

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

PAPEL DAS GLICOPROTEÍNAS-P (PGPs) NA RESISTÊNCIA DE HELMINTOS À
IVERMECTINA: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Luiza Almeida de Figueiredo

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

Luiza Almeida de Figueiredo

PAPEL DAS GLICOPROTEÍNAS-P (PGPs) NA RESISTÊNCIA DE HELMINTOS À
IVERMECTINA: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de Concentração: Helminologia

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Co-orientador: Dr. Ricardo Nascimento Araújo

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

Luiza Almeida de Figueiredo

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP e no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara.

Colaboradores

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG

Ms. Sebastião Rodrigo Ferreira

Thaís Rebouças

Setor de Biologia – CCAB/UVA

Prof. Dr. Rodrigo Cambraia Miranda

ÓRGÃO FINANCIADOR: FAPEMIG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por estar sempre ao meu lado, me apoiando e torcendo pelo meu sucesso. Em especial agradeço minha mãe que com muito amor e dedicação me criou e educou, fazendo de mim o que sou hoje.

Agradeço ao Fernando pelo amor e dedicação, sendo sempre meu companheiro, amigo e cúmplice. Obrigada por cuidar de mim, me acalmar e me fazer feliz.

Aos meus amigos de infância e amigos de faculdade, por estarem sempre presente em minha vida, alegrando meus momentos difíceis e participando das minhas vitórias.

Ao meu orientador, Ricardo Fujiwara. Agradeço primeiramente por ter me recebido como sua aluna de iniciação científica no laboratório. Muito obrigada pelo grande investimento feito em mim, pela confiança que me foi depositada, pelo respeito com que sempre me tratou e pela amizade tão agradável. Muitíssimo obrigada pelos inúmeros ensinamentos e por acreditar no meu potencial.

A todos os colaboradores do projeto, em especial ao Dr. Rodrigo Miranda e Prof. Ricardo Araújo, por terem me ensinado e acompanhado em diversos experimentos, pela disponibilidade e paciência em me tirar dúvidas e por toda a ajuda, muito obrigada.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), por toda a ajuda, parceria e amizade.

Agradeço ao Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais e aos professores das disciplinas pela oportunidade de me formar mestre em parasitologia.

Agradeço a Deus, por ter me dado a vida e por iluminar meu caminho em todos os momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIACÕES	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doenças Parasitárias Causadas por Helmintos.....	2
1.2 Ivermectina.....	4
1.3 Resistência à ivermectina.....	5
1.4 Glicoproteínas-P.....	6
1.5 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo experimental.....	7
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo Geral.....	14
3.2 Objetivos Específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Manutenção da linhagem selvagem de <i>Caenorhabditis elegans</i>	16
4.2 Seleção de linhagem de <i>C. elegans</i> resistente à Ivermectina.....	16
4.3 Extração do RNA de <i>C. elegans</i> e síntese do cDNA.....	16
4.4 Reação de PCR quantitativa.....	17
4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	18
4.6 Clonagem em vetor pGEM®-T e Transformação Bacteriana.....	19
4.7 Extração de plasmídeo bacteriano, clonagem em vetor L4440 e transformação bacteriana.....	19
4.8 Indução de produção do dsRNA (RNA fita dupla) e extração do RNA bacteriano.....	20
4.9 Ensaio de Silenciamento.....	21
4.10 Obtenção de larvas (L3) de <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
4.11 Teste de motilidade.....	21
4.12 Teste de fluorescência.....	22
4.14 Obtenção das sequências protéicas de interesse.....	23
4.15 Produção das matrizes de distância e correlação entre as distâncias nucleotídicas e protéicas.....	23
4.16 Transformação das matrizes de distância através de escala multidimensional (Multidimensional scaling - MDS) e classificação dos grupos.....	23

4.17	Análise Estatística	24
5.	RESULTADOS	25
5.1	Seleção de linhagem de <i>Caenorhabditis elegans</i> resistente à ivermectina	26
5.2	Perfil de amplificação dos genes de glicoproteínas-P	26
5.3	Análise do silenciamento de glicoproteínas-P em <i>Caenorhabditis elegans</i>	27
5.5	Teste de motilidade.....	29
5.6	Teste de viabilidade celular	32
5.7	Clusterização das proteínas	34
6.	DISCUSSÃO	36
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: MAPA DO BRASIL MOSTRANDO A PREVALÊNCIA DAS HELMINTOSES TRANSMITIDAS PELO SOLO. FONTE: BASEADA EM DADOS DA OMS DE 2010 E NO ATLAS GLOBAL DE INFECÇÕES POR HELMINTOS (WWW.THISWORMYWORLD.ORG)... 2
- FIGURA 2: CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS DE *CAENORHABDITIS ELEGANS* A) CICLO DE VIDA DO *CAENORHABDITIS ELEGANS* À TEMPERATURA DE 25°C. B) FOTOS DOS ESTÁGIOS DE VIDA DO *C. ELEGANS* VISTO AO MICROSCÓPIO ÓPTICO. FONTE: ADAPTADA DE ERKUT, CIHAN (2014): *C. ELEGANS* LIFE CYCLE AND DEVELOPMENTAL STAGES..... 8
- FIGURA 3: AS RELAÇÕES DO FILO NEMATODA. ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DA COMPARAÇÃO DA SUBUNIDADE DE RNA RIBOSSOMAL DOS ORGANISMOS. A NOMECLATURA SISTEMÁTICA ADOTADA FOI A INTRODUZIDA POR BLAXTER EM 1998. FONTE: ADAPTADA DE BLAXTER M (2011) NEMATODES: THE WORM AND ITS RELATIVES. PLOS BIOL 9(4): e1001050. DOI:10.1371/JOURNAL.PBIO.1001050..... 9
- FIGURA 4: FOTO DE LARVAS (L₃) PARALISADAS TIRADA DE MICROSCÓPIO ÓPTICO (LEICA DM500), AUMENTO DE 100X, MOSTRANDO O PADRÃO RETILÍNEO QUE ELAS ASSUMEM APÓS CONTATO COM DOSE TÓXICA DE IVERMECTINA. 22
- FIGURA 5: SELEÇÃO *IN VITRO* DE *CAENORHABDITIS ELEGANS* RESISTENTES. FIGURA ADAPTADA DE JAMES & DAVEY, (2009)..... 26
- FIGURA 6: PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DAS GLCOPROTEÍNAS-P DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*, NORMALIZADOS PELOS GENES CONSTITUTIVOS CDC-42 E PMP-3, EM RELAÇÃO AOS VERMES SELVAGENS, SENDO QUE ESTES APRESENTAM EXPRESSÃO RELATIVA 1. OS VALORES DE $2^{-\Delta\Delta CT}$ ESTÃO REPRESENTADOS PELAS COLUNAS, E DEMONSTRAM O NÚMERO DE VEZES QUE O GENE DE INTERESSE ESTÁ MAIS OU MENOS EXPRESSO DO QUE NA LINHAGEM SELVAGEM..... 27
- FIGURA 7: PORCENTAGEM DE SILENCIAMENTO DA PGPS 4 E 12. AS COLUNAS BRANCAS REPRESENTAM A LINHAGEM SELVAGEM E AS COLUNAS PRETAS REPRESENTAM A LINHAGEM RESISTENTE. AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO ENTRE AS SEXTUPLICATAS DE CADA GRUPO..... 28

FIGURA 8: EXPRESSÃO RELATIVA DA PGP 4. OS VALORES DE $2^{-\Delta CT}$ ESTÃO REPRESENTADOS PELAS BARRAS E INDICAM O NÚMERO DE VEZES QUE O GENE ALVO ESTÁ MAIS EXPRESSO QUE O GENE CONSTITUTIVO. OS *** INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ($P < 0,0001$, MANN WHITNEY). AS COLUNAS BRANCAS REPRESENTAM A LINHAGEM SELVAGEM E AS COLUNAS PRETAS REPRESENTAM A LINHAGEM RESISTENTE. AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO ENTRE AS SEXTUPLICATAS DE CADA GRUPO. 29

FIGURA 9: EXPRESSÃO RELATIVA DA PGP 12. OS VALORES DE $2^{-\Delta CT}$ ESTÃO REPRESENTADOS PELAS BARRAS E INDICAM O NÚMERO DE VEZES QUE O GENE ALVO ESTÁ MAIS EXPRESSO QUE O GENE CONSTITUTIVO. O * INDICA DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$, MANN WHITNEY). AS COLUNAS BRANCAS REPRESENTAM A LINHAGEM SELVAGEM E AS COLUNAS PRETAS REPRESENTAM A LINHAGEM RESISTENTE. AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO ENTRE AS SEXTUPLICATAS DE CADA GRUPO..... 29

FIGURA 10: PORCENTAGEM DE PARÁLISE DAS LARVAS L3 APÓS EXPOSIÇÃO À IVERMECTINA POR 48 HORAS NOS GRUPOS SILENCIADO PARA PGP 4, NÃO SILENCIADO E CONTROLE. O (-) REPRESENTA GRUPO NÃO SILENCIADO; O (+) REPRESENTA GRUPO SILENCIADO; O (CT) REPRESENTA GRUPO CONTROLE NÃO EXPOSTO A IVERME. OS *** INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ($P < 0,0001$, TESTE MANN WHITNEY). AS COLUNAS BRANCAS REPRESENTAM A LINHAGEM SELVAGEM E AS COLUNAS PRETAS REPRESENTAM A LINHAGEM RESISTENTE. AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO ENTRE AS SEXTUPLICATAS DE CADA GRUPO..... 30

FIGURA 11: PORCENTAGEM DE PARÁLISE DAS LARVAS L3 APÓS EXPOSIÇÃO À IVERMECTINA POR 48 HORAS NOS GRUPOS SILENCIADO PARA PGP 12, NÃO SILENCIADO E CONTROLE. O (-) REPRESENTA GRUPO NÃO SILENCIADO; O (+) REPRESENTA GRUPO SILENCIADO; O (CT) REPRESENTA GRUPO CONTROLE. OS *** INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ($P < 0,0001$, TESTE MANN WHITNEY). AS COLUNAS BRANCAS REPRESENTAM A LINHAGEM SELVAGEM E AS COLUNAS PRETAS REPRESENTAM A LINHAGEM RESISTENTE. AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO ENTRE AS SEXTUPLICATAS DE CADA GRUPO..... 31

FIGURA 12: PORCENTAGEM DE PARÁLISE DAS LARVAS L3 APÓS EXPOSIÇÃO À IVERMECTINA POR 48 HORAS NOS GRUPOS SILENCIADO PARA PGP 12, NÃO

SILENCIADO E CONTROLE. O (-) REPRESENTA GRUPO NÃO SILENCIADO; O (+) REPRESENTA GRUPO SILENCIADO; O (CT) REPRESENTA GRUPO CONTROLE. OS *** INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ($P < 0,0001$, TESTE MANN WHITNEY). AS COLUNAS BRANCAS REPRESENTAM A LINHAGEM SELVAGEM E AS COLUNAS PRETAS REPRESENTAM A LINHAGEM RESISTENTE. AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO ENTRE AS SEXTUPLICATAS DE CADA GRUPO..... 31

FIGURA 13: AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE CELULAR DE *C. ELEGANS* UTILIZANDO O MARCADOR IODETO DE PROPÍDEO, APÓS SILENCIAMENTO DA PGP 4 E EXPOSIÇÃO À IVERMECTINA. O (-) REPRESENTA GRUPO NÃO SILENCIADO; O (+) REPRESENTA GRUPO SILENCIADO. OS *** INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ($P < 0,0001$, TESTE MANN WHITNEY). AS COLUNAS BRANCAS REPRESENTAM A LINHAGEM SELVAGEM E AS COLUNAS PRETAS REPRESENTAM A LINHAGEM RESISTENTE. AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO ENTRE AS SEXTUPLICATAS DE CADA GRUPO..... 32

FIGURA 14: AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE CELULAR DE *C. ELEGANS* UTILIZANDO O MARCADOR IODETO DE PROPÍDEO, APÓS SILENCIAMENTO DA PGP 12 E EXPOSIÇÃO À IVERMECTINA. O (-) REPRESENTA GRUPO NÃO SILENCIADO; O (+) REPRESENTA GRUPO SILENCIADO. OS *** INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ($P < 0,0001$, TESTE MANN WHITNEY). AS COLUNAS BRANCAS REPRESENTAM A LINHAGEM SELVAGEM E AS COLUNAS PRETAS REPRESENTAM A LINHAGEM RESISTENTE. AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO ENTRE AS SEXTUPLICATAS DE CADA GRUPO..... 33

FIGURA 15: AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE CELULAR DE *C. ELEGANS* UTILIZANDO O MARCADOR IODETO DE PROPÍDEO, APÓS SILENCIAMENTO DAS PGPS 4 E 12 CONCOMITANTEMENTE E EXPOSIÇÃO À IVERMECTINA. O (-) REPRESENTA GRUPO NÃO SILENCIADO; O (+) REPRESENTA GRUPO SILENCIADO. OS *** INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ($P < 0,0001$, TESTE MANN WHITNEY). AS COLUNAS BRANCAS REPRESENTAM A LINHAGEM SELVAGEM E AS COLUNAS PRETAS REPRESENTAM A LINHAGEM RESISTENTE. AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO ENTRE AS SEXTUPLICATAS DE CADA GRUPO..... 33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: INFECÇÕES CAUSADAS POR HELMINTOS TRANSMITIDOS PELO SOLO. FONTE:ADAPTADA DE BETHONY <i>ET AL.</i> , 2006.	2
TABELA 2: LISTA DAS SEQUÊNCIAS DE INICIADORES DAS GLICOPROTEÍNAS-P E DOS GENES CONSTITUTIVOS CDC-42 E PMP-3.	18

LISTA DE ABREVIACÕES

- ABC – ATP-binding cassette
- B.O.D. – Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DNA – “Deoxyribonucleic acid” (Ácido Desoxirribonucléico)
- dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- dsRNA – “Double-strand RNA” (RNA fita dupla)
- GABA – Ácido gama-aminobutírico
- MDR – Resistência múltipla a fármacos
- mRNA – RNA mensageiro
- NGM-Agar – “Nematode Growth media” (Meio de cultura para nematódeos)
- IPTG – Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- PCR – “Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)
- Pgp – Glicoproteína-P
- qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
- RNA – “Ribonucleic acid” (Ácido Ribonucléico)
- RNAi – RNA de interferência
- WHO – “World Health Organization” (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

O uso inadequado de drogas para o controle das doenças parasitárias induz a seleção genética de subpopulações de parasitos resistentes. As glicoproteínas P (Pgps) são transportadores ABC cujas variações alélicas e de expressão gênica estão envolvidas com a resistência a drogas anti-helmínticas. O *Caenorhabditis elegans* é um nematódeo de vida livre que apresenta alta similaridade fisiológica, molecular e morfológica com os nematódeos parasitas. A interferência genética mediada por RNA fita-dupla (dsRNA) é uma ferramenta valiosa na análise da função de genes em *C.elegans*. O projeto propõe induzir a resistência ao anti-helmintico ivermectina em *C.elegans*, e avaliar as diferenças de expressão gênica quando realizado o silenciamento em relação aos vermes selvagens. A linhagem resistente foi obtida utilizando-se subdosagens crescentes de ivermectina durante sucessivas passagens *in vitro*. Após 48 semanas de seleção induzida foi obtida linhagem resistente a 30 ng/mL de ivermectina. Os RNAs de *C.elegans* resistentes e susceptíveis foram extraídos e os cDNAs produzidos. Doze genes de Pgps foram selecionados e a partir deles desenhados primers para amplificação das sequências gênicas pela técnica de PCR e qPCR. A análise das alterações nas expressões gênicas foram executadas por qPCR comparando-se a linhagem resistente em relação à selvagem. Os resultados mostram que apenas 16.66% dos genes estão positivamente regulados em relação ao selvagem. Posteriormente essas sequências foram clonadas em vetor e transformadas em cepa bacteriana adequada. O ensaio de silenciamento baseou-se em alimentar os vermes com bactérias produtoras do dsRNA e alterações na expressão desses genes foram analisadas pela qPCR. Foram obtidos uma redução de 97% da Pgp 4 e 93% da Pgp 12, para as linhagens selvagem e resistente respectivamente; ensaios biológicos de fenótipo avaliando a motilidade e morte celular após o silenciamento mostraram que a Pgp 4 está diretamente relacionada ao fenótipo de susceptibilidade e a Pgp 12 relacionada ao fenótipo de resistência à ivermectina. Além disso, foi feito um estudo comparativo da distância de glicoproteínas-P de nematódeos evidenciando que as Pgps de *C. elegans* são muito próximas das glicoproteínas de diversos nematódeos parasitos, permitindo uma possível extrapolação dos dados. Este estudo contribuiu para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência a anti-helmínticos em nematódeos.

ABSTRACT

Improper use of drugs for parasitic diseases control induces genetic selection of resistant parasites subpopulations. The P-glycoproteins (PGPS) are ABC transporters whose allelic variations and gene expression are involved in resistance to anthelmintic drugs. *Caenorhabditis elegans* is a free-living nematode that has high physiological, molecular and morphological similarity with nematode parasites. The genetic interference mediated by double-stranded RNA (dsRNA) is a valuable tool in the analysis of gene function in *C.elegans*. The project aimed to induce resistance using anthelmintic ivermectin in *C.elegans*, and evaluate the differences in gene expression and phenotyping applying Pgp silencing in wild-type and resistant worms. The resistant strain was obtained using increasing doses of ivermectin during successive passages *in vitro*. After 48 weeks of selection it was obtained a resistant strain (30 ng/ml of ivermectin). The RNAs were extracted from resistant and susceptible *C.elegans* and converted in cDNAs. It was designed primers for amplification of 12 Pgps gene sequences by PCR and qPCR. The analysis in gene expression changes were performed by qPCR comparing the resistant and wild-type strains. The results showed that only 16.66% of the genes are up-regulated in resistant group compared to the wild-type. Subsequently, these sequences were cloned into vectors and transformed in suitable bacterial strain. After that, the worms were feeding with this transformed bacterial and expression changes of these genes were analyzed by qPCR. It was obtained silencing of 99% for Pgp 4 and 94% for Pgp 12 in the resistant strains, in comparison to wild-type (97% and 93%, respectively). Phenotype assays evaluating motility and cell death after the silencing showed that Pgp 4 is related to the susceptibility of ivermectin and Pgp 12 related to resistant phenotype. In addition, it was performed a study comparing the distance of P-glycoproteins in nematodes showing that *C. elegans* Pgps are very close to those of various parasitic nematodes, allowing a possible extrapolation of data. This study contributed to the understanding of the mechanisms involved in anthelmintic resistance in nematodes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Parasitárias Causadas por Helmintos

As doenças parasitárias humanas causadas por geohelmintos acometem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo (Tabela 1) e mais de 5 bilhões estão em área de risco de infecção (Chammartin, 2013). As geohelmintoses ocasionam perda de 5 a 39 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) (Murray *et al.*, 2012) atribuídos principalmente a anemia e redução do desenvolvimento físico e cognitivo causados pelo parasitismo (Strunz *et al.*, 2014). As maiores prevalências são registradas na África, Ásia e América Latina, onde as condições sócio-econômicas e sanitárias são ainda muitas vezes precárias. Trabalhos como o de Ziegelbauer e colaboradores (2012) e de Strunz e colaboradores (2014) mostram que o acesso ao saneamento básico, tratamento de água e uso de sapatos são fatores extremamente importantes que diminuem a prevalência de infecções por helmintos transmitidos pelo solo em locais onde antes a taxa de infecção era alta. No Brasil, a prevalência dessas helmintoses também é alta (Figura 1) e está fortemente relacionada aos níveis sócio-econômicos, sendo a população carente a mais afetada (Hotez *et al.*, 2005).

Número de pessoas infectadas com helmintos transmitidos pelo solo (milhões)	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	807-1221
<i>Trichuris trichiura</i>	604-795
<i>Necator americanus</i> e <i>Ancylostoma duodenale</i>	576-740
<i>Strongyloides stercoralis</i>	30-100

Tabela 1: Infecções causadas por helmintos transmitidos pelo solo. Fonte: Adaptada de Bethony *et al.*, 2006.

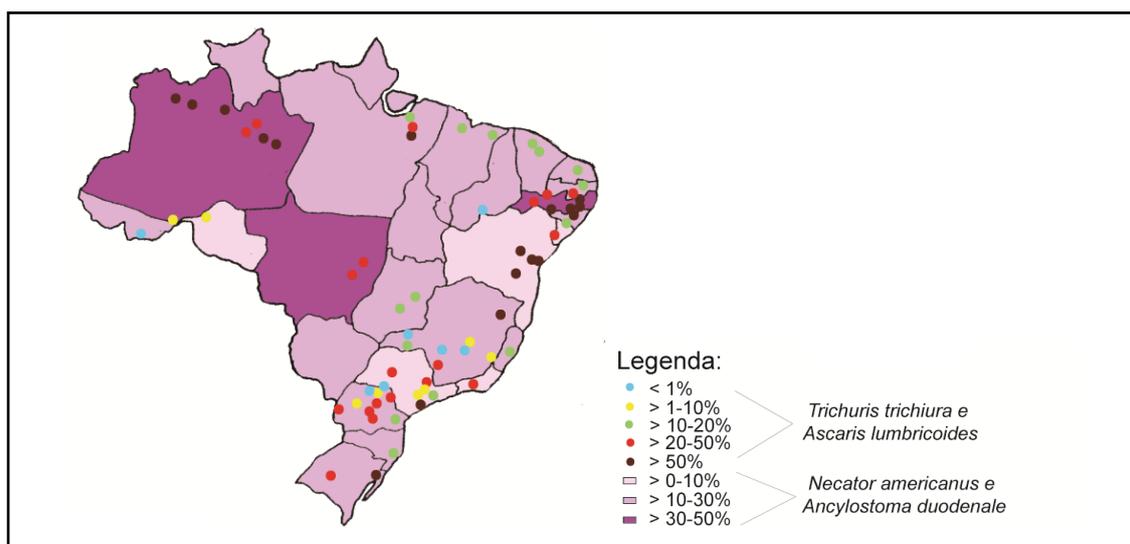


Figura 1: Mapa do Brasil mostrando a prevalência das helmintoses transmitidas pelo solo. Fonte: Baseada em dados da OMS de 2010 e no Atlas Global de Infecções por Helmintos (www.thiswormyworld.org).

As espécies de helmintos denominadas pela Organização Mundial da Saúde como geohelmintos ou helmintos transmitidos pelo solo são: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*, porém alguns autores já incluem a espécie *Strongyloides stercoralis* no mesmo grupo (Krolewiecki *et al.*, 2013; Strunz *et al.*, 2014; Marcos & Machicado, 2014). As pessoas são infectadas após a ingestão de ovos do solo ou alimentos contaminados (*A. lumbricoides* e *T. trichiura*), ou por meio de penetração ativa da pele por estágios larvais infectantes presentes no solo contaminado (ancilostomíase e estrogiloidíase). O hospedeiro parasitado por estas espécies pode apresentar quadros de desnutrição, anemia e diarreia, o que pode interferir no desenvolvimento intelectual da população mais jovem que são, em geral, os mais acometidos (OMS, 2014). Assim, faz-se necessária intervenção para o controle dessas parasitoses, seja pela melhoria de condições de vida ou pelo tratamento específico dos indivíduos parasitados.

Na medicina veterinária as infecções por nematódeos são extremamente frequentes e podem tornar-se um empecilho para a produção de animais, pois os custos com os tratamentos e profilaxias tornam a produção inviável devido aos gastos excessivos (MacRae, 1993; Araújo *et al.*, 2004). Essas helmintoses são ainda mais relevantes quando a criação de animais é feita pelo sistema de manejo extensivo, uma vez que estes ficam mais expostos aos agentes parasitários (Roepstorff & Murrell, 1997). As infecções com nematódeos gastrointestinais em animais de criação determinam importantes perdas econômicas devido tanto à mortalidade, quanto à redução na produtividade dos animais (Amarante, 2004; Araújo *et al.*, 2006).

No Brasil, os principais nematódeos parasitos de ruminantes de produção são representados pelos seguintes gêneros: *Cooperia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus*, *Oesophagostomum*, *Strongyloides*, *Dictyocaulus* e *Bunostomum* (Lima, 2000; Ramos *et al.*, 2004; Amarante *et al.*, 2004; Costa, 2007). A ocorrência e prevalência das infecções por estes nematódeos podem variar de acordo com a região, uma vez que fatores como clima, idade, raça, tipo de exploração (leite, corte ou misto), manejo e pastagens podem influenciar na epidemiologia das parasitoses (Reis, 2004). Nas criações de bovinos do sudeste brasileiro é estimado um índice de mortalidade de bezerras entre 5 e 10%, principalmente em rebanho leiteiro, devido às infecções helmínticas (Silva & Lima, 2009). A medida de controle mais utilizada para estes nematódeos é o uso regular de anti-helmínticos (Wagner & Polley, 1997; Gerwert *et al.*, 2002).

As principais classes de fármacos anti-helmínticos utilizados para o tratamento dessas parasitoses são: os benzimidazóis, que atuam modificando a estrutura celular dos nematódeos (Lancey & Gill, 1994); os imidotiazóis, que atuam sobre os receptores nicotínicos das células musculares induzindo a abertura dos canais iônicos, aumentando a condução de sódio e despolarização da membrana, causando a contração muscular e paralisia dos parasitos (Sangster, 1996); as tetrahidropirimidinas, que atuam no sistema nervoso dos nematódeos sobre receptores de acetilcolina; e avermectinas, que atuam sobre o sistema nervoso dos vermes aumentando a permeabilidade das células nervosas ao cloro (Prichard, 1994).

A ivermectina, pertencente a classe das avermectinas, é um dos fármacos mais importantes na medicina veterinária e humana (Geary, 2005), com capacidade de ação em endo e ectoparasitos (Orton, 1992; Geary, 2005). Apesar da alta eficiência (Geary, 2005), são relatados casos de resistência a muitos anos (Van Wyk & Malan, 1988). Devido a importância, neste trabalho utilizamos a ivermectina para o estudo dos mecanismos de resistência a essa droga.

1.2 Ivermectina

A ivermectina é um anti-parasitário de amplo espectro que foi introduzido no mercado veterinário no ano 1981 e para tratamento humano após 1985 (Geary, 2005). É indicada no tratamento de diversas helmintoses e ectoparasitoses (Orton, 1992) como estrogiloidíase (Grove, 1983; Greene *et al.*, 1989), oncocercose (Goa *et al.*, 1991; Geary, 2005), filariose (Campbell, 1982; Geary, 2005), dirofilariose (Geary, 2005), dentre outros.

A ivermectina é uma lactona macrocíclica sintética do grupo das avermectinas, derivada da fermentação de actinomicetos do gênero *Streptomyces* (Crump & Otaguro, 2005). Sabe-se que as lactonas macrocíclicas potencializam a ação inibidora neuronal mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) promovendo hiperpolarização do neurônio e, portanto, inibindo a transmissão nervosa (Sartor & Bicudo, 1999). Além disso, este medicamento atua como agonista de alta afinidade sobre a subunidade α de canais iônicos seletivos ao cloro presentes no parasito. Nos invertebrados, o ligante a estes canais iônicos é o glutamato e os receptores estão localizados em células musculares somáticas, especialmente da bomba faríngea e do útero (Cully *et al.*, 1996). O canal de cloro é aberto, aumentando a condução intracelular do neurotransmissor,

alterando a membrana do neurônio, hiperpolarizando-a, o que resulta na paralisia motora do tipo flácida e eliminação do parasito (Cully *et al.*, 1994). Nos nematódeos, a interferência na transmissão dos impulsos nervosos ocorre entre células nervosas, enquanto nos artrópodes isto acontece entre células nervosas e musculares (Spinosa *et al.*, 2011).

Apesar de os mamíferos utilizarem o GABA como neurotransmissor, as avermectinas geralmente não causam efeitos tóxicos neles, pois, devido ao seu alto peso molecular não atravessam a barreira hematoencefálica, não atuando no sistema nervoso central (Delayte *et al.*, 2006).

A importância deste fármaco na medicina veterinária foi destacada desde o início de sua utilização, na forma injetável, já que apresentava alta potência (doses menores que 1nM para alguns tratamentos), amplo espectro de ação e persistência no organismo (Geary, 2005). Posteriormente, com a introdução de formulações orais e tópicas para os animais de criação, os custos para administração do fármaco foram reduzidos e gerou-se ainda maior aceitação deste anti-helmíntico nos programas de controle de helmintoses na criação de animais de grande porte (Geary, 2005).

Devido ao grande sucesso nos tratamentos com ivermectina, o fármaco começou a ser amplamente utilizado, principalmente no controle de parasitoses animais (Ômura & Crump, 2004). Desta forma, os criadores, com ou sem instruções corretas de uso, utilizaram a ivermectina e não só facilitaram, como agilizaram, um processo de seleção de parasitos resistentes (Geary, 2005).

1.3 Resistência à ivermectina

O uso inadequado de fármacos para o controle das doenças parasitárias induz a seleção genética de subpopulações de parasitos resistentes e contribui para o surgimento e dispersão de resistência aos quimioterápicos utilizados (Kaplan, 2004; Hotez *et al.*, 2008). Quando uma classe de anti-helmíntico é introduzida pela primeira vez, a frequência de alelos envolvidos em uma possível expressão de resistência é baixa; porém, uma vez que a resistência é detectada em uma população, sua reversão ou perda nunca foi observada (Sangster & Dobson, 2002).

Desde 1987 Waller já relatava sobre resistência à fármacos anti-helmínticos (Waller, 1987) e, em 1988, o primeiro caso de resistência à ivermectina foi descrito (Van Wyk & Malan, 1988). Estudos posteriores de Van Wyk e colaboradores (1999),

sobre a resistência a ivermectina em ovelhas, mostraram que, em países da África do Sul e no Paraguai, a resistência à ivermectina chegava a 73% e 67%, respectivamente. Geerts e Gryseels em 2000, mostraram que nematódeos que parasitam populações humanas, como *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*, já apresentam indícios de resistência à anti-helmínticos (Geerts & Gryseels, 2000). Vercruyssen e colaboradores (2011) também mostraram evidências de resistência à fármacos anti-helmínticos em helmintos transmitidos pelo solo (Vercruyssen *et al.*, 2011).

Diversos trabalhos apontam para a gravidade da situação, mostrando cada vez mais que o conhecimento dos mecanismos que ocasionam a resistência à fármacos anti-helmínticos é fundamental para que estratégias de controle adicionais possam ser desenvolvidas (Waller, 1994; Jackson & Coop, 2000; Kaplan, 2004; Wolstenholme *et al.*, 2004; Bartley, 2009).

De acordo com Wolstenholme e colaboradores (2004), os mecanismos de resistência até agora conhecidos são: (a) alteração no alvo molecular para que o medicamento já não reconheça o alvo, sendo assim ineficaz (Kwa *et al.*, 1994; Silvestre & Cabaret, 2002); (b) mudança no metabolismo que inativa ou remove a droga, ou que impede sua ativação (Robinson *et al.*, 2004); (c) amplificação de genes-alvo para superar a ação da droga e a (d) alteração na distribuição da droga no organismo alvo, que impede que o fármaco acesse seu local de ação (Sangster *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1999; Trailovic *et al.*, 2002).

Uma das possíveis vias de resistência consiste no efluxo de fármacos da célula realizado por uma família de proteínas transmembranas (Glicoproteínas-P) (Blackhall *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998; Le Jambre *et al.*, 1999; Sangster 1999), assim, o presente trabalho foi focado no estudo da participação dessas proteínas na resistência à ivermectina.

1.4 Glicoproteínas-P

As glicoproteínas-P (Pgps) foram os primeiros membros do sub-grupo de transportadores ATP-binding cassette (ABC) a serem estudados e sua superexpressão está relacionada a resistência múltipla a fármacos (MDR) em células de mamíferos e células tumorais humanas (Sharom, 2011). Como muitas outras proteínas ABC, as Pgps são constituídas por dois domínios ligados à membrana, cada um composto por seis hélices transmembranas (domínio transmembrana), e dois domínios citoplasmáticos de

ligação a nucleotídeos que se ligam e hidrolisam o ATP (Schmitt & Tampé, 2002; Jones & George, 2004). Dessa forma, as Pgps utilizam a energia de hidrólise do ATP para bombear o substrato através da membrana (Jin *et al.*, 2012).

Atualmente sabe-se que o genoma de *Caenorhabditis elegans* codifica 15 Pgps (Sheps *et al.*, 2004). Embora esteja presente em quase todos os tecidos (Zhao *et al.*, 2004), as funções de apenas 4 delas foram até então determinadas. A Pgp-2 é expressa no intestino e é necessária para a acidificação dos lisossomos e armazenamento de lipídios (Schroeder *et al.*, 2007). As Pgps-1 e 3 são necessárias para resistir às toxinas fenazinas secretadas pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999), e para contribuir na resistência à metais pesados e drogas (Broeks *et al.*, 1995; Broeks *et al.*, 1996). A Pgp-5 faz parte da maquinaria necessária para proteger as células intestinais de *C. elegans* de certas toxinas bióticas e abióticas, como o fazem outras glicoproteínas-P de *C. elegans* e mamíferos (Kurz *et al.*, 2007).

Estudar o desenvolvimento de mecanismos específicos de resistência a fármacos em nematódeos parasitas é mais dispendioso e complicado, já que demanda desenvolvimento em um hospedeiro. Assim, o *C. elegans* foi escolhido e utilizado neste trabalho como um modelo experimental.

1.5 *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental

O *Caenorhabditis elegans* é um nematódeo de vida livre que foi primeiramente descrito por Emile Maupas em 1900 (Maupas, 1900). Como mostrado na Figura 2, seu ciclo de vida, estudado por Nigon em 1949, é de 2 dias e meio à temperatura de 25°C (Blaxter, 2011); a maior parte da população é constituída por indivíduos hermafroditas (5AA+XX) com a presença reduzida de machos (5AA+XO) (Nigon, 1949).

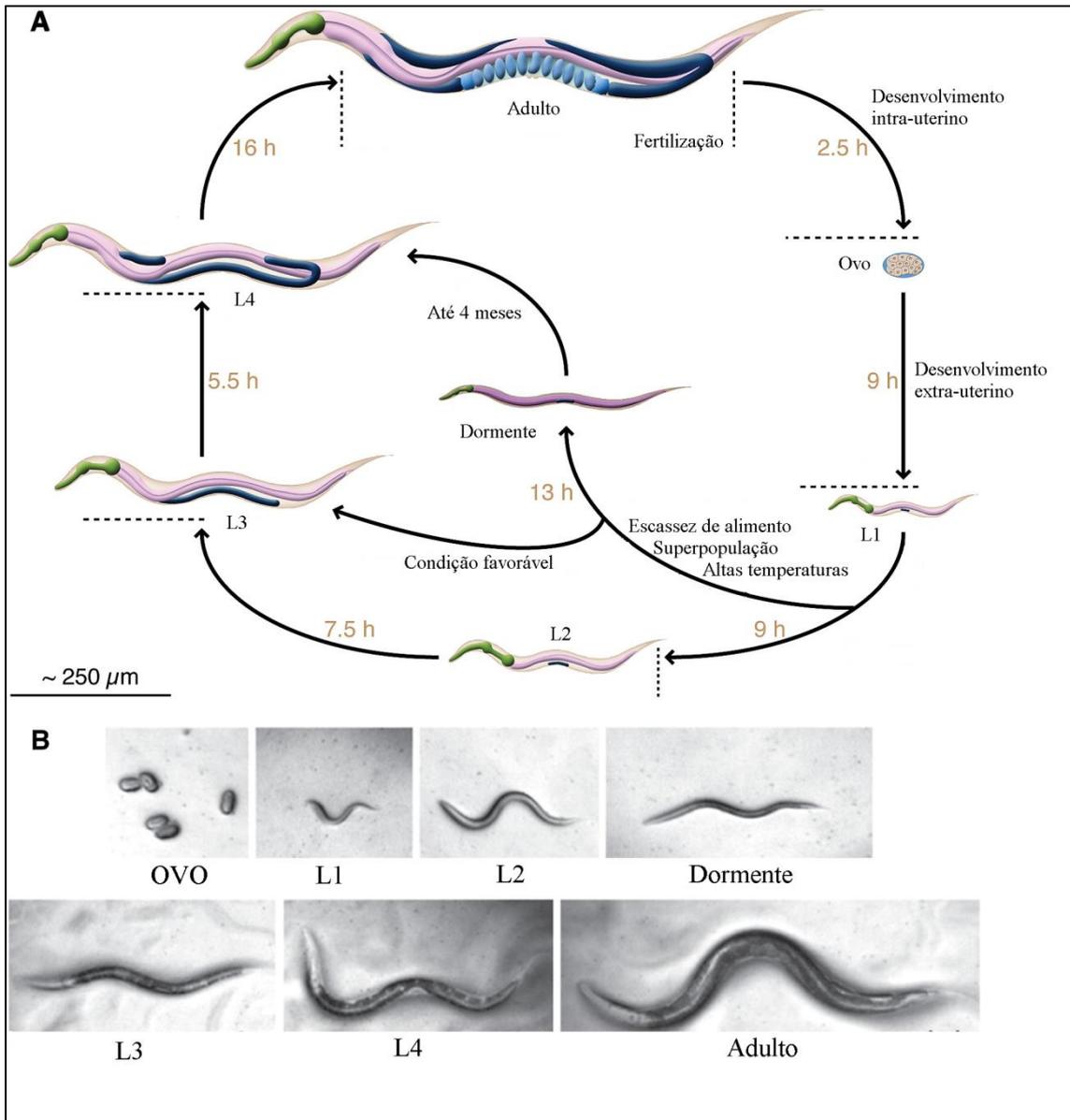


Figura 2: Características biológicas e morfológicas de *Caenorhabditis elegans*. A) Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans* à temperatura de 25°C. B) Fotos dos estágios de vida do *C. elegans* visto ao microscópio óptico. Fonte: Adaptada de Erkut, Cihan (2014): *C. elegans* life cycle and developmental stages.

Em 1979, Brenner definiu o *C. elegans* como organismo modelo para estudos genéticos, começando uma linhagem proveniente de um indivíduo hermafrodita selvagem (denominada N2) (Brenner, 1979). Há muito o *C. elegans* vem sendo utilizado como modelo de estudo em diversos setores da Biologia e Medicina em função dos baixos custos econômicos para manutenção, cultivo e execução de experimentos. Além disso, encontra-se filogeneticamente posicionado próximo às espécies de interesse para a parasitologia veterinária e humana, apresentando alta similaridade fisiológica, molecular e morfológica com os nematódeos parasitas (Blaxter *et al.*, 2000). Como

mostrado na Figura 3, o *C. elegans* foi classificado, a partir de estudos da subunidade do RNA ribossomal, num clado monofilético denominado Chromadoria que reúne diversas espécies de importância parasitológica (Blaxter, 2011). Além disso esse helminto possui ferramentas moleculares que permitem o estudo da regulação gênica a partir do uso de organismos geneticamente deficientes (knockout) e de RNA de interferência (Fire et al., 1998). Portanto, o *C. elegans* constitui-se em um bom modelo para o estudo da resistência a anti-helmínticos (Dent et al., 1999).

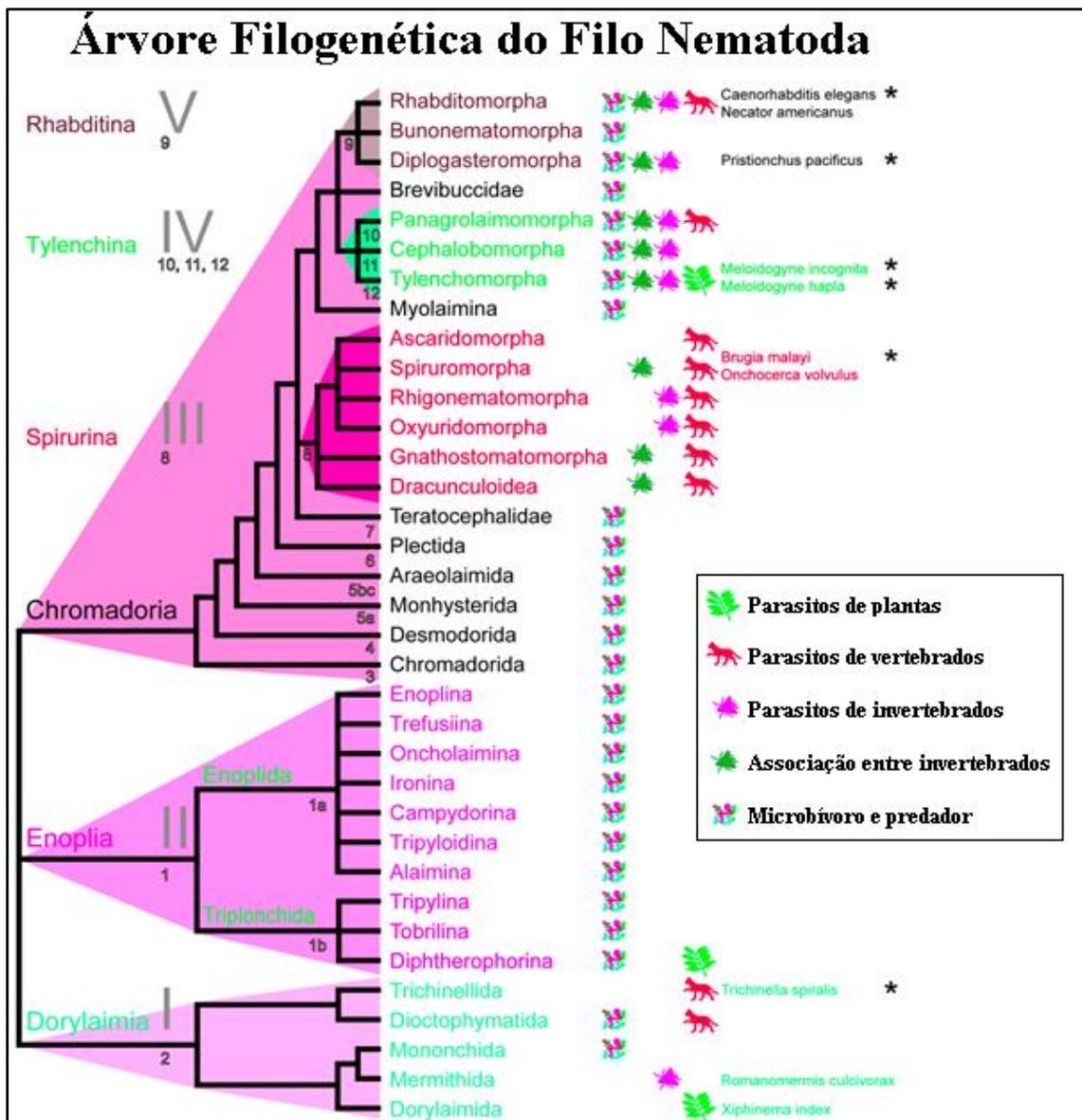


Figura 3: As relações do filo Nematoda. Árvore filogenética construída a partir da comparação da subunidade de RNA ribossomal dos organismos. A nomenclatura sistemática adotada foi a introduzida por Blaxter em 1998. Fonte: Adaptada de Blaxter M (2011) Nematodes: The Worm and Its Relatives. PLoS Biol 9(4): e1001050. doi:10.1371/journal.pbio.1001050.

Por ser um bom modelo experimental, várias técnicas de estudo foram desenvolvidas para serem aplicadas em *C. elegans*. Para estudo de genômica funcional destaca-se o RNA de interferência (RNAi). O RNAi é uma técnica que foi descrita primeiramente em *C. elegans*, em que a introdução de moléculas de RNA fita-dupla (dsRNA) na célula do organismo, ao serem incorporadas na forma ativa a um complexo intracitoplasmático, se ligam a uma sequência de nucleotídeos complementar localizada no mRNA-alvo, resultando em potente e específica inativação do gene correspondente, através da inibição da tradução e/ou degradação do mRNA (Bass, 1998; Fire *et al.*, 1998).

A identificação de alterações moleculares em uma linhagem resistente constitui o primeiro estágio para desvendar a complexa arquitetura de modificações moleculares envolvidas no processo de resistência anti-helmíntica. Os mecanismos de resistência anti-helmíntica em nematódeos são pouco compreendidos (Wolstenholme *et al.*, 2004; Sangster *et al.*, 2005; Jabbar *et al.*, 2006). Dessa forma, este estudo poderá contribuir não só para o entendimento dos mecanismos envolvidos com a resistência anti-helmíntica em nematódeos, mas também auxiliar na identificação de possíveis alvos moleculares associados à resistência anti-helmíntica.

2. JUSTIFICATIVA

As doenças causadas por nematódeos geram problemas para a criação de animais de produção, agricultura e saúde pública e contribuem para aumento nos custos de produção, menor oferta de alimentos e déficits na saúde do hospedeiro (Moncayo & Cooper, 2006; Nicol *et al.*, 2011). Os programas de controle parasitário, culturalmente, são realizados por meio do emprego de anti-helmínticos, com o tratamento em massa das populações humanas e animais, o que pode contribuir para seleção de parasitos resistentes (Wolstenholme *et al.*, 2004; Osei-Atweneboana *et al.*, 2007; James *et al.*, 2009). Embora os indícios de resistência anti-helmíntica para nematóides antropofílicos ainda não alcancem os mesmos patamares dos nematóides parasitos de animais, há uma preocupação crescente dos diversos setores responsáveis pelas políticas públicas de saúde humana. Esta resistência é desencadeada pela constante seleção de subpopulações de helmintos capazes de tolerar concentrações tóxicas. Estes parasitos apresentam altos índices de diversidade genética, elevado tamanho populacional (grande capacidade em gerar descendentes) e, em geral, seus hospedeiros são infectados por vários vermes o que contribui para a geração e seleção de subpopulações resistentes (Gilleard and Beech, 2007). Entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares dos medicamentos utilizados.

A Ivermectina representa uma das mais importantes drogas contra nematóides parasitas de animais e humanos (Geary, 2005). O primeiro caso de resistência apareceu rapidamente poucos anos após o seu lançamento, em 1988 (Van Wyk & Malan, 1988). No estudo de resistência a ivermectina o *C. elegans* poderia constituir um bom modelo com baixo custo de manutenção, uma vez que é um nematódeo de fácil cultivo, que apresenta proximidade filogenética a diversos helmintos de importância humana e veterinária e que permite a possibilidade de estudos acerca de expressão gênica. Nesta dissertação objetivamos contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos de resistência a ivermectina em nematódeos para que alternativas de tratamentos anti-helmínticos sejam desenvolvidas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o papel das glicoproteínas-P de *Caenorhabditis elegans* na resistência à ivermectina.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Selecionar *in vitro* uma linhagem de *C. elegans* resistente à concentrações letais de ivermectina;

3.2.2 Avaliar alterações na expressão de mRNA de glicoproteínas-P na linhagem de *C. elegans* resistente à ivermectina;

3.2.3 Induzir o silenciamento de glicoproteínas-P;

3.2.4 Avaliar as alterações do fenótipo de resistência decorrente do silenciamento de glicoproteínas-P frente a exposição à ivermectina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção da linhagem selvagem de *Caenorhabditis elegans*

Utilizamos a linhagem selvagem Bristol N2 (Brenner, 1974) de *C. elegans*, gentilmente cedida pelo Dr. Carlos Winter (Departamento de Parasitologia/ICB/USP). Culturas monoxênicas da referida linhagem foram mantidas em meio NGM-Agar (Nematode Growth media) semeado com bactérias *Escherichia coli* NA22 em estufa incubadora para B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (Tecnal TE-371, Brasil) a 22 °C, como descrito por Wood, 1988. O meio NGM é composto por 0,25 g de peptona (Neagen, EUA), 0,30 g de NaCl (Dinâmica, Brasil), 2,50 g de bactoágar (Sigma-Aldrich, EUA) e 100 µL de colesterol (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA), 100 µL CaCl₂ 1M (Dinâmica, Brasil), 100 µL MgSO₄ 1M (Impex, Inglaterra) e 5 mL de Tampão Fosfato de Potássio [TPK – 2,14 g de K₂HPO₄ (Nuclear, Brasil) e 11,94 g de KH₂PO₄ (Nuclear, Brasil) em 100 mL de água] em pH 6, em volume final de 100mL de água Milli-Q.

4.2 Seleção de linhagem de *C. elegans* resistente à Ivermectina

A seleção da linhagem resistente (linhagem IVM30) foi realizada utilizando-se a linhagem N2 em sucessivas passagens *in vitro* na presença de subdosagens crescentes de ivermectina 1% (Ouro Fino, Brasil), conforme previamente descrito na literatura (James and Davey, 2009). Resumidamente, 1 ng/mL de ivermectina foi inicialmente adicionado quando da preparação de placas com meio NGM, seguida do repique da linhagem selvagem em placas controle (sem fármaco) e placas com superdosagem de 200 ng/mL (com morte de todos os vermes). Após uma semana de cultura, os vermes que sobreviveram foram transferidos para placas contendo 2 ng/mL de ivermectina, e também para placas controle e com superdosagem. Assim sucessivamente, a cada semana, os *C. elegans* que sobreviviam na maior concentração da droga eram transferidos para placas de NGM contendo dosagens cada vez maiores, chegando, após seis gerações, a uma linhagem resistente a 30 ng/mL de ivermectina.

4.3 Extração do RNA de *C. elegans* e síntese do cDNA

Após 5 dias do repique, as placas contendo os vermes foram lavadas com solução tampão M9 [composta por 5,8 g de Na₂HPO₄.7H₂O (Nuclear, Brasil), 3 g de

KH_2PO_4 (Nuclear, Brasil), 5 g de NaCl (Dinâmica, Brasil) e 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Impex, Inglaterra) em 1000 mL de água) e o material foi transferido para tubo eppendorf; em seguida, os tubos foram centrifugados (Eppendorf centrifuge 5804 R, Alemanha) a 7.000g/10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. A partir do material coletado, o RNA do pool de vermes de cada linhagem foi extraído por meio do kit de extração de RNA NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Alemanha) de acordo com instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi eluído em 50 μL de água Rnase-free (Pht, EUA) e quantificado em espectrofotômetro na absorbância 260 nm (Nanodrop, Thermo Scientific, EUA). Para verificar a integridade e qualidade do mesmo, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (Agargen, Brasil) 2%, onde se avaliou as regiões 18S e 28S do RNA ribossomal.

Posteriormente esses RNAs foram usados para a síntese de cDNA utilizando o kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis (Invitrogen, USA), de acordo com instrução do fabricante. As reações foram realizadas conforme as instruções do fabricante. Durante a síntese de cDNA foi feito um controle negativo (branco), onde o RNA foi substituído por água Milli-Q impossibilitando a síntese de cDNA.

4.4 Reação de PCR quantitativa

Depois de comprovada ausência de contaminação com DNA genômico, realizou-se a PCR quantitativa (qPCR) (ABI PRISM 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems, EUA) para determinação do perfil de expressão relativa dos genes de Pgps em relação aos controles endógenos, CDC-42 e PMP-3. Os primeiros testes foram realizados para definir a curva de eficiência de amplificação de cada par de iniciadores. Em seguida os ensaios de quantificação foram realizados utilizando 5 μL do reagente 2X Power Sybr®-Green ABI (Thermo Fisher, EUA), 1 μL de cada iniciador, direto e reverso (10 μM), e 2 μL de cDNA (50 ng/ μL) em um volume final de 10 μL por poço. O processo de amplificação ocorreu da seguinte forma: pré-desnaturação a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e anelamento a 60°C durante 1 minuto.

Por fim, a análise da qPCR foi realizada pelo 7500 Software v2.0.1 (Thermo Fisher, EUA), e os resultados foram determinados usando o método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livack & Schmittgen, 2001), que representa o número de vezes que os genes de interesse estão mais ou menos expressos nos vermes resistentes em relação aos selvagens após

normalizados pelos genes constitutivos. A sequência dos iniciadores de Pgps e dos controles endógenos está listada na Tabela 2.

Genes	Iniciador	Sequências 5' → 3'
Pgp 1	Direto Reverso	TAGCACCTGAAGATGTCCTG AATGTCGTTGTGTATCGGTAC
Pgp 2	Direto Reverso	AACGAAGTCAGACAAGTCTAAG CATGAATAACTGCTGCAACTG
Pgp 3	Direto Reverso	CAGAAGACGATATAACACTTGG AATGCTCCATTAAGTCACTC
Pgp 4	Direto Reverso	ATTGCCAGCGAGCATGTGGAG TGCCGCGCTTAGTACAAGCC
Pgp 5	Direto Reverso	TAACTGGTATGTGTCAACCG CACAACGCGATTCATATCAC
Pgp 7	Direto Reverso	AACTGCTCAAGTCCTGGTAAC ACATTCCGCGTTCATACTGC
Pgp 8	Direto Reverso	CGATGTGCTGATTCCAGTTG ATGGTTGTGTTAATCCTGTGC
Pgp 9	Direto Reverso	ATTCATCATCGGAAGGATCATC CCTACTGCCAACATTAACCG
Pgp 10	Direto Reverso	GGACTGTCGATTGCGATG TCGAATGTATGCCTTCTTGATG
Pgp 11	Direto Reverso	AGCAGTATTACGACAAGATGC CCACGGACAAGCATACAAC
Pgp 12	Direto Reverso	GAAGTGGCGTAAGAATGGAG AACCGACATCCTCAGTCG
Pgp 13	Direto Reverso	GTGTCTCTCAACCAGTTCTTG ACGAAGATTCCAAGTCCTAAG
CDC-42	Direto Reverso	CTGCTGGACAGGAAGATTACG CTCGGACATTCTCGAATGAAG
PMP-3	Direto Reverso	GTTCCCGTGTTTCATCACTCAT ACACCGTCGAGAAGCTGTAGA

Tabela 2: Lista das sequências de iniciadores das glicoproteínas-P e dos genes constitutivos CDC-42 e PMP-3.

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para obter a clonagem dos genes de Pgps no vetor, primeiramente foi feita uma PCR convencional utilizando-se 6 µL de tampão GoTaq® (Promega, Barsil) 5x, 1 µL de dNTP mix (10 µM) (Promega, Barsil), 1 µL de cada iniciador, direto e reverso, 0,5 µL de GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl) (Promega, Barsil), 16,5 µL de água para PCR (Pht, EUA) e 4 µL de cDNA (250 ng/µL) em um volume final de 30 µL. Foram preparados 24 reações, sendo 12 cada um de um par de iniciador e cDNA e os outros 12 cada um de um par de iniciador e água, constituindo os controles negativos (branco). Para verificar

o êxito do experimento foi realizada um eletroforese em gel de agarose (Agargen, Brasil) 1%, onde se observou o tamanho e nitidez das bandas.

4.6 Clonagem em vetor pGEM®-T e Transformação Bacteriana

Após a PCR, as Pgps 4, 12 e 13 foram selecionadas para clonagem seguindo o protocolo do kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vectors Systems (Promega, EUA). Posteriormente, o vetor foi inserido em bactéria competente DH5 α de acordo com o protocolo Transformation Using the pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Ligation Reactions (Promega, EUA). As bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar, composto de 1 g de triptona (Sigma-Aldrich, EUA), 0,5 g de extrato de levedura (Kasvi, Itália), 1 g de NaCl (Dinâmica, Brasil) e 1,5 g de ágar (Sigma-Aldrich, EUA) em volume final de 100mL acrescido de ampicilina (100 μ g/mL) (Gibco® Life technologies, EUA), isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,4 mM (Invitrogen, Brasil) e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) (Sigma-Aldrich, EUA). Para confirmar a eficiência da clonagem foi feito uma PCR com as 15 colônias brancas selecionadas, sendo 5 de cada Pgp. Uma eletroforese em gel de agarose 1% confirmou o êxito nas clonagens. Esse passo visa inserir extremidades coesivas ao inserto.

4.7 Extração de plasmídeo bacteriano, clonagem em vetor L4440 e transformação bacteriana

Após a transformação bacteriana, os plasmídeos foram purificados através da reação de Miniprep, seguindo o protocolo do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, EUA). Em seguida os produtos obtidos foram submetidos a digestão pela enzima de restrição ApaI (Promega, EUA), através da reação composta por 2 μ L de tampão (Promega, EUA), 0,2 μ L de BSA, 0,5 μ L de enzima (Promega, EUA) e 1,5 μ g de plasmídeo em volume final de 20 μ L. A digestão foi confirmada em gel de agarose 2%, onde se pode ver a formação de 2 bandas, uma do tamanho do gene e outra do tamanho do plasmídeo. O DNA foi então subclonado em vetor L4440, de acordo com mesmo protocolo de clonagem anterior, porém modificando o vetor para L4440.

Posteriormente o vetor foi inserido em cepa de *Escherichia coli*, denominada HT115(DE3), seguindo o mesmo protocolo anterior, porém utilizando a bactéria

termocompetente acima citada. As bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar, como descrito anteriormente.

Para confirmar a eficiência da clonagem foi feito uma PCR com as 30 colônias brancas selecionadas, sendo 10 de cada Pgp. Uma eletroforese em gel de agarose 1% confirmou o êxito nas clonagens e 2 colônias de cada gene foram selecionadas para prosseguir os experimentos.

4.8 Indução de produção do dsRNA (RNA fita dupla) e extração do RNA bacteriano

As colônias transformadas em HT115(DE3) das Pgps foram induzidas à produção de dsRNA da seguinte forma: em 23 mL de meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e tetraciclina (12,5 µg/mL) (Gibco® Life technologies, EUA) foram inoculados 2 mL da cultura bacteriana HT115(DE3) transformada e colocados no shaker (Maxq 400, Thermo Scientific, EUA) à 37°C e 150 rpm, até atingirem OD600 (Densidade óptica) entre 0,5-0,6. Cada cultura foi dividida em 2, sendo que uma ficou como controle negativo, ou seja, sem ser induzida, e a outra, cultura induzida com 1mM de IPTG (Invitrogen, Brasil). Estas foram então colocadas para crescer overnight em estufa (Nova Ética, Brasil) à 37°C, seguida da extração do RNA bacteriano, para verificar se houve a produção do dsRNA.

A extração iniciou-se com a adição, ao caldo bacteriano, de 250µL de SDS 0,1%. Em seguida o tubo foi fervido a 100°C por 3 minutos, adicionado 1 mL de Trizol® (Thermo Scientific, EUA) em cada tubo e as amostras incubadas por 5 minutos no gelo, depois mais 0,2mL de clorofórmio (Synth, Brasil) seguido de outra incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi pipetada e transferida para novo tubo e adicionou-se 0,5mL de isopropanol (Synth, Brasil), os tubos foram novamente incubados no gelo por 10 minutos e após centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Para finalizar, o sedimento de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 80% (Synth, Brasil) e centrifugado por 5 minutos. O etanol foi descartado e, após secagem do tubo, o RNA foi eluído em 50µL de água ultrapura (Pht, EUA) e armazenado a -20°C. Em seguida correu-se um gel de agarose 0,8% para verificar o indício de produção de dsRNA.

4.9 Ensaio de Silenciamento

Para o ensaio de silenciamento, placas de meio NGM-ágar foram previamente preparadas com adição de ampicilina (100 µg/mL), tetraciclina (12,5 µg/mL) e IPTG 0,4 mM. As bactérias induzidas à produção de dsRNA e as mantidas como controles negativos foram centrifugadas a 5000g por 3 minutos, e o sobrenadante descartado. O pellet foi então ressuspenso em 1 mL e dividido em duas placas, gerando duplicatas de cada cultura. Essas bactérias foram semeadas nas placas com auxílio da alça de drigalski e em seguida vermes das linhagens selvagem e resistente foram espalhados nessas placas. As mesmas foram mantidas por 5 dias em B.O.D a 23°C.

Após o tempo de incubação das placas, o RNA de aproximadamente 1000 vermes de cada placa foi extraído e o cDNA produzido, seguindo os protocolos descritos anteriormente. Para confirmar a redução nos níveis de mRNA dos genes alvos, foi feita uma qPCR de acordo com o mesmo protocolo anteriormente descrito porém a análise foi feita utilizando o método $2^{-\Delta C_t}$, que representa o número de vezes que o gene de interesse está mais ou menos expresso que os genes constitutivos. O restante dos vermes foi utilizado para os testes de motilidade e morte celular descritos a seguir.

4.10 Obtenção de larvas (L3) de *Caenorhabditis elegans*

As larvas L₃ de *C. elegans* foram cultivadas em placas de NGM-ágar semeadas com bactérias *E. coli* HT115 induzidas ou não à produção de dsRNA. Após sete dias de cultivo das placas em BOD a 23°C, as placas foram lavadas com meio M9 (Stiernagle, 2006) e passadas através de três tamises com aberturas de 40µm, 30µm e 20µm. As larvas retidas no tamis de 20µm, maioria L₃, foram recolhidas por retrolavagem deste tamis. As larvas obtidas foram lavadas com M9 e centrifugadas a 700g por 4 minutos duas vezes seguidas. O tamanho médio das larvas resuperadas era: 527µ (σ 3,4) de comprimento por 23,3µ de diâmetro (σ 1,9) (Knight *et al.*, 2002).

4.11 Teste de motilidade

As larvas (L₃) de *C. elegans* foram ressuspenso em meio M9 e feita alíquota com aproximadamente 1000 larvas para cada 100µL. Em seguida foi adicionado 100µL dessa suspensão de larvas em cada poço de uma placa de 96 poços (Biosystems, Brasil). Posteriormente a ivermectina foi adicionada na concentração final de 34 nM. No grupo

de controle negativo foi adicionado apenas meio M9 e no controle positivo foi adicionado ivermectina em superdosagem de 1000mM. As placas contendo as larvas foram acondicionadas em BOD a 23°C. Após 48 horas, 15 µl de solução contendo aproximadamente 150 larvas foi retirado de cada poço para análise e quantificação foi realizada em microscópio óptico, no aumento de 40X, para determinação do número de larvas paralisadas. As larvas eram consideradas paralisadas (Figura 4) quando apresentavam corpo retilíneo e sem nenhum movimento (Park *et al.* 2007).



Figura 4: Foto de larvas (L₃) paralisadas tirada de microscópio óptico (Leica DM500), aumento de 100X, mostrando o padrão retilíneo que elas assumem após contato com dose tóxica de ivermectina.

4.12 Teste de viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade de larvas por meio do marcador molecular iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, EUA), as larvas previamente expostas a 34 mM de ivermectina por 48 horas (descrito em Teste de Motilidade) foram incubadas com 20µM de iodeto em placa de 96 poços. Essas placas foram agitadas por 15 minutos em temperatura ambiente em agitador horizontal de bancada (Elmeco, EUA), protegidas da luz, e em seguida levadas para leitura no aparelho fotodocumentador (GE ImageQuant LAS 4000[®], Inglaterra) com excitação em luz ultravioleta e emissão no comprimento de onda de 605 nm para iodeto de propídeo. Foram realizadas também as leituras do controle negativo (larvas em meio M9, sem ivermectina) e positivo (larvas em meio M9 com 1000mM de ivermectina). A análise de densitometria das imagens foi realizada com o software GE[®] ImageQuant TL 8.1 (GE, Inglaterra).

4.14 Obtenção das sequências protéicas de interesse

Para obter as sequências protéicas de glicoproteínas-P, foi feita uma busca por proteínas de nematódeos disponíveis no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando as seguintes palavras-chaves: P-glycoprotein, PGP, multidrug resistance protein. Foram excluídas as sequências protéicas hipotéticas e parciais.

4.15 Produção das matrizes de distância e correlação entre as distâncias nucleotídicas e protéicas

As matrizes de distância foram produzidas realizando o alinhamento par-a-par das sequências obtidas usando o programa ClustalW com seus parâmetros padrões. Os alinhamentos foram usados para calcular as distâncias entre as sequências usando o pacote PHYLIP versão 3.69 (Felsenstein, 1989; Felsenstein, 2005), produzindo assim matrizes quadradas de dissimilaridade para todas as famílias gênicas analisadas, tanto para os alinhamentos múltiplos quanto para as matrizes produzidas com alinhamento par-a-par.

4.16 Transformação das matrizes de distância através de escala multidimensional (Multidimensional scaling - MDS) e classificação dos grupos

Com o objetivo de produzir um gráfico representando a distribuição espacial e a clusterização das sequências, foi realizada a análise de escala multidimensional (Multidimensional scale - MDS). As matrizes de distância foram transformadas por escala multidimensional para matrizes de duas dimensões. MDS é uma técnica estatística usada para a exploração visual dos dados com base no número de dimensões a serem exploradas. As novas matrizes contendo somente duas colunas apresentam as coordenadas para produção de projeções espaciais que representam o posicionamento das sequências em relação ao restante da família. A transformação das matrizes e classificação das famílias em grupos foi realizada através do programa R-project (R Development Core Team, 2011).

4.17 Análise Estatística

A análise estatística e os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Inc, EUA), utilizando-se o teste Mann Whitney para comparação de dois grupos. O nível de significância aceito foi de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Seleção de linhagem de *Caenorhabditis elegans* resistente à ivermectina

Para selecionar uma linhagem de *C. elegans* resistentes, os vermes foram cultivados em meio NGM contendo ivermectina. Após 14 semanas os vermes foram capazes de sobreviver e se reproduzir em placas com 10 ng/mL, e, após 48 semanas obtivemos *C. elegans* resistentes a concentração de 30 ng/mL de ivermectina. A cada ciclo, os vermes sobreviventes foram desafiados a uma maior concentração da droga. A figura 4 mostra o tempo decorrido para selecionar os vermes nas concentrações indicadas.

Para determinar a estabilidade da resistência à ivermectina, a linhagem IVM30 foi cultivada durante 12 semanas, em placas com NGM sem ivermectina e a sua resistência foi testada novamente. Como esperado, a maioria dos vermes sobreviveu ao experimento. Isso mostra que a resistência selecionada para a ivermectina manteve-se estável, mesmo após 3 meses sem ivermectina.

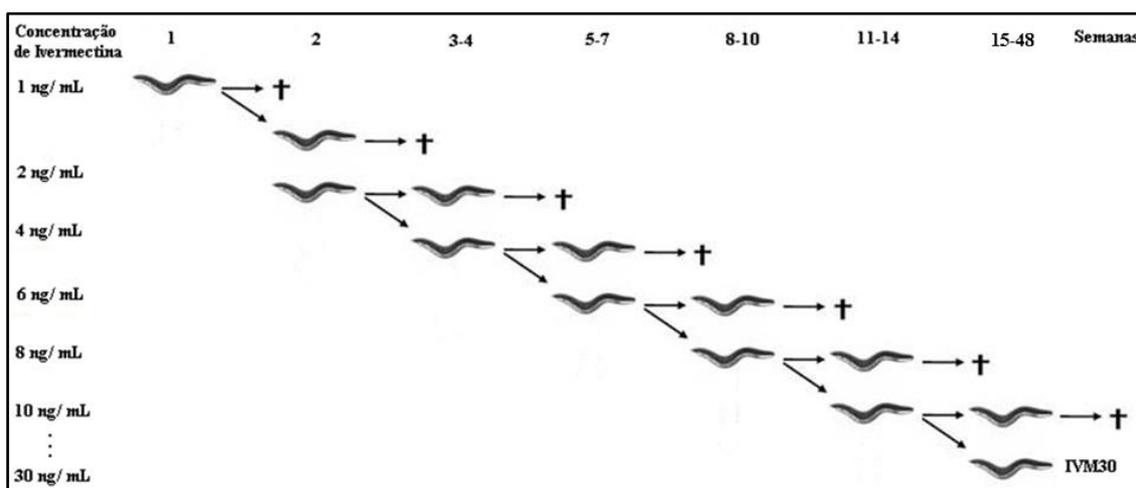


Figura 5: Seleção *in vitro* de *Caenorhabditis elegans* resistentes. Figura adaptada de James & Davey, (2009).

5.2 Perfil de amplificação dos genes de glicoproteínas-P

Uma vez selecionada a linhagem resistente a ivermectina, o próximo passo foi avaliar o perfil de amplificação dos 12 genes de glicoproteínas-P com intuito de compreender o perfil de transcrição desses genes após seleção de fenótipo de resistência. A expressão relativa do mRNA das Pgps foi analisada utilizando o ensaio de qPCR com os níveis de expressão normalizados pelos genes constitutivos CDC-42 e PMP-3.

Como mostrado na Figura 5, apenas as Pgps 12 e 13 apresentam regulação positiva, sendo mais expressos do que na linhagem selvagem. Os demais genes avaliados apresentaram regulação negativa, sendo menos expressos do que na linhagem selvagem. As barras indicam a expressão gênica de cada Pgp com dados obtidos de dois experimentos realizados independentemente.

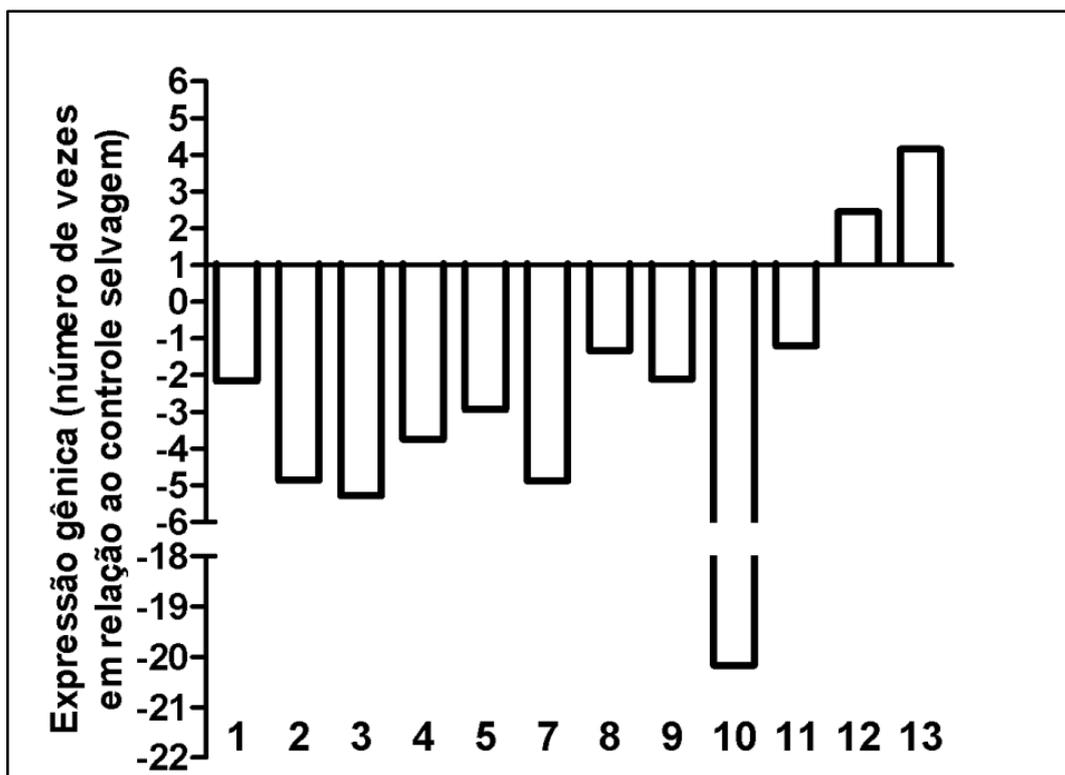


Figura 6: Perfil de amplificação das glicoproteínas-P de *Caenorhabditis elegans*, normalizados pelos genes constitutivos CDC-42 e PMP-3, em relação aos vermes selvagens, sendo que estes apresentam expressão relativa 1. Os valores representados pelas colunas representam o número de vezes que o gene de interesse está mais ou menos expresso do que na linhagem selvagem.

5.3 Análise do silenciamento de glicoproteínas-P em *Caenorhabditis elegans*

Após concluídas e confirmadas as etapas pré e pós clonagem dos genes de Pgps, as bactérias induzidas (grupo silenciado) e não induzidas (grupo controle) à produção de dsRNA foram semeadas em placas e posteriormente foi feito repique de *C. elegans* selvagens ou resistentes, para que eles as ingerissem. Os resultados do silenciamento gênico foram avaliados após extração do RNA desses vermes, a partir da técnica de PCR em Tempo Real.

Apesar da tentativa de silenciar todos os genes de Pgps avaliados no perfil de amplificação das glicoproteínas-P, apenas as Pgps 4 e 12 foram bem sucedidas. Assim, os resultados a seguir serão focados nessas duas glicoproteínas-P.

A porcentagem de silenciamento nos vermes selvagens e resistentes foi calculada para avaliar a eficiência do processo de silenciamento utilizado. Assim, na Figura 6 estão representados os percentuais médios de silenciamento para linhagens selvagem e resistente que foram, para Pgp 4 de 97% e 99%, respectivamente e, para Pgp 12, 93% e 94%, respectivamente.

Nesse mesmo experimento foram avaliadas as expressões relativas desses genes em comparação aos controles endógenos. O silenciamento da Pgp 4 nas linhagens selvagem e resistente resultou numa diminuição significativa da expressão desse gene nos grupos silenciados ($p < 0,0001$), como mostrado na Figura 7. Da mesma forma, o silenciamento da Pgp 12 nas linhagens selvagem e resistente também resultou em diminuição significativa da expressão gênica em relação ao grupo não silenciado ($p = 0,0286$) (Figura 8).

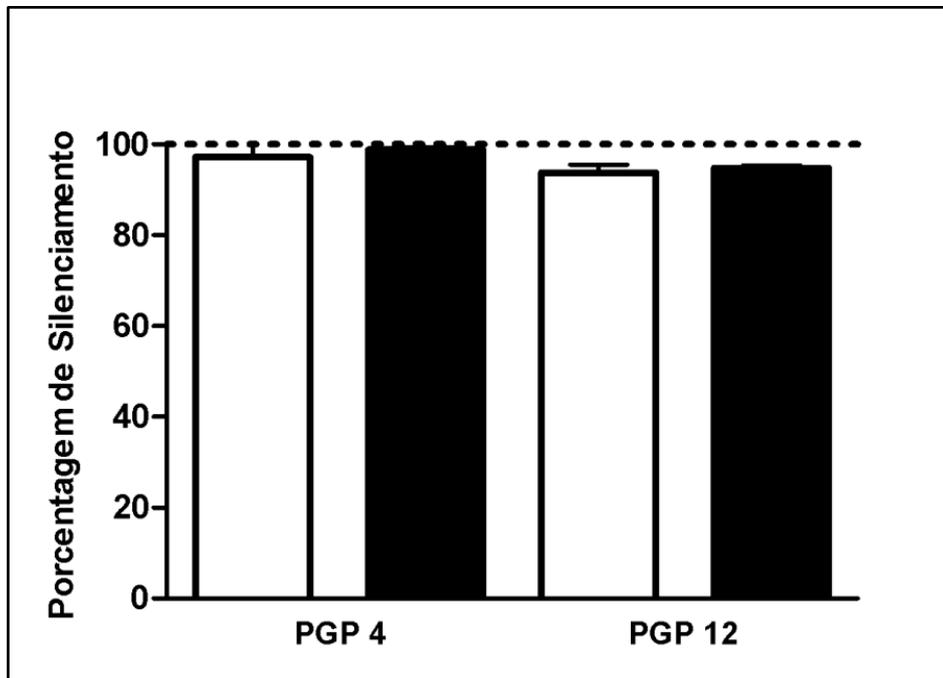


Figura 7: Porcentagem de silenciamento da Pgps 4 e 12. As colunas brancas representam a linhagem selvagem e as colunas pretas representam a linhagem resistente. As barras indicam o erro padrão entre as sextuplicatas de cada grupo.

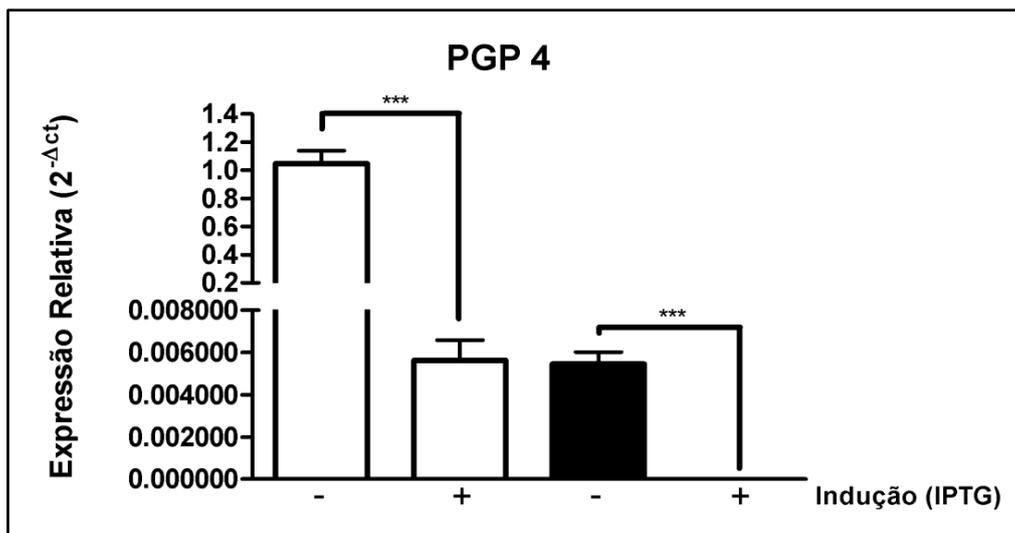


Figura 8: Expressão relativa da Pgp 4. Os valores de $2^{-\Delta ct}$ estão representados pelas barras e indicam o número de vezes que o gene alvo está mais expresso que o gene constitutivo. Os *** indicam diferenças estatísticas ($p < 0,0001$, Mann Whitney). As colunas brancas representam a linhagem selvagem e as colunas pretas representam a linhagem resistente. As barras indicam o erro padrão entre as sextuplicatas de cada grupo.

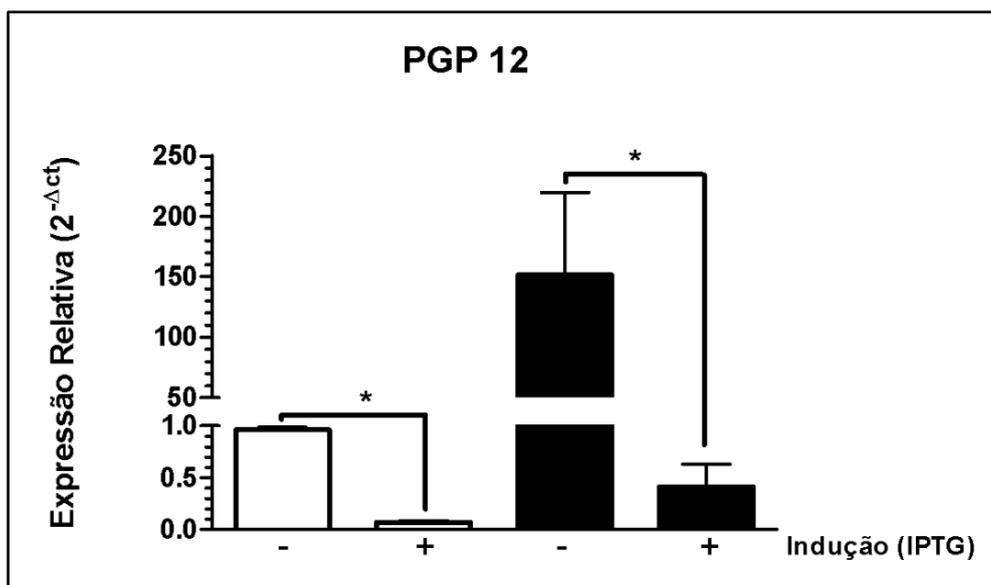


Figura 9: Expressão relativa da Pgp 12. Os valores de $2^{-\Delta ct}$ estão representados pelas barras e indicam o número de vezes que o gene alvo está mais expresso que o gene constitutivo. O * indica diferença estatística ($p < 0,05$, Mann Whitney). As colunas brancas representam a linhagem selvagem e as colunas pretas representam a linhagem resistente. As barras indicam o erro padrão entre as sextuplicatas de cada grupo.

5.5 Teste de motilidade

Após a confirmação da eficiência do processo de silenciamento das Pgps 4 e 12, foram feitos ensaios biológicos para avaliar as consequências do silenciamento dessas

glicoproteínas-P nas linhagens selvagem e resistente de *C. elegans* frente a exposição à ivermectina. O primeiro parâmetro avaliado foi a motilidade e conforme observado na Figura 9, quando a Pgp 4 foi silenciada, a linhagem selvagem diminuiu significativamente o percentual de parálise ($p < 0,0001$), apresentando valores similares ao grupo controle, que são vermes não silenciados e não expostos a ivermectina, enquanto que a linhagem resistente não apresentou diferenças significativas.

Ao silenciar a Pgp 12 (Figura 10), os *C. elegans* selvagens não apresentaram diferenças de motilidade entre grupo silenciado e não silenciado; já a linhagem resistente apresentou um aumento significativo da parálise dos vermes quando comparado ao grupo não silenciado ($p < 0,0001$), aproximando aos valores obtidos para os selvagens.

No grupo em que foi feito o silenciamento concomitante das Pgps 4 e 12 (Figura 12), a linhagem selvagem não apresentou diferenças estatísticas entre silenciados e não silenciados, enquanto que a linhagem resistente apresentou um aumento significativo na parálise dos vermes silenciados em relação aos não silenciados ($p < 0,0001$).

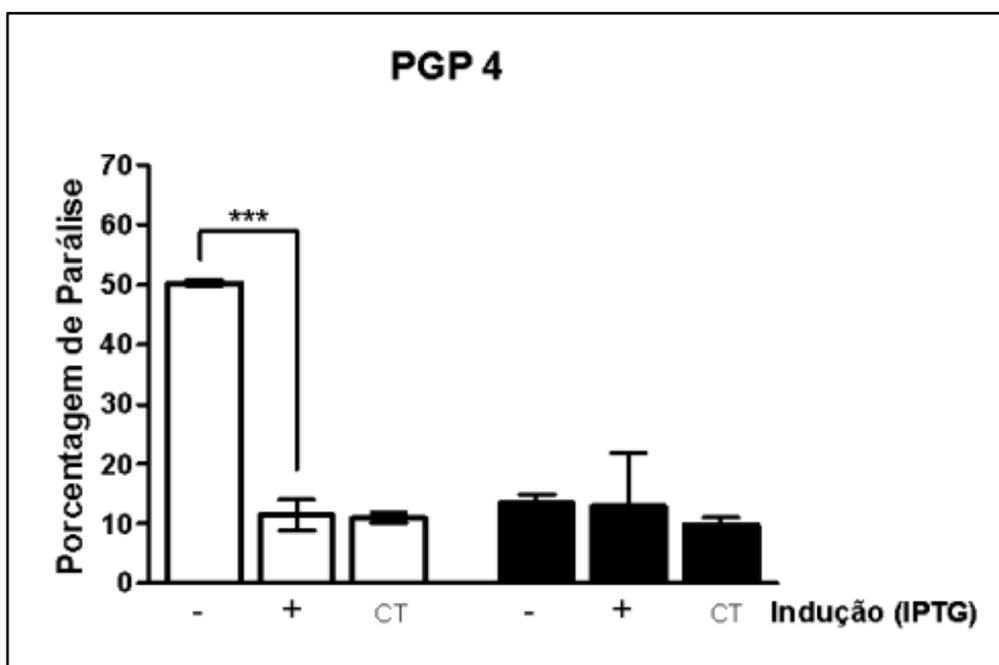


Figura 10: Porcentagem de parálise das larvas L3 após exposição à ivermectina por 48 horas nos grupos silenciado para Pgp 4, não silenciado e controle. O (-) representa grupo não silenciado; O (+) representa grupo silenciado; O (CT) representa grupo controle não exposto a iverme. Os *** indicam diferenças estatísticas ($p < 0,0001$, Teste Mann Whitney). As colunas brancas representam a linhagem selvagem e as colunas pretas representam a linhagem resistente. As barras indicam o erro padrão entre as sextuplicatas de cada grupo.

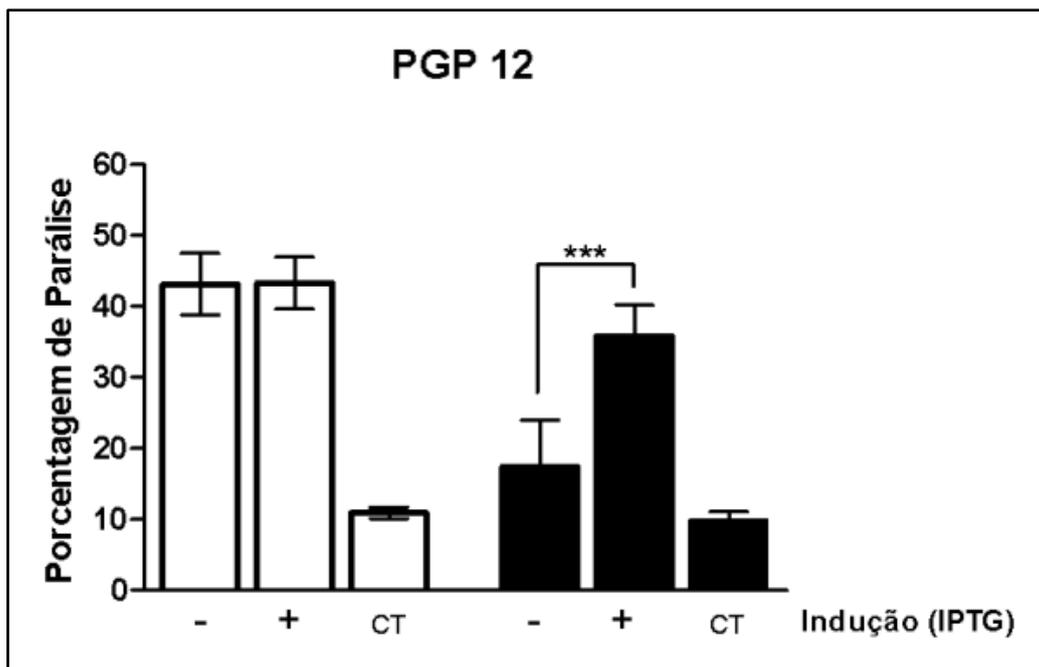


Figura 11: Porcentagem de parálise das larvas L3 após exposição à ivermectina por 48 horas nos grupos silenciado para Pgp 12, não silenciado e controle. O (-) representa grupo não silenciado; O (+) representa grupo silenciado; O (CT) representa grupo controle. Os *** indicam diferenças estatísticas ($p < 0,0001$, Teste Mann Whitney). As colunas brancas representam a linhagem selvagem e as colunas pretas representam a linhagem resistente. As barras indicam o erro padrão entre as sextuplicatas de cada grupo.

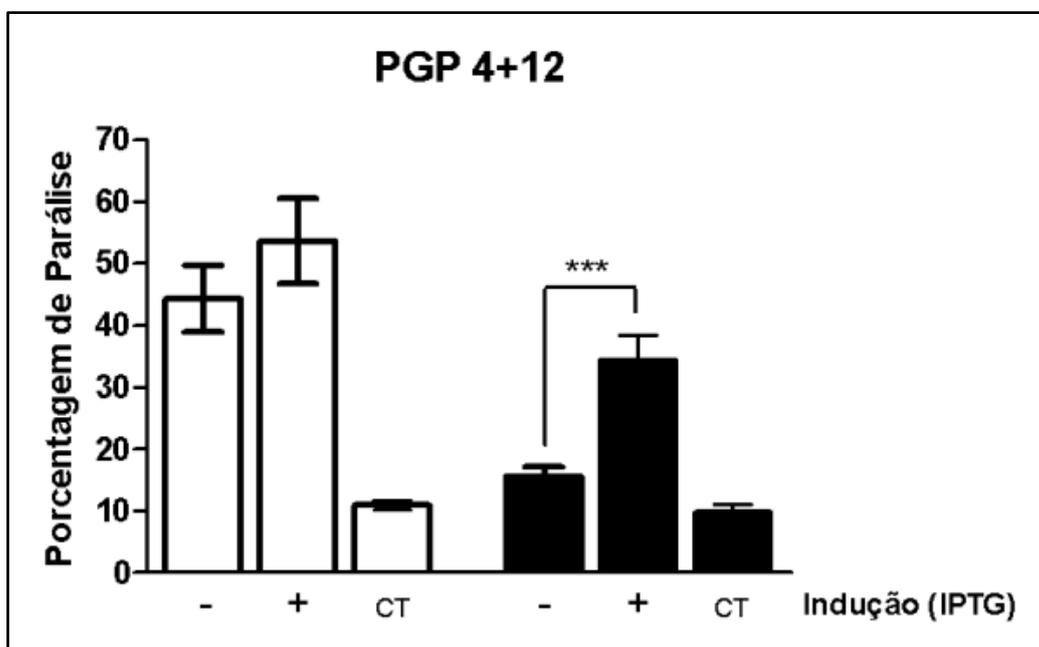


Figura 12: Porcentagem de parálise das larvas L3 após exposição à ivermectina por 48 horas nos grupos silenciado para Pgp 12, não silenciado e controle. O (-) representa grupo não silenciado; O (+) representa grupo silenciado; O (CT) representa grupo controle. Os *** indicam diferenças estatísticas ($p < 0,0001$, Teste Mann Whitney). As colunas brancas representam a linhagem selvagem e as colunas pretas representam a linhagem resistente. As barras indicam o erro padrão entre as sextuplicatas de cada grupo.

5.6 Teste de viabilidade celular

O segundo ensaio biológico realizado foi o teste de fluorescência utilizando o marcador iodeto de propídeo. Assim, o parâmetro avaliado foi a fluorescência relativa dos grupos silenciados comparado ao não silenciados para as Pgps 4 e/ou 12.

Como mostrado na Figura 12, o silenciamento da Pgp 4 na linhagem selvagem levou a uma redução significativa da fluorescência relativa em relação ao grupo não silenciado ($p < 0,0001$), enquanto que para a linhagem resistente, silenciamento da Pgp4 não influenciou nesse parâmetro. O silenciamento da Pgp 12 não resultou em diferenças de emissão de fluorescência para a linhagem selvagem porém, para a linhagem resistente, houve aumento significativo da fluorescência relativa comparado ao grupo não silenciado ($p < 0,0001$) (Figura 13).

Da mesma forma, o silenciamento concomitante das duas Pgps não resultou em diferenças na emissão de fluorescência nos *C. elegans* selvagens, entretanto, na linhagem resistente, acarretou em aumento significativo da fluorescência relativa do grupo silenciado comparado ao não silenciado ($p < 0,0001$) (Figura 14).

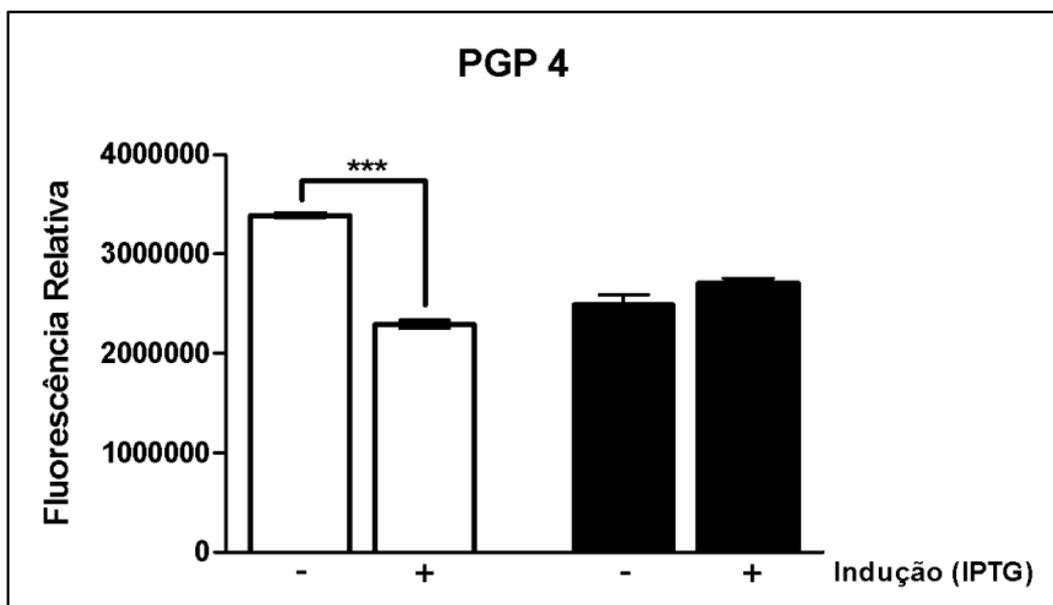


Figura 13: Avaliação da mortalidade celular de *C. elegans* utilizando o marcador iodeto de propídeo, após silenciamento da Pgp 4 e exposição à ivermectina. O (-) representa grupo não silenciado; O (+) representa grupo silenciado. Os *** indicam diferenças estatísticas ($p < 0,0001$, Teste Mann Whitney). As colunas brancas representam a linhagem selvagem e as colunas pretas representam a linhagem resistente. As barras indicam o erro padrão entre as sextuplicatas de cada grupo.

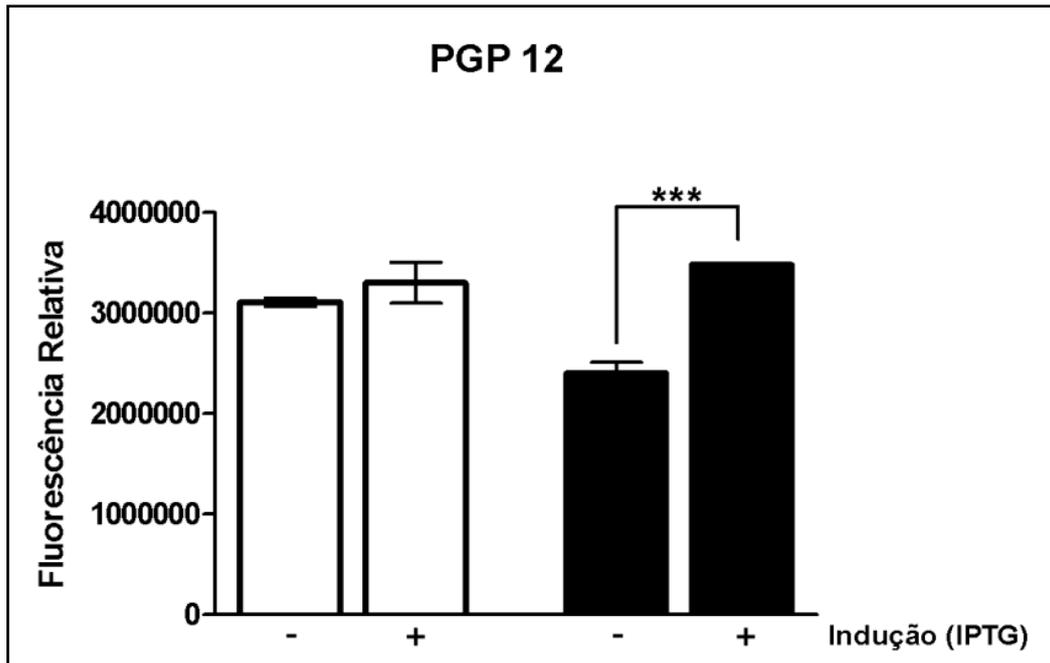


Figura 14: Avaliação da mortalidade celular de *C. elegans* utilizando o marcador iodeto de propídeo, após silenciamento da Pgp 12 e exposição à ivermectina. O (-) representa grupo não silenciado; O (+) representa grupo silenciado. Os *** indicam diferenças estatísticas ($p < 0,0001$, Teste Mann Whitney). As colunas brancas representam a linhagem selvagem e as colunas pretas representam a linhagem resistente. As barras indicam o erro padrão entre as sextuplicatas de cada grupo.

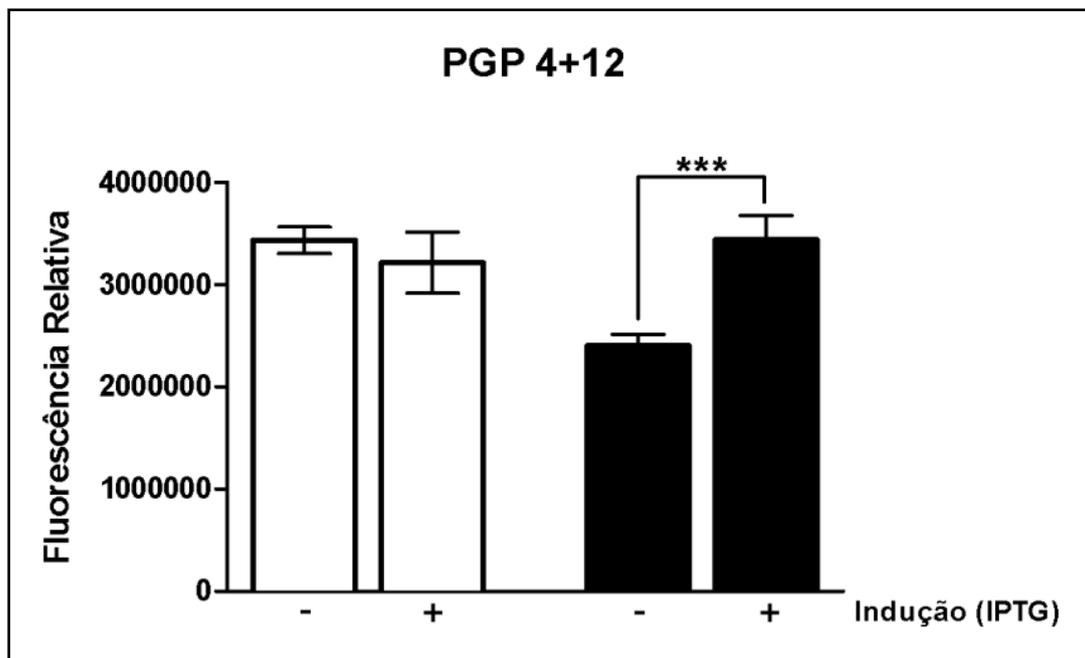


Figura 15: Avaliação da mortalidade celular de *C. elegans* utilizando o marcador iodeto de propídeo, após silenciamento das Pgps 4 e 12 concomitantemente e exposição à ivermectina. O (-) representa grupo não silenciado; O (+) representa grupo silenciado. Os *** indicam diferenças estatísticas ($p < 0,0001$, Teste Mann Whitney). As colunas brancas representam a linhagem selvagem e as colunas pretas representam a linhagem resistente. As barras indicam o erro padrão entre as sextuplicatas de cada grupo.

5.7 Clusterização das proteínas

Afim de se conhecer a similaridade entre as glicoproteínas-P abordadas neste trabalho e as Pgps de nematódeos parasitas foi feita uma busca no banco de dados de proteínas do Filo Nematoda e, posteriormente às análises foi produzido um gráfico de duas dimensões para melhor visualização dos resultados.

Na figura 16 é demonstrado de uma forma geral que a sequência protéica das glicoproteínas-P de *C. elegans* são muito próximas das Pgps obtidas no banco de dados utilizado, que incluem as seguintes espécies parasitas: *Ascaris suum* (A), *Brugia malayi* (B), *Cooperia oncophora* (C), *Haemonchus contortus* (H), *Loa loa* (L), *Onchocerca volvulus* (O), *Parascaris equorum* (P), *Strongyloides ratti* (S), *Trichuris trichiura* (T) e *Wuchereria bancrofti* (W).

Como previsto, as Pgps de *C. elegans* são extremamente semelhantes entre si (representadas da seguinte forma: símbolo ▲- Pgp 4, símbolo ● - Pgp 12 e número 3 – restante de Pgps) e também entre as Pgps do gênero *Caenorhabditis* (representadas pelos números 1 - *C. brenneri*, 2 - *C. briggsae* e 4 - *C. remanei*) sendo agrupadas no mesmo cluster. Entretanto, neste grupo também estão incluídas as sequências de glicoproteínas-P de *Ascaris suum*, *Brugia malayi*, *Cooperia oncophora*, *Haemonchus contortus*, *Strongyloides ratti* e *Trichuris trichiura*, que são nematódeos parasitos de mamíferos. Assim, é possível afirmar que a separação dos grupos não está relacionada à taxonomia, mas sim às propriedades das proteínas.

É possível ainda afirmar que dentro de um mesmo grupo, quanto mais próximo as sequências, maior a similaridade. Assim, a Pgp 12 apresenta maior similaridade em relação às Pgps de *Ascaris suum*, *Brugia malayi*, *Cooperia oncophora*, *Strongyloides ratti* e *Trichuris trichiura*, enquanto a Pgp 4 é mais similar às Pgps de *Ascaris suum* e *Brugia malayi*.

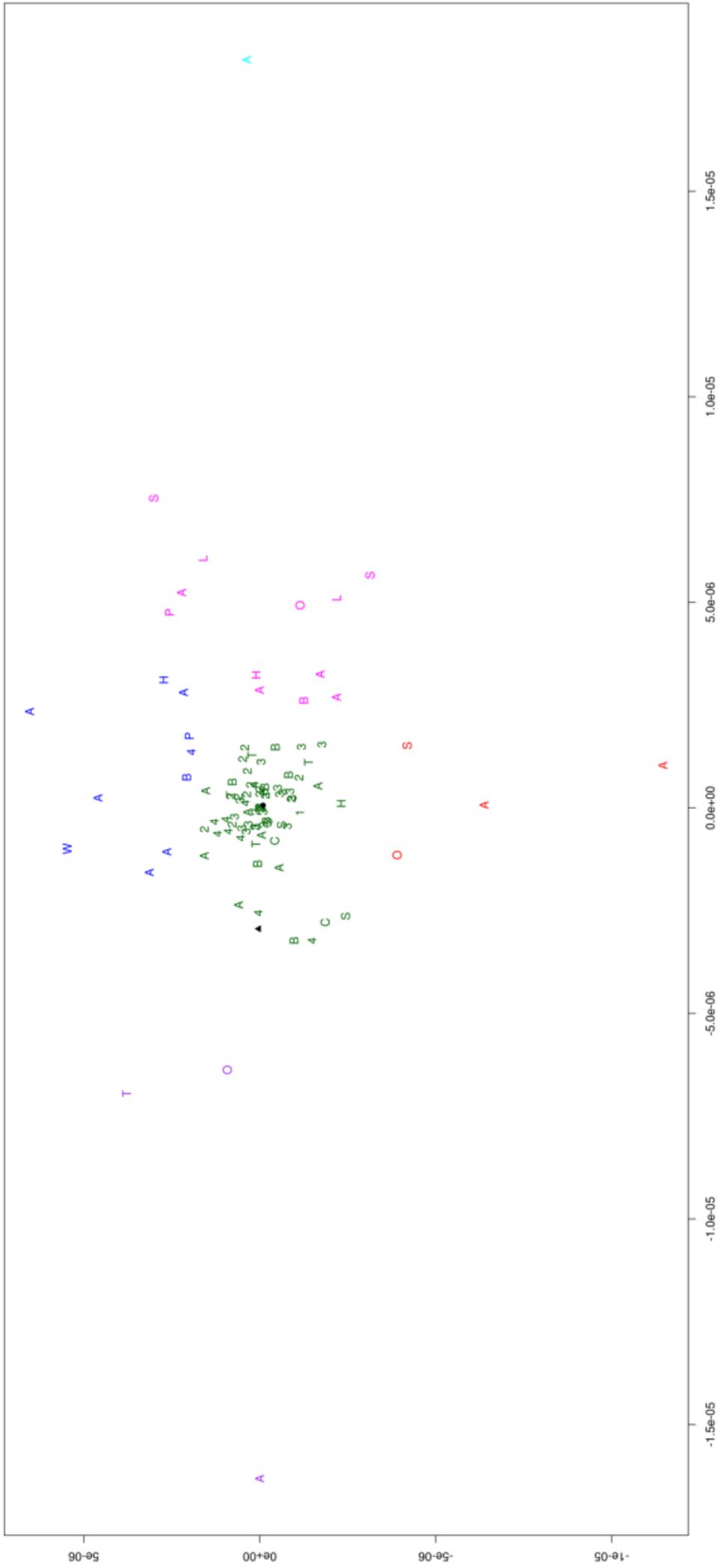


Figura 16: Clusterização das Pgps encontradas no banco de dados de proteínas de nematódeos. *Ascaris suum* (A), *Brugia malayi* (B), *Cooperia oncophora* (C), *Haemonchus contortus* (H), *Loa loa* (L), *Onchocerca volvulus* (O), *Parascaris equorum* (P), *Strongyloides ratti* (S), *Trichuris trichiura* (T), *Wuchereria bancrofti* (W), *C. brenneri* (1), *C. briggsae* (2), *C. remanei* (4), Pgp 4 de *C. elegans* (▲), Pgp 12 de *C. elegans* (●), restante da Pgps de *C. elegans* (2).

6. DISCUSSÃO

A resistência a anti-helmínticos é considerada um sério problema em nematódeos parasitas de animais e humanos. De acordo com Blackhall e colaboradores (1998), a seleção de resistência é um processo evolutivo que leva a alterações genéticas em populações de parasitos em resposta à exposição a um fármaco. Embora o tratamento com fármacos continue sendo o principal meio de controle para helmintos, existe uma grande necessidade de se compreender os mecanismos que determinam a resistência, geralmente associados à uma frequência excessiva de tratamentos (Martin *et al.*, 1982; Barton, 1983; Coles, 1986; Waller, 1987; Taylor & Hunt, 1989), e a administração de doses inadequadas (subdosagem) (Egerton *et al.*, 1988; Hoekstra *et al.*, 1997).

A processo de seleção de resistência é determinado por etapas, conforme observado em células cancerosas por Davey e colaboradores (1995). Como mostrado no resultado obtido neste trabalho para seleção de *C. elegans*, após apenas uma geração de exposição a uma concentração não citotóxica máxima de ivermectina (1 ng/mL), os *C. elegans* foram capazes de crescer normalmente em uma dose duas vezes mais elevada. A seleção de vermes resistentes foi alcançada com relativa facilidade mesmo utilizando doses superiores (6 ng/mL), após 7 gerações. Entretanto, a obtenção de linhagem resistente a 10 ng/mL já apresentou limitações em relação ao número de vermes obtidos inicialmente. Em outro estudo, os autores conseguiram selecionar vermes resistentes à uma concentração máxima de 10 ng/mL (James & Davey, 2009).

Somente após 48 semanas foi possível a obtenção de vermes resistentes a uma concentração de 30 ng/mL. Apesar do tempo prolongado em laboratório, este resultado pode refletir o rápido aparecimento de *H. contortus*, um nematódeo parasita filogeneticamente próximo ao *C. elegans*, resistentes à ivermectina (Coles *et al.*, 2005).

Semelhante ao processo de seleção de resistência a benzimidazóis, várias populações de nematódeos gastrintestinais (Kaplan, 2004) e de filarias (Prichard, 2005) desenvolveram mecanismos de evasão às lactonas macrocíclicas. Esses mecanismos permitem tolerância a concentrações antes letais de ivermectina em populações resistentes, dentre estes, a atividade de transporte de glicoproteínas-P é discutida como uma razão para o desenvolvimento de resistência (Lespine *et al.*, 2012).

Os transportadores celulares de fármacos desempenham um papel significativo na resistência a drogas numa variedade de doenças e o aumento da expressão desses transportadores é geralmente associado ao uso de fármacos. Dentre os transportadores já encontrados existem as glicoproteínas-P, que já foram identificadas por diversos autores

em nematódeos (Lincke *et al.*, 1992, Lincke *et al.*, 1993; Sangster, 1994; Xu *et al.*, 1998). Em *H. contortus*, o aumento da expressão de glicoproteínas-P foi associado a resistência à lactonas macrocíclicas (Blackhall *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998; Sangster, 1999). Entretanto, no presente trabalho a linhagem resistente a 30 ng/mL de ivermectina selecionada *in vitro* apresentou regulação negativa para a maioria das Pgps testadas, sendo que apenas as Pgps 12 e 13 apresentaram regulação positiva. Este resultado é diferente dos encontrados por James e Davey (2009), que observaram um aumento da Pgp-1 em *C. elegans* resistentes a 10 ng/mL de ivermectina, o homólogo da glicoproteína-P em humanos (Lincke *et al.*, 1992; James & Davey, 2009). Nos seres humanos, a glicoproteína-P parece ter um papel fundamental na biodisposição da lactona macrocíclica ivermectina, sendo relatada tanto como substrato quanto como inibidor do transporte da droga (Didier & Loor, 1996; Lespine *et al.*, 2007). A divergência entre os resultados pode ser devido a diferença das linhagens resistentes selecionadas, já que no estudo publicado a linhagem obtida era resistente a apenas 10 ng/mL e neste trabalho os *C. elegans* usados eram resistentes a 30 ng/mL. Porém não é possível afirmar já não foi feito um estudo do perfil de amplificação das Pgps durante as etapas de seleção.

Uma das maneiras de se estudar a função de um gene ou proteína é através do bloqueio/deleção deste para que se observe as consequências no organismo em estudo. Assim, a reversão genética em *C. elegans* vem sendo muito utilizada desde 1998, quando foi mostrado que a introdução de RNA de fita dupla em um verme resulta em inativação potente e específica de um gene com a sequência correspondente (Fire *et al.*, 1998). Timmons e Fire, foram os primeiros a descrever um método de interferência (RNAi) em que bactérias expressando dsRNA são semeadas em placa para alimentação do *C. elegans*.

A utilização das técnicas de RNAi e qPCR juntas são uma poderosa ferramenta para se estudar a perda de função de genes específicos (Paddison *et al.*, 2002). Neste trabalho as Pgps 4 e 12 foram silenciadas pelo método de RNAi e a eficiência do ensaio foi validada utilizando-se a qPCR. Com os resultados obtidos, 97% e 99% de silenciamento na linhagem selvagem e resistente para Pgp 4 e 93% e 94% de silenciamento na linhagem selvagem e resistente para Pgp 12, pode-se afirmar que a técnica de silenciamento empregada foi altamente eficiente. Os resultados seguintes corroboram com esta idéia, já que mostram que houve uma diminuição significativa ($p <$

0,05) nos níveis de expressão das Pgps em ambas as linhagens quando comparadas à expressão dos genes constitutivos de *C. elegans*, PMP-3 e CDC-42.

Após comprovada a eficiência do silenciamento, foram feitos ensaios biológicos para avaliar os efeitos fenotípicos do bloqueio gênico das Pgps 4 e 12 sobre a resistência ou susceptibilidade à ivermectina. O principal método, considerado padrão ouro, de avaliação *in vitro* de atividade anti-helmíntica de um fármaco é o teste de motilidade, que se baseia na avaliação microscópica da alteração dos movimentos e disposição do corpo do verme após a exposição ao fármaco. A motilidade é um ensaio que pode ser realizado em diferentes fases de desenvolvimento após a eclosão do ovo e requer pouca estrutura laboratorial (Tritten *et al.*, 2012). Outras técnicas que empregam marcadores fluorescentes, como iodeto de propídio têm-se demonstrado eficientes para a mensuração de viabilidade celular em mamíferos (Chan *et al.*, 2012). O iodeto de propídeo é um intercalador de ácido nucleico, capaz de atravessar células com membranas íntegras. Entretanto, as células viáveis são capazes de expulsá-lo, sendo este então capaz de marcar células mortas (Al-Rubeai *et al.*, 1997). Neste trabalho foram utilizadas as duas técnicas para a avaliação dos efeitos fenotípicos do silenciamento.

O teste de motilidade trouxe resultados inusitados para o silenciamento da Pgp 4 na linhagem selvagem, já que promoveu uma diminuição significativa da parálise dos vermes, próximo ao valor encontrado para o grupo controle, não silenciado e não desafiado com ivermectina. Reforçando os dados, o teste de fluorescência do mesmo grupo mostrou que o o silenciamento também diminuiu a fluorescência relativa detectada dos silenciados, o que indica que houve menos morte celular. Estes dois resultados juntos permitem inferir que a Pgp 4 está diretamente relacionada ao fenótipo de susceptibilidade à ivermectina, já que o seu bloqueio na linhagem selvagem, que naturalmente apresenta maior expressão de Pgp 4 do que os resistentes, promoveu a mudança das larvas para um fenótipo semelhante ao de resistência. Já o silenciamento na linhagem resistente não promoveu diferenças fenotípicas nos parâmetros avaliados comparando-se o grupo silenciado e não silenciado.

Com o silenciamento da Pgp 12 os resultados obtidos foram diferentes, pois na linhagem selvagem não ocorreram diferenças nos resultados dos testes entre os grupos silenciado e não silenciado, porém na linhagem resistente, o bloqueio desta Pgp resultou em aumento do percentual de parálise dos vermes e da fluorescência relativa emitida, indicando aumento da morte celular. Estes resultados permitem inferir que a Pgp 12 está diretamente relacionada ao fenótipo de resistência à ivermetina, já que seu bloqueio na

linhagem resistente, que apresenta maior expressão desse gene, promove uma mudança das larvas para o fenótipo semelhante aos selvagens.

Os resultados discutidos acima estão parcialmente de acordo com trabalhos recentemente publicados por Ardelli e Prichard (2013) e I. Jana I. Janssen e colaboradores (2013). Nos dois estudos foram utilizadas linhagens nocautes para diversas Pgps de *C. elegans* e apesar de as metodologias empregadas terem sido diferentes, os dois observaram que a deleção da Pgp 12 resultou em aumento da sensibilidade à ivermectina. Porém os resultados por eles obtidos para os nocautes a Pgp 4 mostraram discreto aumento da sensibilidade ao fármaco, diferentemente do que foi observado neste trabalho. Já outro estudo, feito por Yan e colaboradores (2012), mostrou que em concentrações altas de ivermectina (20 ng/mL) a regulação negativa da Pgp 4 provocou aumento da motilidade dos vermes, semelhante ao efeito observado neste trabalho. As divergências quanto ao papel da Pgp 4 na resistência à ivermectina indicam que mais estudos ainda precisam ser feitos para elucidação da função desta proteína.

Já o bloqueio concomitante das Pgps 4 e 12 gerou resultados similares ao bloqueio apenas da Pgp 12, pois somente na linhagem resistente promoveu aumento da parálise das larvas e da fluorescência relativa. Aparentemente o silenciamento das duas Pgps na linhagem selvagem gerou um efeito compensatório de forma que o fenótipo resistente, gerado pelo bloqueio da Pgp 4, foi compensado pelo fenótipo susceptível causado pelo silenciamento da Pgp 12. Nenhum estudo publicado realizou o silenciamento duplo de Pgps em *C. elegans*, sendo este, portanto, um resultado inédito para a literatura.

Depois de comprovado a participação das Pgps 4 e 12 de *C. elegans* nos processos de resistência e susceptibilidade a ivermectina, foi feito um estudo com o objetivo de avaliar a similaridade destas Pgps com as de parasitos do Filo Nematoda. A projeção espacial permite uma visualização global das sequências mais próximas (pontos mais próximos na projeção espacial) e das mais distantes (pontos mais afastados na projeção), dessa forma, esta análise permite avaliar a distribuição (diversidade) e a formação de grupos. Estimativas de diversidade e distância molecular, seja usando sequências nucleotídicas ou protéicas, são importantes para contribuir no entendimento dos processos evolutivos a que foram submetidas as sequências estudadas (Halpern e Bruno, 1998). Essas distâncias podem ser usadas para inferir árvores filogenéticas, diversidade e divergência entre sequências (Tamura e Kumar, 2002). Análises de

distância também são importantes para entender padrões evolutivos em famílias multigênicas e evolução adaptativa encontradas usando dados moleculares (Nei, 1996). Distâncias são métricas que resumem as diferenças em uma média geral de diferenciação entre as sequências (Kalinowski, 2002). Normalmente uma matriz de distância entre as sequências é estimada e pode ser usada para produzir gráficos que permitem a visualização das relações entre as sequências e grupos, podendo ser representado por árvores (Nei, 1996), análise de componentes principal e escala multidimensional (MDS) (Kalinowski, 2002). No presente trabalho construímos um MDS onde observamos que o grupo verde reuniu as proteínas alvo, as Pgps de *Caenorhabditis* e as sequências de *Ascaris suum*, *Brugia malayi*, *Cooperia oncophora*, *Haemonchus contortus*, *Strongyloides ratti* e *Trichuris trichiura*, demonstrando que as proteínas possuem características comuns (Freitas *et al.*, 2012). Já que compartilham características, essas sequências poderiam também desempenhar funções de resistência e susceptibilidade nesses parasitos (Coles *et al.*, 2005).

Assim, os dados encontrados neste trabalho contribuem para um melhor entendimento do processo de resistência/susceptibilidade a ivermectina no organismo de vida livre, *C. elegans*, e permitem inferir uma possível aplicabilidade farmacológica ao mostrar quais as glicoproteínas-P diretamente envolvidas nesses processos. Portanto, poderiam ser desenvolvidos inibidores específicos para a Pgp 12, responsável pela resistência, e estimuladores específicos para a Pgp 4, responsável pela susceptibilidade.

Este trabalho evidenciou a necessidade de estudos mais aprofundados nesse extenso grupo protéico, já que na literatura são encontradas poucas informações sobre a similaridade funcional das glicoproteínas-P nos diversos organismos em que elas estão presentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aagaard, L.; Rossi, J. J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Advanced drug delivery reviews*, v. 59, n. 2-3, p. 75–86, 30 mar. 2007.

Al-Rubeai M, Welzenbach K, Lloyd DR, Emery AN 1997. A rapid method for evaluation of cell number and viability by flow cytometry. *Cytotechnology*, 24, 161-168.

Amarante, A. F. T., 2004. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.*, v.13, suplemento 1, 2004.

Amarante, A.F.; Bricarello, P.A.; Rocha, R.A.; Gennari, S.M., 2004. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary parasitology*, 120, 91-106

Ambudkar, S. V et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, v. 22, n. 47, p. 7468–85, 20 out. 2003.

Araújo, J.V.; Mota, M.A.; A.K., C., 2004. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13, 7.

Araújo, J.V.; Freitas, B.W.; Vieira, T.C.; Campos, A.K., 2006. Avaliação do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 15, 4.

Ardelli, B. F.; Prichard, R. K. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Veterinary parasitology*, v. 191, n. 3-4, p. 264–75, 31 jan. 2013.

Ardelli, B. F.; Stitt, L. E.; Tompkins, J. B. Inventory and analysis of ATP-binding cassette (ABC) systems in *Brugia malayi*. *Parasitology*, v. 137, n. 8, p. 1195–212, jul. 2010.

Barton, N. J., 1983. Development of anthelmintic resistance in nematodes from sheep in Australia subjected to different treatment frequencies. *International Journal for Parasitology*, 13 (2) (1983), pp. 125–132.

Bartley, D. J. et al. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, v. 136, n. 9, p. 1081–8, ago. 2009.

Barton, N. J. Development of anthelmintic resistance in nematodes from sheep in Australia subjected to different treatment frequencies. *International Journal for Parasitology*, v. 13, n. 2, p. 125–132, abr. 1983.

Bartram, J.; Cairncross, S. Hygiene, sanitation, and water: forgotten foundations of health. *PLoS medicine*, v. 7, n. 11, p. e1000367, jan. 2010.

Bass, B. L.; Sharp, P.; Bartel, D. Double-Stranded RNA as a Template for Gene Silencing. v. 101, p. 235–238, 2000.

Blackhall, W. J., Liu, H. Y., Xu, M., Prichard, R. K., Beech, R. N., 1998. Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Sep 15;95(2):193-201.

Blaxter, M. 2000. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. *International Journal of Parasitology* 30:347– 355.

Bethony, J. et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*, v. 367, n. 9521, p. 1521–32, 6 maio 2006.

Blackhall, W. J. et al. Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. v. 95, p. 193–201, 1998.

Blaxter, M. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 4, p. 347–355, abr. 2000.

Blaxter, M. Nematodes: the worm and its relatives. PLoS biology, v. 9, n. 4, p. e1001050, abr. 2011.

Broeks, A., Janssen, H.W., Calafat, J., Plasterk, R.H., 1995. A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins. EMBO J. 14, 1858–1866.

Broeks, A.; Gerrard, B.; Allikmets, R.; Dean, M.; Plasterk, R.H., 1996. Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. Embo J 1996;15:6132–43. [PubMed: 8947035].

Brooker, S. Europe PMC Funders Group Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: Adding up the numbers – A review. International Journal Parasitology, v. 40, n. 10, p. 1137–1144, 2011.

Brooker, S.; Clements, A. C. A.; Bundy, D. A. P. Europe PMC Funders Group Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. Adv Parasitol, n. 05, p. 1–33, 2007.

Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., 2007. Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007.

Calafat, J.; Plasterk, R. H. A. *Caenorhabditis elegans*. v. 14, n. 9, p. 1858–1866, 1995.

Campbell, W. C., 1982. Efficacy of the avermectins against filarial parasites: a short review. Veterinary Research Communications, 5 (3): 251-262.

Chammartin, F. et al. Soil-transmitted helminth infection in South America: a systematic review and geostatistical meta-analysis. The Lancet. Infectious diseases, v. 13, n. 6, p. 507–18, jun. 2013.

Chan LL, Wilkinson AR, Paradis BD, Lai N 2012. Rapid image-based cytometry for comparison of fluorescent viability staining methods. *Journal of fluorescence*, 22, 1301-1311.

Coles, G.C.; Rhodes, A.C.; Wolstenholme, A.J., 2005. Rapid selection for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 129, 345–347.

Costa, MdSVLFd, 2007. Dinâmica das infecções por helmintos gastrintestinais de bovinos na região do vale do mucuri, MG. Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 128 pp.

Crump, A., Ootoguro, K., 2005. Satoshi Omura: in pursuit of nature's bounty. *Trends Parasitol.* 21, 126–132.

Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Paress, P.S., Van der Ploeg, L.H., Schaeffer, J.M., Arena, J.P., 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371, 707–711.

Cully, D.F. et al., 1996. Molecular biology and electrophysiology of glutamate-gated chloride channels of invertebrates. *Parasitology* 113, S191–S200

Davey, R.A., Longhurst, T.J., Davey, M.W., Belov, L., Harvie, R.M., Hancox, D., Wheeler, H., 1995. Drug resistance mechanisms and MRP expression in response to epirubicin treatment in a human leukaemia cell line. *Leuk. Res.* 19, 275–282.

De Silva, N. R. et al. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends in Parasitology*, v. 19, n. 12, p. 547–551, dez. 2003.

Delayte E. H., Otsuka M., Larsson C.E. Eficácia das lactonas macrocíclicas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicidose canina generalizada. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. V.58, p. 31–38, 2006.

Dent, J.A., Smith, M.M., Vassilatis, D.K., Avery, L., 2000. The genetics of ivermectina resistance in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2674–2679.

Didier, A., Loor, F., 1996. The abamectin derivative ivermectin is a potent Pglycoprotein inhibitor. Anticancer Drugs 7, 745–751.

Egerton, J. R., Suhayda, D., Eary, C. H., 1988. Laboratory selection of *H. contortus* for resistance to ivermectina. Journal of Parasitology, 74 (4) (1988), pp. 614–617.

Felsenstein, J., 1989. PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics 5: 164-166.

Felsenstein, J., 2005. Using the quantitative genetic threshold model for inferences between and within species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B 360: 1427-1434.

Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998, 391:806-811.

Freitas, L. M. et al., 2011. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. PLoS ONE, Volume 6.

Geary, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. Trends in parasitology, v. 21, n. 11, p. 530–2, nov. 2005.

Geerts, S.; Gryseels, B. Drug Resistance in Human Helminths : Current Situation and Lessons from Livestock. v. 13, n. 2, 2000.

Gerwert, S.; Failing, K.; Bauer, C., 2002. Prevalence of levamisole and benzimidazole resistance in oesophagostomum populations of pig-breeding farms in North RhineWestphalia, Germany. Parasitology research, 88, 63-68.

Gibbs, R.P.; Herd, K.D., 1986. Murrell (Eds.), Food Animal Practice, W.B. Saunders, Philadelphia (1986), pp. 423–432.

Goa, K. L.; McTavish, D.; Clissold, S. P., 1991. Ivermectin. A review of its antifilarial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy in onchocerciasis. *Drugs*, 42(4): 640-658

Greene, B.; Kenneth, R. B.; Taylor, H. R., 1989. Use of ivermectin in humans. In: Campbell, W. C. Ivermectin and abamectin. Springer-Verlag, New York, p. 311-323

Grove, D. I., 1983. The effects of 22, 23-dihydroavermectin B₁ on *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* infection in mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 77(4): 405-410

Halpern, A. L.; Bruno, W. J. Evolutionary Distances for Protein-Coding Sequences : Modeling Site- Specific Residue Frequencies. n. 2, p. 910–917, 1962.

Handling, A. S. Compiled by John Sulston and Jonathan Hodgkin MRC Laboratory of Molecular Biology. 1974.

Hoekstra, R.; Visser, A.; Wiley, L. J.; Weiss, A. S.; Sangster, N. C.; Roos, M. H., 1997. Characterisation of an acetylcholine receptor gene of *Haemonchus contortus* in relation to levamisole resistance. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 84 (2) (1997), pp. 179–187.

Hotez, P.J., Bethony, J.M., Bottazzi, M.E., Brooker, S., Buss, P., 2005. Hookworm: “The great infection of mankind”. *PLoS Med* 2(3): 187-191.

Jackson, F. and Coop, R. L., 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120 (Suppl.), S95–S107.

James, C. E., Davey, M. W., 2009. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectina resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology* 39 (2009) 213–220.

Janssen, I. J. I. et al. *Caenorhabditis elegans*: modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains. *Experimental parasitology*, v. 134, n. 2, p. 171–7, jun. 2013.

Jin, M. S. et al. Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein. v. 490, n. 4, p. 566–569, 2012.

Jones, P.M.; George, A.M., 2004. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* 61:682-699.

Kaplan, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in parasitology*, v. 20, n. 10, p. 477–81, out. 2004.

Krolewiecki, A. J. et al. A public health response against *Strongyloides stercoralis*: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 5, p. e2165, jan. 2013.

Kurz, C. L., Shapira, M., Chen, K., Baillie, D. L., Tan, M. W., 2007. *C. elegans* pgp-5 is involved in resistance to bacterial infection and heavy metal and its regulation requires tir-1 and a p38 map kinase cascade. *Biochem Biophys Res Commun*. 363(2): 438–443.

Kwa, M.S.G. et al. (1994) Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63, 299–303

Lacey, E. and Gill, J.H. (1994) Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Trop.* 56, 245–262

Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineay, T., Orłowski, S., Alvinerie, M., 2007. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure–affinity relationship. *Eur. J. Pharm. Sci.* 30, 84–94.

Lima, W.S., 2000. Controle das Helmintoses de Bovinos. In M Bressan Práticas de

manejo sanitário em bovinos de leite, Embrapa Gado de Leite/ Comunicação Empresarial, Juiz de Fora.

Lincke, C.R., The, I., van Groenigen, M., Borst, P., 1992. The P-glycoprotein gene family of *Caenorhabditis elegans*: cloning and characterization of genomic and complementary DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 228, 701–711.

Lincke, C.R., Broeks, A., The, I., Plasterk, R.H.A., Borst, P., 1993. The expression of two P-glycoprotein (pgp) genes in transgenic *Caenorhabditis elegans* is confined to intestinal cells. *EMBO J.* 12, 1615–1620.

MacRae, J.C., 1993. Metabolic consequences of intestinal parasitism. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 52, 121-130.

Mahajan-Miklos, S.; Tan, M.W.; Rahme, L.G.; Ausubel, F.M., 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 1999;96:47–56. [PubMed: 9989496].

Marcos, L. A; Machicado, J. D. Soil-transmitted helminth infections in South America. *The Lancet. Infectious diseases*, v. 14, n. 3, p. 183, mar. 2014.

Martin, P.J., Anderson, N., Jarrett, R. G., Brown, T. H., Ford, G. E., 1982. Effects of a preventive and suppressive control scheme on the development of thiabendazole resistance in *Ostertagia* spp. *Australian Veterinary Journal*, 58 (5) (1982), pp. 185–190.

Maupas, E., 1900 Modes et formes de reproduction des nematodes. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale* 8: 463–624.

Moncayo, A.L.; Cooper, P.J., 2006. Geohelminth infections: impact on allergic diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38, 1031-1035.

Montresor, A. et al. Soil-transmitted helminthiasis: the relationship between prevalence and classes of intensity of infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, p. 1–6, 16 nov. 2014.

Murray, C. J. L. et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, v. 380, n. 9859, p. 2197–223, 15 dez. 2012.

Nicol, J.M.; Turner, S.J.; Coyne, D.L.; den Nijs, L.; S. H.; Z. T.M., 2011. Current Nematode Threats to World Agriculture. In J John, G Gheysen, C Fenoll, , Ankara, Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions, Springer.

Nigon, V., 1949. Les modalités de la reproduction et le déterminisme de sexe chez quelques Nématodes libres. *Ann. Sci. Nat., Zool.*, ser. 11, ll: 1-132.

Ōmura, S.; Crump, A. The life and times of ivermectin — a success story. v. 2, n. December, p. 984–989, 2004.

Orton, C. J.; Watts, J. E.; Rugg, D., 1992. Comparative effectiveness of avermectins and deltamethrin in suppressing oviposition in *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Journal Economic Entomology*, 85(1): 28-32

Osei-Atweneboana, M.Y.; Eng, J.K.; Boakye, D.A.; Gyapong, J.O.; Prichard, R.K., 2007. Prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* infection and efficacy of ivermectin in endemic communities in Ghana: a two-phase epidemiological study. *Lancet*, 369, 2021-2029.

Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., Conklin, D. S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948–958

Prichard, R., 1994. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 54 (1994) 259-268
Pullan, R. L. et al. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & vectors*, v. 7, n. 1, p. 37, jan. 2014.

Pullan, R. L.; Brooker, S. J. The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & vectors*, v. 5, p. 81, jan. 2012.

Ramos C.I., Bellato V., Souza A.P.d., Avila V.S.d., Coutinho G.C., Dalagnol C.A. 2004. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural*, 34, 7.

Robertson, A.P. et al., 1999. Resistance to levamisole resolved at the single-channel level. *FASEB J.* 13, 749–760

Robinson, M.W. et al., 2004. The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 92, 205–210

Roepstorff, A.; Murrell, K.D., 1997. Transmission dynamics of helminth parasites of pigs on continuous pasture: *Ascaris suum* and *Trichuris suis*. *International journal for parasitology*, 27, 563-572.

Sangster, N. C. P-glycoproteins in nematodes. *Parasitology Today*, v. 10, n. 8, p. 319–322, jan. 1994.

Sangster, N.C., 1996. Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology* 113, S201–S216

Sangster, N.C. et al., 1998. Binding of [H-3]m-aminolevamisole to receptors in levamisole- susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 28, 707–717

Sangster, N. and Dobson, R.J., 2002. Anthelmintic Resistance. In *The Biology of Nematodes* (Lee, D.L. ed.), pp. 531–567, Harwood.

Silva, M. E. ; Lima, W. S., 2009 . Controle e aspectos epidemiológicos das helmintoses de bovinos. *Boletim Técnico - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais*, v. 93, p. 1-40, 2009.

- Sartor, I.F.; Bicudo, P.L., 1999. Agentes empregados no controle de ectoparasitas. In:
- Spinosa, H.S.; Górnjak, S.L.; Bernardi, M.M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.480-492.
- Schmitt, L.; Tampé, R., 2002. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* 12:754-760.
- Schinkel, A.H.; Borst, P., 1991. Multidrug resistance mediated by P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1991;2:213–26. [PubMed: 1680493].
- Schroeder, L.K.; Kremer, S.; Kramer, M.J.; Currie, E.; Kwan, E.; Watts, J.L.; Lawrenson, A.L.; Hermann, G.J., 2007. Function of the *Caenorhabditis elegans* ABC transporter PGP-2 in the biogenesis of a lysosomerelated fat storage organelle. *Mol Biol Cell* 2007;18:995–1008. [PubMed: 17202409].
- Scolari, C. et al. Prevalence and distribution of soil-transmitted helminth (STH) infections in urban and indigenous schoolchildren in Ortigueira, State of Paraná, Brasil: implications for control. v. 5, n. 4, p. 302–307, 2000.
- Silvestre, A. and Cabaret, J. (2002) Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 297–300
- Sharom, F. J., 2011. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemical Society Essays Biochem.* (2011) 50, 161–178.
- Sheps, J.A.; Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D.L.; Ling, V., 2004. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol* 2004;5:R15. [PubMed: 15003118].
- Strunz, E. C. et al. Water, sanitation, hygiene, and soil-transmitted helminth infection: a systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*, v. 11, n. 3, p. e1001620, mar. 2014.

Spinosa, H.S.; Górnaiak, S.L.; Bernardi, M.M., 2011. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 5ª Edição Guanabara Koogan, 2011.

Taylor, M.A.; Hunt, K. R., 1989. Anthelmintic drug resistance in the UK. *The Veterinary Record*, 125 (7) (1989), pp. 143–147.

Trailovic, S.M. et al., 2002. Levamisole receptor phosphorylation: effect of kinase antagonists on membrane potential responses in *Ascaris suum* suggest that CaM kinase and tyrosine kinase regulate sensitivity to levamisole. *J. Exp. Biol.* 205, 3979–3988

Tritten L, Braissant O, Keiser J 2012. Comparison of novel and existing tools for studying drug sensitivity against the hookworm *Ancylostoma ceylanicum* in vitro. *Parasitology*, 139, 348-357.

UK Essays. November 2013. Anthelmintic Resistance In Parasitic Nematode Biology Essay. [online]. Available from: <http://www.ukessays.com/essays/biology/anthelmintic-resistance-in-parasitic-nematode-biology-essay.php?cref=1>

Utzinger, J. et al. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss medical weekly*, v. 142, n. November, p. w13727, jan. 2012.

Van Wyk, J.A., Malan, F.S., 1988. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Vet Rec* 123, 226-228.

Van Wyk, J.A. et al. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.66, p.273–284, 1999.

Vercruysse, J. et al. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, v. 1, n. 1, p. 14–27, dez. 2011.

Wagner, B., Polley, L., 1997. *Ascaris suum* prevalence and intensity: an abattoir survey of market hogs in Saskatchewan. *Veterinary parasitology*, 73, 309-313.

Waller, P. J., 1987. Anthelmintic resistance and future of round worm control. *Veterinary Parasitology*, 25 (2) (1987), pp. 177–191.

Waller, P.J., Dash, K.M., Barger, I.A., Le Jambre, L.F., Plant, J., 1995. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. *Vet Rec.* 1995 Apr 22; 136(16):411-3.

Waller, P.J., Echevarria, F., Eddi, C., Maciel, S., Nari, A., Hansen, J.W., 1996. Review The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: general overview. *Vet Parasitol.* 1996 Apr; 62(3-4):181-7.

Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N. C., 2004. Drug resistance in veterinary helminthes. *Trends Parasitol.* Vol.20 No.10.

Williamson, S. M.; Wolstenholme, A J. P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies. *Journal of helminthology*, v. 86, n. 2, p. 202–8, jun. 2012.

World Health Organization. To overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Health Organization, 2012.

Xu, M., Molento, M., Blackhall, W.J., Ribeiro, P., Beech, R.N., Prichard, R.K., 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of Pglycoprotein homolog. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 327–335.

Younis, A. et al. RNA Interference (RNAi) Induced Gene Silencing : A Promising Approach of Hi-Tech Plant Breeding. v. 10, 2014.

Zhao, Z.; Sheps, J.A.; Ling, V.; Fang, L.L.; Baillie, D.L., 2004. Expression analysis of ABC transporters reveals differential functions of tandemly duplicated genes in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 2004;344:409–17. [PubMed: 15522294].

Ziegelbauer, K. et al. Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*, v. 9, n. 1, p. e1001162, jan. 2012.