



EFEITO DO ZINCO SOBRE A RESISTÊNCIA DO *HAEMONCHUS CONTORTUS* EM TESTES *IN VITRO*

Rillary Moscardine **Schuindt**¹; Bruna Gonçalves **Santos**²; Rodrigo **Giglioti**³; Luciana Morita **Katiki**⁴

Nº 24702

RESUMO – O Zinco (Zn) é um mineral importante para o bom funcionamento do sistema imunológico e a sua suplementação para os ovinos têm o intuito de melhorar a imunidade, visando assim amenizar os problemas causados pelo parasitismo do *Haemonchus contortus*. O parasita *H. contortus* é altamente prevalente em ovinos e causa severa anemia e perdas de produtividade. O Zn administrado a ovinos infectados pode beneficiar a resistência do animal, no entanto, há a possibilidade do mesmo Zn interferir na resistência do parasita aos anti-helmínticos. Dessa forma, o Zn foi administrado diariamente por 5 meses para cordeiros artificialmente infectados com *H. contortus* e ao final desse período, ovos do parasita foram coletados para testes. O efeito da exposição indireta do Zn-micrométrico (convencional) e Zn-Nanoparticulado (nanopartículas de 20 µm) sobre *H. contortus* (o parasita recebeu o Zn dos tecidos e fluidos do ovino) foi avaliado em testes *in vitro* de eclodibilidade. Dessa forma, a resistência de ovos de *H. contortus* foram avaliadas com desafio ao anti-helmíntico Albendazol. O Albendazol foi solubilizado em água destilada e polímero inerte polivinilpolipirrolidona (PVPP) e avaliado nas seguintes concentrações: 300 mcg; 150 mcg; 75 mcg; 37,5 mcg; 18,75 mcg; 9,37 mcg; 4,68 mcg; 2,34 mcg; 0,58 mcg; 0,29 mcg; 0,14 mcg/mL, havendo 6 repetições para cada concentração de Zn-micrométrico, Zn-nanoparticulado e testados sobre 100 ovos em placas de poliestireno de 48 poços. Controle com PVPP também foi realizado. As placas foram incubadas em BOD a 27°C por 24 horas. Após a incubação, a eclodibilidade foi quantificada nas larvas e ovos. Não houve diferenças entre a resistência ao Albendazol entre os tratamentos Zn micronizado, Zn nanoparticulado e Controle. Concluímos que as diferentes formas de Zn não modificaram a resistência do parasita ao Albendazol.

Palavras-chaves: *Haemonchus*, resistência, zinco, ovinos, albendazol.

1 Autor, Bolsista FAPESP: Graduação em Medicina Veterinária, FAM, Americana-SP; rillaryschuindt1303@gmail.com

2 Colaborador, Mestranda do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), Piracicaba-SP.



3 Colaborador, Pesquisador do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP.

4 Orientadora: Pesquisador do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP; Imkatiki@sp.gov.br

ABSTRACT – Zinc (Zn) is an important mineral for the proper functioning of the immune system and its supplementation for sheep is intended to improve immunity, thus aiming to alleviate the problems caused by the parasitism of *Haemonchus contortus*. The *H. contortus* parasite is highly prevalent in sheep and causes severe anemia and productivity losses. Zn administered to infected sheep may benefit the animal's resistance, however, there is a possibility that the same Zn interferes with the parasite's resistance to anthelmintics. Thus, Zn was administered daily for 5 months to lambs artificially infected with *H. contortus* and at the end of this period, eggs of the parasite were collected for testing. The effect of indirect exposure of Zn-micrometer (conventional) and Zn-nanoparticulate matter (20 μ m nanoparticles) on *H. contortus* (the parasite received Zn from sheep tissues and fluids) was evaluated in *in vitro* hatchability tests. Thus, the resistance of *H. contortus* eggs was evaluated with challenge to the anthelmintic Albendazole. Albendazole was solubilized in distilled water and inert polymer polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and evaluated at the following concentrations: 300 mcg; 150 mcg; 75 mcg; 37.5 mcg; 18.75 mcg; 9.37 mcg; 4.68 mcg; 2.34 mcg; 0.58 mcg; 0.29 mcg; 0.14 mcg/mL, with 6 replicates for each concentration of Zn-micrometer, Zn-nanoparticulate and tested on 100 eggs in 48-well polystyrene plates. Control with PVPP was also performed. The plates were incubated in BOD at 27°C for 24 hours. After incubation, hatchability was quantified in larvae and eggs. There were no differences between Albendazole resistance between micronized Zn, nanoparticulate Zn and Control treatments. We conclude that the different forms of Zn did not modify the parasite's resistance to Albendazole.

Keywords: *Haemonchus*, resistance, zinc, sheep, albendazole.

1. INTRODUÇÃO

Haemonchus contortus é um nematóide que parasita o trato gastrointestinal de ruminantes. Esse parasita habita no abomaso alimenta-se de sangue, causa anemia e outras complicações associadas, ocasiona graves perdas de produção e morte dos animais seriamente afetados. A infecção por *H. contortus* ocorre por via oral através de pastagens contaminadas com a larva infectante, que se fixa no hospedeiro, desenvolve-se para a fase adulta e se reproduz. Os ovos do parasita são eliminados nas fezes do hospedeiro para a pastagem e quando em condições favoráveis, eclodem larvas de primeiro estágio (L1), que posteriormente se desenvolvem para larvas de segundo (L2) e terceiro estágio (L3) dentro de aproximadamente uma semana, quando então, se torna infectante fechando o ciclo. (Amarante, 2014; Katiki, 2011; Roberto *et al.*, 2018).

No aparelho digestivo após o animal ter ingerido as larvas infectantes (L3), as mesmas sofrem mudança para a fase L4, que se liga à mucosa do abomaso para se alimentar do sangue do hospedeiro pela primeira vez (Alba-Hurtado, 2013; El-Ashram, 2017) e posteriormente, alcançam a fase de jovens adultos e adultos maduros sexualmente (entre 20 a 40 dias após a ingestão). Logo após a última mudança cutânea, as larvas que estão no quinto estágio completam totalmente o seu desenvolvimento, amadurecem sexualmente, após a cópula, as fêmeas dão início a oviposição, começando o chamado período de patente (PP) da infecção, que dura cerca de 25 a 55 dias (Amarante, 2014).

O manejo inadequado de medicamentos está diretamente relacionado à resistência de anti-helmínticos. Nos últimos anos, tem aumentado o uso intensivo de anti-helmínticos pertencentes a classe dos benzimidazóis (BZs), dos imidotiazóis (levamisol) e das lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) que havia demonstrado um impacto positivo inicialmente, mas atualmente a sua ação possui uma forma de controle (apesar de ser amplamente utilizada) não desejada e eficaz, pois, resulta na seleção e propagação de nematoides gastrintestinais resistentes (Molento *et al.*, 2004).

O albendazol é uma droga classificada no grupo dos benzimidazóis utilizada no combate a parasitas (Martin, 1997). Segundo Lacey (1988) esse anti-helmíntico possui atividade *in vitro* (é ovicida) e *in vivo* em modelos animais e em humanos, especialmente no combate a várias espécies de helmintos. A forma como os benzimidazóis funcionam é através da via comum final da disrupção metabólica ocasionando a inibição da polimerase de beta-tubulina, causando disrupção na formação dos microtúbulos citoplasmáticos, comprometendo a função celular do parasita. Uma outra forma de ação desta droga é fazendo a inibição da enzima fumarato redutase no transporte de glicose, modificando os mecanismos energéticos do parasito (Lanusse, 1996).

O zinco é um micromineral importante no sistema imunológico. Sua deficiência em ruminantes causa redução na ingestão de alimentos, crescimento e conversão alimentar, além de problemas ósseos e diminuição da imunidade. Para diagnosticar a deficiência, o teor de zinco presente no sangue é bastante utilizado, e os valores variam entre 0,4 e 0,6mg/kg e são considerados deficientes (McDowell, 1992). Segundo Underwood (1981), os teores de zinco plasmáticos considerados dentro da normalidade para ovinos variam de 0,61 a 0,89mg/kg, com média de 0,75mg/kg. Por outro lado, o excesso pode gerar supressão da resposta imune, danos hepáticos e renais, valores plasmáticos acima de 1,2mg/kg já é um sinal de alerta, porém não necessariamente tóxico, níveis acima de 2,5mg/kg são considerados potencialmente tóxicos e prejudiciais aos ovinos (McDowell, 1992).

Íons metálicos (como o Zinco) representam micronutrientes com múltiplas funções celulares fundamentais, desempenhando papéis cruciais tanto na defesa do organismo hospedeiro quanto nas estratégias empregadas por microorganismos patogênicos (Li *et al.*, 2018). Por exemplo, eles desempenham funções essenciais em enzimas como superóxido dismutase e metaloproteases (Gerwin *et al.*, 2018).

O efeito do zinco sobre os parasitas foi avaliado em teste *in vitro*. O teste da eclodibilidade de ovos é utilizado em primeira instância (Katiki, 2011).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local: O estudo foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Zootecnia em Nova Odessa-SP.

2.2 Animais: Ovinos da raça Santa Inês, aos 2 meses, após a desmama, livres de parasitas, foram separados por grupos homogêneos em sexo e idade: controle (n=10), Zn-nanoparticulado (n=10) e Zn-micrométrico (n=10) e receberam cápsulas contendo 50 mg via oral (VO) diariamente e individualmente de acordo com o tratamento. O grupo controle recebeu uma cápsula contendo feno moído. Os animais ficaram em baias coletivas (de acordo com cada tratamento), a alimentação dos animais era de volumoso (feno) e concentrado. Cada animal recebeu oralmente semanalmente cerca de 1.200 larvas L3 (infectante) de *H. contortus*

2.3. Coleta de material para teste de eclodibilidade: Os ovos de *Haemonchus contortus* utilizados para o presente estudo foram coletados diretamente da ampola retal de animais. Foi coletado cerca de 5g de fezes de 5 animais de cada tratamento (pool de fezes), as fezes foram levadas até o laboratório e homogeneizadas e solubilizadas em água.

2.4. Teste in vitro de eclodibilidade dos ovos de *H. contortus*: Para o teste foram retirados cerca de 5g de fezes diretamente do reto do animal de cada grupo. As fezes foram levadas ao laboratório e homogeneizadas e solubilizadas em água. Em seguida, filtradas com auxílio de peneira de 1,00 mm, passando pelas peneiras de 105 µm, 55 µm e 25 µm. Nessa última, os ovos ficam retidos e em seguida foram transferidos para tubo de polietileno tipo Falcon de 50mL e completados com água destilada. Os tubos contendo ovos foram levados para a centrifugação a $g = 2.950$ (4000 RPM – Kindly KC5), com o valor da força centrífuga relativa em durante três minutos. O sobrenadante foi descartado e os ovos ficaram retidos no fundo do tubo. Na sequência, foi adicionada uma solução hipersaturada de NaCl e uma nova centrifugação realizada, por três minutos. Ao final da

centrifugação os ovos ficaram na superfície. O sobrenadante juntamente com os ovos foi transferido para uma peneira de 25 μm e lavados com água destilada em abundância para a realização da retirada do sal. A solução contendo ovos foi mantida em tubo tipo Falcon (Jackson; Hoste, 2010). Dez alíquotas de 20 μL dessa solução contendo ovos foram quantificadas por meio de microscópio ótico a fim de determinar a concentração média de ovos. O teste foi realizado em placas de cultura de poliestireno contendo 48 poços K12-048.

2.5. Diluição do Albendazol: O Albendazol foi solubilizado juntamente com polivinilpirrolidona (PVPP) e água destilada de modo que a máxima concentração a ser testada foi de 300 mcg/mL; posteriormente as diluições tiveram decaimento pela metade: 150 mcg/mL; 75 mcg/mL; 37,5 mcg/mL; 18,75 mcg/mL; 9,37 mcg/mL; 4,68 mcg/mL; 2,34 mcg/mL e depois para 0,58 mcg/mL; 0,29 mcg/mL; 0,14 mcg/mL. Para cada concentração foram realizadas 6 repetições contendo 100 ovos e 0,5mL de solução de Albendazol em cada poço. Concomitantemente, foi realizado testes controle com água destilada e PVPP e ovos. As placas foram incubadas a 27 °C por 24 horas e a contagem dos ovos e das larvas (L1) realizada para determinação da CL50 (figura 1).

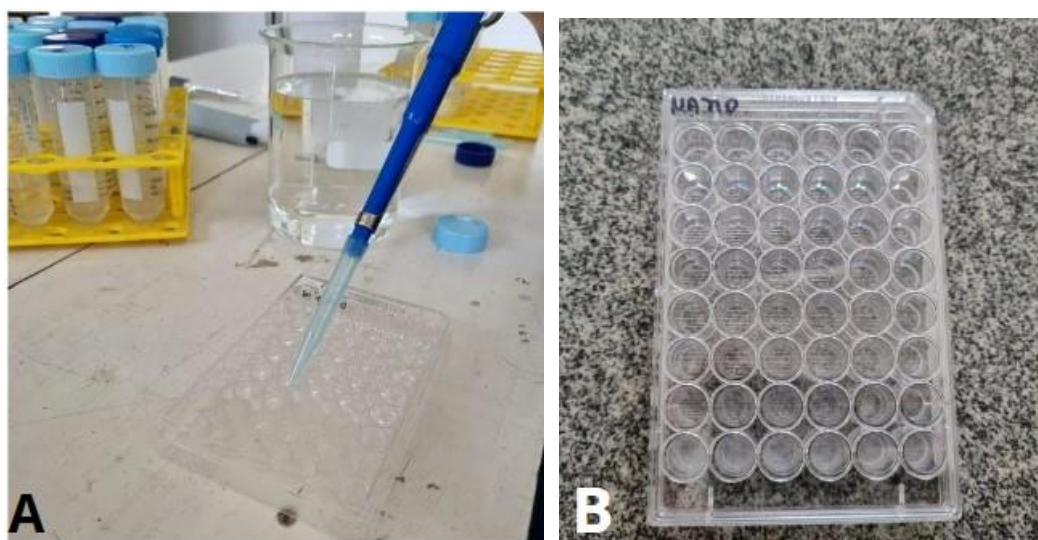


Figura 1- A) Momento da preparação de placa para o teste de eclodibilidade em meio com Albendazol. **B)** Placa do Grupo Nanoparticulado pronta com cerca de 100 ovos de *H. contortus* e 0,5mL de solução do meio de Albendazol. Fonte: arquivo pessoal.

Os dados foram analisados pelo software estatístico SAS Probit para determinar CL50 de cada tratamento como variáveis independentes (doses) após transformação logarítmica (logdose).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação a eclodibilidade de ovos não foi possível visualizar diferenças significativas nos testes *in vitro*, entre os grupos Zinco-Nanoparticulado, Zinco-Micrométrico e Controle. A tabela 1 apresenta os resultados desse teste após incubação por 24h, os ovos do controle negativo evoluíram normalmente conforme o ciclo biológico. Os grupos de cada tratamento se mostraram capaz de evolução do ciclo, mesmo com concentrações máximas de Albendazol. O grupo Controle com 0.33mcg/mL seguido pelos grupos Zinco-Nanoparticulado 0.34mcg/mL que possuem praticamente a mesma CL50 que e o grupo Zinco-Micrométrico com 0.41mcg/mL.

Tabela 1- Concentração letal de 50% (CL 50 mcg/mL) e limites de confiança dos grupos Zinco-Micrométrico, Zinco-Nanoparticulado, Placebo em testes *in vitro* de eclodibilidade de ovos em meio com Albendazol.

	CL50mcg/mL
Zinco-Micrométrico	0.41(0.29-0.58)
Zinco-Nanoparticulado	0.34(0.32-0.37)
Controle	0.33(0.28-0.39)

No Brasil, após o primeiro caso relatado de resistência parasitária em ovinos no Estado do Rio Grande do Sul (Santos; Gonçalves, 1967), os relatos de isolados resistentes aos fármacos se tornaram cada vez mais recorrentes. Estudo realizado por Cezar et al. (2010) validou por meio de testes de eficácia anti-helmíntica que não houve a diminuição na contagem de OPG, constatando a presença da resistência múltipla aos medicamentos levamisol, albendazol, moxidectina, ivermectina, triclorfon e combinação de albendazol + levamisol + ivermectina no Estado do Rio Grande do Sul. No Estado de São Paulo a resistência múltipla foi estudada por Almeida et al. (2010), foram testados os medicamentos closantel, albendazol, ivermectina, fosfato de levamisol determinando que isolados de *H. contortus* e *T. colubriformis* confirmam resistência a todos os fármacos testados.

Estudos realizados por Shakibaie et al. (2022) comparou a interação de nanopartículas de zinco com albendazol por meio de teste *in vitro* e *in vivo* em relação aos protoscoleces de cisto hidático obtidos de fígado de ovinos naturalmente infectados. As nanopartículas de zinco com albendazol na concentração de 200 µg/ml, matou completamente os protoscoleces após 10 minutos de exposição em teste *in vitro* e em *in vivo* ocorreu a morte do mesmo após 20 min de exposição. O resultado desse estudo não se assemelha com o do nosso projeto, afinal o produto comercial albendazol que utilizamos para avaliar por meio de teste *in vitro* a eclodibilidade dos ovos de *H. contortus* provenientes de fezes de ovinos suplementados com zinco se mostrou ineficaz, sendo assim confirmando a presença da resistência parasitária a esse medicamento, garantindo a evolução do ciclo biológico desse parasita.



Até o presente momento, não há estudos suficientes que correlacione a eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus* de ovinos suplementados com zinco frente a eficácia do albendazol, sendo assim, necessário mais pesquisas para avaliar a toxicidade e eficiência dessa associação.

4. CONCLUSÃO

O teste *in vitro* de eclodibilidade de ovos de *H. contortus* extraídos das fezes de ovinos que receberam suplementação de zinco, não mostraram diferenças significativas na tolerância ao albendazol.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (2023/14846-0) pela bolsa concedida, minha família, minha orientadora e colaboradores.

6. REFERÊNCIAS

ALBA-HURTADO, F.; MUÑOZ-GUZMÁN, M. A. Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. **BioMed research international**, v. 2013, n. 1, p. 162158, 2013.

ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology international**, v. 59, n. 4, p. 622-625, 2010.

AMARANTE, A. F. T.; RAGOZO, A.; SILVA, B. F. **Os parasitas de ovinos**. 2014.

CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L. A.; RIBAS, H. O.; VOGEL, F. S. F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 157-160, 2010.

EL-ASHRAM, S.; SUO, X. Exploring the microbial community (microflora) associated with ovine *Haemonchus contortus* (macroflora) field strains. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 70, 2017.

GERWIEN, F.; SKRAHINA, V.; KASPER, L.; HUBE, B.; BRUNKE, S. Metals in fungal virulence. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 1, p. fux050, 2018.

JACKSON, F.; HOSTE, H. In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. **In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies**, p. 25-45, 2010.



KATIKI, L. M. **Atividade anti-helmíntica in vitro e in vivo de compostos fitoquímicos para o controle de nematóides gastrointestinais de ovinos.** 2011.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International journal for parasitology**, v. 18, n. 7, p. 885-936, 1988.

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

LI, Y.; SUN, L.; LU, C.; GONG, Y.; LI, M.; SUN, S. Promising antifungal targets against *Candida albicans* based on ion homeostasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 286, 2018.

MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**, v. 154, n. 1, p. 11-34, 1997.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition.** 1992.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 82-87, 2004.

ROBERTO, F. F. S.; DIFANTE, G.S.; ZAROS, L.G.; GURGEL, A.L.C. Nematoides gastrintestinais na ovinocultura de corte sob regime de pastejo. **Pubvet**, v. 12, p. 147, 2018.

SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpes de *Haemonchus contortus* resistentes ao Thiabendazole no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revta Fac. Agron. Vet. UFRGS**, v. 9, p. 201-211, 1967.

SHAKIBAIE, M.; KHALAF, A. K.; RASHIDIPOUR, M.; MAHMOUDVAND, H. Effects of green synthesized zinc nanoparticles alone and along with albendazole against hydatid cyst protoscoleces. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 78, 2022.

UNDERWOOD, E.J. **The mineral nutrition of livestock.** 1981.