direção a maiores proporções de EPR e MOX. No contorno ABA-IVM-MOX, a área com
 894 maior inibição está restrita a elevadas proporções de ABA e IVM. No contorno EPR-IVM-
 895 MOX é observado maior deslocamento da área de maior inibição em direção a maiores
 896 proporções de EPR e MOX.

897 Para o isolado resistente, a área com maior inibição no contorno ABA-EPR-IVM está
 898 deslocada em direção a maiores proporções de IVM. No contorno ABA-EPR-MOX a área
 899 de maior inibição está deslocada em direção a maiores proporções de EPR. Para o contorno
 900 ABA-IVM-MOX, a área de maior inibição se encontra deslocada em direção a maiores
 901 proporções de IVM. No contorno EPR-IVM-MOX, a área de maior inibição encontra-se
 902 restrita aos eixos IVM-MOX e EPR-MOX, com deslocamento em direção a maiores
 903 proporções de IVM e EPR. Em ambos os isolados menor inibição é observada em áreas com
 904 maior proporção de MOX.



905
 906
 907
 908
 909
 910
 911
 912

Figura 4. Gráficos ternários de contorno de misturas otimizado do delineamento experimental das quatro lactonas macrocíclicas. Áreas de inibição, variando entre a menor (vermelho escuro) e a maior (verde escuro) porcentagem de inibição relativa, expressas em porcentagem, de acordo com a proporção de abamectina (ABA), eprinomectina (EPR), ivermectina (IVM) e moxidectina (MOX), contra o isolado sensível e resistente. Pontos pretos indicam pontos experimentais observáveis: ponto central – todas as drogas do contorno, associadas em igual proporção, 1 – droga não associada, 0 – ausência da droga do vértice oposto na associação.

913 Na análise de variância das associações do modelo cúbico especial (Tabela 2), a
 914 associação EPR+MOX, contra o isolado sensível, e EPR+MOX e IVM+MOX, contra o
 915 isolado resistente, demonstraram efeito sinérgico significativo ($p < 0,05$). A associação
 916 EPR+IVM+MOX demonstrou efeito antagônico significativo ($p < 0,05$). No modelo
 917 quadrático (Tabela 2) o efeito sinérgico significativo da associação EPR+MOX se manteve
 918 em ambos os isolados, havendo também efeito sinérgico significativo da associação
 919 ABA+IVM, contra o isolado resistente. As demais associações avaliadas, em ambos os
 920 modelos, não demonstraram efeitos significativos ($p > 0,05$).
 921

Tabela 2. Análise de variância dos termos do modelo cúbico especial e quadrático de experimento de mistura simplex-centroid. Associações de abamectina (ABA), eprinomectina (EPR), ivermectina (IVM) e moxidectina (MOX), contra o isolado sensível e resistente. Coeficientes de regressão de resposta ajustado (Coef.), erro padrão (EP), razão entre o Coef e EP (T) fator de inflação da variância (VIF), desvio padrão (DP) e coeficiente de determinação (R^2).

Modelo	Termos	Sensível				Resistente				VIF
		Coef.	EP	T	Valor- p	Coef.	EP	T	Valor- p	
Cúbico especial	ABA	50,01	7,85	-	-	54,18	4,31	-	-	2,45
	EPR	48,5	7,85	-	-	59,82	4,31	-	-	2,45
	IVM	47,56	7,85	-	-	70,17	4,31	-	-	2,45
	MOX	28,6	7,85	-	-	52,54	4,31	-	-	2,45
	ABA+EPR	15,9	39,5	0,40	0,692	3,6	21,7	0,17	0,869	2,49
	ABA+IVM	47,2	39,5	1,20	0,244	24,4	21,7	1,12	0,273	2,49
	ABA+MOX	34,9	39,5	0,88	0,386	-14,1	21,7	-0,65	0,523	2,49
	EPR+IVM	14	39,5	0,35	0,727	-9,3	21,7	-0,43	0,671	2,49
	EPR+MOX	96,3*	39,5	2,44	0,023	58,7*	21,7	2,71	0,013	2,49
	IVM+MOX	-3,1	39,5	-0,08	0,939	45,7*	21,7	2,11	0,046	2,49
	ABA+EPR+IVM	421	277	1,52	0,142	241	152	1,58	0,127	2,25
	ABA+EPR+MOX	412	277	1,49	0,150	-29	152	-0,19	0,848	2,25
	ABA+IVM+MOX	-400	277	-1,44	0,162	85	152	0,56	0,583	2,25
	EPR+IVM+MOX	348	277	1,26	0,221	-319*	152	-2,10	0,047	2,25
ABA+EPR+IVM+MOX	-3707	2688	-1,38	0,181	1746	1476	1,18	0,249	2,36	
		DP=		R ² =		DP=		R ² =		
		11,3986		0,6291		6,26126		0,6747		
Quadrático	ABA	49,7	8,35	-	-	53,16	4,68	-	-	2,41
	EPR	46,5	8,35	-	-	59,73	4,68	-	-	2,41
	IVM	47,4	8,35	-	-	69,81	4,68	-	-	2,41
	MOX	28,4	8,35	-	-	52,81	4,68	-	-	2,41
	ABA+EPR	49,9	36,6	1,36	0,183	19,9	20,5	0,97	0,340	1,86
	ABA+IVM	38,1	36,6	1,04	0,307	46,7*	20,5	2,28	0,031	1,86
	ABA+MOX	25,4	36,6	0,69	0,494	-6,1	20,5	-0,30	0,769	1,86
	EPR+IVM	44,7	36,6	1,22	0,233	-8,4	20,5	-0,41	0,684	1,86
	EPR+MOX	127*	36,6	3,46	0,002	45,2*	20,5	2,21	0,036	1,86
	IVM+MOX	-16	36,6	-0,44	0,665	38,3	20,5	1,87	0,072	1,86
		DP=		R ² =		DP=		R ² =		
		12,2350		0,4798		6,85216		0,5357		

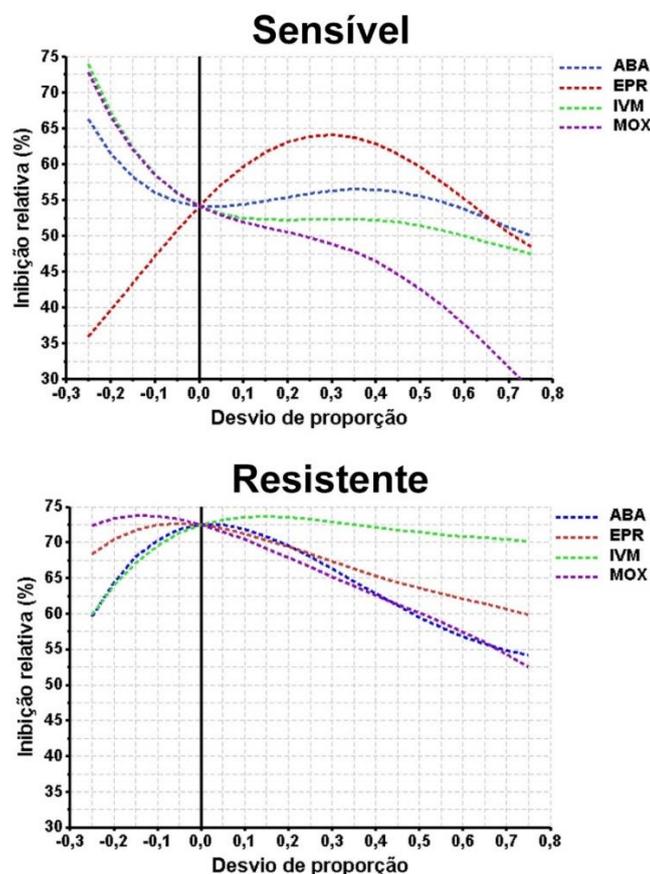
*Coeficiente de regressão de resposta ajustado da associação, estatisticamente significativo ($p < 0,05$) pela análise de variância, comparado as drogas não associadas.

922

923 De acordo com o gráfico COX de desvio de proporção da CE50 de cada droga (Figura
924 5), para o isolado sensível, tendo como referência a mistura das quatro drogas em igual
925 proporção (0,0 = 0,25:1), proporções de EPR entre 0,25:1 e 0,85:1 resultaram em inibições
926 superiores à da mistura de referência, havendo pico de inibição na proporção 0,55:1. Para
927 ABA, inibições superiores à da mistura de referência foram observadas em proporções
928 inferiores a 0,25:1 e entre 0,25:1 e 0,85:1. Para IVM e MOX, aumento de inibição foi
929 observado de acordo com a redução de proporção da CE50 na mistura.

930 No isolado resistente, foi verificado aumento de inibição, em proporções superior à
931 da mistura de referência, apenas para IVM, entre as proporções 0,25:1 e 0,60:1. Para ABA
932 e IVM, tanto o aumento, quanto a redução da proporção na mistura resultaram em redução
933 de inibição, comparado a mistura de referência. Para MOX, a redução da proporção na
934 mistura resultou em aumento de inibição, atingindo pico na proporção de 0,1:1.

935



936

937 **Figura 5.** Gráficos de traço de resposta COX. Inibição da migração larval relativa (%), de acordo com a
938 proporção de abamectina (ABA), eprinomectina (EPR), ivermectina (IVM) e moxidectina (MOX) na mistura,
939 contra o isolado sensível e resistente. Linha sólida (0,0): mistura de referência (0,25 da CE50 de cada droga).
940

941 De acordo com os gráficos ternários de contorno de misturas otimizado (Figura 4) e
942 os gráficos de traço resposta COX (Figura 5), para o isolado sensível, a associação
943 EPR+MOX apresentou proporção ótima teórica de 0,85:1 da CE50 de EPR + 0,15:1 da CE50
944 de MOX. No isolado resistente a proporção ótima teórica de ABA+IVM foi de 0,25:1 da
945 CE50 de ABA + 0,75:1 da CE50 de IVM da CE50, para a associação EPR+MOX, a
946 proporção ótima teórica foi de 0,6:1 da CE50 de EPR + 0,4:1 da CE50 de MOX, enquanto
947 que para IVM+MOX, a proporção ótima teórica foi de 0,65:1 da CE50 de IVM + 0,35:1 da
948 CE50 de MOX.

949

950 **4. Discussão**

951

952 De acordo com Cornell (2002), determinar o tipo de efeito (aditivo, antagonico e
953 sinérgico) de uma mistura é algo complexo, considerando o número de componentes, a
954 proporção e demais fatores que influenciam a resposta da mistura. A aplicação do modelo
955 cúbico especial e quadrático simplex-centroid, permite realizar a triagem do efeito de um
956 grande número de componentes em diferentes associações de forma simultânea,
957 possibilitando facilitar e acelerar o processo de identificação das combinações com maior
958 potencial. O modelo cúbico de análise já foi utilizado para identificar efeito sinérgico e
959 determinar a relação ótima, entre componentes e proporções de mistura de complexos
960 enzimáticos, utilizados na degradação de biomassa lignocelulósica, (Gao et al., 2010;
961 Laothanachareon et al., 2015). A racionalização do delineamento experimental através desse
962 método, é extremamente útil para aumentar a eficácia dos complexos enzimáticos, otimizar
963 seu uso e reduzir o custo de produção dos materiais (Gao et al., 2010; Laothanachareon et
964 al., 2015).

965 O modelo cúbico especial permite avaliar a resposta de um maior número
966 associações, incluindo misturas com mais de dois componentes, entretanto, o aumento do
967 número de comparações resulta no aumento do erro tipo II, consequência da
968 multicolinearidade entre as variáveis independentes, demonstrado pelo aumento de VIF,
969 como visto nesse estudo, o que resulta em menor sensibilidade para identificar efeito
970 sinérgico significativo. A aplicação do modelo quadrático, subsequente ao modelo cúbico,
971 possibilitou refinar a avaliação da resposta de associações com dois componentes, pela
972 redução da quantidade de comparações. O aumento de sensibilidade do método foi
973 demonstrado pela redução do VIF, resultando no aparecimento de efeito sinérgico da
974 associação ABA+IVM, contra o isolado resistente.

975 Maior eficácia da associação de ABA+IVM, já foi demonstrado contra isolados
976 mistos de NGIs de bovinos, utilizando formulação comercial (Borges et al., 2008), e
977 mediante a aplicação concomitante das moléculas suspensas em formulações separadas,
978 havendo nesse caso possível efeito sinérgico (Ballent et al., 2019). No presente trabalho foi
979 possível confirmar a possibilidade levantada por Ballent et al. (2019), sobre o efeito
980 sinérgico da associação de ABA+IVM, previamente observados *in vivo*, contra isolados
981 resistentes de NGIs há interação sinérgica significativa dessas moléculas.

982 O perfil de potência relativa das moléculas ($ABA \approx MOX > IVM \approx EPR$) contra os
983 isolados sensível e resistente, obtido no TIML, está próximo ao previamente observado por
984 Kotze et al. (2014), em teste de desenvolvimento larval. As diferentes potências relativas das
985 LMs são muito importantes para a relação sinérgica entre as moléculas, pois no presente
986 trabalho efeito sinérgico foi observado nas associações de moléculas mais potentes com as
987 menos potentes (ABA+IVM, MOX+EPR e MOX+IVM).

988 A P-gp apresenta elevada afinidade por EPR e IVM, possuem grande potência de
989 inibição de atividade desse transportador e também de inibição da atividade da ATPase,
990 sendo observado o oposto no caso da MOX (Lespine et al., 2007). Apartir dos resultados
991 obtidos no presente trabalho, é possível afirmar que os efeitos sinérgicos observados são
992 resultado da atuação de LMs com maior afinidade pela P-gp (EPR e IVM), possibilitando
993 prolongar a atuação de moléculas com maior potência relativa e menor nível de afinidade
994 (ABA e MOX), seja pelo bloqueio do sítio de ligação, pela redução de atividade ou pela
995 sobrecarga e exaustão energética do parasito (Didier e Loor, 1996; Eneroth et al., 2001;
996 Lespine et al., 2007). Nesse caso, grande atenção deve ser dada à EPR. Dentre as demais
997 LMs é a que mais se relaciona e com a P-gp e a primeira a apresentar redução de potência e
998 eficácia (Lespine et al., 2009; Kotze et al., 2014; David et al., 2016). Essa característica pode
999 ser muito valiosa no controle da RA. Sendo que, mesmo no isolado sensível foi verificado
1000 sinergismo da associação EPR+MOX. Outro resultado que sustenta a atuação das
1001 associações contra a P-gp é a ausência de outros efeitos sinérgicos contra o isolado sensível,
1002 não havendo diferença entre o uso das moléculas associadas ou não, à excessão de
1003 EPR+MOX. O isolado sensível teve seu uso previamente estabelecido como uma espécie de
1004 controle negativo, com a finalidade de demonstrar que o efeito sinérgico das associações,
1005 contra o isolado resistente, depende principalmente dos mecanismos moleculares de
1006 resistência.

1007 A capacidade de LMs atuarem como moduladores e possibilitarem a reversão da
1008 resistência (Lespine et al., 2007), principalmente se associadas, é muito mais atrativo que o

1009 uso de substâncias com potencial efeito modulador, devido a elevada segurança clínica e
1010 facilidade de utilização das LMs (Burg et al., 1979; McKellar e Benchaoui, 1996; Prichard
1011 et al., 2012). Substância como o verapamil (Demeler et al., 2013), quercetina (Bartley et al.,
1012 2009; Borges et al., 2020), elacridar, zosuquidar (Raza et al., 2015) e diversas outras
1013 substância já demonstraram capacidade de modulação da P-gp *in vitro*, algumas tendo sido
1014 associadas a diferentes AHs. No entanto, os resultados *in vitro* não se reproduzem *in vivo*,
1015 devido a elevada toxicidade, elevada variabilidade da resposta clínica e distinta
1016 farmacocinética entre droga e modulador (Shukla et al., 2008; Kathawala et al., 2015;
1017 Borges, et al. 2020). Portanto, a associação de LMs com diferentes potências e nível de
1018 interação com a P-gp, possibilitam a produção de formulações muito mais seguras, estáveis
1019 e efetivas, comparado ao uso de outras substâncias moduladoras de resistência, tendo em
1020 vista os resultados positivos já observado *in vivo* (Borges et al., 2007; Borges et al., 2008;
1021 Ballent et al., 2019).

1022 A razão do efeito antagônico da associação EPR+IVM+MOX, contra o isolado
1023 resistente, não é clara, mas pode estar relacionado com a super expressão de genes
1024 relacionados a P-gp e também a proporção das moléculas na mistura. *Caenorhabditis*
1025 *elegans*, nematoda de vida livre, normalmente utilizado como modelo de análise, possui 14
1026 genes homólogos de P-gp, sendo encontrados 10 em *H. contortus*, dos quais, dois (pgp-16 e
1027 pgp-17) são isolados apenas nele, estando a P-gp presente em todos os estágios de
1028 desenvolvimento, de ovo à adulto (RIOU et al., 2005; LAING et al., 2011; LAING et al.,
1029 2013). Esse grande número de genes podem ser expressos pelo parasito, em diferentes níveis
1030 e tecidos, dependendo do tipo e quantidade de droga ao qual é exposto. Em *C. elegans* a
1031 transcrição de diversos genes MRP aumenta após exposição à IVM e MOX, sendo que IVM
1032 induz mudanças na amplitude e no tempo de expressão em diferentes tecidos (Ardelli e
1033 Prichard, 2008; Ardelli e Prichard, 2013; Ardelli, 2013). A importância do tipo e quantidade
1034 de LM, utilizada na associação é demonstrado pelos gráficos ternários de contorno de
1035 mistura (Figura 4) e traço de resposta COX (Figura 5), havendo relação direta da inibição
1036 relativa com a proporção das drogas na mistura.

1037 O perfil de resposta das moléculas, quando em mistura, difere muito de acordo com
1038 o nível de resistência da população avaliada (Figura 5). No perfil de inibição relativa das
1039 moléculas, a associação de LMs foi mais efetiva contra a população resistente,
1040 principalmente com presença de EPR ou IVM na mistura, isso, demonstra que a efetividade
1041 das associações é dependente do nível de resistência, estando esse efeito, provavelmente,
1042 relacionado a ação dessas moléculas sobre os mecanismos de resistência, sendo que, no caso

1043 do isolado sensível, a possível reduzida presença e impacto desses mecanismos, resultou em
1044 inibições relativas muito próximas entre moléculas associadas e não associadas, tendo como
1045 excessão a EPR, com perfil de inibição superior quando associada. Por tanto, o uso de EPR
1046 ou IVM nas mistura é determinante para a observação de efeito sinérgico contra contra L3s
1047 de *H. contortus*.

1048 Os modelos utilizados podem predizer a proporção teórica ótima das associações,
1049 entretanto, o estabelecimento da proporção ótima real das moléculas, necessita de avaliação
1050 mais refinada, com maior número de proporções daquelas moléculas que apresentaram efeito
1051 sinérgico. Além disso, testes *in vivo* também necessitam serem realizados, com a finalidade
1052 de determinar a eficácia e a segurança clínica dessas associações.

1053

1054 **5. Conclusões**

1055

1056 O efeito sinérgico de EPR+MOX, contra o isolado sensível, de ABA+IVM,
1057 EPR+MOX e IVM+MOX, contra o isolado resistente, e o efeito antagônico de
1058 EPR+IVM+MOX, são dependentes da associação de drogas com diferentes potências e das
1059 proporções utilizadas, sendo EPR e IVM as moléculas de maior impacto nesses efeitos.

1060

1061 **Agradecimentos** – Os autores agradecem ao Professor Doutor Alessandro Francisco Talamini do
1062 Amarante por generosamente ceder o isolado de *H. contortus* sensível à ivermectina.

1063

1064 **Bem-estar animal** – Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de
1065 Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA número: 983/2018).

1066

1067 **Conflito de interesse** – Os autores declaram que não possuem conflitos de interesse.

1068

1069 **6. Referências**

1070

1071 Anderson, N., Martin, P.J., Jarret, R.G., 1988. Mixtures of anthelmintics: A strategy against
1072 resistance. **Aust. Vet. J.** 65, 62-64.

1073 Anderson, N., Martin, P.J., Jarrett, R.G., 1991. The efficacy of mixtures of albendazole
1074 sulphoxide and levamisole against sheep nematodes resistant to benzimidazole and
1075 levamisole. **Aust. Vet. J.** 68, 127–132.

- 1076 Ardelli, B. F., 2013. Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in
1077 drug action and resistance in nematodes. **Parasitol. Int.** 62 (6), 639-646.
- 1078 Ardelli, B.F., Prichard, R.K., 2008. Effects of ivermectin and moxidectin on the transcription
1079 of genes coding for multidrug resistance associated proteins and behaviour in
1080 *Caenorhabditis elegans*. **J. Nematol.** 40, 290–298.
- 1081 Ardelli, B.F., Prichard, R.K., 2013. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of
1082 *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. **Vet. Parasitol.** 191, 264–275.
- 1083 Ballent, M., Canton, C., Dominguez, P., Bernat, G., Lanusse, C., Virkel, G., Lifschitz, A.,
1084 2019. Pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of the ivermectin and
1085 abamectina nematocidal interaction in cattle. **Vet. Parasitol.** online, 109010.
- 1086 Bartley, D.J., McAllister, H., Bartley, Y., Dupuy, J., Ménez, C., Alvinerie, M., Jackson, F.,
1087 Lespine, A., 2009. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin
1088 susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia*
1089 *circumcincta* and *Haemonchus contortus*. **Parasitol.** 136, 1081–1088.
- 1090 Bartram, D.J., Leathwick, D.M., Taylor, M.A., Geurden, T., Maeder, S.J., 2012. The role of
1091 combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep
1092 nematodes. **Vet. Parasitol.** 186, 151-158.
- 1093 Borges, D.G.L., Araújo, M.A., Carollo, C.A., Carollo, A.R.H., Lifschitz, A., Conde, M.H.,
1094 Freitas, M.G., Freire, Z.S., Tutija, J.F., Nakatani, M.T.M., Borges, F.A., 2020.
1095 Combination of quercetin and ivermectin: In vitro and in vivo effects against
1096 *Haemonchus contortus*. **Acta Trop.** 201, 105213.
- 1097 Borges, F. A.; Cho, H. S.; Santos, E.; Oliveira, G. P.; Costa, A. J., 2007. Pharmacokinetics
1098 of a new long acting endectocide formulation containing 2.25% ivermectin and
1099 1.25% abamectin in cattle. **J. vet. Pharmacol. Therap.** 30, 62–67.
- 1100 Borges, F. A.; Silva, H. C.; Buzzulini, C.; Soares, V. E.; Santos, E.; Oliveira, G. P.; Costa,
1101 A. J., 2008. Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25%
1102 ivermectin + 1.25% abamectin in cattle. **Vet. Parasitol.** 155, 299–307.
- 1103 Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, S. A., Hartman, R., Kong, Y
1104 L., Monaghan, R. L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J. B., Wallick, H., Stapley, E. O.,
1105 Oiwa, R., Omura, S., 1979. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic
1106 Agents: Producing Organism and Fermentation. **Antimic. Agents and Chemot.** 15
1107 (3), 361-367.
- 1108 Cornell, J., 2002. **Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of**
1109 **Mixture Data**, third ed. Wiley, USA.

- 1110 David, M., André, F., Hashem, S., Prichard, R.K., Orlowski, S., Lespine, A., 2016. In silico
1111 analysis of the binding of anthelmintics to *Caenorhabditis elegans* P-glycoprotein 1.
1112 **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Res.** 6, (3), 299–313.
- 1113 Demeler, J., Gill, J.H., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2013. The *in vitro*
1114 assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep
1115 trichostrongyloids. **Int. J. Parasitol. Drug. Resist.** 3, 109–118.
- 1116 Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzike, A., Varady, M., Kenyon,
1117 F., Coles, G., Höglunde, J., Jackson, F., Vercruyse, J., von Samson-Himmelstjerna,
1118 G., 2010. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of
1119 resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. **Vet. Parasitol.**
1120 174, 58–64.
- 1121 Didier, A., Loor, F., 1996. The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein
1122 inhibitor. **Anticancer Drugs.** 7, 745–751.
- 1123 Eneroth, A.; Astrom, E.; Hoogstraate, J.; Schrenk, D.; Conrad, S.; Kauffmann, H.M.;
1124 Gjellan, K., 2001. Evaluation of a vincristine resistant Caco-2 cell line for use in a
1125 calcein AM extrusion screening assay for P-glycoprotein interactio. **Eur. J. Pharm.**
1126 **Sci.** 12, 205–214.
- 1127 Entrocasso, C., Alvarez, L., Manazza, J., Lifschitz, A., Borda, B., Virkel, G., Mottier, L.,
1128 Lanusse, C., 2008. Clinical efficacy assessment of the albendazole-ivermectin
1129 combination in lambs parasitized with resistant nematodes. **Vet. Parasitol.** 155, 249-
1130 256.
- 1131 Foucquier, J., Guedj, M., 2015. Analysis of drug combinations: current methodological
1132 landscape. **Pharmacol. Res. Perspect.** 3, e00149.fou
- 1133 Gao, D., Chundawat, S.P.S., Krishnan, C., Balan, V., Dale, B.E., 2010. Mixture optimization
1134 of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber
1135 expansion (AFEX) pretreated corn stover. **Bioresour. Technol.** 101, 2770–2781.
- 1136 Godoy, P., Che, H., Beech, R.N., Prichard, R.K., 2015b. Characterization of *Haemonchus*
1137 *contortus* P-glycoprotein-16 and its interaction with the macrocyclic lactone
1138 anthelmintics. **Mol. & Biochem. Parasitol.** 204, 11-15.
- 1139 Godoy, P., Lian, J., Beech, R.N., Prichard, R.K., 2015a. *Haemonchus contortus*
1140 Pglycoprotein 2: In situ localisation and characterisation of macrocyclic lactone
1141 transport. **Int. J. Parasitol.** 45, 85–93.

- 1142 Kathawala, R.J. Gupta, P. Ashby Jr., C.R. Chen, Z.S., 2015. The modulation of ABC
1143 transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade,
1144 **Drug Resist. Updat.** 18, 1–17.
- 1145 Kerboeuf, D., Guégnard, F., 2011. Anthelmintics Are Substrates and Activators of
1146 Nematode P Glycoprotein. **Antimic. Agents and Chemot.** 55 (5), 2224–2232.
- 1147 Kotze, A.C., Ruffell, A.P., Knox, M.R., Kelly, G.A., 2014. Relative potency of macrocyclic
1148 lactones in in vitro assays with larvae of susceptible and drug resistant Australian
1149 isolates of *Haemonchus contortus* and *H. placei*. **Vet. Parasitol.** 203, 294–302.
- 1150 Laing, R., Hunt, M., Protasio, A.V., Saunders, G., Mungall, K., Laing, S., Jackson, F., Quail,
1151 M., Beech, R., Berriman, M., Gilleard, J.S., 2011. Annotation of two large
1152 contiguous regions from the *Haemonchus contortus* genome using RNA-seq and
1153 comparative analysis with *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One** 6, (8), e23216.
- 1154 Laing, R., Kikuchi, T., Martinelli, A., Tsai, I. J., Beech, R. N., Redman, E., Holroyd, N.,
1155 Bartley, D. J., Beasley, H., Britton, C., Curran, D., Devaney, E., Gilabert, A., Hunt,
1156 M., Jackson, F., Johnston, S. L., Kryukov, I., LI, K., Morrison, A. A., Reid, A. J.,
1157 Sargison, N., Saunders, G. I., Wasmuth, J. D., Wolstenholme, A., Berriman, M.,
1158 Gilleard, J. S., Cotton, J. A., 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus*
1159 *contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. **Gen. Bio.** 14, 8, R88.
- 1160 Lanusse, C., Canton, C., Virkel, G., Alvarez, L., Costa-junior, L., Lifschitz, A., 2018.
1161 Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. **Trends**
1162 **Parasitol.** 34, 664–682.
- 1163 Laothanachareon, T., Bunternngsook, B., Suwannarangsee, S., Eurwilaichitr, L., Champreda,
1164 V., 2015. Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and
1165 pectinolytic enzymes to *Trichoderma reesei* cellulase on rice straw degradation.
1166 **Bioresour. Technol.** 198, 682–690.
- 1167 Lespine, A., Dupuy, J., Alvinerie, M., Comera, C., Nagy, T., Krajcsi, P., Orłowski, S., 2009.
1168 Interaction of macrocyclic lactones with the multidrug transporters: the bases of the
1169 pharmacokinetics of lipid-like drugs. **Curr. Drug Metab.** 10, 272 – 288.
- 1170 Lespine, A.; Martin, S.; Dupuy, J.; Roulet, A.; Pineau, T.; Orłowski, S.; Alvinerie, M., 2007.
1171 Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure–affinity
1172 relationship. **Europ. J. Pharm. Scie.** 30, 84–94.
- 1173 Lloberas, M.; Alvarez, L.; Entrocasso, C.; Virkel, G.; Ballent, M.; Mate, L.; Lanusse, C.;
1174 Lifschitz, A., 2013. Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of
1175 moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes:

1176 Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression. **Int. J. Parasitol.**
1177 **Drugs Drug Res.** 3, 20-27.

1178 McKellar, Q.A., Benchaoui, H.A., 1996. Avermectins and milbemycins. **J. Vet. Pharmacol.**
1179 **Therap.** 19 (5), 331-351.

1180 Miller, D.K., Craig, T.M., 1996. Use of anthelmintic combinations against multiple resistant
1181 *Haemonchus contortus* in Angora goats. **Small Ruminant Res.** 19, 281–283.

1182 Prichard, R. K., Geary, T. G., 2019. Perspectives on the utility of moxidectin for the control
1183 of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic resistance. **Int. J.**
1184 **Parasitol. Drugs Drug Res.** 10, 69-83.

1185 Prichard, R., Ménez, C., Lespine, A., 2012. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity
1186 but not identity. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Res.** 2, 134-153.

1187 Raza, A., Kopp, S.R., Jabbar, A., Kotze, A.C., 2015. Effects of third generation P
1188 glycoprotein inhibitors on the sensitivity of drug-resistant and -susceptible isolates
1189 of *Haemonchus contortus* to anthelmintics *in vitro*. **Vet. Parasitol.** 211, 80–88.

1190 Riou, M., Koch, C., Delaleu, B., Berthon, P., Kerboeuf, D., 2005. Immunolocalisation of
1191 ABC transporter, P-glycoprotein, in the eggshells and cuticles of free-living and
1192 parasitic stages of *Haemonchus contortus*. **Parasitol. Res.** 96, 142–148.

1193 Roberts, F.H.S, O’Sullivan, P.J. and Riek, R.F., 1952. The epidemiology of parasitic gastro
1194 enteritis of cattle. **Aust. J. Agri. Res.**, 3, 187-226.

1195 Shalaby, H.A., 2013. Anthelmintics Resistance; How to Overcome it? **Iranian J. Parasitol.**
1196 8 (1), 18-32.

1197 Shukla, S.; Wu, C-P; Ambudkar, S.V., 2008. Development of inhibitors of ATP-binding
1198 cassette drug transporters – present status and challenges. **Expert Opin. Drug**
1199 **Metab. Toxicol.** 4 (2), 205-223.

1200 Smith, G., 1990. A mathematical model for the evolution of anthelmintic resistance in a
1201 direct life cycle nematode parasite. **Int. J. Parasitol.** 20, 913–921.

1202 Ueno, H.; Gonçalves P. C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes.
1203 UFBA:UFRGS: **Jap. Int. Coop. Ag.** , 143.

1204



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 48 DE 01 DE AGOSTO DE 2018.

O PRESIDENTE EM EXERCÍCIO DO COLEGIADO DE CURSO DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, **ad referendum**:

Aprovar os projetos dos mestrandos referentes à disciplina – Projetos -, a qual foi ofertada no primeiro semestre de 2018, conforme constam na tabela abaixo.

Orientador	Aluno	Título do Projeto
Veronica Jorge Babo Terra	Carolina Pereira Marinho	Resistência antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> isolada do trato urinário de cães
Fabrcio de Oliveira Frazílio	Carolynne Ferreira Barbosa	Bloqueio ecoguiado do plano transversal abdominal com levobupivacaína isolada, ou em associação à dexmedetomidina, em gatas submetidas à ovari-histerectomia
Larissa Gabriela Ávila	Daniela Lopes Rici	Problemas oclusivos associados ao risco de alterações na articulação temporomandibular em equinos diagnosticadas por imagens radiográficas e ultrassonográficas
Eliane Vianna da Costa e Silva	Marcos Vargas da Silveira	Precocidade sexual em fêmeas nelore submetidas a estímulos hormonais pré-estação de monta
Fernando de Almeida Borges	Matheus Takemi Muchon Nakatani	Associação entre lactonas macrocíclicas contra <i>Haemonchus contortus</i>
Carlos Alberto do Nascimento Ramos	Rodrigo Leite Soares	Pesquisa molecular de filarídeos caninos e seus hospedeiros artrópodes em Campo Grande, MS, Brasil.

BRENO FERNANDES BARRETO SAMPAIO.

1208 ANEXO 2. Certificado da comissão de ética no uso de animais

30/03/2020

SEI/UFMS - 0848404 - Certificado



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Associação entre lactonas macrocíclicas contra *Haemonchus contortus*”, registrada com o nº 983/2018, sob a responsabilidade de **Fernando de Almeida Borges** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 9ª reunião ordinária do dia 25/10/2018.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/11/2018 a 30/05/2019
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Ovis aries</i> / SRD
Nº de animais	4
Peso/Idade	15 kg / 4 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda Escola FAMEZ/UFMS

file:///C:/Users/mathe/Downloads/Certificado_0848404.html

1/2

1209

Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 29 de outubro de 2018.



Documento assinado eletronicamente por **Joice Stein, Professor do Magisterio Superior**, em 01/11/2018, às 07:43, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0848404** e o código CRC **DC75956E**.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº
23104.036532/2018-50

SEI nº 0848404