Capítulo 3 - Resistência parasitária

Mirna Samara Dié Alves
Tallysson Nogueira Barbosa

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

ALVES, M. S. D., and BARBOSA, T. N. Resistência parasitária. In: BEZERRA, A. C. D. S., and SILVA, M. D. C., eds. *Fitoterapia e a Ovinocaprinocultura: uma associação promissora* [online]. Mossoró: EdUFERSA, 2018, pp. 49-76. ISBN: 978-85-57570-91-7. <https://doi.org/10.7476/9786587108643.0005>.

All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

RESISTÊNCIA PARASITÁRIA

Mirna Samara Dié Alves
Tallysson Nogueira Barbosa

1 INTRODUÇÃO

A importância socioeconômica da ovinocaprinocultura para a pecuária brasileira é evidente, principalmente no que diz respeito aos pequenos produtores, e tornou-se de grande importância para a sustentabilidade familiar, com ênfase na região Nordeste do Brasil (FIGUERIEDO FILHO et al., 2012). Entretanto, a maior limitação encontrada para o seu desenvolvimento são as helmintoses, doenças parasitárias causadas por nematoides gastrintestinais.

Tais doenças são a principal causa de perdas econômicas e o maior problema sanitário para a criação de caprinos, principalmente devido aos custos com a prevenção e os tratamentos, ao atraso no crescimento dos animais, ao comprometimento produtivo, a alterações nas taxas de fertilidade e à mortalidade (NEVES et al., 2012). Os principais nematoides gastrintestinais encontrados são representados pelos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides*, *Oesophagostomum*, *Cooperia*, *Bunostomum*, *Trichuris* e *Skrjabinema* (LIMA, 2010), sendo os quatro primeiros os de maior frequência e importância econômica.

A principal forma de controle tem sido quase que exclusivamente o uso repetitivo de medicamentos anti-helmínticos (KAMARAJ et al., 2010) pertencentes a diversos grupos químicos, tais como benzimidazóis, imidatiázóis, salicilanilidas e lactonas macrocíclicas, os quais possuem mecanismos com amplo espectro de ação. A falta

de conhecimento biológico e epidemiológico sobre os parasitas, por parte dos produtores, levou à utilização indiscriminada, repetitiva e descontrolada desses anti-helmínticos – que ainda é evidenciada nos dias atuais –, elevando o seu valor no mercado e promovendo resultados abaixo do esperado, provavelmente como consequência do rápido desenvolvimento do processo conhecido como resistência parasitária (CARVALHO et al., 2011). O desenvolvimento da resistência vem aumentando significativamente as dificuldades no controle das helmintoses e gerando um cenário de acúmulo de perdas e quedas de produção para a ovinocaprinocultura.

2 GRUPOS QUÍMICOS DE ANTI-HELMÍNTICOS

2.1 Benzimidazóis

Os benzimidazóis são o maior grupo químico utilizado no tratamento de doenças parasitárias em animais domésticos. Esses anti-helmínticos são eficazes contra nematoides gastrintestinais, tanto nos estágios imaturos em desenvolvimento quanto nos organismos adultos, apresentando ação ovicida devido à sua capacidade de inibição da polimerização de microtúbulos (COELHO, 2010). Os principais e mais eficazes anti-helmínticos do grupo dos benzimidazóis são o albendazol, fenbendazol e oxbendazol, devido à sua metabolização mais lenta (LIMA, 2010).

O mecanismo de ação dos benzimidazóis vem sendo discutido desde 1975. Os estudos propõem que a ação desse grupo é consequência da sua capacidade de ligação com a β -tubulina, que é uma das subunidades proteicas formadoras dos microtúbulos. Tais estruturas celulares necessitam de um ambiente equilibrado (KÖEHLER, 2001) para sua constituição e a ligação droga/ β -tubulina evita a dimerização com a α -tubulina, consequentemente, impedindo a polimerização dos microtúbulos, o que gera a perda de função em várias partes da célula

(MOLENTO et al., 2004). Outra rota de ação dos benzimidazóis no controle parasitário é a inibição da enzima fumarato redutase, que atua no metabolismo energético mitocondrial, comprometendo os mecanismos de produção de energia do parasito (LANUSSE, 1996).

2.2 Imidatiazóis

Os imidatiazóis fazem parte do grupo de antiparasitários que atuam no sistema nervoso do parasita, agindo de forma similar aos agonistas acetilcolínicos (ou colinérgicos), causando paralisia espástica nos nematoides, além de contração muscular estável. A ação desse grupo ocorre devido à presença de receptores nicotínicos sinápticos e extra-sinápticos de acetilcolina na superfície da musculatura somática dos nematoides (MELO & BEVILAQUA, 2002).

O mecanismo de ação detalhado dessas drogas não foi ainda esclarecido, visto que as características bioquímicas dos receptores nicotínicos de nematoides ainda não foram descobertas; porém, as características de sequências das subunidades e do perfil farmacológico são semelhantes às dos vertebrados, o que seria um indicativo do funcionamento destes como canais iônicos controlados por receptores (KÖHLER, 2001). Os principais representantes desse grupo são o tetramisol e o levamisol. Ambos os compostos apresentam ação em larvas e nematoides adultos, porém são ineficazes contra larvas em hipobiose (MELO & BEVILAQUA, 2002). Tais fármacos possuem ainda amplo espectro de ação e rápida absorção e, apesar de apresentarem um índice terapêutico relativamente baixo, são considerados bons fármacos para controle parasitário (BEZERRA, 2014).

2.3 Lactonas macrocíclicas

As lactonas macrocíclicas são constituídas por derivados químicos de micro-organismos do solo que possuem amplo espectro e alta eficiência contra nematoides. Apresentam atividade contra adultos, larvas hipobióticas e estágios imaturos, causando paralisia e supressão reprodutiva dos parasitos (LIMA, 2010). Essas lactonas possuem dois grandes subgrupos: avermectinas e milbemicinas. No primeiro subgrupo estão incluídas a ivermectina e a doramectina, enquanto no segundo participam a milbemicina e a moxidectina (COELHO, 2010).

As avermectinas são antibióticos de amplo espectro utilizados contra nematoides cardíacos, respiratórios e gastrintestinais em animais e também contra a oncocercose em humanos (MARTIN, 1997). A ação das lactonas macrocíclicas ocasiona paralisia flácida da musculatura somática dos nematoides e bloqueia o bombeamento faríngeo, impedindo que esses parasitos se alimentem. Assim, sugere-se que a ação anti-helmíntica seja ocasionada pela interrupção da ingestão de alimentos, sem deixar de considerar a importância terapêutica da ação sobre a musculatura somática (MELO & BEVILAQUA, 2002).

O sítio de ação desse grupo de anti-helmínticos em invertebrados são os canais de cloro com receptor de glutamato. Um aspecto do efeito seletivo seria relacionado a essa ação em canais específicos de invertebrados. Estudos sugerem a presença de canais de cloro com receptor de glutamato sensíveis a milbemicina D, o que oferece uma explicação quanto ao efeito desse fármaco na faringe dos nematoides (MARTIN, 1997).

A ivermectina atua nesses canais de cloro como agonista do glutamato, aumentando a ativação do receptor e, conseqüentemente, a abertura do canal de cloro. Em baixas concentrações, a ivermectina amplifica o efeito do transmissor natural – o glutamato; mas em altas concentrações, o fármaco se liga alostericamente ao receptor,

ocasionando a abertura direta e irreversível do canal, o que por fim leva a uma hiperpolarização da membrana celular e paralisia muscular (LESPINE et al., 2012). As lactonas macrocíclicas podem ainda ter efeito em outros canais de cloro, como nos canais com receptor para o ácido γ -amino-butírico (GABA) e nos canais de cloro com receptor de dopamina (LESPINE et al., 2012).

2.4 Salicilanilidas

O grupo das salicilanilidas é formado por compostos lipofílicos que atuam no transporte de prótons através das membranas, principalmente na membrana mitocondrial interna. Além disso, possuem atuação por maior tempo devido à sua força de ligação a proteínas plasmáticas (MELO & BEVILAQUA, 2002).

Os principais representantes são a rafoxanida, a oxiclozanida e o closantel, sendo todos estes trematodocidas e com mecanismo de atuação relacionado ao desacoplamento da fosforilação oxidativa, o que leva a um desequilíbrio nos mecanismos de produção de energia do parasito. Essas substâncias lipofílicas, capazes de carrear prótons, podem ser transportadas através da membrana interna das mitocôndrias. Como consequência, ocorre uma interferência no gradiente de prótons, levando ao desacoplamento da fosforilação oxidativa de modo que a produção de trifosfato de adenosina (ATP) e o processo de oxidação não estejam mais ligados (MARTIN, 1997).

3 RESISTÊNCIA AOS GRUPOS QUÍMICOS DE ANTI-HELMÍNTICOS

A resistência é um processo de alteração de sensibilidade a um determinado fármaco pelo aparecimento de modificações genéticas

herdáveis (LIMA, 2010). A utilização de um químico antiparasitário pode ocasionar um processo de seleção natural em uma população de parasitas. Dependendo da espécie do nematoide, da pressão seletiva exercida pelo fármaco e da técnica de manejo aplicada aos animais (BEZERRA, 2014), os parasitas sobreviventes às exposições ao anti-helmíntico podem apresentar resistência a este e transferir essa resistência para a geração seguinte.

Do ponto de vista genético, a resistência é caracterizada por três aspectos principais: estabelecimento, desenvolvimento e dispersão. Porém, as espécies de nematoides não apresentam a mesma susceptibilidade ao desenvolvimento, visto que existem aspectos que atuam em conjunto, como a pressão seletiva da droga administrada, a diversidade genética e o tamanho da população dos parasitas. Nesse contexto, a espécie de nematoide gastrointestinal *H. contortus*, por exemplo, apresenta populações elevadas em razão da capacidade de ovipostura das fêmeas, tendo como consequência um alto nível de resistência associado (MELO & BEVILAQUA, 2005).

A resistência a anti-helmínticos é definida como a diminuição da eficácia de um medicamento contra uma população parasitária que costumava apresentar susceptibilidade à droga (FLEMING et al., 2006). O mecanismo que causa esse processo varia de acordo com as espécies de nematoides e os grupos de drogas administradas. Tais mecanismos podem ser específicos (associados à ação do anti-helmíntico) ou inespecíficos (associados a alterações no receptor do fármaco ou na modulação de sua concentração) (MELO & BEVILAQUA, 2005).

Entre os aspectos mais importantes para o desenvolvimento da resistência, destaca-se a necessidade de: (1) uma estrutura populacional que permita, de maneira consistente, a disseminação dos genes de resistência e (2) rápidas taxas de modificações nas sequências nucleotídicas, em conjunto com uma grande população. Tais aspectos levam a uma alta

diversidade genética dentro do grupo e facilitam o desenvolvimento da resistência (FLEMING et al., 2006).

3.1 Benzimidazóis

O mecanismo descrito de resistência aos benzimidazóis está relacionado a alterações que levam a modificações na tubulina. Assim, os parasitos resistentes caracterizam-se pela diminuição dos sítios de afinidade à droga nas subunidades proteicas dos microtúbulos (GILLEARD, 2006). No que diz respeito à resistência nesse grupo, um experimento utilizando sondas de *Southern blot* contendo o Ácido Desoxirribonucleico Complementar (cDNA) do isotipo-1 da β -tubulina resultou na primeira evidência de seleção do gene da β -tubulina em *H. contortus*, envolvido com a resistência. O experimento demonstrou que havia uma redução no número de fragmentos hibridizados em populações resistentes quando comparadas a populações susceptíveis (LUBEGA et al., 1994).

No processo de resistência a esse grupo químico, bem estabelecido nos tricostrongilídeos, foram descobertas variações na sequência do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) que afetam somente uma base na sequência do genoma; tais variações são conhecidas como Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) (GHISI; KAMINSKY; MÄSER, 2007). O primeiro SNP com atuação direta no desenvolvimento da resistência a ser detectado encontra-se na posição do gene da β -tubulina correspondente ao aminoácido 200 da proteína, sendo esse SNP caracterizado pela modificação de timina para adenina, gerando no processo de tradução a adição de uma tirosina em lugar da fenilalanina, resíduo 200 da estrutura primária da β -tubulina (KWA; VEENSTRA; ROOS, 1994). Apesar de outros polimorfismos terem sido posteriormente descritos, a mutação nessa posição, também chamada F200Y, é considerada o marcador molecular predominante no processo de resistência aos benzimidazóis (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2007).

Outro SNP descoberto caracteriza-se por uma alteração na posição 167 do gene da β -tubulina, também conhecida como F167Y, que se caracteriza pela transversão da timina pela adenina na sequência do gene resultando na substituição da fenilalanina pela tirosina ou pela histidina na proteína β -tubulina (PRICHARD, 2001; SILVESTRE; CABARET, 2002; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2007). Silvestre e Cabaret (2002) descreveram que a presença da mutação F167Y só ocorreu em populações sem a mutação F200Y. Estudos realizados permitem concluir que ambas as mutações podem conferir resistência e que tanto o isotipo-1 quanto o isotipo-2 da β -tubulina estão ligados ao processo de resistência aos benzimidazóis (PRICHARD, 2001; SILVESTRE; CABARET, 2002; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2007).

Foi também encontrada uma alteração na posição 198 do gene da β -tubulina, caracterizada por uma transição da adenina para citosina que resulta numa mudança na tradução, levando à adição do aminoácido alanina em lugar do glutamato na estrutura primária da β -tubulina, em uma posição na proteína que é correspondente a essa mutação no gene. A descoberta desse SNP a partir de uma pesquisa realizada em isolados resistentes de *H. contortus*, provenientes da África do Sul e da Austrália, revelou ainda que 90% das sequências do gene da β -tubulina dos isolados resistentes, sem a mutação F200Y, apresentavam a mutação na posição 198 do gene, também conhecida como E198A (GHISI; KAMINSKY; MÄSER, 2007). Portanto, da mesma forma que foi observado para a mutação F167Y, a mutação E198A apenas ocorreu em isolados que apresentaram o gene selvagem para o códon correspondente ao aminoácido 200 da proteína β -tubulina.

A primeira evidência de resistência de nematoides ao grupo dos benzimidazóis foi publicada em 1964 e foi observada em ovelhas (KAPLAN, 2004). A partir desse primeiro registro, um número crescente de estudos tem demonstrado o desenvolvimento da resistência

aos benzimidazóis. Em países como Alemanha, França, Bélgica, Índia, Brasil, Austrália, Malásia, Holanda e Nova Zelândia, já foi constatada a existência de *H. contortus* resistentes a esses fármacos (JABBAR et al., 2006). No que diz respeito ao estudo dos SNPs, outras pesquisas foram realizadas, em vários países, a fim de caracterizar a presença desses SNPs de resistência nas populações parasitárias. Nos Estados Unidos, um estudo foi realizado com dez populações do gênero *Haemonchus*. Destas, nove foram identificadas como populações de *Haemonchus placei* e uma como sendo de *H. contortus*. Para a população de *H. contortus*, 32 vermes foram analisados e os resultados demonstraram que 29 dos 32 possuíam a mutação F200Y e 2 dos 32 a mutação F167Y de resistência aos benzimidazóis (CHAUDHRY et al., 2014).

No Reino Unido, a mutação F167Y foi encontrada em seis das sete populações de *H. contortus* estudadas, originárias de seis diferentes fazendas, tendo sido a frequência dessa mutação similar à frequência da mutação F200Y (REDMAN et al., 2015). Na região norte da Índia, a mutação F200Y também foi detectada em *H. contortus* a partir de PCR alelo-específico (CHANDRA et al., 2014). Estudos demonstraram ainda evidência da disseminação da mutação E198A de uma origem única para vários locais no sul da Índia (CHAUDHRY et al., 2015).

No México, um estudo realizado com populações de *Haemonchus* spp. obtidas de nove fazendas, detectou a presença da mutação F200Y a partir de PCR alelo-específico, não tendo sido detectadas as mutações F167Y e E198A em nenhuma das populações estudadas (ENCALADAMENA et al., 2014).

No Brasil, em um estudo realizado com isolados de *H. contortus* de diferentes regiões do país, todos os espécimes avaliados apresentaram SNPs associados à resistência aos benzimidazóis. Os marcadores foram observados mais frequentemente em isolados provenientes de fazendas com longo histórico de uso de benzimidazóis. Foram encontradas apenas as mutações F167Y e F200Y, as quais não foram detectadas dentro

de uma mesma sequência de DNA ou cromossomo; porém, um dos isolados apresentou caráter heterozigoto (F167Y/F200Y) (BRASIL et al., 2012), o que pode levar à mudança na ideia de que a mutação F167Y só aconteceria nos parasitas de genótipo selvagem, como descrito anteriormente.

Outra pesquisa, realizada no Estado do Ceará com seis populações de *H. contortus*, revelou, a partir do uso de PCR em tempo real para a detecção dos SNPs de resistência, uma alta frequência dos alelos de resistência F200Y e F167Y; não houve registro do SNP E198A (SANTOS et al., 2014).

Considerando todas as evidências de polimorfismo associado à resistência parasitária aos benzimidazóis, fica clara a importância da continuidade dos estudos para entendimento do papel dos SNPs no processo de resistência, sem deixar de considerar que há outros mecanismos relacionados com tal processo. Esses mecanismos também precisam ser avaliados cientificamente para o melhor entendimento dos processos de resistência ao grupo dos benzimidazóis.

3.2 Imidatiazóis

No grupo dos imidatiazóis, estudos são necessários para que se possa entender o mecanismo da resistência, principalmente contra o levamisol (MOLENTO et al., 2013). Em estudos desenvolvidos em laboratório, utilizando o modelo *Caenorhabditis elegans*, vários genes relacionados com o processo de resistência foram detectados; porém, o mecanismo de desenvolvimento da resistência clínica em outros nematoides ainda é pouco entendido e acredita-se que pode envolver diferentes genes e mecanismos de expressão e resistência, em relação àqueles encontrados em *C. elegans* (KOTZE et al., 2014).

Os estudos, no entanto, indicam que a resistência a esse grupo de fármacos pode estar ligada à alteração farmacológica dos receptores nicotínicos para acetilcolina (nAChRs) (SANGSTER, 1999). Esses receptores são formados por cinco subunidades polipeptídicas que, agregadas, constituem um canal iônico transmembranar pentamérico, o qual é aberto por interação do receptor com um ligante e, assim, permite a passagem de íons levando a uma resposta fisiológica (KOTZE et al., 2014). As subunidades dos receptores nAChRs podem ser de dois tipos: subunidades α com duas cisteínas vicinais ou subunidades não- α sem as cisteínas (MARTIN et al., 2012). Em *C. elegans*, o receptor do levamisol é formado por cinco subunidades, cada uma com cerca de 500 aminoácidos de comprimento e quatro regiões transmembrana, sendo eles: LEV-8, UNC-38, UNC-63 (subunidades α), UNC-29 e LEV-1 (subunidades não- α). (BOULIN et al., 2008).

Genes ortólogos aos genes codificantes de LEV-1, UNC-29, UNC-38 e UNC-63 de *C. elegans* foram encontrados em algumas espécies de tricostrongilídeos, dentre as quais estão *Trichostrongylus colubriformis* e *H. contortus* (NEVEU et al., 2010). Nesses parasitas, a subunidade LEV-1 apresenta-se sem um peptídeo de sinal (NEVEU et al., 2010), sugerindo que essa subunidade pode não fazer parte da estrutura e construção do receptor AChR (MARTIN et al., 2012).

Estudos identificaram ainda em *H. contortus* outra subunidade bem conservada do receptor AChR, a ACR-8 (FAUVIN et al., 2010), a qual é mais similar à subunidade ACR-8 de *C. elegans*, mas apresenta aminoácidos em comum com LEV-8, levando a acreditar que seria o homólogo mais próximo ao LEV-8 de *C. elegans* (BOULIN et al., 2011). O receptor colinérgico ativado pelo levamisol (L-AChR) em *H. contortus* é descrito então como sendo composto por quatro subunidades diferentes (ACR-8, UNC-29, UNC-38 e UNC-63), das quais uma será repetida para que haja a formação do receptor pentamérico em *H. contortus* (BOULIN et al., 2011). Diferentes combinações dessas

subunidades levam à formação de receptores com diferentes características farmacológicas (KOTZE et al., 2014).

Estudos revelaram que em *H. contortus*, o gene que codifica a subunidade UNC29 passou por duplicações, levando à geração de quatro genes semelhantes: *Hco-unc-29.1*, *Hco-unc-29.2*, *Hco-unc-29.3* e *Hco-unc-29.4*. Tais constatações fortalecem a ideia de que o receptor colinérgico pode ser diferente do que o observado em *C. elegans* e outras espécies. Além disso, é possível que cada um desses genes derivados codifique proteína com funcionamento diferente, o que levaria a variados níveis de sensibilidade ao levamisol (WOLSTENHOLME, 2011).

Foram identificadas ainda duas variantes do gene *unc-63* de *H. contortus*, que levariam à formação de duas subunidades diferentes UNC-63a e UNC-63b (NEVEU et al., 2010) e duas variantes do gene *acr-8* de *H. contortus*, que originariam as subunidades ACR-8a e ACR-8b (FOULIN et al., 2010).

As subunidades ACR-8, UNC-29.1, UNC-38 e UNC-63a foram utilizadas para reconstituir o receptor colinérgico sensível a levamisol no sistema de expressão em oócitos de *Xenopus* sp., comprovando sua participação e importância no processo de construção desses receptores e, conseqüentemente, sua possível importância no processo de resistência (BOULIN et al., 2011). Além disso, o padrão de expressão gênica dessas subunidades é altamente complexo, e a redução na expressão desses genes pode estar associada à resistência ao levamisol (SARAI et al., 2013).

Outro aspecto que tem sido estudado e pode estar relacionado ao processo de resistência é a expressão de formas truncadas, a partir dos genes *unc-63* e *acr-8*, em isolados resistentes de *H. contortus* (SARAI et al., 2013). Estudos descreveram a presença de uma isoforma truncada de UNC-63, chamada de UNC-63b em isolados resistentes de *H. contortus*, *T. colubriformis* e *Trichostrongylus circumcincta* (NEVEU et al., 2010). Tal isoforma truncada foi posteriormente descrita como capaz de inibir

os níveis normais de expressão de L-AChR em *H. contortus*, levando à indução da resistência (BOULIN et al., 2011).

Estudos descreveram ainda a redução na expressão dos níveis de UNC-63a (subunidade não-truncada e presente no receptor sensível a levamisol) e dos quatro parálogos de UNC-29 em isolados resistentes de *H. contortus* (SARAI et al., 2013). A expressão reduzida de algumas subunidades do receptor e também de proteínas auxiliares foi demonstrada em larvas resistentes de *H. contortus* (SARAI et al., 2014).

Portanto, acredita-se que a resistência a esse grupo de fármacos está associada a múltiplos processos envolvendo as subunidades ACR-8, UNC-29, UNC-38 e UNC-63 do receptor L-AChR (WOLSTENHOLME, 2011; MOLENTO et al., 2013; KOTZE et al., 2014).

A resistência aos imidatiázóis poderia também estar ligada a mutações em genes que não codificam componentes estruturais do próprio receptor, mas outros componentes essenciais à sua formação (SARAI et al., 2013; SARAI et al., 2014). São exemplos os genes que codificam as proteínas auxiliares do processamento de subunidades do receptor de levamisol UNC-50, UNC-70 e RIC-3, essenciais na formação do receptor, os quais após mutações levaram à resistência ao levamisol em *C. elegans* (MARTIN & ROBERTSON, 2007).

Portanto, sugere-se que há múltiplos mecanismos – específicos e inespecíficos – de resistência dentro de uma mesma população, que levam a diferentes níveis de resistência a uma determinada droga (SARAI et al., 2013; KOTZE et al., 2014; SARAI et al., 2014). A complexidade farmacológica dos receptores e de sua expressão associada a mecanismos inespecíficos de desenvolvimento da resistência leva a crer que o processo de resistência, para esse grupo de drogas, é poligênico e variável entre diferentes organismos (SARAI et al., 2013).

3.3 Lactonas macrocíclicas

As lactonas macrocíclicas (LMs) têm como alvos biológicos principais os canais de cloro com receptores de glutamato, que são expressos principalmente nas células musculares – em especial no músculo faríngeo – e neurônios dos nematoides e de alguns ectoparasitas. As drogas desse grupo se ligam aos receptores, causando a abertura desses canais e induzindo à hiperpolarização que levará, finalmente, à paralisia flácida (KOTZE et al., 2014).

Há poucas evidências que apontem para a presença de uma alteração genética significativa nos canais de cloro com receptores de glutamato para explicar por completo o desenvolvimento da resistência às LMs (LESPINE et al., 2012). Dessa forma, os mecanismos de resistência relatados estão mais associados à mudança fisiológica nos sítios de ligação das drogas desse grupo, presentes no músculo faríngeo, principalmente no que diz respeito à ivermectina (COELHO, 2010).

Os mecanismos que levam à alteração fisiológica estão diretamente relacionados aos canais de cloro (importantes para a bomba faríngeo envolvida na resistência), à β -tubulina e às glicoproteínas de permeabilidade (P-gps), ocasionando a resistência em tricostrongilídeos, como *H. contortus* e *T. colubriformis* (MOLENTO et al., 2013). Entre esses mecanismos, o que apresenta maiores implicações no desenvolvimento de resistência às LMs são as alterações nos níveis de expressão e na especificidade a drogas dos transportadores da superfamília ABC, entre os quais estão as P-glicoproteínas, também conhecidas como glicoproteínas de permeabilidade (LESPINE et al., 2012). As LMs são conhecidas pela capacidade de interferir no transporte mediado por P-gps, lentificando o processo de transporte e, ainda, impedindo a ligação de outras substâncias a serem transportadas (LESPINE et al., 2012).

Estudos apontam que a eliminação das LMs por via fecal em conjunto com a ação das P-gps tem como consequência mais importante a

limitação do nível sistêmico da ivermectina e da duração da exposição do animal à droga, o que resulta na diminuição da eficácia do medicamento (LESPINE et al., 2012). Por apresentarem mecanismos não específicos de resistência, tais transportadores podem ocasionar uma resistência cruzada pela modulação de diferentes drogas nos seus alvos, comprometendo a eficiência de vários grupos de drogas ao mesmo tempo (LESPINE et al., 2012).

Quanto a alterações genéticas, as mais estudadas e conhecidas para esse grupo de fármacos são as mutações ocorridas no gene *GluCl α 3* (KOTZE et al., 2014). A importância desse gene foi comprovada pelo estudo da mutação do gene na posição que codifica a leucina 256 do domínio N-terminal (L256). Foi avaliada em células transfectadas (células da linhagem COS-7) a interação da ivermectina com os canais de cloro contendo receptores de glutamato que apresentavam a substituição de L256 por diversos resíduos de aminoácidos aromáticos, devido a alterações no gene mutante *GluCl α 3B* de *H. contortus* (McCAVERA, et al., 2009). Houve uma redução na ligação da ivermectina às membranas de células transfectadas com o gene mutante, no entanto não foi demonstrada nenhuma mutação na posição 256 em isolados de *H. contortus*, deixando uma dúvida quanto à influência de tal mutação no cenário real (McCAVERA et al., 2009).

Diante de todas essas evidências, sugere-se que a resistência às LMs em nematoides seja causada por mecanismos poligênicos. Esses mecanismos podem estar ligados a frequências alélicas de genes que codificam os alvos da droga ou a alterações nos níveis de expressão gênica (LESPINE et al., 2012). Além disso, é claro, deve-se considerar os outros mecanismos não específicos já citados.

3.4 Salicilanilidas

O grupo das salicilanilidas é representado, no que diz respeito ao controle de helmintos de importância para a caprinocultura, principalmente pelo closantel, um anti-helmíntico de curto espectro de ação. Esse composto passou a ser extremamente usado para o controle de *H. contortus* após as primeiras evidências de resistência a outros grupos de anti-helmínticos (PRICHARD, 1994). No entanto, estudos têm documentado a existência de populações de *H. contortus* resistentes ao closantel na África do Sul, Austrália e no Brasil – entre outros países (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012).

Diferentemente dos outros grupos de anti-helmínticos, o mecanismo de desenvolvimento da resistência a esse grupo de fármacos em *H. contortus* é desconhecido e pouco discutido (KÖHLER, 2001). É importante entender que a maior aplicação das salicilanilidas é feita para o controle da *Fasciola hepatica*. A extensão do uso dessas drogas em *H. contortus* é possível, principalmente, pelo fato de esse parasita ingerir sangue e também graças à alta e forte ligação do closantel (e outros anti-helmínticos do grupo) às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina (ROTHWELL; SANGSTER, 1997). Tais aspectos aumentam a meia-vida e a eficácia da droga contra esses parasitas de pequenos ruminantes (MARTIN, 1997; KÖHLER, 2001)

Alguns estudos sugerem que o gene da glutathione S-transferase estaria envolvido no desenvolvimento de resistência ao closantel e à rafoxanida em *F. hepatica* (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009).

As enzimas glutathione S-transferases (GSTs) são uma família de proteínas multifuncionais envolvidas no processo de detoxificação de substâncias exógenas e endógenas, derivadas de compostos tóxicos. Essas reações, bem como as reações de conjugação, estão entre os possíveis mecanismos pelos quais ocorre o desenvolvimento de resistência a um composto (MILLER; HOWELL; BORAY, 1994).

As GSTs seriam responsáveis pela mediação da conjugação de grupos funcionais reativos – expostos pela ação das enzimas do citocromo P450 – com a glutatona, o ácido glicurônico ou a glicose, para que estes sejam metabolizados e eliminados pela bomba conjugada de glutatona (CVILINK; LAMKA; SKÁLOVÁ, 2009). Essa reação de conjugação de moléculas com compostos estranhos ocasiona a diminuição da toxicidade do composto e o torna mais hidrofílico, facilitando assim sua remoção (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009).

Algumas pesquisas mostram que essas enzimas têm participação nas reações de conjugação que ocorrem nos helmintos e reportam ainda à metabolização de anti-helmínticos por elas, revelando sua importância no metabolismo dos anti-helmínticos e seu possível envolvimento no desenvolvimento da resistência às salicilanilidas (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009).

Um estudo avaliando GSTs em *F. hepatica* revelou uma diminuição na atividade das GSTs associada com o aumento da resistência ao closantel e rafoxanida, mas não está claro ainda qual mecanismo envolve essas enzimas no desenvolvimento da resistência (MILLER; HOWELL; BORAY, 1994).

Uma pesquisa revelou que em *H. contortus* houve um aumento da atividade de GST em isolados resistentes ao composto cambendazol, mas a significância desse evento para o desenvolvimento da resistência não foi determinada (KAWALEK; REW; HEAVNER, 1984). Outro estudo demonstrou que a administração de um inibidor da síntese de glutatona aumentou a sensibilidade de isolados de *H. contortus* resistentes ao tiabendazol, sugerindo a possível participação dessa substância nos mecanismos de resistência (KERBOEUF; AYCARDI, 1999).

Apesar da contribuição desses estudos, não há dados sobre a participação das GSTs nos mecanismos de resistência às salicilanilidas em *H. contortus*; no entanto, esses estudos levam a acreditar que essas enzimas

possam realmente ter influência significativa no desenvolvimento da resistência a esse grupo de anti-helmínticos.

4 TESTES PARA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA

Com o surgimento da resistência aos anti-helmínticos, foram desenvolvidas metodologias para sua detecção, auxiliando na escolha de estratégias de controle (FORTES; MOLENTO, 2013). Os testes empregados para detecção de resistência podem ser *in vivo* e *in vitro*. Os testes *in vivo* são mais difundidos, porém apresentam um baixo nível de eficácia devido à interferência do organismo animal (CRAVEN et al., 1999). Contudo, testes *in vivo* permitem avaliações das características farmacológicas fundamentais, como a farmacodinâmica da droga, a relação estabelecida entre o parasito/hospedeiro e o mecanismo de ação pelo qual a droga desempenha sua atividade no indivíduo (MELO, 2005).

Um dos testes *in vivo* utilizado é o teste da redução de contagem de ovos nas fezes, que se caracteriza por sua praticidade e rapidez; além disso, outro fator que justifica sua escolha é o fato de permitir a avaliação de qualquer anti-helmíntico (OLIVEIRA, 2003). No entanto, o número de ovos encontrados não representa a mesma quantidade de adultos parasitando o indivíduo, visto que pode ocorrer a presença de machos e fêmeas estéreis (UENO; GUTIERRES, 1983). Outro teste utilizado é o teste controlado, que oferece uma alta margem de confiabilidade na avaliação do índice de eficácia de anti-helmínticos (RODRIGUES et al., 2007). Contudo, um dos principais entraves para a adoção dessa técnica está em seu elevado custo, o que diminui sua acessibilidade.

Os testes *in vitro* são caracterizados por detectar a eficiência de um grupo variável de drogas, pela rapidez, praticidade e por serem economicamente viáveis (FORTES & MOLENTO, 2013). Têm como vantagem principal a capacidade de evitar a interferência do hospedeiro.

deiro (CHAGAS; NICIURA; MOLENTO, 2011). Dentro do grupo dos testes *in vitro* têm-se o teste de eclosão de ovos (TEO), o teste de desenvolvimento larval (TDL), o teste de migração larval (TML) e as análises moleculares como os mais utilizados nas avaliações para atestar a presença de populações de helmintos com resistência aos fármacos (CHAGAS; NICIURA; MOLENTO, 2011).

O TEO se baseia na interação direta do anti-helmíntico com os ovos, a partir do qual pode-se observar a eficiência do fármaco em impedir o desenvolvimento embrionário do parasita (COSTA et al., 2002), sendo utilizado exclusivamente para testar grupos de anti-helmínticos com características ovicidas. O TDL é mais vantajoso, quando comparado ao TEO, por permitir a análise de grupos de anti-helmínticos que apresentam um amplo espectro de ação, por permitir a avaliação de drogas com atuação em diferentes estágios do desenvolvimento e com diferentes mecanismos de ação (HUBERT; KERBOEUF, 1992). O TML foi desenvolvido para analisar a eficácia de fármacos que interferem na locomoção do nematoide, por meio da paralisia que a droga ocasiona na musculatura somática, permitindo a avaliação da capacidade migratória das larvas de terceiro estágio (BORGES, 2014).

As análises moleculares oferecem características mais vantajosas em relação aos demais testes, apresentando especificidade, sensibilidade (mesmo com quantidades reduzidas de material genético) e permitindo a identificação de espécies parasitárias (MELO; BEVILAQUA, 2005). Estudos envolvendo análises moleculares, principalmente em pesquisas de SNPs de resistência, estão sendo desenvolvidos em todas as partes do mundo, possibilitando avanços significativos para a compreensão do mecanismo de resistência em helmintos.

A ciência vem trabalhando no desenvolvimento de técnicas que apresentem alternativas aos métodos convencionais de controle da resistência parasitária. Pesquisas sobre o potencial de ação de óleos essenciais, como também sobre o uso de técnicas de fitoterapia, estão

avançando como alternativas no controle de parasitas gastrintestinais de pequenos ruminantes (CHAGAS et al., 2008), assim como a busca por métodos de controle biológico, destacando-se o uso de fungos nematófagos (AMARANTE, 2004).

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, A.F.T. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, supl. 1, p. 68-71, 2004.
- BEZERRA, A. C. D. S. **Caracterização da resistência a anti-helmínticos e análise molecular de populações de *Haemonchus contortus* frente aos benzimidazóis no município de Mossoró-RN**. 2014. 97p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). UFERSA, Mossoró. 2014.
- BORGES, D. G. L. **Testes *in vitro* com extratos de plantas coletadas no pantanal Sul-Mato-Grossense sobre *Haemonchus placei* (Nematoda: Trichostrongylidae)**. 2014. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2014.
- BOULIN, T. et al. Functional reconstitution of *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 5, p. 1421–1432, 2011.
- BOULIN, T. et al. Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 47, p. 18590–18595, 2008.
- BRASIL, B. S. A. F. et al. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 5, p. 469-479, 2012.
- CARVALHO, C. D. et al. Infecção parasitária e perfil sanitário de plantel caprino em área urbana de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 7, n. 3, 2011.
- CHAGAS, A.C.S. et al. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes® in Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 68-73, 2008.

CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, DF. 153p. 2011.

CHANDRA, S. et al. Molecular diagnosis of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in sheep from different geographic regions of North India. **Veterinary World**, v. 7, n. 5, p. 337–341, 2014.

CHAUDHRY, U. et al. The presence of benzimidazole resistance mutations in *Haemonchus placei* from US cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 411-415, 2014.

CHAUDHRY, U. et al. Genetic evidence for the spread of a benzimidazole resistance mutation across southern India from a single origin in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **International Journal of Parasitology**, v. 45, n. 11, p. 721-728, 2015.

COELHO, W. A. C. et al. Resistência anti-helmíntica em caprinos no município de Mossoró-RN. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 589-599, 2010.

COSTA, C.T.C. et al. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 11, 2, 57-60, 2002.

CRAVEN, J. et al. A comparison of in vitro tests and faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.49 - 59, 1999.

CVILINK, V.; LAMKA, J.; SKÁLOVÁ, L. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 1, p. 8–26, 2009.

ENCALADA-MENA, L. et al. Phenotypic and genotypic characterisation of *Haemonchus* spp. and other gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazole in infected calves from the tropical regions of Campeche State, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1–2, p. 246–254, 2014.

- FAUVIN, A. et al. cDNA-AFLP analysis in levamisole-resistant *Haemonchus contortus* reveals alternative splicing in a nicotinic acetylcholine receptor subunit. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 170, n. 2, p. 105–107, 2010.
- FIGUERIEDO FILHO, L. A. S. et al. Fatores ambientais e genéticos sobre a curva de crescimento de caprinos mestiços. **Comunicata Scientiae**, v. 3, n. 3, p. 154–161, 2012.
- FLEMING, S. A. et al. Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 2, p. 435–444, 2006.
- FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2013.
- GHISI, M.; KAMINSKY, R.; MÄSER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 313–320, 2007.
- GILLEARD, J. S. Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics. **International Journal of Parasitology**, v. 36, n. 12, p. 1227–1239, 2006.
- HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Records**, v.130, p.442–446, 1992.
- JABBAR, A. et al. Anthelmintic resistance: The state of play revisited. **Life Sciences**, v. 79, n. 26, p.2413–2431, 2006.
- JAMES, C. E.; HUDSON, A. L.; DAVEY, M. W. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 7, p. 328–335, 2009.
- KAMARAJ, C. et al. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Melia azedarach* against *Haemonchus contortus* (Strongylidae). **Parasitology Research**, v. 106, n. 5, p. 1071–1077, 2010.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 477-481, 2004.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1-2, p. 70-78, 2012.

KAWALEK, J. C.; REW, R. S.; HEAVNER, J. Glutathione-S-transferase, a possible drug-metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus*: comparative activity of a cambendazole-resistant and a susceptible strain. **International Journal for Parasitology**, v. 14, n. 2, p. 173-175, 1984.

KERBOEUF, D.; AYCARDI, J. Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintics by modulation of glutathione activity. **Parasitology Research**, v. 85, n. 8-9, p. 713-718, 1999.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 336-345, 2001.

KOTZE, A. C. et al. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, p. 164-184, 2014.

KWA, M. S.; VEENSTRA, J. G.; ROOS, M. H. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, n. 2, p. 299-303, 1994.

LANUSSE, C E. Farmacologia dos compostos anti-helmínticos. In: PADILHA, T. Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes. Coronel Pacheco: Embrapa, 1996. p. 1-44.

LESPINE, A. et al. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 58-75, 2012.

LIMA, W. C. **Resistência anti-helmíntica na caprinocultura leiteira do arranjo familiar do cariri paraibano**. 2010. 52p. Dissertação. UFCG, Patos, 2010.

LUBEGA, G. W. et al. *Haemonchus contortus*: The role of two β -tubulin gene subfamilies in the resistance to benzimidazole anthelmintics. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, n. 9, p. 1705–1715, 1994.

MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **Veterinary Journal** (London, England: 1997), v. 154, n. 1, p. 11–34, 1997.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. **Parasitology**, v. 134, n. Special Issue 08, p. 1093–1104, 2007.

MARTIN, R. J. et al. Levamisole receptors: a second awakening. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 289–296, 2012.

McCAVERA, S. et al. An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular Pharmacology**, v. 75, n. 6, p. 1347-1355, 2009.

MELO, A.C.F.L. **Caracterização do nematoide de ovinos *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil**. 2005. 44 p. Tese. Universidade Estadual do Ceará, 2005.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. Resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes: uma revisão. **Ciência Animal**, v. 12, n. 1, p. 35–45, 2002.

- MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, n. (555-556), p. 141–146, 2005.
- MILLER, C. M. D.; HOWELL, M. J.; BORAY, J. C. Glutathione S-transferases as markers of salicylanilide resistance in isolates of *Fasciola hepatica*. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 533–542, 1994.
- MOLENTO, M. B. et al. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v. 34, n.4, p. 1139–1145, 2004.
- MOLENTO, M. B. et al. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 80, n. 2, p. 253–263, 2013.
- NEVES, H. H. et al. Controle de verminoses gastrintestinais em caprinos utilizando preparados homeopáticos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 7, n. 1, p. 145–151, 2012.
- NEVEU, C. et al. **Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance**: Pharmacogenetics and Genomics, v. 20, n. 7, p. 414–425, 2010.
- OLIVEIRA, R.G. Avaliação “*in vivo*” da ação anti-helmíntica de plantas consideradas medicinais como recurso potencial no controle de endoparasitos gastrintestinais de ovinos. 2003. 51 p. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- PRICHARD, R. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, Special Issue: 14th W.A.A.V.P. Conference. v. 54, n. 1–3, p. 259–268, 1994.
- PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintic. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 445–453, 2001.

REDMAN, E. et al. The emergence of resistance to the benzimidazole anthelmintics in parasitic nematodes of livestock is characterised by multiple independent hard and soft selective sweeps. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003494, 2015.

RODRIGUES, A. B. et al. Sensibilidade dos nematoides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2007.

ROTHWELL, J.; SANGSTER, N. *Haemonchus contortus*: The uptake and metabolism of closantel. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 3, p. 313-319, 1997.

SANGSTER, N. C. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? **Veterinary Parasitology**, v. 85, n. 2-3, p. 189–201; discussion 201–204, 215–225, 1999.

SANTOS, J. M. L. d. et al. Identification and quantification of benzimidazoles resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3-4, p. 160-164, 2014.

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

SARAI, R. S. et al. Drug-efflux and target-site gene expression patterns in *Haemonchus contortus* larvae able to survive increasing concentrations of levamisole *in vitro*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, p. 77-84, 2014.

SILVESTRE, A.; CABARET, J. Mutation in position 167 of isotype 1 b -tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? **Molecular Biochemistry and Parasitology**, v.120, p. 297-300, 2002.

UENO, H.; GUTIERRES, V. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Tóquio: Japan Internacional Cooperation Agency, 1983. 176 p.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. **Parasitology**, v. 134, n. 8, p. 1077-1086, 2007.

WOLSTENHOLME, A. J. Ion channels and receptor as targets for the control of parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 1, p. 2-11, 2011.