



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANA CARLA DIÓGENES SUASSUNA BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTI-HELMÍNTICOS E ANÁLISE
MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Haemonchus contortus* FRENTE AOS
BENZIMIDAZÓIS NO MUNICÍPIO DE MOSSORÓ – RN**

MOSSORÓ-RN

2014

ANA CARLA DIÓGENES SUASSUNA BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTI-HELMÍNTICOS E ANÁLISE
MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Haemonchus contortus* FRENTE AOS
BENZIMIDAZÓIS NO MUNICÍPIO DE MOSSORÓ – RN**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Campus de Mossoró, como exigência final para obtenção do título de Doutora no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz da Silva Vieira – EMBRAPA Caprinos e Ovinos

MOSSORÓ-RN

2014

O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade de seus autores

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência

B574c Bezerra, Ana Carla Diógenes Suassuna
..... Caracterização da resistência a anti-helmínticos e análise molecular de populações de *Haemonchus contortus* frente aos benzimidazóis no Município de Mossoró - RN/ Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra -- Mossoró, 2015.
..... 92f.: il.
..... Orientador: Prof. Dr. Luiz da Silva Vieira
..... Tese (Doutorado em Ciência Animal) -- Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.
..... 1. Pequenos ruminantes. 2. Parasitos gastrintestinais.
..... 3. Polimorfismo. I. Título.
RN/UFERSA/BCOT /131-15 CDD: 599.63
..... Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba
..... CRB-15/452

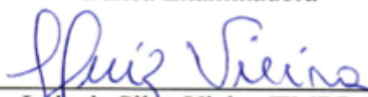
ANA CARLA DIÓGENES SUASSUNA BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTI-HELMÍNTICOS E ANÁLISE
MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Haemonchus contortus* FRENTE AOS
BENZIMIDAZÓIS NO MUNICÍPIO DE MOSSORÓ – RN**

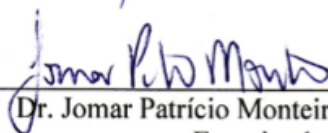
Tese apresentada à Universidade Federal Rural do
Semi-Árido (UFERSA), Campus de Mossoró, como
exigência final para obtenção do título de Doutor no
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Aprovada em: 14/11/2014

Banca Examinadora



Dr. Luiz da Silva Vieira (EMBRAPA)
Presidente e Orientador



Dr. Jomar Patrício Monteiro (EMBRAPA)
Examinador



Dr. Antônio César Rocha Cavalcante (EMBRAPA)
Examinador



Prof. Dra. Lilian Giotto Zaros de Medeiros (UFRN)
Examinadora



Prof. Dra. Lorena Mayana Beserra de Oliveira (UECE)
Examinadora

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA CARLA DIÓGENES SUASSUNA BEZERRA nasceu no dia 23 de novembro de 1975 na cidade de Alexandria-RN, filha de Valter Suassuna e Maria do Socorro Diógenes Suassuna, cursou ensino fundamental no Colégio Santa Terezinha (Caicó – RN) e o ensino médio no Colégio Marista (Natal – RN). Em Agosto de 1995 iniciou o ensino superior no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) concluindo em junho de 2000. Em 2006, iniciou, na mesma instituição, o curso de Mestrado em Ciência Animal onde concluiu em 2007. Em 2010, foi aprovada em concurso para professor efetivo na UFERSA para as disciplinas de Biossegurança e Ética em Biotecnologia e Parasitologia e Microbiologia Molecular, sendo atualmente professora do Departamento de Ciências Animais. Iniciando o doutorado em Ciência Animal da UFERSA em 2011 tendo como linha de pesquisa Sanidade Animal com ênfase na Parasitologia.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir chegar ao fim de mais uma etapa, por estar presente nos momentos mais atribulados, por ser a luz da minha vida, por guiar os meus passos e fazer parte de mais uma conquista na minha vida;

À minha família que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, por ter acompanhado passo a passo meu crescimento profissional, em especial, meu pai Valter Suassuna, minha mãe Maria do Socorro Diógenes Suassuna, meu marido Antalmo Bezerra Júnior e meus filhos Valter Suassuna Neto e Ana Carolyn Diógenes Bezerra.

Ao grupo do LIPAM: Cristiane, João, Priscilia, Hebert, Ryan, Tallyson, Mara, Thais, Camila, Mirna e Anna. Minha eterna gratidão.

Ao meu orientador e pesquisador Dr. Luiz da Silva Vieira por toda ajuda e conhecimentos repassados, pelo apoio quando mais precisei. A parasitologia vai ter uma grande perda quando o senhor se afastar.

A professora Dra. Lilian Zaros pela grande ajuda em todo esse percurso, compressão e disponibilidade. Obrigada!!!

Aos pesquisadores Dr. Jomar Monteiro e Antônio Cézar Rocha Cavalcante por todo conhecimento repassado. Eternamente grata!

As minhas amigas de coleta (antigas e atuais) Romeika Hermínia e Zuliete Aliona por terem compartilhado momentos de alegrias, tristezas, conquistas, derrotas, preocupações e ansiedades.

Aos meus novos amigos da biotecnologia os professores: Silvestre Brilhante, Michele Dalvina, Karoline Soares, Maurício Godoy, Taffarel Torres, Isadora Louise e Alexsandra Fernandes. E aos antigos mas sempre presentes: Jesane Lucena, Alexandre Rodrigues, Nilza Dutra, Marlon Feijó e Sthenia Santos. Vocês foram um grande presente em minha vida.

Aos meus amigos da EMBRAPA: Dona Helena, Janice, Edilson, Rosalba e em especial a Jéssica Santos pela grande ajuda nessa parte final da tese, o que você fez por mim é impagável.

A Wesley Adson pela brilhante ajuda na estatística. Muito obrigada!

Ao coordenador da Pós-graduação em Ciência Animal Dr. Jean Berg pela grande compreensão em todos os momentos de sufoco. Muito obrigada!!!

Ao presidente da Associação de Caprinos e Ovinos de Mossoró (ASCCOM) Jerônimo Frota pelo contato com os produtores, a Isadora Brasil por conseguir a Clínica Móvel da prefeitura e pela grande amizade formada (Que Deus reestabeleça sua saúde) e um agradecimento em especial aos 30 produtores que trabalhei todos esses anos. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço também a Dra. Lorena Mayana por participar da minha banca. Além das minhas amigas Paula Viviane e Patrícia Barra, parasitologistas do meu coração, por aceitarem ser suplentes. Obrigada!

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTI-HELMÍNTICOS E ANÁLISE MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Haemonchus contortus* FRENTE AOS BENZIMIDAZÓIS NO MUNICÍPIO DE MOSSORÓ – RN. BEZERRA, Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra. Caracterização da resistência a anti-helmínticos e análise molecular de populações de *Haemonchus Contortus* frente aos benzimidazóis no município de Mossoró – RN. 2014. 84f Tese (Doutorado em Ciência Animal) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, Brasil, 2014.

RESUMO: O aumento na resistência anti-helmíntica em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes tornou-se um problema global para o desenvolvimento da pecuária. Nesse contexto, a fim de avaliar o cenário da resistência na região do Rio Grande do Norte foram realizados em 30 propriedades rurais testes de resistência *in vivo* e *in vitro* utilizando produtos químicos dos grupos das avermectina, salicilanilidas, benzimidazóis e imidatiázóis. Para o teste *in vivo* utilizou-se o grupo I controle quatro grupos experimentais, sendo grupo II albendazol (10 mg/kg), grupo III levamisol (7,5 mg/kg), grupo IV closantel (5,0 mg/kg) e grupo V ivermectina (0,2 mg/kg). A infecção por nematóides foi determinada utilizando ensaios de ovos por grama de fezes (OPG) e a eficiência de cada tratamento pelo teste de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT). Para os teste *in vitro*, foi utilizando tiabendazol, com concentrações necessária para inibir 50% de eclosão dos ovos (EC_{50}) e ensaios com inibição de 50% do desenvolvimento larval, porém com a ivermectina foram realizados ensaios de inibição de 50% do desenvolvimento e migração larval (DL_{50}). Para análise molecular foram isolados *Haemonchus contortus* em cada propriedade avaliada para cálculo da frequência de alelos resistentes e sensíveis para os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs): F200Y, F167Y e E198A. Os resultados obtidos com os testes *in vivo* e *in vitro* mostraram que a resistência foi detectado em todas as drogas testadas, com o levamisol e closantel apresentando-se como os tratamentos mais eficientes, com resultados FECRT de 84,3% e 74,6%, respectivamente. Nas análises *in vitro* o resultado do tiabendazol no teste de eclosão foi EC_{50} 0,598 µg/ml (IC95%: 0,323-0,818), enquanto que no desenvolvimento larval uma DL_{50} e DL_{99} de 0,518 µg/ml (IC95%: 0,432-0,887) e 4,359 µg/ml (IC95%: 3,047-8,178), respectivamente. Para ivermectina no teste de desenvolvimento larval foi observado DL_{50} 0,637 µg/ml (CI95%: 0,382 – 0,903 µg/ml) e DL_{99} 19,56 µg/ml (CI95%: 11,44 – 46,55 µg/ml), enquanto que no de migração o valor da DL_{50} foi 16,337 µM (CI95%: 12,7-21,3 µM). Na análise molecular observou-se uma frequência maior do alelo resistente para o SNP F200Y apresentando porcentagens mais altas com valores de 85,81% e 73,11%, enquanto que o F167Y apresentou valores menores de alelos resistentes variando entre 43,73% e 2,93%. No SNP E198A foram detectados alelos apenas sensíveis. Avaliando o cenário da resistência anti-helmíntica na região, percebe-se que está estabelecida para as principais drogas existentes no mercado.

Palavras chave: Pequenos ruminantes, parasitos gastrintestinais, polimorfismo

ABSTRACT

ANTHELMINTIC RESISTANCE CHARACTERIZATION AND MOLECULAR ANALYSIS OF *Haemonchus contortus* POPULATIONS UPON BENZIMIDAZOLES IN THE CITY OF MOSSORÓ – RN. Bezerra, Ana Carla Diogenes Suassuna Bezerra. Anthelmintic resistance characterization and molecular analysis of *Haemonchus contortus* populations upon benzimidazoles in the city of Mossoró – RN. 2014. 84f Thesis (Ph.D. in Animal Science) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, Brazil, in 2014.

ABSTRACT: The increase in anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes on small ruminants became a worldwide issue on the development of livestock. In order to assess the resistance scenario in that context in the Rio Grande do Norte region, *in vivo* and *in vitro* resistance tests were carried out in 30 rural properties using chemicals in the avermectin, salicylanides, benzimidazoles and imidatiázols groups. For the *in vivo* test, group I was used as control and four other experimental groups received oral medication, being group II given albendazole (10 mg/kg), group III levamisole (7.5 mg/kg), group IV closantel (5.0 mg/kg) and group V ivermectin (0.2 mg/kg). The nematode infection was determined using fecal egg count (FEC) essays and the efficiency of each treatment was analyzed by the fecal egg count reduction test (FECRT). For the *in vivo* e *in vitro* tests, using tiabendazole, the necessary concentration to inhibit 50% of egg hatching (EC₅₀) and assays with a 50% inhibition of larval development (LD₅₀) were assessed, however 50% of larval development and migration inhibition assays (LD₅₀) essays were carried out using ivermectin. For the molecular analysis *Haemonchus contortus*/property were isolated for the calculation of the frequency of resistant and sensitive alleles for single nucleotide polymorphisms (SNPs): F220Y, F167Y and E198A. The results obtained from *in vivo* tests showed that resistance was detected for all of the drugs, with leavamisole and closantel appearing as the most effective treatments with FECRT results of 84.3% and 74.6%, respectively. In the *in vitro* assays, tiabendazole had a result in the hatching test of EC₅₀ 0.598 µg/ml (95% IC: 0.323-0.818), while exhibiting in the larval development test a LD₅₀ and LD₉₉ 0.518 µg/ml (95% IC: 0.432-0,887) and 4.359 µg/ml (95% IC: 3.047-8.178), respectively. For ivermectin in the larval development test, DL₅₀ 0.637 µg/ml (95% IC: 0.382 – 0.903 µg/ml) e DL₉₉ 19.56 µg/ml (95% IC: 11.44 – 46.55 µg/ml) was observed, while in the migration essay the LD₅₀ value was 16.337 µM (95% IC: 12.7-21.3 µM). In the molecular analysis a higher frequency of the resistant allele for SNP F200Y was observed, presenting higher percentage values of 85.81% and 73.11%, while the F167Y resistant alleles had lower values ranging from 2.93% to 43.73%. In the E198A SNP, only sensitive alleles were detected. Assessing the scenario of anthelmintic resistance in the region, one notices that it's established for the main existing drugs on the market.

Keywords: Small ruminants, gastrointestinal parasites, polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curva dose-resposta obtida através do ensaio de inibição da migração larval em ágar usando ivermectina realizada em propriedades rurais de caprinos naturalmente infectados no município de Mossoró, Nordeste do Brasil.....	62
---	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Grupo experimentais adotados para o teste de redução na contagem de ovos nas fezes realizado em caprinos infectados naturalmente na zona rural do município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte.....	40
Tabela 2 – Redução na contagem de ovos nas fezes (RCOF) de caprinos naturalmente infectados tratados com albendazol, levamisol, closantel e ivermectina em propriedades de caprinos do estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil.....	49
Tabela 3 – Resistência múltipla observada nas propriedades de caprino infectados naturalmente de acordo com o teste de contagem do número de ovos nas fezes, realizado na zona rural do município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte	53
Tabela 4 – Valores médios $\pm$ erro padrão do OPG e eficiência (%) do albendazol, closantel, ivermectina e levamisol em 30 propriedades rurais criadoras de caprinos, no Nordeste do Brasil	54
Tabela 5 – Níveis de resistência do parasito ao albendazol, levamisol, closantel e ivermectina nas propriedades de caprinos de acordo com a porcentagem	55
Tabela 6 – Concentração efetiva do tiabendazol necessária para inibir 50% e 95% de eclosão dos ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos oriundos de propriedades rurais do município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte.....	56
Tabela 7 – Concentração efetiva do tiabendazol necessária para inibir 50% de desenvolvimento larval (L1 para L3) em nematoides gastrintestinais de caprinos naturalmente infectados oriundos de propriedades rurais do município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte.....	58
Tabela 8 – Teste de desenvolvimento larval em caprinos naturalmente infectados tratados com ivermectina com cálculo da concentração efetiva necessária para inibir 50% do desenvolvimento larval em propriedades rurais da região do município de Mossoró.....	60
Tabela 9 – Frequência de alelos sensíveis e resistentes para o SNP F200Y detectados em <i>Haemonchus contortus</i> de caprinos da região do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil	63
Tabela 10 – Frequência de alelos sensíveis e resistentes para o SNP F167Y detectados em <i>Haemonchus contortus</i> de caprinos da região do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil	64

Tabela 11 – Frequência de alelos sensíveis e resistentes para o SNP E198A detectados em <i>Haemonchus contortus</i> de caprinos da região do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil	66
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RN – Rio Grande do Norte

AR – Resistência anti-helmíntica

PCR – Reação em cadeia da polimerase

L1 – Larva de primeiro estágio

L2 – Larva de segundo estágio

L3 – Larva de terceiro estágio

GABA – Ácido γ -aminobutírico

FECRT – Teste de redução na contagem de ovos nas fezes

OPG – Ovos por grama de fezes

TEO – Teste de eclosão de ovos

W.A.A.V.P. – *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*

CE₅₀ – Concentração efetiva necessária para inibir 50% da eclosão dos ovos

LDA (ou TDL) – *Larval development inhibition assay* (Teste de desenvolvimento larval)

LMIA (ou TML) – *Larval migration inhibition assay* (Teste de migração larval)

ISE – *Inbred Susceptible Edinburgh*

EDTA – Etilenodiamonotetraacetato

Tris-Hcl – *Hydroxymethyl aminomethane hydrochloride*

K – Potássio

PH – Potencial hidrogeniônico

TE – tampão de eluição

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

Ct – *Threshold cycle*

SDS – *sodium dodecil sulfato*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 CAPRINOCULTURA NO BRASIL	20
3.2 CAPRINOCULTURA NO NORDESTE	20
3.3 ENDOPARASITOS GASTRINTESTINAIS EM CAPRINOS	21
3.3.1 <i>Trichostrongylus</i> e <i>Oesophagostomum</i>	21
3.3.2 <i>Haemonchus contortus</i>	22
3.2.2.1 Patogenicidade	22
3.4 CONTROLE PARASITÁRIO	23
3.4.1 Terapia alternativa	23
3.4.1.1 Fungos Nematoides	23
3.4.1.2 Fitoterápicos	24
3.4.2 Terapia antihelmíntica	25
3.4.2.1 Lactonas macrocíclicas	26
3.4.2.2 Benzimidazóis	26
3.4.2.3 Imidatiazóis	28
3.4.2.4 Salicilanilidas	28
3.5 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA	29
3.5.1 Fatores relacionados a resistência	30
3.5.2 Resistência Molecular	31
3.6 TESTES PARA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA	32
3.6.1 Testes <i>in vivo</i>	32
3.6.1.1 Teste controlado	32
3.6.1.2 Teste da Redução na Contagem do Número de Ovos nas Fezes	33
3.6.2 Testes <i>in vitro</i>	34
3.6.2.1 Teste de Eclosão de Ovos	34
3.6.2.2 Teste de Desenvolvimento Larval	35

3.6.2.3 Teste de Migração Larval.....	35
3.6.2.4 Teste Molecular.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 ÁREA DO ESTUDO E CARACTERÍSTICAS METEOROLÓGICAS.....	39
4.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DAS UNIDADES PRODUTIVAS DE CAPRINOS.....	39
4.3 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
4.3.1 Grupos experimental	39
4.4 TESTE <i>in vivo</i>	40
4.4.1 Teste de redução na contagem de ovos nas fezes....	40
4.5 TESTES <i>in vitro</i>	41
4.5.1 Coleta das amostras	41
4.5.2 Recuperação dos ovos.....	41
4.5.3 Teste de Eclosão de Ovos	41
4.5.4 Teste de Desenvolvimento Larval.....	42
4.5.5 Teste de Migração Larval.....	42
4.5.6 Testes Moleculares.....	43
4.5.6.1 Coleta <i>Haemonchus contortus</i>	43
4.5.6.2 Extração do material genética.....	43
4.5.6.3 Primers.....	44
4.5.6.4 PCR em tempo real.....	44
4.5.7 Análise dos dados	44
4.5.7.1 Questionário.....	44
4.5.7.2 Teste de Redução da Contagem do Número dos Ovos nas Fezes.....	45
4.5.7.3 Coprocultura.....	45
4.5.7.4 Teste de Eclosão de Ovos e de Desenvolvimento larval.....	45
4.5.7.5 Teste de Migração larval.....	46
4.5.7.6 Testes Moleculares.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
6. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIA.....	71
APÊNDICE.....	89

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade em expansão em todo o Brasil, em especial na região Nordeste, possuindo importância socioeconômica entre os pequenos produtores, melhorando sua renda, por meio da produção de carne, leite e da venda de couro (ALMEIDA et al., 2010).

Na região semiárida do Rio Grande do Norte (RN), o desenvolvimento da criação caprina é bastante evidente, porém o parasitismo por nematóides tem sido um dos principais problemas sanitários (COELHO, 2009), em razão, das graves lesões causadas nos animais infectados, levando a perdas significativas para o produtor (MOLENTO et al., 2011).

O comércio e uso de drogas anti-helmínticas com amplo espectro de atividade tem sido uma ferramenta sólida há quase 40 anos para o controle dos nematóides gastrintestinais. Mas, se por um lado a utilização dos anti-helmínticos tornou-se indispensável propiciando aumento na produtividade dos rebanhos, por outro seu uso contínuo teve como consequência a seleção de populações de helmintos resistentes (AMARANTE, 2009).

A detecção precoce da resistência anti-helmíntica (RA) é um fator importante para o controle químico sustentável, embora na maioria dos países latino-americanos, insuficientes programas preventivos tem sido implementados para impedir a detecção e expansão dessa resistência (MOLENTO et al., 2011), que atualmente ocorre em todas as classes de drogas utilizadas no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes (DEMELER et al., 2014).

Dentre os endoparasitos resistentes, podemos destacar *Haemonchus contortus*, cuja totalidade de 50 fêmeas sobreviventes a determinado tratamento, podem eliminar meio milhão de ovos por dia, aptos a tolerar o composto, devido à transmissividade genética da resistência (MOLENTO, 2009). Além disso, é considerado de grande prevalência em várias regiões, incluindo no Rio Grande do Norte, onde foi destacado por Coelho e colaboradores (2010) como helminto encontrado com maior frequência.

RA em caprinos tem sido registrada em várias regiões ao redor do mundo (TERRIL et al., 2001; DEMELER et al., 2010; MARTINEZ-VALLADARES et al., 2013; DEMELER et al., 2014), inclusive no Brasil em pequenos ruminantes (VIEIRA;

CAVALCANTE, 1999; MELO et al, 2003; ALMEIDA et al., 2010; COELHO et al., 2010; MOLENTO et al., 2011; VERÍSSIMO et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

Vários testes podem dectar a RA em pequenos ruminantes, com destaque para os testes *in vivo* de redução do número de ovos nas fezes e *in vitro* como: eclosão de ovos, desenvolvimento e migração larval (ROTHWELL; SANGSTER, 1993), além do diagnóstico molecular, com destaque para reação em cadeia da polimerase – PCR, com potencial para identificação das espécies de parasitos resistentes (SANGSTER et al., 2002).

Diante do exposto, fez-se necessário a caracterização do nível de resistência parasitária em unidades produtoras de caprinos, objetivando manter a eficácia dos fármacos anti-helmínticos, retardar o aparecimento da RA e possibilitar benefícios diretos ao produtor do Rio Grande do Norte na escolha de anti-helmínticos mais eficazes. Como consequência uma redução nos custos de produção através da utilização racional desses medicamentos, melhoria nos índices produtivos dos rebanhos, alterações nas práticas de manejo e consequente redução do número de óbitos. Por fim, a análise molecular do gene da beta tubulina de populações de *H. contortus* resistentes aos benzimidazóis contribui para o avanço do conhecimento das mutações genéticas que levam ao processo de resistência na região.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar e caracterizar a presença de resistência aos antihelmínticos em unidades produtivas de caprinos e investigar a presença de polimorfismos responsáveis pela resistência a benzimidazóis em populações de *H. contortus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil das propriedades produtoras de caprinos no município de Mossoró-RN quanto ao manejo;
- Identificar por meio de testes *in vivo* e *in vitro* populações de endoparasitos gastrintestinais resistentes e sensíveis aos grupos químicos das lactonas macrocíclicas, benzimidazóis, imidatiazóis e salicilanilidas em unidades produtiva de caprinos;
- Isolar populações de *H. contortus* aos benzimidazóis;
- Investigar a presença dos SNP F200Y; F167Y e E198A no gene codificante para o isotipo 1 da β -tubulina em populações de *H. contortus* resistentes a benzimidazóis isolados em rebanhos caprinos do Rio Grande do Norte.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CAPRINOCULTURA NO BRASIL

A caprinocultura é uma atividade agroeconômica de grande importância no Brasil e que atualmente está em franca expansão (SPRENGER, 2013), sendo a produção de carne caprina em 2011 estimada em 42 mil toneladas, apresentando um crescimento de 247% na última década (FAO, 2011).

O interesse por essa atividade vem aumentando significativamente devido à facilidade de manutenção dos animais em rebanhos locais de pequeno e médio porte (HAMMERSCHMIDT et al., 2012), voltando assim a atenção por parte de governantes, técnicos e produtores, e propiciando alterações em alguns setores como a intensificação de pesquisas com foco na exploração racional de animais e beneficiamento de seus produtos (ANDRÉ JÚNIOR, 2013).

Neste contexto, devido a fatores ambientais e históricos, a caprinocultura se sobressaiu como atividade econômica no Nordeste do Brasil em relação às outras regiões (SOUZA et al., 2013).

3.2 CAPRINOCULTURA NO NORDESTE

A região nordeste protagoniza em cenário nacional a maior concentração de caprinos do Brasil, contendo cerca de 90,7% do rebanho nacional, o que equivale a aproximadamente dez milhões de cabeças (IBGE, 2012). Como fatores predisponentes estão a adaptação desses pequenos ruminantes ao clima semiárido, baixa necessidade de capital inicial, capacidade de acúmulo de renda em pequena escala e a oferta de produtos em novos mercados.

Essa atividade agropecuária se caracteriza por apresentar um sistema de criação extensivo ou sistema tradicional, com rebanho compostos por animais sem padrão racial definido ou por raças nativas (SANTOS, 2001). No entanto, quando se observa o panorama da caprinocultura no cenário nacional, verifica-se alta demanda por conhecimentos e tecnologia que contribuam para a eficiência dessa atividade na região (ANUALPEC, 2006).

Assim, as doenças parasitárias, ocasionadas por nematoides gastrintestinais, figuram entre as maiores preocupações dos produtores, técnicos do setor e indústria farmacêutica (DEMELETER et al., 2014).

3.3 ENDOPARASITOS GASTRINTESTINAIS EM CAPRINOS

Os principais nematoides gastrintestinais observados são dos gêneros *Haemonchus* sp, *Trichostrongylus* sp, *Strongyloides* sp, *Cooperia* sp, *Bunostomum* sp, *Trichuris* sp, *Skrjabinema* sp e *Oesophagostomum* sp (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999). Desses gêneros os de maior importância econômica são *Haemonchus* sp, *Trichostrongylus* sp, *Oesophagostomum* sp e *Strongyloides* sp (BRITO et al., 1996), com destaque para *Haemonchus* sp visto que, além da sua alta prevalência no Brasil apresenta grande patogenicidade (VERÍSSIMO et al., 2012).

A maioria dos endoparasitos está no abomaso, intestino delgado e intestino grosso. Possuindo um ciclo de vida simples, direto, rápido e dura cerca de 21 dias. Assim, no interior do trato digestivo adaptam os endoparasitos adultos que produzem milhares de ovos os quais são lançados no meio ambiente por meio das fezes (URQUHART et al., 1998).

Após eclosão, as larvas infectantes (L3) desenvolvem-se de acordo com as condições ambientais, ficando disponíveis na pastagem. Os animais ao se alimentarem, ingerem essas larvas infectantes que desencapsulam no rúmen, sofrem duas mudas e penetram na mucosa do tubo digestivo, onde se desenvolverão dando continuidade ao ciclo. A presença do parasito na mucosa causa irritação e inflamação pela migração das larvas, permitindo em algumas espécies o hematofagismo.

Os adultos, movem-se livremente na superfície da mucosa, fazendo com que os animais não consigam absorver corretamente os nutrientes dos alimentos ingeridos, consequentemente não convertem em peso ou leite o que consomem (ATHAYDE et al., 2005; McMANUS et al., 2010).

3.3.1 *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum*

A espécie *Trichostrongylus colubriformis*, que parasita o intestino delgado e está presente em praticamente todas as criações de pequenos ruminantes. Estes helmintos

lesam a mucosa intestinal, provocando exsudação local de proteínas séricas. Dessa forma, em infecções maciças, os animais podem apresentar anorexia, diarreia e edema submandibular. Já *Oesophagostomum* são responsáveis por enterite, que em infecções agudas, provoca grave diarreia, constituindo o principal sinal clínico e rápida perda de peso (URQUHART et al., 1990).

Porém, o parasito mais frequentes é *Haemonchus contortus*, uma vez que, ocasiona prejuízos bem sérios, principalmente por levar os hospedeiros a óbito.

3.3.2 *Haemonchus contortus*

A importância relativa das diferentes espécies de endoparasitos varia em função de combinações de fatores como: intensidade da infecção, prevalência, patogenicidade do parasito e resistência com base nesses fatores, pode-se afirmar que *H. contortus* é a principal espécie que parasita pequenos ruminantes no Brasil (RAMOS et al., 2004).

H. contortus possuem ciclo evolutivo direto, com os ovos eliminados nas fezes e em condições favoráveis (18 a 26°C com 80 a 100% umidade relativa) se desenvolvem no pasto em larva de terceiro estágio (L3) que é infectante em aproximadamente 5 dias (FORTES, 2004). Por um lado, em condições frias o desenvolvimento pode ser retardado por semanas ou meses, sobrevivendo devido a manutenção de um baixo metabolismo.

3.3.2.1. Patogenicidade

O caráter patogênico de *H. contortus* deve-se a sua ação hematófaga, em decorrência da sua lanceta bucal agir tanto sugando sangue como disseminando substâncias anticoagulantes que impedem a formação de fibrina no local de alimentação, promovendo o surgimento de lesões no abomaso (TAYLOR et al., 2007). As lesões provocadas na mucosa gástrica provocam quadros de inflamações diminuição do fluxo de ácido clorídrico e pepsinogênio, causando alterações no pH gástrico e facilitando o desenvolvimento de bactérias anaeróbicas.

Animais infectados por esse nematoide, na fase aguda da parasitose, apresentam perda de peso, desidratação, diarreia, anemia e pelos arrepiados e sem brilho. Porém, em

infecções mais intensas a anemia pode ser agravar, quando facilmente se nota as mucosas (ocular, gengival e vulvar) extremamente pálidas, podendo haver óbitos nessa fase, caracterizando uma hemoncose hiperaguda principalmente em animais jovens (VIEIRA et al., 2009).

Fatores predisponentes podem auxiliar essas parasitoses com destaque para: idade, sendo os jovens e senis mais sensíveis; estado nutricional inadequado, épocas de maior estresse (como parto, lactação, desmame e nascimento), além de fatores do animal como raça, manejo, superpopulação e a introdução de animais portadores nos rebanhos (ANDERSON, 1982).

3.4 CONTROLE PARASITÁRIO

3.4.1 Terapia Alternativa

Os estágios não-parasitários dos nematódeos gastrintestinais (ovos e larvas), no meio ambiente, sofrem a influência de vários inimigos naturais, que são denominados agentes antagonistas de nematódeos, tais como artrópodes, fungos, bactérias, besouros da ordem coleóptera e vírus (ARAÚJO, 2009).

Com destaque para os fungos atuando na redução das larvas infectantes na pastagem (ARAÚJO et al., 2007).

3.4.1.1 Fungos nematódeos

Esses fungos de nematódeos podem ser predadores, endoparasitas, oportunistas e produtores de metabólitos tóxicos aos nematoides (MORGAN-JONES et al., 1988), com os fungos nematófagos podendo ser isolados do solo, das fezes, do esterco e de outros ambientes.

A utilização desses fungos no controle de verminose tem apresentado resultados promissores, com a finalidade do controle biológico, reduzindo seu número em níveis aceitáveis e manter um balanço entre o nematoides e o fungo (GRONVOLD et al., 1996).

3.4.1.2 Fitoterápicos

Muitos pesquisadores têm estudado o uso de óleos essenciais e homeopatia, para o controle dos parasitos (CHAGAS et al., 2008), além do controle biológico com a utilização de fungos nematófagos e de fitoterapia (KATIKI et al., 2011).

A fitoterapia no controle de verminoses é uma alternativa que poderá reduzir o uso de anti-helmínticos, prolongando assim, a vida útil dos produtos químicos disponíveis, onde muitas plantas são tradicionalmente conhecidas por suas atividades anti-helmínticas (VIEIRA, 2007).

Estudos das atividades biológicas das plantas usadas contra doenças nos animais podem indicar caminhos promissores para o desenvolvimento de extratos que podem ser usados de forma comercial (ELOFF et al., 2010), demonstrando uma excelente aplicação biotecnológica do produto (OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Vários trabalhos descrevem a promissora atuação destas plantas. Oliveira (2013) comprovou que no teste *in vitro*, o tratamento com extratos aquosos de folhas de *Anacardium humile* e *Syzygium cumini* foram capazes de reduzir o numero de ovos por grama de fezes dos ovinos de maneira significativa. Enquanto que El-Sherbini (2013) obteve, com extratos aquosos de frutos imaturos de *Mangifera indica*, alta eficácia para a inibição do desenvolvimento larval de *Strongyloides stercoralis*.

Ademais, várias outras espécies também são citadas na literatura como, por exemplo: *Croton zehntneri* e *Digitaria insularis*, 99% de eficácia contra *H. contortus* (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2007; ALMEIDA et al., 2003), *Spigelia anthelmia* com eficácia de 100% para trichostrongilídeos e *Oesophagostomum* sp. (ADEMOLA et al., 2007).

Os princípios ativos encontrados nas plantas, responsáveis pelos efeitos terapêuticos, podem ser divididos em grupamentos químicos como os ácidos orgânicos, alcalóides, compostos fenólicos, taninos, cumarinas, flavonóides, antraquinonas, óleos essenciais e saponinas (FERRO, 2008), com destaque principalmente para os taninos que no controle de nematoides tem apresentado resultados promissores (NERY et al., 2009).

Outro grupamento bioquímico com potencial são as proteínas, como as lectinas; metabólitos de plantas que podem conferir propriedades anti-helmínticas contra parasitos gastrintestinais, através da interrupção do desenvolvimento das larvas (dos

parasitos) em todo o seu ciclo de vida, podendo então proporcionar um complemento útil para as estratégias de controle (ÁLVAREZ et al., 2012).

Porém, apesar dos avanços na busca de estratégias de controle não químico, o tratamento antiparasitário ainda é o mais utilizado.

3.4.2 Terapia Antihelmíntica

A utilização de fármacos de modo supressivo aliado às falhas de manejo contribuem para o estabelecimento de parasitos resistentes aos produtos (ALMEIDA et al., 2010), tornando os métodos tradicionais de controle ineficazes quando baseados unicamente na utilização de anti-helmínticos (VIEIRA et al., 2010).

A eficácia das drogas diminui consideravelmente devido a sobrevivência de parasitos resistentes e há a transferência dos seus genes à prole, fazendo com que permaneça a população resistente e se elimine os indivíduos susceptíveis (MOLENTO, 2005).

Este problema sócio econômico vem sendo descrito a muitos anos. O primeiro relato de resistência envolveu o tiabendazol (DRUDGE et al., 1964), seguido de relatos ao mesmo princípio nos Estados Unidos (THEODORIDES et al., 1970) e Nova Zelândia (KETTLE et al., 1983). No Brasil foi descrito pela primeira vez no Nordeste por Vieira (1986) no estado do Ceará.

Posteriormente detectou-se resistência a ivermectina nos Estados Unidos (HOWELL et al., 2008) e em países como a Noruega este problema visualizou-se na forma de resistência múltipla a ivermectina, albamectina e moxidectina (DOMKE et al., 2012). Nesse contexto, a expansão da resistência vem sendo observada, provavelmente em todos os países produtores de caprinos (KAPLAN et al., 2012).

Considerando que as alternativas químicas são escassas e que o esquema estratégico, quando utilizado por muito tempo, não promove o controle e toda a população de parasitos tende a tornar-se resistente. É necessária a continuidade de pesquisas e a adoção de alternativas de forma integrada, que reduzam ou eliminem a dependência por compostos químicos, e sejam de baixo custo e menos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (VIEIRA et al., 2010).

Dentre os vários vermífugos ofertados, destacam-se os grupos das lactonas macrocíclicas, benzimidazóis, imidatiázóis e salicilanilidas.

3.4.2.1 Lactonas Macrocíclicas

As lactonas macrocíclicas são endectocidas bastante utilizados em caprinos, com destaque para as avermectinas clássicas como: abamectina, doramectina, eprinomectina e ivermectina, derivadas da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermitilis* (LANUSSE et al., 2009).

Ivermectina foi a primeira avermectina introduzida no mercado em meados da década de 80, em animais de companhia. Trata-se de complexos orgânicos sintéticos, apresentando atividade sob os estágios adultos e em desenvolvimento de nematoides gastrintestinais. Além disso, estes compostos causam efeitos inibidores no trato reprodutivo das fêmeas que poderia explicar a redução na postura de ovos (FELLOWES et al., 2000).

Sua farmacodinâmica baseia-se na interrupção da transmissão sináptica relacionada ao ácido gama amino butírico (GABA), interação junto aos canais de glutamato-cloro independentes de GABA, ampliando a permeabilidade celular dos parasitos aos íons de cloro.

Uma vez administrado, a droga age diretamente na sinapse entre os interneurônios inibidores e os neurônios motores excitatórios sendo o local primário de ação. Este fenômeno diminui a resistência da membrana celular e provoca uma ligeira hiperpolarização do potencial de repouso das células pós-sinápticas, bloqueando a transmissão dos estímulos neurais aos músculos resultando em paralisia flácida seguida de morte ou expulsão do parasito (ADAMS, 2003).

Um número crescente de genes tem sido relacionado a resistência a ivermectina em *H. contortus* (MOLENTO et al., 2011), dentre estes genes, pode-se citar uma subunidade dos canais de cloreto ativados pelo glutamato, o canal de ácido γ -aminobutírico (GABA), glicoproteínas P e um suposto aminoácido controlador da subunidade HG1 de canais de ânions (TAYLOR et al., 2002). Consequentemente, a impressão geral é que o mecanismo de resistência a ivermectina é complexo, com alelos em vários *loci* que contribuem para a resistência (GILLEARD, 2006).

3.4.2.2 Benzimidazóis

No caso dos benzimidazóis, o albendazol e oxfendazol são fármacos de baixa toxicidade, que tem ação contra helmintos, tendo como mecanismo principal uma potente inibição na formação de microtúbulos do parasita. Essa ação antimicrotubular é responsável por seu efeito ovicida em helmintos e teratogênico, quando utilizado em fêmeas de ruminantes gestantes (LANUSSE et al., 2009).

Desde a introdução do tiabendazol em 1961 foram desenvolvidos uma ampla variedade de medicamentos como os tiazólicos (tiabendazol e cambendazol); metilcarbamatos (parbendazol, mebendazol, flubendazol, ciclobendazol, albendazol, fenbendazol, oxfendazol, oxibendazol, luxabendazol e ricobendazol), halogenados (triclabendazol) e pró - benzimidazóis (febantel, tiofanato e netobimin) (LANUSSE, 1996).

São antihelmínticos que apresentam baixa toxicidade e atuam sobre uma grande variedade de nematóides (KRÍZOVÁ-FORSTOVÁ et al., 2011). Estudos de populações de *H. contortus* resistente e sensível aos benzimidazóis indicaram a existência de diferenças específicas no DNA genômico destas populações, envolvendo mutações no aminoácido F200Y sendo o primeiro a ser descrito (KWA et al., 1994), o segundo foi o F167Y (SILVESTRE; CABARET, 2002) e o menos frequente E198A (GHISI et al., 2007) do isotipo 1 do gene da β -tubulina, que estar relacionado ao mecanismo da resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis (SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2005).

Desta forma, ocorre uma interrupção do equilíbrio tubulina/microtúbulo, sabendo que estes microtúbulos são organelas citoplasmáticas que participam de importantes processos tais como a formação do citoesqueleto celular, movimentação das partículas celulares e formação do fuso mitótico durante a divisão celular (MARTIN, 1997), temos que se deflagrará uma cascata de mudanças bioquímicas e fisiológicas que podem ser diretas ou indiretas, resultando na perda do equilíbrio celular, levando a morte do nematoide (LACEY, 1988).

Outro mecanismo de ação dos benzimidazóis no controle parasitário é a inibição da enzima fumarato redutase que atua no transporte de glicose, alterando os mecanismos energéticos do parasito (LANUSSE, 1996). Ao longo dos anos, alterações genéticas nos nematoides gastrintestinais vêm sendo observadas, ocasionando um processo grave de resistência parasitária, inativando a atuação da droga.

Contudo, existe evidência que a situação seja mais complexa e que outros *loci* possam estar envolvidos. Além disso, ainda não está claro como os alelos para resistência surgem, são selecionados e se espalham em populações de parasitos, e também como os mecanismos de resistência diferem entre as diferentes espécies parasitos ou entre diferentes estirpes nas mesmas espécies (GILLEARD, 2006).

3.4.2.3 Imidatiazóis

Outro grupo utilizado são os imidatiazóis, onde podemos salientar o levamisol, apresentando rápida absorção e um amplo espectro nematocida, induzindo a contração muscular e paralisia espástica dos nematoides susceptíveis (LANUSSE et al., 2009).

Nesse contexto, o mecanismo de ação corresponde a ação dos imidatiazóis como agonistas colinérgicos, e como tais, se ligam aos receptores colinérgicos estimulando continuamente estes receptores, o que leva a paralisia do parasita o que facilita a sua eliminação pelo organismo hospedeiro (KÖHLER, 2001). Além disso, essas drogas atuam juntamente com neurotransmissores como acetilcolina, causando abertura de canais catiônico (RODRIGUES, 2005).

Pesquisas utilizando o organismo modelo *Caenorhabditis elegans* associado a resistência aos levamisóis indicaram que existe baixa afinidade de ligação ao levamisole ou afinidade reduzida inativando ou reduzindo a resposta paralítica. Assim, indica-se que a resistência ao levamisole envolva a perda da sensibilidade contra estes anti-helmínticos na subunidade do receptor colinérgico do parasita (MOLENTO, 2004).

Considerado alternativa no controle contra os nematoides, porém com relato de resistência em larvas (SAEED et al., 2010), pode se tornar um problema sério no tratamento de diferentes parasitos de helmintos.

3.4.2.4 Salicilanilidas

Os salicilanilidas halogenados são um grupo de drogas desenvolvidas principalmente como antiparasitárias em animais, tendo como principais compostos sintetizados o closantel, niclosamida, oxiclozanida, raxofanida e resorantel (WALLEY, 1966; DOUCH; GAHAGAN, 1977). O closantel apresenta ação antiparasitária contra

helminthos considerado um potente desacoplador da fosforilação oxidativa da mitocôndria dos parasitos, podendo interferir na síntese de ATP pela mitocôndria do parasita (COSTA et al, 1996).

Os salicilanilidas atuam desacoplando a fosforilação pela translocação de prótons através da membrana interna da mitocôndria. Assim, a membrana interna da mitocôndria que normalmente é impermeável aos prótons, tornar-se permeável pela adição de desacopladores da fosforilação oxidativa que atua pela destruição do gradiente de prótons. Esta atividade seletivamente previne a utilização de energia química derivada do transporte de elétrons para a fosforilação de ADP em ATP, privando assim a célula de sua fonte normal de energia (SWAN, 1999). Uma consequência secundária da redução de ATP consiste no relaxamento do músculo somático do parasito (BACON et al., 1998).

O closantel também provoca alteração na ultraestrutura dos parasitas hematófagos provocando edema e desprendimento do tegumento, dano mitocondrial e redução dos produtos de secreção das células do tegumento e gastrodermais. A sensibilidade destes hematófagos aos agentes desacopladores pode ser devido a atividade do ciclo de Krebs ser restrita a camada externa do parasita (SWAN, 1999).

Porém, pelo teste de redução de ovos por grama de fezes, o closantel vem apresentando indícios de resistência (FALBO et al, 2009). Moraes et al. (2007) em um estudo realizado em propriedades no Estado de Santa Catarina, encontraram resistência de 13% em coproculturas para *Haemonchus* sp ao closantel nas propriedades estudadas.

3.5 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA

Consiste no fenômeno pelo qual populações sensíveis a um fármaco têm sua condição de sensibilidade alterada devido à ocorrência de alterações genéticas herdáveis. Assim, ocorre diminuição do efeito do fármaco devido à modificação da captação da droga no sítio de ação, mudanças no sistema enzimático necessário para produzir o efeito da droga, além de alteração nos receptores celulares, por diminuição do seu número ou da sua afinidade (MOTTIER; LANUSSE, 2001).

O fenômeno da RA química é inevitável e a seleção é iniciada logo após a primeira exposição ao fármaco. O intervalo inicial (meses/anos) para que esse fenômeno aconteça irá depender da espécie do parasito, da pressão de seleção exercida pela droga

utilizada e do tipo de manejo escolhido para cada situação. A resistência é, assim, transferida de geração para geração, dentro de uma determinada população (MOLENTO, 2009).

3.5.1 Fatores relacionados a resistência

Desta forma, o mecanismo de instalação da resistência deve-se ao uso incorreto, frequente e continuado de uma mesma base farmacológica destinada ao controle dos parasitos, utilização de medicamentos de longa meia vida e incorporação de animais contaminados ao rebanho (MOLENTO, 2004). Tal circunstância deve-se ao caráter biológico, onde uma droga perde sua eficácia quando utilizada nas mesmas condições em um longo período de tempo (SPRENGER, 2013).

O aparecimento de cepas de nematoides resistentes a anti-helmínticos pode ser explicado pela teoria da evolução, que tem como ponto básico a seleção natural, ou seja, os indivíduos mais adaptados sobrevivem para se reproduzir (GRIFFITHS et al., 2008). Assim, populações susceptíveis contém uma subpopulação de indivíduos com capacidade genética para sobreviver ao tratamento que originará a próxima geração desta população.

A utilização de compostos químicos capazes de eliminar grandes quantidades de parasitos dos hospedeiros promove a seleção química após a exposição constante a altas doses do medicamento. Além disso, os produtores fazem uso de uma rápida rotatividade dos grupos de diferentes princípios ativos aumentando a resistência parasitária (MOLENTO, 2004). Desta forma, os processos de resistência são traduzidos em alterações bioquímicas gerando mudanças de sistemas enzimáticos necessários para que o medicamento promova sua ação (BORGES et al., 2011).

Avaliando a problemática atribuída pela resistência a uma determinada droga, tem-se o fato da mesma acontecer dentro de um prazo que contempla de cinco a oito gerações seguintes a aplicação do princípio ativo, correspondendo a um intervalo de aproximadamente um ano para que ocorra o estabelecimento da resistência em uma determinada região (PRICHARD, 1990).

A resistência anti-helmíntica pode ser atestada, em determinados casos, após períodos de observação verificando a pouca eficácia do fármaco utilizado (MOLENTO,

2005). No entanto, existem testes adaptados para utilização do diagnóstico da resistência (COLES et al., 1992; COLES et al., 2006).

3.5.2 Resistência molecular

A resistência molecular está estabelecida principalmente aos benzimidazóis, sendo associada com modificações relacionadas à tubulina, proteína que compõe os microtúbulos, na qual moléculas do fármaco ligam-se para desencadear seu efeito terapêutico. Assim, os parasitos resistentes caracterizam-se pela diminuição dos sítios de alta afinidade à droga nas subunidades proteicas dos microtúbulos (KWA et al., 1994).

Dentre os endoparasitos pode-se destacar, no contexto da resistência, o gênero *Haemonchus*. Assim, quando são analisados particularmente populações de *H. contortus* resistentes e sensíveis, encontra-se em seu DNA genômico nítidas diferenças como a presença de mutações em distintas posições do gene da β -tubulina (ELARD; HUMBERT, 1999).

Na posição 198 se têm uma substituição de GAA para GCA, levando a mudança no aminoácido traduzido de glutamato para alanina. Outra mutação registrada na literatura é referente ao aminoácido 167 (SILVESTRE; CABARET, 2002), neste o códon TTC passou a ser TAC, tal mudança significa a nível proteico uma substituição de um resíduo de fenilalanina por um resíduo de tirosina, substituição esta que parece ser a maior envolvida no mecanismo da resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis.

Essa mesma substituição é verificada ainda na posição 200, onde mais uma vez o resíduo final irá equivaler a tirosina (ROOS et al., 1990; KWA et al., 1994; ELARD et al., 1996; ELARD; HUMBERT, 1999; SILVESTRE; CABARET, 2002; DROGEMULLER et al., 2004; SCHWAB et al., 2005; MELVILLE et al., 2006; GHISI et al., 2007; HODGKINSON et al., 2008; MOTTIER; PRICHARD, 2008).

Acredita-se ainda que a modulação da concentração da droga mediada pelas glicoproteínas-p no receptor alvo pode ser um outro potencial mecanismo de resistência (KERBOEUF et al., 2003). Estas proteínas que são produtos do gene MDR1, aparentemente removem seus substratos da dupla camada de lipídeos da membrana para o espaço extracelular, agindo como bombas de efluxo de xenobióticos (MOLENTO; PRICHARD, 1999).

Para constatar a existência da resistência aos tratamentos empregados no manejo dos rebanhos de caprinos, diversas técnicas podem ser empregadas. Entre eles o teste de redução na contagem de ovos nas fezes, teste este caracterizado pela emissão de um diagnóstico de “resistência” quando uma determinada droga que apresentava redução acima de 99% da carga parasitária apresentar redução menor do que 95% contra determinado parasito após certo período de tempo (MOLENTO, 2004).

3.6 TESTES PARA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA

A detecção precoce da RA é um fator importante para o controle químico sustentável, embora na maioria dos países estabeleçam insuficientes programas preventivos para impedir a expansão dessa resistência (MOLENTO et al., 2011).

Segundo Alvarez-Sánchez et al., (2005), a resistência pode ser avaliada por métodos *in vivo* (Redução da Contagem de Ovos nas Fezes - FECRT), *in vitro*: Eclosão de Ovos (TEO), Desenvolvimento e Migração Larval (TDL e TML) e moleculares.

3.6.1 Testes *in vivo*

O teste *in vivo* caracterizam-se variação inter animal (CRAVEN et al., 1999), havendo a necessidade de se observar o papel da farmacocinética no hospedeiro, a interação do parasito e o hospedeiro, além do seu modo de ação. Mesmo assim, são testes largamente utilizados para monitorar a resistência em nematóides em pequenos ruminantes (MELO et al., 2009).

3.6.1.1 Teste controlado

Dentre os testes *in vivo* destacam-se o “controlado” onde a eficácia do anti-helmíntico é determinada pela comparação da população de parasitos no grupo tratado com um grupo não tratado e o teste de redução na contagem de ovos nas fezes, amplamente utilizado para detectar resistência parasitária (MOLENTO, 2009).

Teste *in vivo* mais confiável, mas também de maior custo. Animais livres de endoparasitos são infectados com uma quantidade conhecida de formas infectantes e medicados em duas vezes a dose recomendada (TAYLOR et al., 2002).

Neste teste, a eficácia do anti-helmíntico é determinada pela comparação da população de parasitos no grupo tratado com a do grupo não tratado, sendo o método mais confiável para avaliar a atividade anti-helmíntica. Após a dosificação dos animais do grupo medicado é dado um intervalo entre o tratamento e o sacrifício dos animais. Estes são necropsiados e a carga parasitária é identificada e contada. Os adultos são diferenciados dos estágios larvais e se possível, quantificação das larvas hipobióticas (WOOD et al., 1995).

Como desvantagem apresenta falhas na estimativa da eficiência do anti-helmíntico, pois mede a produção de ovos de fêmeas adultas, onde nem sempre se estabelece uma correlação fidedigna com a parasitária. Contudo, uma boa correlação entre a contagem de ovos nas fezes e a contagem de parasitos no animal foi encontrada para *Haemonchus* sp. (TAYLOR et al., 2002).

3.6.1.2 Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (RCOF)

Teste que fornece uma estimativa da eficiência do anti-helmíntico, devido ao fato de quantificar produção de ovos de fêmeas adultas, onde nem sempre há uma correlação com a carga parasitária. Contudo, uma boa correlação entre a contagem de ovos nas fezes e a contagem de parasitos foi encontrada para *Haemonchus* sp. (TAYLOR et al, 2002).

Para a realização do FECRT, deve haver distribuição de forma mais homogênea possível dos grupos experimentais. Devendo observar dados como: sexo, categoria animal, raça, tratamento anti-helmíntico, grau Famacha, escore de condição corporal, peso do animal, presença de sinais clínicos (como diarreia, edema submandibular e doenças infecciosas) e contagem de OPG pré-experimento (NICIURA et al., 2009).

Recomenda-se a coleta das amostras fecais de 10-14 dias após o tratamento (COLES et al., 1992). Uma vez que, se o intervalo entre tratamentos for inferior a 10 dias, podem ocasionar uma superestimação da eficácia de alguns anti-helmínticos como os benzimidazóis (MARTIN et al, 1997).

No mínimo sete a 10 animais devem ser distribuídos em cada grupo experimental: grupo de tratamento com anti-helmínticos e grupo controle não tratado. Para os tratamentos de via oral, deve-se proceder jejum alimentar prévio dos animais por 12 horas, com água à vontade. O dia da aplicação dos anti-helmínticos é

considerado o dia zero do FECRT. Após os tratamentos, os animais podem permanecer no mesmo manejo e pasto em que estavam antes da realização do teste (NICIURA et al., 2009).

Culturas das larvas podem ser usadas para determinar as espécies envolvidas, mas as condições de cultura podem favorecer o desenvolvimento de uma espécie em detrimento de outra (PRESIDENTE, 1985).

Parasitas com um elevado potencial biótico, por exemplo, *H. contortus*, pode exercer uma influência desproporcional sobre os resultados e fatores de correção foram incluídos por alguns autores, ademais, parece também que o teste não tem a sensibilidade para detectar os níveis de resistência abaixo de 25% (TAYLOR et al., 2002).

3.6.2 Testes *in vitro*

Nos testes *in vitro* podemos salientar a fácil execução e aplicação, além de possibilitar a realização em larga escala (O'GRADY; KOTZE, 2004). Dentre esses testes, os mais utilizados são: teste de eclosão de ovos, teste de desenvolvimento larval, teste de motilidade larval e o teste molecular.

3.6.2.1 Teste de Eclosão de Ovos

O TEO é indicado pelo *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (W.A.A.V.P.) para detectar resistência aos benzimidazóis (COLES et al., 1992). Este teste baseia-se na atividade ovicida do fármaco servindo de modelo para o desenvolvimento de outros testes *in vitro* (MELO, 2005).

Realiza-se a incubação dos ovos em soluções contendo o anti-helmíntico em diferentes concentrações finais. Ao final de 48 horas, realiza-se a leitura do teste, classificando os achados em ovos ou larvas.

Interpretações qualitativas e quantitativas dos resultados podem ser feitas e a identificação das larvas permite que as espécies de nematóides envolvidas seja determinadas (WHITLOCK et al., 1980; CHAGAS et al., 2011).

O percentual de ovos que eclodem (ou, inversamente, morrem) em cada concentração é determinada. Quando a dose efetiva para inibir 50% da eclosão de ovos

(EC₅₀) for superior ou igual a 0,1µg/mL considera-se a presença de resistência na população de nematóides testada (COLES et al., 1992). O não desenvolvimento de ovos *in vitro*, pode ser uma das limitações desse teste no diagnóstico de rotina (TAYLOR et al, 2002)

3.6.2.2 Teste de Desenvolvimento Larval

A maioria dos vermífugos afetam o metabolismo de um parasita de alguma maneira e, como tal, a resistência aos anti-helmínticos pode ser determinada através de seus efeitos sobre o crescimento do parasita (TAYLOR et al, 2002).

O TDL consiste no desenvolvimento *in vitro* de larvas de primeiro estágio (L1) para as larvas de terceiro (L3) na presença de calor, *Escherichia coli* liofilizada como fonte de alimento, e na presença dos anti-helmínticos de interesse (COLES et al., 1992; CHAGAS et al, 2011).

Considerando rápido, confiável, baixo custo e adequado para investigação da resistência anti-helmíntica (TAYLOR et al, 2002). Como utiliza L1, não há nenhum pré-requisito para ovos não desenvolvidos ou amostras de fezes frescas facilitando assim a realização do processo (COLES, 1992).

Nesse teste pode existir algumas modificações como a utilização de ensaio de microplaca em que ovos de nematóides são adicionados a uma matriz de ágar contendo o anti-helmíntico resolvendo assim problemas de solubilidade da droga (LACEY et al., 1991, TAYLOR et al, 2002) ou utilizar placas de 24 poços sem a presença do ágar (CHAGAS et al, 2011).

3.6.2.3 Teste de Migração Larval

Neste ensaio, larvas infectantes, preferencialmente frescas (até 30 dias), obtidas em coproculturas (UENO; GONÇALVES, 1998) são incubadas com diluições em série para uma substância a ser testada. Após este tempo a percentagem de larvas paralisadas ou imóveis é determinada para cada concentração (VASCONCELOS et al., 2006).

Os testes de motilidade e migração larval são empregados na avaliação e no efeito dos anti-helmínticos que provocam a paralisia na musculatura somática dos parasitos (FORTES et al, 2013). Gill et al., (1995) relatou o uso de testes de migração

para diagnosticar a presença de resistência à ivermectina. O emprego desta técnica permite avaliar a capacidade migratória de larvas de terceiro estágio, depois de um período de incubação com a solução tratamento (BORGES, 2014). Desta forma é possível analisar o índice de tolerância sobre determinado produto (CHAGAS et al., 2011)

Ademais, o teste de motilidade larval pode determinar uma curva-padrão local ou regional de dose resposta e, a partir desses dados, avaliar ou monitorar a eficiência dos produtos que manifestarem o efeito de paralisia espástica, como ocorre no grupo das lactonas macrocíclicas (CHAGAS et al., 2011).

A avaliação da motilidade é feita através do uso de ágar e de peneiras para a separação de larvas de terceiro estágio que migram e as que não migram resultando em uma quantificação confiável (MOLENTO, 2004). Demeler et al., (2010) afirmaram a padronização do teste de inibição da migração larval como forma de detectar a presença de resistência à ivermectina em nematoides de ruminantes no continente europeu.

3.6.2.4 Testes Moleculares

Considerando que o mecanismo de aquisição de resistência está atrelado a uma série de eventos moleculares, uma das formas mais perspicazes de monitorar estas alterações no parasito é através de ensaios genéticos. Porém a utilização de ferramentas moleculares para o diagnóstico de nematoides resistentes aos anti-helmínticos ocorre principalmente no grupo dos benzimidazóis (TAYLOR et al., 2002), onde algumas mutações relacionadas ao uso de compostos deste grupo foram detectadas em ensaio com *Haemonchus* (MOTTIER; PRICHARD, 2008).

Marcadores moleculares podem ser utilizados para detectar a resistência em estágio inicial (RANGEL, 2008). Atualmente se dispõe de uma grande variedade de métodos para a análise de marcadores moleculares, entre eles a reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês *Polimerase Chain Reaction*), que uma vez otimizado representa um diagnóstico molecular eficaz, com alta sensibilidade e especificidade, podendo amplificar sequências-alvo a partir de números extremamente baixos de cópias de DNA em uma amostra (GRIFFITHS et al., 2008).

Usualmente se monitora a presença do aminoácido fenilalanina ou tirosina na posição 200 do gene da β -tubulina, responsável pela caracterização de cepas sensíveis e

resistentes aos benzimidazóis, respectivamente (ELARD et al., 1999). No entanto, devido à ausência de um consenso definitivo sobre as mutações no gene da β tubulina recomenda-se monitorar todos os polimorfismos previamente relatados sempre que possível, pois suas incidências podem variar de uma região geográfica para outra (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009).

A resistência aos benzimidazóis já se encontra relativamente bem caracterizada tendo como alvo o gene codificante para o isotipo 1 da beta tubulina. Mais especificamente já são conhecidas três mutações associadas a fenótipos de resistência: TTC para TAC no códon 200 (a mais frequente), GAA para GCA no códon 198 e TTC para TAC no códon 167 (KWA et al., 1994; ELARD et al. 1996; ELARD; HUMBERT, 1999; SILVESTRE; CABARET, 2002; DROGEMULLER et al., 2004; SCHWAB et al., 2005; MELVILLE et al., 2006; HODGKINSON et al., 2008; GHISI et al., 2007; MOTTIER; PRICHARD, 2008).

Testes moleculares baseados em PCR foram desenvolvidos para detectar estas mutações individualmente (SILVESTRE; HUMBERT, 2000; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2003; ALVAREZ-SANCHEZ et al., 2005) utilizando também metodologias mais avançadas como PCR quantitativo em tempo real e pirosequenciamento (BRAASCH; COREY, 2001; PETERSEN; WALSH et al. 2007; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009).

Apesar dos inúmeros trabalhos ainda não existe um consenso definitivo sobre as mutações no gene da beta tubulina e recomenda-se monitorar todos os polimorfismos previamente relatados sempre que possível, pois suas incidências podem variar de uma região geográfica para outra (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009).

Para que se possa verificar essas mutações individualmente, uma série de testes moleculares baseados em Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foram desenvolvidos (SILVESTRE; HUMBERT, 2000; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2003; ALVARES-SANCHEZ et al., 2005). A amplificação do fragmento do isotipo1 da β - tubulina através da Reação em Cadeia pela Polimerase Alelo Específica (AS-PCR) é útil na detecção das mutações descritas em nematoides adultos de *H. contortus* (KWA et al., 1994). Outras possibilidades para se efetuar a detecção destas mutações seriam PCR quantitativo em tempo real ou qPCR e o pirosequenciamento (RONAGHI et al., 1996, 1998; BRAASCH; COREY, 2001; PETERSEN; WENGEL, 2003; VON SAMSON- HIMMELSTJERNA et al., 2007; WALSH et al., 2007).

A qPCR é um avanço da PCR convencional, em que a amplificação e detecção de produtos amplificados são realizadas em uma única reação, dispensando assim as etapas de eletroforese em gel. Na técnica são utilizadas formas de mensurar a quantidade de DNA durante a amplificação, entre elas as sondas fluorescentes TaqMan e SYBR-Green; com o uso dessas sondas a cada ciclo é emitido um sinal fluorescente com a intensidade proporcional a quantidade de produto amplificado, que permite a quantificação indireta do DNA (SANTOS, 2001).

As vantagens práticas da qPCR sobre a PCR convencional envolvem a maior sensibilidade, velocidade, simplicidade, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (YANG; ROTHMAN, 2004). Esta técnica permite calcular a proporção de cada variante alélica, podendo ser realizada utilizando tanto DNA extraído de nematoides individualmente, quanto DNA obtido a partir de pool de parasitos. A partir de então, distintas abordagens de qPCR são utilizadas para a detecção e quantificação da frequência dos SNP que determinam fenótipos de resistência ou susceptibilidade (VON SAMSON- HIMMELSTJERNA; BLACKHALL, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DO ESTUDO E CARACTERÍSTICAS METEOROLÓGICAS

O estudo foi conduzido na zona rural do município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte, região Nordeste do Brasil, nas coordenadas 5°11'15'' de latitude sul e 37°20'39'' de longitude oeste e altitude de 16 metros, com clima predominante quente e semiárido, temperatura média 27,4 °C, estação chuvosa irregular e concentrada entre o verão, com precipitação pluviométrica média anual de 695,8mm (ARAÚJO et al., 2012).

Tipo de vegetação caatinga hiperxerófila, com abundância de cactáceas e plantas de pequeno porte, onde os caprinos utilizam como alimento em razão do regime extensivo de criação.

4.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DAS UNIDADES PRODUTORAS DE CAPRINOS

Foram aplicados questionários epidemiológicos em 120 propriedades rurais criadoras de caprinos do município de Mossoró, para determinação da real situação do controle parasitário (Apêndice).

4.3 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Um total de 30 propriedades de caprinos foram selecionados com base em precedente histórico de ineficiência anti-helmíntico.

Em cada unidade produtiva 60 caprinos naturalmente infectados por nematóides gastrintestinais foram selecionados e distribuídos em cinco grupos de forma aleatória, considerando-se o peso (variou de 11 a 30 Kg), grau de anemia e Método Famacha[®] (Considerando-se os graus dois, três e quatro) e contagem de ovos por grama de fezes (CHAGAS et al., 2011)

4.3.1 Grupos experimentais

O pré-requisito inicial de seleção dos animais foi a ausência de tratamento anti-helmíntico por um período de 90 dias antes do estudo (Tabela 1), com as drogas administradas por via oral.

Tabela 1- Grupos experimentais adotados para o Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes realizado em caprinos infectados naturalmente na zona rural do município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte

Grupo Experimental	Antihelmíntico	Dosagem
I (Controle)	-	-
II	Albendazol	10,0 mg/kg de peso corporal
III	Levamisol	7,5 mg / kg de peso corporal
IV	Ivermectina 0,08%	0,2 mg / kg de peso corporal
V	Closantel	5,0 mg / kg de peso corporal

4.4 TESTE *in vivo*

4.4.1 Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de cada animal no período da manhã, a partir do dia 0 e 10 dias após o tratamento. Com a coleta estabelecida com 4g de amostra fecais e utilização de duas câmaras de McMaster. O número de ovos por grama de fezes (OPG) foi calculado por multiplicação do número total de ovos por 12, sendo considerado parasitado animais acima de 100 ovos/grama de fezes (GORDON; WHITLOCK, 1939; CHAGAS et al, 2011).

O estado da resistência da população para cada rebanho foi determinada pela Redução na Contagem de Ovos na Fezes de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de redução} = 100 \times [1 - (T / C)]$$

Em que T é o grupo tratado e C é o grupo de controle (COLES et al., 1992).

Coproculturas foram realizadas no dia 0 e 10 dias após o tratamento para identificação dos gêneros (ROBERTS; O'SULLIVAN, 1950), com a identificação das larvas realizado com base nas características morfológicas de pelo menos 100L3 por cultura de fezes (UENO; GONÇALVES, 1998).

4.5 TESTES *in vitro*

4.5.1 Coleta das amostras

Amostras fecais foram coletadas nas 30 propriedades selecionadas, diretamente da ampola retal dos caprinos. A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizada mediante a metodologia de Gordon e Whitlock, (1939) e Chagas et al., (2011). A coleta das fezes foi realizada mediante término do período de efeito residual do tratamento de pelo menos 90 dias da última vermifugação (NICIURA et al., 2009), independente da raça, do sexo ou da categoria.

4.5.2 Recuperação dos ovos

A recuperação dos ovos de nematoides foi de acordo com a metodologia de Hubert e Kerboeuf (1992) onde as fezes passaram por uma sequência de tamises contendo aberturas de 1mm, 105µm, 55µm e 25µm para retenção dos ovos. Com a solução de ovos retida, centrifugado por 5 min a 3000 rotações por min (rpm), com descarte do sobrenadante e adição de solução hipersaturada para suspensão dos ovos, com posterior lavagem e conteúdo despejado em um cálice de decantação por 30 minutos.

4.5.3 Teste de eclosão de ovos (TEO)

Cerca de 100 ovos recém recuperados contidos em uma suspensão de 250 µl incubadas em 250 µl de solução de tiabendazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) distribuídas em sete concentrações 0,05-3,2 µg/ml, diluído em uma solução a 0,03% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Para o controle negativo foi utilizado 0,03% de DMSO na suspensão de ovos recuperados.

A distribuição foi realizada em placas de 24 poços e após 48h de incubação, o desenvolvimento das larvas foi interrompido pela adição de duas gotas de solução de Lugol, com posterior contagem de todos os ovos e larvas de primeiro estágio (L1) (COLES et al., 2006). Tanto o tratamento como o controle foram realizados em cinco repetições.

4.5.4 Teste de Desenvolvimento Larval (TDL)

No TDL a recuperação dos ovos foi realizada como descrito por Hubert e Kerboeuf (1992) nas 30 propriedades estudadas, onde em placas de 24 poços, foram adicionados 200 µl de solução contendo aproximadamente 100 ovos/poço recém recuperados, com as placas incubadas a 27°C durante 24 horas, com adição posterior de 80 µl de meio nutriente (*Escherichia coli*, o extrato fermentativo e anfotericina B) e o com o volume final por poço completado para 500 µl com água destilada e tiabendazol (HUBERT; KERBOEUF 1992; CHAGAS et al., 2011).

Foram realizados dois testes, sendo um com tiabendazol e outro com ivermectina. As concentrações utilizadas de tiabendazol foram 3,125 µg, 1,56 µg, 0,78 µg, 0,39 µg, 0,195 µg, 0,097 µg/ml e para ivermectina 0,96 µg/mL, 1,92 µg/mL, 3,84 µg/mL, 7,68 µg/mL, 15,36 µg/mL e 30,72 µg/mL, porém para o controle negativo foi utilizado suspensão de ovos, meio nutritivo e volume de 500 µl completado com água destilada. Tanto o tratamento como o controle foram realizados em cinco repetições e ficaram incubados por 7 dias, onde foi adicionado lugol.

4.5.5 Teste de Migração Larval (TML)

Nas 30 propriedades foram coletadas fezes em pool de animais parasitados onde foram realizadas coproculturas (UENO; GONÇALVES, 1998) para obtenção da L3. Após a recuperação as L3 foram submetidas a uma solução de hipoclorito de sódio 2% para desembainhar por aproximadamente uma hora.

Quando 90% das larvas com mobilidade estava sem bainha, essas foram subdivididas (em triplicatas/tratamento e controle) em grupos de 400 L3 (CHAGAS et al., 2011) em placas de 24 poços, com o volume ajustado para 500 µL, onde adicionou-se 500 µL da ivermectina 0,08% nas seguintes concentrações: 1 µM, 2 µM, 4 µM, 8 µM,

16 μ M, 32 μ M, 64 μ M, 128 μ M e 256 μ M, exceto o controle negativo que foi adicionado L3 e água destilada, levando posteriormente as placas para a estufa a 27°C por 6 horas.

Depois, adicionou-se 1000 μ L de ágar (1,4%) a 40°C a todos os poços e pipetou-se 2000 μ L para o aparato (placa de petri com 22 mL de água congelada, malhas e anel de plástico), retorna a estufa incubadora a 27°C por 18 horas, sob lâmpada de 150 Watts.

Após a segunda incubação centrifugou (3000 rpm por 5 min) apenas o líquido removendo o aparato, com o volume final ajustado para 10 mL, de onde retirou-se três alíquotas de cada tratamento e do controle, centrifugando (3000 rpm por 3 min) em microtubo com posterior leitura das larvas que migraram (D'ASSONVILLE et al., 1996, MOLENTO; PRICHARD, 2001).

4.5.6 Testes moleculares

4.5.6.1 Coleta *Haemonchus contortus*

Foram realizadas 30 necropsias de caprinos, sendo uma em cada propriedade pesquisada, onde foram extraídos diretamente do abomaso os exemplares de *H. contortus*, identificados pela morfologia (UENO; GONÇALVES, 1999) e conservados em álcool etílico a 80% a -20°C.

4.5.6.2 Extração do material genético

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído em *pool* de 10 adultos, macerados com auxílio de lâminas e adicionados a 500 μ L de tampão de digestão (0.2% SDS, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0.4 mg/ml proteinase K, 100 μ g/ml RNase, pH 8,0), com SDS removido por precipitação durante a incubação em gelo com acetato de potássio 5M durante 2 horas, seguido por centrifugação (15700g a 4°C por 15 minutos).

O sobrenadante foi retirado e colocado em microtubo novo contendo o mesmo volume de isopropanol, onde centrifugou-se, removendo o sobrenadante e o sedimento foi lavado com etanol a 70%, sendo ressuspensão com 500 μ L de tampão de eluição (TE).

O DNA extraído foi submetido a dois ciclos de fenol:clorofórmio na proporção de 1:1 sendo a purificação do DNA realizada com álcool e o sedimento final ressuspenso em 50 µl de tampão TE , sendo armazenados a -20 °C (SANTOS et al., 2014).

4.5.6.3 Primers

Para cada SNP foi desenhado os *primers* pelo programa Primer 3 (UNTERGASSER et al., 2007), considerando uma temperatura de anelamento de 58°C, baseadas em sequencias obtidas do GenBank (Accession numbers: GQ910877.1 a GQ910916.1) (SANTOS et al., 2014).

4.5.6.4 PCR em tempo real

Após a extração, o DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (I-quant), verificando a quantidade mínima de 25 ng. Para as reações foi utilizado: 12,5 µl 2X Fast Start diferenciais universais SYBR Green Master Mix (Roche, West Sussex, Reino Unido), 0,3 pmol/µl de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 24 ng de DNA e água para um volume total de 25 µl. E para o controle negativo foi trocado o DNA pela água. Sendo todas as reações feitas em triplicata.

Condição de amplificação para SNP F200Y e F167Y foram: 95 °C por 10 min e 35 ciclos a 95 °C por 15s e em 58 °C por 30s. Já o SNP E198A a amplificação ocorreu em 34 ciclos. A curva de Melting foi utilizada para detecção de dímeros e o gel de agarose a 3% para visualização dos produtos amplificados (SANTOS et al., 2014). Com todas as análises comparadas individualmente com uma amostra sensível (ISE).

4.5.7 Análise dos dados

4.5.7.1 Questionário

Os dados dos questionários foram tabulados no software Windows Excel e submetidos a análises da frequência de cada variável.

4.5.7.2 Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes

Utilizou-se o limite inferior para um intervalo de confiança de 95% onde foi calculado de acordo com as recomendações do WAAVP (COLES et al., 1992). Quando o valor FECRT é inferior a 95% e o limite inferior de menos de 90%, a população de nematoides deve ser considerada resistente a um anti-helmíntico. Se os valores obtidos satisfizer apenas um critério, a população de nematoides devem ser classificados como suspeitos, mas quando ninguém forem atendidas, a população de nematóides é suscetível.

As contagens de OPG foram previamente transformadas em $\log(x + 1)$ para estabilizar variância e analisados pelo software Minitab Windows versão 16.1.1. As diferenças estatísticas entre os grupos foram realizadas por análise de variância (*One Way ANOVA*), seguida por teste de Tukey com Intervalo de Confiança a 95%. Valores de $p < 0,05$ were considerados significativos.

4.5.7.3 Coprocultura

A resistência no gênero *Haemonchus* nas propriedades foram determinadas pelo programa RESO 2.0, onde diferenças na proporção de propriedades que continham *Haemonchus* sensíveis ou resistentes foi obtida pelo teste quiquadrado utilizando o programa Minitab Windows software version 16.1.1, considerando valores de significância a 5%.

4.5.7.4 Teste de Eclosão de Ovos e Desenvolvimento Larval

Para o diagnóstico *in vitro*, os valores oriundos do TEO foram analisados pelo teste de ANOVA bem como pelo teste T de Student ($p < 0,05$). Foi determinada a concentração efetiva para inibir 50% de eclosão de ovos através do método de Probit utilizando o programa SPSS 7.0.

Para os teste *in vitro* no TEO e TDL foram contabilizados os ovos e larvas de primeiro estágio (L1) e as L1 e de terceiro estagio (L3), respectivamente, para cálculo da inibição da eclosão e desenvolvimento larval, com a concentração efetiva necessária

para inibir 50% da eclosão (CE₅₀) e do desenvolvimento larva (CE₅₀) calculada por análise de regressão pelo Probit do Programa SPSS para Windows.

4.5.7.5 Teste de Migração Larval

No TML a porcentagem de eficácia foi calculada de acordo com a fórmula (MOLENTO; PRICHARD 2001):

$$E = [(Mc - Mtr) / Mc] \times 100$$

Onde, E é a porcentagem de eficácia, Mc é o número médio de larvas contado no grupo de controle e Mtr é o número médio de larvas contado no grupo tratado. O cálculo da CE₅₀ foi medido por uma regressão não linear a qual resultou em uma curva sigmoide de resposta e concentração, usando o programa Prisma, com os dados transformados em logaritmo ($X = \log X$)

4.5.7.6 Testes moleculares

Foram avaliados pelo teste Qui-quadrado e as percentagens de alelos resistentes e sensíveis presentes nas amostras analisadas de acordo com Alvarez-Sanchez et al., (2005).

Esta análise leva em conta os valores de Ciclo Limiar (Ct), gerados no processo de amplificação do sinal fluorescente. Sendo levados em conta tanto os iniciadores voltados para situações de sensibilidade quanto os específicos para genótipos de resistência. O primeiro valor determinado diz respeito ao ΔCt (Diferença entre os Ciclos de Limiar), este obtido pela presente equação: $\Delta Ct = (Ct \text{ alelo sensível} - Ct \text{ alelo resistente})$

$$\Delta Ct = (Ct \text{ alelo sensível} - Ct \text{ alelo resistente})$$

Na análise molecular, os valores de Ct (*Threshold Cycle*) para cada reação de PCR em tempo real foi determinado pelo software Realplex 2,2 (Eppendorf). Os valores de ΔCt calculados foram utilizados para determinar FR (Frequência Alélica de Resistência), através da equação:

$$\text{Frequência Alélica} = [1 / (2^{\Delta C_t} + 1)] \times 100.$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando a análise dos questionários aplicados nas 120 propriedades rurais, constatou-se que 100% (120/120) dos animais residem em espaços delimitados por algum tipo de cerca ou contenção. Destes 80% (96/120) realiza prática de quarentena enquanto que 86,6% (104/120) vermifugam os animais que são incorporados ao rebanho.

Em 100% (120/120) das propriedades, o cálculo de determinação da dose do vermífugo foi feito de maneira empírica. A prática de vermifugar sem um critério estabelecido são frequentes na região estudada onde são comuns as subdosagem ou superdosagem (COELHO et al., 2010). Nesse contexto, esta prática pode ser citada como sendo um fator responsável pelo aparecimento do fenômeno de resistência anti-helmíntica múltipla (PRICHARD et al., 1990) e que pode ser agravada por ciclos de alternância de princípios ativos (MOLENTO, 2004).

Em 80% (96/120) os animais são soltos após a administração do antiparasitário, contrariando as orientações de manejo que recomendam o confinamento do animal por 12 horas após a administração (EMBRAPA, 2007). Este tipo de conduta de manejo é comum no sistema de criação extensivo, bastante associado a percas de produtividade e altas taxas de parasitismo na região semiárida (COSTA et al., 2008; BRITO et al., 2009; ANASTÁCIO, 2011).

Em 56,6% (68/120) dos casos foram realizadas quatro vermifugações no decorrer do ano e em 43,3% (52/120) restantes três aplicações anuais. A utilização excessiva de antiparasitários pode tornar ineficaz o manejo desses medicamentos auxiliando diretamente no avanço da resistência (VASCONCELOS et al., 2006).

Em 80% (96/120) dos casos o único fator determinante para a realização da administração dos anti-helmínticos foi a transição entre os períodos do ano, concentrando-as nas épocas chuvosas. Já se sabe que esta opção de manejo ajuda a desencadear o desenvolvimento da resistência, em virtude de se vermifugar todo o rebanho sem exames parasitários que comprovem a necessidade (MELO, 2005).

Além do calendário supracitado foi levado em consideração também a sintomatologia das verminoses por 10% (12/120) dos produtores e a verificação de parasitemia pelo método FAMACHA[®] em 10% (12/120). Este dado revela que o método não recebe a devida atenção dos produtores rurais. Mas quando utilizado na

rotina de manejo o método FAMACHA[®] apresenta nível de confiabilidade superior a 95%, no que concerne ao diagnóstico de infecções causadas por *Haemonchus contortus* (VAN WIK et al., 1997), auxiliando na decisão de vermifugação dos animais dentro das propriedades (MOLENTO et al., 2004). Como consequência se teria uma redução na pressão de seleção da população de parasitos, diminuindo a concentração dos genes mutados, associados a resistência (COSTA et al., 2011).

Em 100% (120/120) das propriedades verificou-se a troca anual do vermífugo adotado no manejo antiparasitário. Porém, a rápida rotatividade dos princípios ativos pode agravar a resistência parasitária (HAMMERSCHMIDT et al., 2012). Uma alternativa para esse problema seria regulamentar a forma de prescrição e compra dessas drogas de utilização veterinária para evitar os efeitos abusivos associados a auto-prescrição (LEITE et al., 2006).

Fatores associados a qualidade sanitária das propriedades também foram analisados, de modo que, 43,3% (52/120) dos produtores fazem uso das esterqueiras e 93,3% (112/120) realizam uma limpeza semanal nos apriscos. Estes dados sugerem que não há um rigor sanitário nas propriedades levando a uma baixa qualidade no manejo adotado e gerando um fator predisponente para os quadros de parasitismo (SOTOMAIOR et al., 2009).

No análise do Teste Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (RCOF), verificou-se que a resistência anti-helmíntica foi detectada em todas as propriedades estudadas para, pelo menos, um dos fármacos testados (Tabela 2).

Tabela 2- Redução na contagem de ovos nas fezes (RCOF) de caprinos naturalmente infectados tratados com albendazol, levamisol, closante e ivermectina em propriedades de caprinos no estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil

Prop	Controle	Albendazol		Levamisol		Closantel		Ivermectina	
	OPG	OPG	RCOF	OPG	RCOF	OPG	RCOF	OPG	RCOF
	médio*	médio*	(%)	médio*	(%)	médio*	(%)	médio*	(%)
1	911	400	56,0	56	93,8	56	93,8	387	57,5
2	125	49	60,8	35	72,0	23	81,6	37	24,4
3	267,4	39	85,4	20	92,5	77	71,2	134,5	49,7

4	126	78	38,0	53	57,9	42.1	66.5	45	64,2
5	1145	175	84,7	24	97	52	95.4	85	92,5
6	115	21	81,7	9	92,1	7	94	17	85,2
7	320,6	113	64,6	389	95	389	0	132	58,8
8	1339	638	52,3	123	90.8	291	78,2	711	46,9
9	248	115	53,6	115	53,6	145	41,5	201	18,9
10	466	187	59,8	58	87,5	30	93,5	143	69,3
11	214,3	91	57,5	92	57,0	36.2	83	30	86
12	462	228	50,6	136	70,5	450	3	222	52
13	136	36	74	19	86	13	90,4	67	50,7
14	528	237	55,1	165	68,7	62	88,2	273	48,2
15	559	590	0	20	96,4	56	90	233	58,3
16	132	36	72,7	32	75,7	32	75,7	63	52,2
17	127	91	28,3	87	31,4	35	72,4	17	86,6
18	651	107	83,5	93	85,7	50	92.3	25	96,1
19	1402	456	67,4	39	97,2	195	86,1	447	68,1
20	117	34	71	5	95,7	16	86,3	32	72,6
21	408	1500	0	181	55,6	145	64,4	570	39,7
22	514	195	62	77	85	110	78,5	221	57
23	163	46	71,7	15	90,7	75,5	53,6	154,3	5,3
24	106	37	65	18	83	10	90,5	30	71,6
25	278	62	77,6	105	62,2	105	62,2	94	66,1
26	253	83,3	67	2	99.2	36	85,7	27	89,3
27	748	651	13	135,1	82	316,6	57,6	220,7	70,4

28	374,1	288	19,3	111	69	166	53,5	303	15,1
29	131	37	71,7	31	76,3	32	75,5	63	52
30	357	287,7	19,3	110,5	69	165,5	54,7	303	15

* Média aritmética do número de ovos por grama de fezes nos animais de cada grupo.

A primeira descrição da resistência aos benzimidazóis em pequenos ruminantes no Brasil data de 1979, no Rio Grande do Sul (SANTIAGO; COSTA, 1979). Desde então, vários trabalhos, mostra continuamente que a resistência aos benzimidazóis está fortemente estabelecida e difundida no Brasil tornando esta classe de drogas, pelo menos, com utilidade comprometida (CHARLES et al., 1989; ECHEVARRIA et al., 1996; VIEIRA; CAVALCANTE, 1999; MELO et al., 2003; ALMEIDA et al., 2010; COELHO et al., 2010; VERISSIMO et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

Nesse contexto, esforços devem ser realizados pelas autoridades governamentais para informar ao público, uma vez que, são poucos os relatos recentes de utilização significativa de benzimidazole em ruminantes no Brasil (COELHO et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2011).

Outro resultado observado foi a ineficácia do albendazol na região estudada ter aumentado nos últimos anos, com 100% das propriedades analisadas. Isto pode ser inferido com base em estudos anteriores na mesma região que apontaram valores de 80% (24/30) de propriedades com registros de ineficácia ao mesmo princípio (COELHO et al., 2010).

Na Região Nordeste, foram publicados percentuais de 35,3% de propriedades resistentes nas regiões serrana, litorânea e semiárida do estado do Ceará (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999) e 72% de propriedades resistentes no Vale do Jaguaribe, no mesmo estado (MELO et al., 2009).

Além disso, o percentual encontrado foi superior, ao encontrado em outras regiões do Brasil, onde no Rio Grande do Sul, 89,6% das propriedades analisadas possuíam populações resistentes ao albendazol (ECHEVARRIA et al., 1996), enquanto que Paraná esse percentual de propriedades resistentes foi de 88,1% (THOMAZ-SOCCOL et al., 2004).

Esse resultado do panorama de resistência aos benzimidazóis em todas as propriedades contempladas no estudo, já foi reportado na mesorregião dos Sertões Cearenses (SANTOS et al., 2014).

Quanto ao closantel 22 propriedades apresentara um RCOF menor de 90%. Resistência ao closantel foi relatada anteriormente no Sul e Sudeste do Brasil (ECHEVARRIA et al., 1996; FALBO et al., 2009; RAMOS et al., 2002; VERÍSSIMO et al., 2012). Porém, o presente estudo, apresenta o primeiro relato de resistência ao closantel no Nordeste.

A situação para a resistência ao levamisol não é diferente de benzimidazole. A resistência a este anti-helmíntico aparece generalizada no país, com ocorrências nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste (ECHEVARRIA et al., 1996, RAMOS et al., 2002, MELO et al., 2003, ALMEIDA et al., 2010; VERÍSSIMO et al., 2012).

Nos testes utilizando ivermectina observou que 96,6% apresentaram resistência ao fármaco testado, com uma variação entre 5,3% a 96,1% (Tabela 2). Surgindo na década de setenta, as avermectinas foram amplamente difundidos para controlar nematoides gastrintestinais e artrópodes ectoparasitos como pulgas, carrapatos, piolhos e moscas, em várias espécies animais, incluindo ruminantes (PRICHARD; ROULET, 2007).

Porém, com a frequência de tratamento aumentando substancialmente ao longo do tempo (MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2013), as lactonas macrocíclicas se tornaram amplamente utilizadas em explorações de caprinos (GUIMARÃES et al., 2011), sendo o antiparasitário predominantes em várias partes do mundo (TORRES-ACOSTA et al.; 2003; MELO et al., 2009; CRUZ et al., 2010)

É indispensável a verificação periódica dos rebanhos de pequenos ruminantes para monitorar e evitar RA (MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2013), visto que, nematoides gastrintestinais continuam a ser uma ameaça aos pequenos ruminantes, em razão do desenvolvimento de RA única e múltipla em nematoides caprinos (SAEED et al., 2010), associada muitas vezes a manejo inadequado.

Na mesma região do presente estudo, Coelho e colaboradores (2010) verificaram utilizando a ivermectina RCOF de 43,3%, demonstrando que a situação da resistência se agravou nos últimos anos. Em outros estados como São Paulo RCOF com essa mesma droga variou entre 0 a 86% (VERÍSSIMO et al., 2012). A RA vem sendo destaque em várias regiões, onde diversos fatores tem contribuindo para o agravamento dessa

resistência (LIMA et al. 2010), destacando-se, dentre outros, o uso de subdose (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999), associado à falta de exames coproparasitológicos para monitoramento da eficácia dos produtos utilizados (LIMA et al., 2010).

Resistências múltiplas foram detectadas em 96,6% das propriedades estudadas (Tabela 3). Em pequenos ruminantes, resistência múltipla a benzimidazole e levamisole foi diagnosticado no estado do Rio de Janeiro (ECHEVARRIA et al., 1996), no Ceará para levamisol e oxfendazole (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999) e em São Paulo para moxidectina, closantel, triclorfom, levamisol, albendazol e ivermectina (ALMEIDA et al., 2010). Além, de vários países da Europa (CHARTIER et al, 1998; MARTINEZ-VALLADARES et al, 2013) e África (BOERSEMA; PANDEY, 1997; ATANASIO et al., 2002, KUMSA; ABEBE, 2009).

Tabela 3 – Resistência múltipla observadas nas propriedades de caprino infectados naturalmente de acordo com o Teste de Contagem do Número de Ovos nas Fezes, realizado na zona rural do município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte.

Anti-helmínticos	Propriedades com Resistencia Múltipla*
Albendazole+Closantel	20% (6/30)
Albendazole+Closantel+ Levamisole	76,6% (23/30)

(*) Uma propriedade não apresentou resistência múltipla

Agravamento de RA tornou-se um problema mundial de destaque no controle de nematóides em pequenos ruminantes, com ênfase nas principais regiões produtoras, como a América do Sul (RINALDI et al., 2014). Portanto, intervalo de percentagem de eficiência precisa ser estabelecida e os níveis de resistência monitorizada.

Verificando a média do OPG por propriedade o albendazole apresentou a menor eficiência 45,6 %, o closantel de 74,6% e o cloridrato de levamisol com 84,3 %. Porém, ao verificar estatisticamente a média OPG do levamisole observou-se que não diferiu do closantel, embora a sua eficiência média considerando as 30 unidades produtivas tenha sido inferior a 95% (Tabela 4). Pesquisas anteriores na mesma região mostrou uma eficiência entre 29 a 100% de albendazol (COELHO et al., 2010), evidenciando a existência de RA para -benzimidazole. No estado do Ceará, Viera e Cavalcante (1999) observaram uma redução da eficiência de 20,6% para levamisol e 17,6% para

oxfendazole, ambos considerados como baixa eficiência uma vez que os valores estão entre 0 e 30,9%.

Table 4 – Valores médios $\pm$ erro padrão do OPG e eficiência (%) do albendazol, closantel, ivermectina e levamisol em 30 propriedades rurais criadoras de caprinos, no Nordeste do Brasil

Grupo Experimental	Média $\pm$ DP	Eficiência (%)
Control	423,6 $\pm$ 34,6 ^A	-
Albendazole	230,3 $\pm$ 25,1 ^B	45,6 (0 – 85,4)
Closantel	107,3 $\pm$ 12,0 ^C	74,6 (0 – 95,4)
Levamisole	66,11 $\pm$ 5,99 ^C	84,3 (31,4 – 99,2)

^{A,B,C} Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística ($P < 0,05$).

ANOVA (Tukey post hoc).

Keyyu et al., (2002) na Tanzânia relataram eficácia reduzida e desenvolvimento de resistência aos benzimidazóis e imidazothiazole pelo *H. contortus* em nematóides de caprinos. Em São Paulo, foram descritos não haver redução significativa ao anti-helmínticos albendazole, levamisole, ivermectina e closantel, demonstrando a eficiência apenas para triclorfom e moxidectina (ALMEIDA et al., 2010). No entanto, no Paraná estudos mostraram que o tratamento de caprinos com o closantel teve uma eficiência de 55,2% (FALBO et al., 2009).

Em outros países, como a Etiópia, o RCOF não apresentou resultados significativos para albendazole, tetramisole e ivermectina (KUMSA; ABEBE, 2009), além, de outros países africanos que também tiveram resultados semelhantes (KEYYU et al., 2002; ATANASIO et al., 2002). Na Espanha, resistência anti-helmíntico de 63,6% foi detectada por RCOF nos rebanhos testados, com a menor eficiência encontrada para albendazol (MARTINEZ-VALLADARES et al., 2013).

Nas coproculturas, as larvas infectantes mais prevalentes foram do gênero *Haemonchus* e *Trichostrongylus*. Quando comparadas propriedades resistentes e sensíveis ao *Haemonchus* pós-tratamento, observou-se resistência em 78,5 % (22 propriedades), enquanto que ao *Trichostrongylus* verificou-se 78,2% (23 propriedades)

($p < 0,05$). Citados como mais frequentes em diversas regiões pesquisadas (MELO et al., 2009; MOLENTO et al., 2011; MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2013).

Quando testado a ivermectina ambos apresentaram resistência pós-tratamento a com *Haemonchus* (70%) e *Trichostrongylus* (60%). Em testes de resistência na mesma região *Haemonchus* (36,6%) apresentou índice bem inferior ao encontrado nesse estudo, seguida pelos gêneros *Trichostrongylus* sp (33,3%) e *Oesophagostomum* sp (6,6%) (COELHO et al., 2010), que caracteriza o agravamento e disseminação da RA ao grupo químico das lacotnas macrocíclicas na região estudada.

Analisando a eficácia da droga no controle de gêneros verificou-se que o closantel apresenta uma maior eficiência para *Haemonchus* e *Trichostrongylus*. No estado do Ceará, gênero *Haemonchus* apresentou resistência ao levamisol e benzimidazol, enquanto que *Trichostrongylus* para o levamisol (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999).

No Paraná, *Haemonchus* foi encontrado em 97% das culturas fecais após o tratamento com closantel (FALBO et al., 2009) e em São Paulo do gênero também foi encontrada em culturas fecais após o tratamento com albendazol, levamisol, moxidectina, ivermectina e closantel, enquanto *Trichostrongylus* teve menor eficácia ao albendazol (ALMEIDA et al., 2010).

Na África *Haemonchus* foi analisada como resistentes ao albendazol, tetramisole e ivermectina (KUMSA; ABEBE, 2009) e na Europa *Trichostrongylus* apresentou resistência a ivermectina (MARTINEZ-VALLADARES et al., 2013).

Em termos de níveis de resistência, as taxas de eficiência entre 0 e 30,9% foram considerados como de alta resistência, entre 31 e 60,9% como resistência intermediária e mais de 61%, de baixa resistência (Tabela 5). Closantel e levamisol apresentou eficiência na maioria das fazendas, com 22 e 25 propriedades respectivamente. No entanto, albendazole apresentou uma menor eficiência com 6 unidades produtivas com alta resistência.

Tabela 5 – Níveis de resistência do parasito ao albendazol, levamisol, closantel e ivermectina nas propriedades de caprinos de acordo com a porcentagem de eficiência anti-helmíntica.

Eficiência	Nível de	Total de unidades de produção por princípio
------------	----------	---

(%)	Resistência	Albendazol	Levamisol	Closantel	Ivermectina
0 -30,9	Alto	6	0	2	5
31-60,9	Intermediário	9	5	6	11
> 61	Baixo	15	25	22	14

De acordo com o TEO, em todas as propriedades pesquisadas apresentaram resistência ao TEO, com a unidade produtiva de número um apresentando a menor porcentagem com CE_{50} 0,119 $\mu\text{g/ml}$ (IC95%: 0,003-0,398) e a de número 14 com a maior CE_{50} 1,63 $\mu\text{g/ml}$ (IC95%: 1,323-1,826) (Tabela 6). Com as trinta propriedades estudadas apresentando um CE_{50} média 0,598 $\mu\text{g/ml}$ (IC95%: 0,323-0,818).

Tabela 6 – Concentração efetiva do tiabendazol necessária para inibir 50% e 95% de eclosão dos ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos oriundos de propriedades rurais do município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte

Unidade	CE_{50}	IC95	CE_{50}	IC95
Produtiva	($\mu\text{g} / \text{ml}$)	(%)	($\mu\text{g} / \text{ml}$)	(%)
1	0,119	(0,003-0,398)	1,142	(0,295-2,015)
2	0,375	(0,164- 0,578)	1,765	(1,313-2,558)
3	0,147	(0,075-0,234)	1,248	(0,682-4,05)
4	0,271	(0,14-0,659)	1,3	(0,498-5,775)
5	0,263	(0,04-0,471)	0,937	(0,532-3,224)
6	0,403	(0,02-0,782)	1,404	(0,698-17,401)
7	0,702	(0,161-1,070)	1,819	(1,195-7,570)
8	0,318	(0,174-0,554)	3,289	(1,486-18,610)
9	0,289	(0,135-0,557)	3,248	(1,326-31,71)
10	1,38	(1,013-1,56)	2,15	(1,98-2,924)
11	0,215	(0,125-0,333)	2,326	(1,221-7,749)

12	0,365	(0,205-0,631)	1,98	(1,022-8,397)
13	0,657	(0,486-0,807)	1,66	(1,359-2,205)
14	1,63	(1,323-1,826)	2,409	(2,101-3,484)
15	0,455	(0,088-0,913)	1,936	(1,548-3,299)
16	0,85	(0,383-1,124)	1,963	(1,548-3,299)
17	0,166	(0,041-0,207)	1,477	(0,713-7,776)
18	0,558	(0,295-0,687)	0,963	(0,795-1,508)
19	0,399	(0,123-0,504)	0,671	(0,538-1,423)
20	0,473	(0,159-0,629)	0,955	(0,741-1,787)
21	0,417	(0,320-0,490)	0,711	(0,604-0,928)
22	0,523	(0,258-0,663)	0,913	(0,728-1,523)
23	0,354	(0,249-0,437)	0,828	(0,687-1,083)
24	0,326	(0,139-0,451)	0,712	(0,526-1,198)
25	0,387	(0,266-0,488)	1,028	(0,833-1,395)
26	0,279	(0,149-0,384)	0,686	(0,514-1,039)
27	0,285	(0,214-0,344)	0,634	(0,532-0,806)
28	0,067	(0,024-0,122)	0,278	(0,164-0,409)
29	0,406	(0,068-0,695)	1,177	(0,687-6,501)
30	0,535	(0,308-0,723)	1,358	(1,032-2,063)

Com uma CE_{50} média 0,598 $\mu\text{g/ml}$ e apresentando a menor CE_{50} de 0,11 $\mu\text{g/ml}$, todas as propriedades pesquisadas foram consideradas resistentes pelo TEO, uma vez que, de acordo com Coles et al. (1992) valores de TEO acima de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ é indicativo de resistência aos benzimidazóis. A resistência aos benzimidazóis já foi diagnosticada em várias regiões do mundo (CHARLES et al., 1989; VIEIRA; CAVALCANTE, 1999; MELO et al., 2003; COELHO et al., 2010; MOLENTO et al., 2011; VERISSIMO et al., 2012; RIALCH et al., 2013; SANTOS et al., 2014).

Estes valores de CE_{50} foram superiores aos valores de 1,49 $\mu\text{g/ml}$ a 4,62 $\mu\text{g/ml}$, registrados no Ceará (SANTOS et al., 2014), 0,3 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, reportados na Bahia (BORGES, 2011), sendo assim uma das mais elevadas doses já descritas no Brasil. No contexto mundial esse dado supera os observados na Eslováquia (VÁRADY et al., 2006), se equiparando aos documentados na Dinamarca, cujos CE_{50} também ultrapassam a marca de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (MAINGI et al., 1998).

No Norte da Índia em estudos com os benimidazóis, a CE_{50} da propriedade mais resistente apresentou um valor de 0,119 $\mu\text{g/ml}$, sendo bem inferior ao valor do presente estudo (1,63 $\mu\text{g/ml}$). Porém, o resultado encontrado no Rio Grande do Norte foi inferior ao publicado na região do Ceará com uma CE_{50} 4,62 $\mu\text{g/ml}$ (SANTOS et al., 2014).

A utilização de fármacos de modo supressivo aliado às falhas de manejo contribuem para o estabelecimento de parasitos resistentes aos produtos químicos (ALMEIDA et al., 2010), tornando os métodos tradicionais de controle ineficazes quando baseados unicamente na utilização de anti-helmínticos (VIEIRA et al., 2010).

Para o TDL com tiabendazol a unidade produtiva de número trinta apresentou a menor porcentagem com CE_{50} 0,123 $\mu\text{g/ml}$ (IC95% 0,089-0,157) e a de número 14 com a maior CE_{50} 1,008 $\mu\text{g/ml}$ (IC95%:0,891-1,109), porém com uma CE_{50} média de 0,518 $\mu\text{g/ml}$ (IC95% 0,432-0,887) e CE_{99} 4,359 $\mu\text{g/ml}$ (IC95% 3,047-8,178) (Tabela 7).

Tabela 7 – Concentração efetiva do tiabendazol necessária para inibir 50% de desenvolvimento larval (L1 para L3) em nematoides gastrintestinais de caprinos naturalmente infectados oriundos de propriedades rurais do município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte

Unidade	CE_{50}	IC95	CE_{99}	IC95
Produtiva	($\mu\text{g} / \text{ml}$)	(%)	($\mu\text{g} / \text{ml}$)	(%)
1	0,255	(0,69-0,407)	1,533	(1,051-3,824)
2	0,33	(0,058-0,610)	3,865	(2,462-11,666)
3	0,17	(0,010-0,407)	2,321	(1,527-4,791)
4	0,382	(0,086-0,677)	4,898	(3,097-14,819)
5	0,136	(0,053-0,246)	2,27	(1,530-3,708)

6	0,155	(0,46-0,315)	3,968	(2,561-7,025)
7	0,496	(0,364-0,612)	3,019	(2,260-4,818)
8	0,632	(0,492-0,751)	3,204	(2,431-5,070)
9	0,311	(0,260-0,365)	7,98	(5,232-14,065)
10	0,517	(0,420-0,611)	3,716	(2,799-5,598)
11	0,539	(0,449-0,625)	3,059	(2,366-4,423)
12	0,548	(0,469-0,627)	3,181	(2,472-4,528)
13	0,803	(0,535-1,256)	4,091	(2,166-22,335)
14	1,008	(0,891-1,109)	2,509	(2,089-3,413)
15	0,611	(0,529-0,692)	2,948	(2,335-4,080)
16	0,875	(0,70-1,00)	2,4	(1,91-3,76)
17	0,738	(0,532-0,890)	2,926	(2,214-5,099)
18	0,689	(0,432-0,887)	2,446	(1,925-3,759)
19	0,35	(0,186-0,453)	5,687	(2,308-34,034)
20	0,478	(0,308-0,632)	4,382	(3,094-7,813)
21	0,291	(0,195-0,406)	4,237	(2,134-16,227)
22	0,245	(0,143-0,362)	4,201	(1,908-24,675)
23	0,255	(0,218-0,295)	3,745	(2,674-5,850)
24	0,469	(0,280-0,636)	3,56	(2,503-6,674)
25	0,214	(0,162-0,268)	16,267	(8,861-39,013)
26	0,421	(0,215-0,606)	3,778	(2,604-7,567)
27	0,212	(0,168-0,258)	8,564	(5,307-16,603)
28	0,161	(0,125-0,197)	4,941	(3,193-9,098)
29	0,167	(0,011-0,464)	5,41	(3,415-11,544)

30	0,123	(0,089-0,157)	5,291	(3,261-10,639)
----	-------	---------------	-------	----------------

Quanto ao TDL apresentou maior CE_{50} e CE_{99} de 1,008 e 16,267 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Estudos similares na Índia encontraram uma máxima CE_{50} e CE_{99} de 0,147 $\mu\text{g/ml}$ e 3,051 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, porém com CE_{99} bem inferior ao que foi encontrada nesses estudo. Os benzimidazóis tem sido utilizados há décadas para controlar nematoides gastrintestinais (CAMPBELL, 1990), tendo como consequência o fenômeno de resistência (ECHEVARRIA et al., 1996), que vem aumentando ao longo dos anos.

O TDL com ivermectina foi realizado em 30 propriedades, onde a Tabela 8 mostra a dose letal (DL) necessária para inibir 50% do desenvolvimento da larva de primeiro estágio (L1) para L3. Quanto a ivermectina o maior grau de resistência nas unidades produtivas pesquisadas foi na propriedade 13 com uma CE_{50} de 8,964 $\mu\text{g/ml}$ tendo um intervalo de confiança (IC) a 95% valores entre 6,051 e 14,450 $\mu\text{g/ml}$. Enquanto que a menor resistência foi verificada na propriedade 2 com uma CE_{50} de 3,404 $\mu\text{g/ml}$ e IC95% entre 2,765 e 4,076 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 8- Teste de desenvolvimento larval em caprinos naturalmente infectados tratados com ivermectina com cálculo da concentração efetiva necessária para inibir 50% de desenvolvimento larval em propriedades rurais da região do município de Mossoró.

Propriedade	Ivermectina	
	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC95%
1	4,782	(3,008-7,398)
2	3,404	(2,765-4,076)
3	5,118	(2,828-8,905)
4	5,669	(3,541-9,139)
5	7,542	(5,245-11,393)
6	8,656	(5,132-17,377)
7	4,626	(3,887-5,475)

8	5,194	(4,347-6,192)
9	5,619	(4,687-6,745)
10	5,01	(4,121-6,070)
11	6,212	(4,155-9,383)
12	7,77	(5,278-12,060)
13	8,964	(6,051-14,450)
14	6,174	(5,213-7,338)
15	7,45	(4,576-13,2117)
16	8,286	(6,927-10,057)
17	7,98	(6,728-9,581)
18	8,931	(7,457-10,897)
19	6,104	(5,163-7,235)
20	5,538	(4,729-6,483)
21	5,992	(3,861-9,076)
22	5,984	(4,045-8,966)
23	7,741	(6,550-9,245)
24	7,611	(6,524-8,957)
25	8,269	(7,075-9,769)
26	6,111	(5,195-7,208)
27	5,469	4,603-6,494)
28	5,168	(3,502-7,523)
29	4,378	(3,715-5,128)
30	4,782	(3,008-7,398)

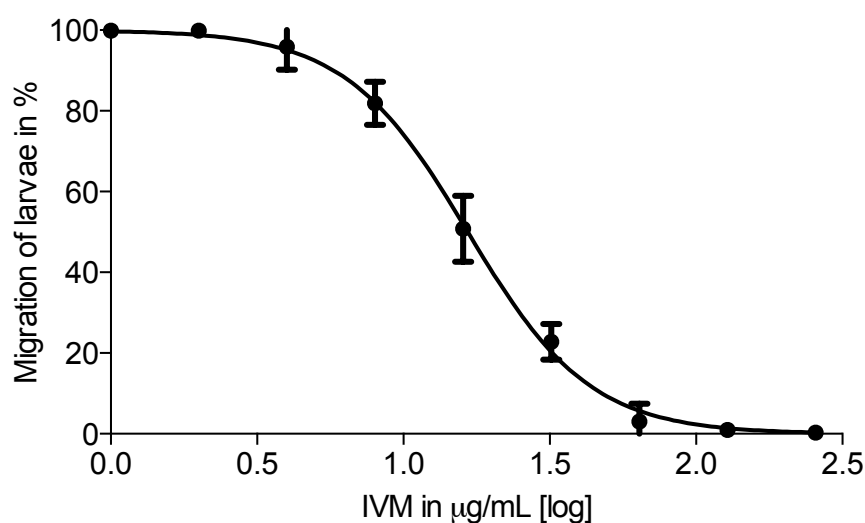
TDL foi descrito pela primeira vez por Coles et al., (1992) e posteriormente por Hubert e Kerbouef (1992) e Gill et al., (1995), onde a ivermectina pode ser indicada e utilizada nesses ensaios por possuir efeitos inibitórios sobre as larvas (GILL et al., 1995; KOTZE et al., 2006).

Assim, se verificarmos os trabalhos de Hubert e Kerbouef (1992), a dose máxima indicada em ensaios de TDL com ivermectina foi de 0.0002 $\mu\text{g/ml}$ bem inferior a dose encontrada nesse trabalho. Provavelmente em razão da AR que apareceu como um problema importante na pecuária, surgindo a necessidade do desenvolvimento de melhores ferramentas de diagnóstico e de compreensão dos mecanismos e grau de resistência, especialmente contra lactonas macrocíclicas (FALZON et al., 2013).

Maingi et al., (1998) realizaram TDL em propriedades resistentes e sensíveis a ivermectina pelo FECRT, obtendo uma CE_{50} variando de 23 - 68.4 nM, em uma propriedade resistente e CE_{50} mínima de 13.1 - 17 nM, nas propriedades sensíveis.

Para o TML as 30 propriedades também foram pesquisadas com o cálculo da CE_{50} correspondendo a 16,337 μM e IC95% entre 12,7-21,3 μM . Sendo que a curva da dose- resposta para ivermectina está representada na Figura 1.

Figura 1 – Curva dose-resposta obtida através do ensaio de inibição da migração larval em agar usando ivermectina realizadas em propriedades rurais de caprinos naturalmente infectados no município de Mossoró, no Nordeste do Brasil.



O TML tem sido utilizado como teste para detecção de resistência a drogas como ivermectina e moxidectina em nematóides de ovinos, caprinos e bovinos (WAGLAND et al., 1992; RABEL et al., 1994; MOLENTO; PRICHARD, 2001; GATONGI et al., 2003; KAPLANO et al., 2007; DEMELER et al., 2010; BORGES et al., 2011).

A ivermectina corresponde a um medicamento conhecido por inibir o desenvolvimento e mobilidade em estágios larvais nematoides gastrintestinais (GILL et al., 1995), onde atuam na faringe do parasito e possui efeitos inibitórios sobre as larvas e os vermes adultos (KOTZE et al., 2006).

Nos ensaios *in vitro* foi observado uma CE_{50} de 16,337 μ M nas propriedades pesquisadas. Fortes et al (2013) analisando cepas resistentes de *Haemonchus contortus* encontrou valor de CE_{50} de 91.06 μ g/ml.

Quanto aos resultados da biologia molecular, na PCR em tempo real (qPCR) para o F200Y foi obtidos resultados em 10 propriedades, sendo que o ISE apresentou uma frequência de alelos sensíveis de 96,07% e resistente de 3,92%. Enquanto que as maiores frequência de alelo resistente foram na propriedade dois e sete, com 85,81% e 73,11% de alelos resistentes, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequência de alelos sensíveis e resistentes para o SNP F200Y detectados em *Haemonchus contortus* de caprinos da região do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil.

Isolados	SNP F200Y			
	Ct $\pm$ S*		Frequência de alelos (%)	
	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente
ISE	21,37 $\pm$ 0,05	25,98 $\pm$ 0,08	96,07	3,92
1	29,69 $\pm$ 0,19	29,17 $\pm$ 0,13	41,02	58,97
2	29,21 $\pm$ 0,14	26,61 $\pm$ 0,04	14,18	85,81
3	28,12 $\pm$ 0,08	26,33 $\pm$ 0,19	22,3	77,60
4	22,46 $\pm$ 0,15	22,62 $\pm$ 0,04	52,71	47,28
5	24,65 $\pm$ 0,10	23,79 $\pm$ 0,04	35,62	64,37

6	21,73 $\pm$ 0,02	21,10 $\pm$ 0,06	39,25	60,74
7	24,35 $\pm$ 0,15	22,91 $\pm$ 0,04	26,88	73,11
8	28,06 $\pm$ 0,11	26,96 $\pm$ 0,09	31,7	68,28
9	23,49 $\pm$ 0,09	22,25 $\pm$ 0,05	29,74	70,25
10	21,61 $\pm$ 0,05	21,72 $\pm$ 0,01	51,96	48,03

* Ct: *Threshold cycle* de três repetições; S: Desvio padrão

Para o SNP F167Y foi obtido resultado das 30 propriedades pesquisadas, com o ISE apresentando uma frequência de alelos sensíveis de 99,95%, sendo que a maior frequência de alelos resistentes para esse SNP foram as propriedades 10 e 18, apresentando 43,73 e 42,26%, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequência de alelos sensíveis e resistentes para os SNP F167Y isolados em *Haemonchus contortus* de caprinos da região do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil

Isolados	SNP F167Y			
	Ct $\pm$ S*		Frequência de alelos (%)	
	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente
ISE	23,00 $\pm$ 0,03	34,03 $\pm$ 0,36	99,95	0,04
1	30,55 $\pm$ 0,15	32,91 $\pm$ 0,40	83,63	16,36
2	28,99 $\pm$ 0,34	1,20 $\pm$ 0,44	83,31	16,68
3	28,7 $\pm$ 0,11	30,30 $\pm$ 0,296	75,19	24,80
4	23,66 $\pm$ 0,10	24,30 $\pm$ 0,13	61,02	38,97
5	25,05 $\pm$ 0,08	26,60 $\pm$ 0,02	74,49	25,50
6	22,28 $\pm$ 0,15	23,70 $\pm$ 0,06	72,79	27,20
7	24,14 $\pm$ 0,02	26,00 $\pm$ 0,24	78,48	21,51
8	26,77 $\pm$ 2,11	29,72 $\pm$ 0,04	88,58	11,41

9	23,54 $\pm$ 0,14	24,89 $\pm$ 0,09	71,87	28,12
10	22,84 $\pm$ 0,05	23,20 $\pm$ 0,09	56,26	43,73
11	21,52 $\pm$ 0,10	23,10 $\pm$ 0,15	74,97	25,02
12	28,57 $\pm$ 0,03	29,84 $\pm$ 0,09	70,59	29,40
13	22,61 $\pm$ 0,05	24,30 $\pm$ 0,06	76,29	23,70
14	23,80 $\pm$ 0,09	25,02 $\pm$ 0,09	69,96	30,03
15	21,94 $\pm$ 0,28	23,46 $\pm$ 0,09	74,14	25,85
16	29,10 $\pm$ 0,21	30,03 $\pm$ 0,24	65,57	34,42
17	29,88 $\pm$ 0,05	30,51 $\pm$ 0,13	60,69	39,30
18	30,30 $\pm$ 0,14	30,75 $\pm$ 0,55	57,73	42,26
19	28,99 $\pm$ 0,18	30,70 $\pm$ 0,17	76,58	23,41
20	21,58 $\pm$ 0,44	24,63 $\pm$ 0,19	89,22	10,77
21	23,18 $\pm$ 0,07	25,10 $\pm$ 0,06	79,09	20,90
22	23,98 $\pm$ 0,28	24,69 $\pm$ 0,09	62,00	37,99
23	29,39 $\pm$ 0,09	30,65 $\pm$ 0,33	70,54	29,45
24	25,74 $\pm$ 0,04	28,34 $\pm$ 0,29	85,84	14,15
25	24,67 $\pm$ 0,04	25,60 $\pm$ 0,17	65,52	34,47
26	24,49 $\pm$ 0,01	26,98 $\pm$ 0,09	84,88	15,11
27	23,58 $\pm$ 0,06	25,46 $\pm$ 0,21	78,55	21,44
28	23,87 $\pm$ 0,12	28,91 $\pm$ 2,12	97,06	2,93
29	21,54 $\pm$ 0,24	24,06 $\pm$ 0,21	85,15	14,84
30	22,38 $\pm$ 0,17	23,41 $\pm$ 0,08	67,15	32,84

* Ct: *Threshold cycle* de tries repetições; S: Desvio padrão

Para o SNP E198A foram analisadas 17 amostras que resultou na detecção de alelos sensíveis para todos os isolados (Tabela 11).

Tabela 11 - Frequencia de alelos sensíveis e resistentes para os SNP E198A isolados em *Haemonchus contortus* de caprinos da região do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil.

Isolados	SNP E198A			
	Ct± S*		Frequencia de alelos (%)	
	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente
ISE	28,44 ± 0,17	-	100	0
1	29,22 ± 0,14	-	100	0
2	27,52 ± 0,18	-	100	0
3	26,75 ± 0,24	-	100	0
4	21,98 ± 0,04	33,39 ± 0,74	99,96	0,039
5	23,63 ± 0,17	-	100	0
6	20,70 ± 0,025	30,42 ± 0,81	99,88	0,11
7	23,19 ± 0,62	-	100	0
8	26,76 ± 0,17	-	100	0
9	22,35 ± 0,06	32,84 ± 1,62	99,93	0,06
10	20,76 ± 0,12	31,37 ± 0,23	99,93	0,06
11	20,13 ± 0,07	30,96 ± 0,15	99,94	0,05
12	28,24 ± 0,19	-	100	0
13	21,17 ± 0,15	31,84 ± 0,45	99,93	0,06
14	21,66 ± 0,52	31,32 ± 0,59	99,87	0,12
15	19,69 ± 0,07	30,97 ± 1,52	99,95	0,04
16	27,37 ± 0,037	-	100	0
17	28,40 ± 0,15	-	100	0

* Ct: *Threshold cycle* de tries repetições; S: Desvio padrão

As análises genéticas possuem maior impacto sobre o diagnóstico de resistência as drogas (MOLENTO et al., 2011). Desta forma, se presume que a detecção deve ser norteada pelo conhecimento dos SNP (GHISI et al., 2007), objetivando eliminar os prováveis inconsistências entre os resultados de outras metodologias empregadas para detecção de fenótipos de resistência (MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2012).

Nesse contexto, foi diagnosticada presença da resistência no F200Y e F167Y. Pesquisas têm mostrado uma correlação entre três polimorfismos (SNP), sobre o isotipo do gene da tubulina (ROBINSON et al., 2002), nas posições 167, 198 e 200, e consequentemente resistência aos benzimidazóis em diferentes espécies de nematoides.

As análises do SNP F167Y revelaram a existência de alelos resistentes com a propriedade de número dez apresentando maior porcentagem desse alelo (43,74%), ainda que em proporções menores que aquelas verificadas para o SNP F200Y. Essa menor proporção corrobora a maioria dos dados moleculares já registrados (SILVESTRE; CABARET, 2002; MOTTIER; PRICHARD, 2008; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009).

Entretanto um comportamento contrário foi observado quando comparado ao perfil genético de isolados do Ceará, já que, as mutações na posição F167Y, foram tidas como principal explicação para o fenômeno de resistência naquele estado (SANTOS et al., 2014).

De acordo com Silvestre e Cabaret (2002) a mutação na posição 200 de do gene da tubulina é o principal mecanismo genético que confere resistência aos benzimidazóis em nematoides de infecção natural, porém, mutação na posição 167 de isotipo um gene de β -tubulina pode atuar na resistência aos benzimidazóis, na ausência da mutação na posição 200, em condições de laboratório. Além disso, o alelo resistente para SNP F167Y foi geralmente encontrado em porcentagens mais baixas em estudos similares publicados (SILVESTRE; CABARET, 2002).

Os valores das Frequências Alélicas de Resistência para o SNP F200Y foram os mais elevados entre os polimorfismos pesquisados, com maior frequência alélica observada na propriedade dois (85,6%), esses valores máximos se aproximam dos registrados na Índia para este mesmo SNP (TIWARI et al., 2006; MARHASHI et al., 2011).

O controle ISE, esboçou uma porcentagem de 3,93% de alelos resistentes para este polimorfismo em particular, o que é tido como um resultado esperado, uma vez que, este isolado acumula uma pequena taxa de mutação nesta trinca nucleotídica (WALSH et al., 2007).

A elevada frequência deste alelo pode ser associada diretamente aos baixos valores de eficiência encontrados nos testes de redução na contagem de ovos nas fezes (TYDÉN et al., 2014), bem como aos elevados valores de EC50 nos ensaios de eclodibilidade de ovos (MARHASHI et al., 2011). Além disso, estes altos percentuais permitem caracterizar este evento genético como principal fator atrelado à resistência anti-helmíntica (CUDEKOVÁ et al., 2010).

Os valores encontrados são superiores aos constatados em isolados do estado de São Paulo com valores máximos de 66,7%, (NICIURA et al., 2012), isolados de Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina, cujas maiores frequências foram de 40% (BRASIL et al., 2012) e no Ceará, onde os maiores valores atingiram 30,20% (SANTOS et al., 2014).

Quanto ao SNP E198A, a frequência de alelos resistentes foi considerada baixa ou ausente em todas as propriedades pesquisadas. Apresentando resultado similar ao encontrado por Santos e colaboradores (2014) que diagnosticou 100% de frequência de alelos sensíveis para esse SNP.

A frequência de alelo resistente desse polimorfismo tem sido associado principalmente a isolados altamente resistentes (RUFENER et al., 2009). Além disso, sua ausência pode ser observada em populações que já desenvolveram alta frequência de alelos resistentes aos outros SNP encontrados no *Haemonchus* (SANTOS et al., 2014), como observado no presente estudo.

O fato desta mutação não ter sido detectada, foi provavelmente por não ter havido pressão de seleção sobre um indivíduo que manifestou essa permuta nas bases nucleotídicas. No entanto esses dados podem fornecer subsídios para uma teoria que defende que estas mutações possuem caráter exclusivo, de modo que quando se observam perfis de resistência vinculados ao SNP F200Y, não são constatadas frequências consideráveis no SNP E198A (BARRÉRE et al., 2012; KOTZE et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

As análises voltadas para este polimorfismo em particular reúnem poucos relatos (MOTTIER; PRICHARD, 2008), onde tais alterações foram documentadas em

situações de múltiplos ciclos de seleção de resistentes em âmbito laboratorial (RUFENER et al., 2009).

A elevada frequência deste alelo pode ser associada diretamente aos baixos valores de eficiência encontrados nos testes de redução na contagem de ovos nas fezes (TYDÉN et al., 2014), bem como aos elevados valores de EC50 nos ensaios de eclodibilidade de ovos (MARHASHI et al., 2011). Além disso, estes altos percentuais permitem caracterizar este evento genético como principal fator atrelado à resistência anti-helmíntica (CUDEKOVÁ et al., 2010).

Os valores encontrados são superiores aos constatados em isolados do estado de São Paulo com valores máximos de 66,7%, (NICIURA et al., 2012), isolados de Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina, cujas maiores frequências foram de 40% (BRASIL et al., 2012) e no Ceará, onde os maiores valores atingiram 30,20% (SANTOS et al., 2014).

6. CONCLUSÕES

- O manejo adotado nas propriedades pesquisadas favorece a resistência parasitária na região;
- Aos testes *in vivo* a resistência encontra-se disseminada em todas as drogas testadas, com o levamisol e closantel apresentando-se como os tratamentos mais eficientes, com resultados FECRT de 84,3% e 74,6%, respectivamente;
- Nas análises *in vitro* houve resistência ao tiabendazol no teste de eclosão de ovos (EC_{50} 0,598 $\mu\text{g/ml}$). No desenvolvimento larval ao tiabendazol a CE_{50} 0,518 $\mu\text{g/ml}$ e a ivermectina possui CE_{50} 0,637 $\mu\text{g/ml}$. No teste de migração larval a CE_{50} 16,337 μM ;
- Os isolados apresentaram elevada frequência de alelos resistentes para o SNP: F167Y e F200Y, não revelando alterações genéticas referentes ao SNP E198A.

REFERÊNCIAS

ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 8ª edição. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2003. 1048p.

ADEMOLA, I.O.; FAGBEMI, B.O.; IDOWU, S.O. Anthelmintic activity of *Spigelia anthelmia* extract against gastrointestinal nematodes of sheep. **Parasitology Research**, v.101, p.63-69, 2007.

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, p.622–625, 2010.

ALMEIDA, M.A.O.; BOTURA, M.B.; SANTOS, M.M.; ALMEIDA, G.M.; DOMINGUES, L.F.; COSTA, S.L.; BATATINHA, M.J.M. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Capim santo) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (Capim-açu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.3, p.125-9, 2003.

ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. A. et al. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in *Trichostrongylids* of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 291-298, 2005.

AMARANTE, A.F.T. Nematoides gastrintestinais em ovinos. In: CAVALTANTE, A.C.R.; VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M.B. (Org.). **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa, 2009. cap. 1, p.35.

ANASTÁCIO, P. F. B. **Parasitoses gastrintestinais em ovinos em regime extensivo e intensivo em explorações do Ribatejo** – Portugal. 2011.108p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Técnica de Lisboa, 2011.

ANDERSON, N. **Internal parasites of sheep and goats**. In: COOP, I. E. (Ed.). *Sheep and goat production*. Amsterdam: Elsevier. p. 175-191, 1982.

ANUALPEC - **ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA**. Editora: São Paulo, Argos, FNP Consultoria e Comercio, p. 277. 2006.

ARAÚJO, J. V. **Controle biológico**. In: CAVALCANTE, A C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. (Ed.). *Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 403-429, 2009.

ARAÚJO, J. V.; RODRIGUES, M. L. A.; SILVA, W. W.; VIEIRA, L. S. Controle biológico de nematódeos gastrintestinais de caprinos em clima semiárido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1177-1181, 2007.

ARAÚJO, D.R.; SILVA, P.C.M.; DIAS, N.S.; LIRA, D.L.C. Estudo da área de preservação permanente do rio Mossoró no sítio urbano de Mossoró-RN por meio de técnicas de geoprocessamento. **Revista Caatinga**, v.25, p.177-183, 2012.

ATANASIO, A.; BOOMKER, J.; SITOE, C. A survey on the occurrence of resistance to anthelmintics of gastrointestinal nematodes of goats in Mozambique. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 215–220, 2002.

ATHAYDE, A.C.R.; SILVA, A. M.A.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W.W. **Controle Parasitário por Plantas Medicinais**. In: UFCG; SEBRAE. (Org.). Manual de Alimentação e Controle Parasitário com Plantas Medicinais para a Caprinovinocultura. 1 ed. Patos: SEBRAE, v. 1, p. 37-42, 2005.

BACON, J.A.; ULRICH, R.G.; DAVIS, J.P.; THOMAS, E.M.; JOHNSON, S.S. et al. Comparative in vitro effects of closantel and selected B – ketoamide anthelmintics on a gastrointestinal nematode and vertebrate liver cells. **Journal Veterinary Pharmacology Therapie**, v. 21, p. 190-198, 1998.

BARRÈRE, V., ALVAREZ, L., SUAREZ, G., CEBALLOS, L., MORENO, L., LANUSSE, C., PRICHARD, R. K. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. v.186, p.344– 349, 2012.

BOERSEMA, J.H.; PANDEY, V.S. Anthelmintic resistance of *Trichostrongylus* in sheep in the Highveld of Zimbabwe. **Veterinary Parasitology**. v.68, p.383–388, 1997.

BRAASCH, D. A.; COREY, D. R. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. **Chemistry & Biology**, v.8, p.1–7, 2001.

BRASIL, B.S.A.F.; NUNES, R. L. A.; BASTIANETTO, E. B.; DRUMMONDA, M.G.; CARVALHO, D.C.; LEITE, R.C.; MOLENTO, M.B.; OLIVEIRA, D.A.A. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p.469–479, 2012.

BRITO, M.F.; PIMENTEL NETO, M.; MONTES, B.M.P. Aspectos Clínicos em caprinos infestados experimentalmente por *Oesophagostomum columbianum*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 18, p. 33-43, 1996.

BORGES, F.A.; ROSSINI, J.B.; VELLUDO, P.P.; BUZZULINI, C.; COSTA, G.H.; MOLENTO, M.B.; COSTA, A.J. Weak phenotypic reversion of ivermectina resistance in a field resistant isolate of *Haemonchus contortus* by verapamil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.731-736, 2011.

BORGES, D. G. N. ***In vitro* test with extract of plants collected in pantanal of Mato Grosso do Sul against *Haemonchus placei* (Nematoda:Trichostrongylidae).** 2014. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2014.

BRITO, D. R. B.; SANTOS, A. C. G.; TEIXEIRA, W. C.; GUERRA, R. M. S. N. C. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da Microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no estado do Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 32, p. 967-974, 2009.

CAMPBELL, W.C. Benzimidazole: veterinary use. **Parasitol Today**. v.6, p.130–133, 1990.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S.; NAVARRO, A. M. C. Anthelmintic activity of croton zehntneri and lippia sidoides essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 2/3, p. 288-94, 2007.

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

CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S.; FREITAS, A. R.; ARAÚJO, M. R. A.; ARAÚJO-FILHO, J. A.; ARAGUÃO, W. R.; NAVARRO, A. M. C. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 68-73, 2008.

CHARLES, T.P.; POMPEU, J.; MIRANDA D.B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematoda infections of goats. **Veterinary Parasitology**, v.34, p.71-75, 1989.

CHARTIER, C.; PORS, I.; HUBERT, J.; ROCHETEAU, D.; BENOIT, C.; BERNARD, N. Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in western France. **Small Ruminant Research**, v.29, p.33–41, 1998.

COELHO, W.A.C. **Resistência anti-helmíntica no município de Mossoró-RN**. 2009. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró-RN. 2009.

COELHO, W.A.C., AHID, S.M.M., FONSECA, Z.A.A.S., SILVA, I.P. Resistência anti-helmíntica em caprinos no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 589-599, 2010.

COLES, G.C.; BAUER, C., BORGSTEEDE, F.H.M., GEERTS, S., KLEI, T.R., TAYLOR, M.A., WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.

COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.E.; PRICHARD, R.K.; VON SAMSON-HIMMELS- TJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.A.; VERCROYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.167-85, 2006.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p.65-71, 2011.

COSTA, R. G.; ALMEIDA, C. C.; PIMENTA FILHO, E. C.; HOLANDA JUNIOR, E. V.; SANTOS, N. M. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região Semi- Árida do estado da Paraíba, Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v.57, n.218, p.195-205, 2008.

COSTA, A.J.; ARANTES, G.J; VASONCELOS, O.T.; BARBOSA, O.F.; MORAES, F.R. Espectro de ação do closantel, a 2,5 mg/kg, contra nematoides parasitos de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, n.1, p. 11-14, 1996.

CRAVEN, J.; BJORN, H.; BARNES, E. H.; HENRIKSEN, S. A.; NANSEN, P. Comparison of *in vitro* tests and faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. **Veterinary Parasitology**, v.85, n. 1, p.49-59, 1999.

CUDEKOVÁ, P.; VÁRADY, M.; DOLINSKÁ, M.; KONIGOVÁ, A. Phenotypic and genotypic characterisation of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.155–159, 2010.

CRUZ, D.G.; ROCHA, L.O.; ARRUDA, S.S.; PALIERAQUI, J.G.B.; CORDEIRO, R.C.; SANTOS JUNIOR, E.; MOLENTO, M.B.; SANTOS, C.P. Anthelmintic efficacy

and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.170, p. 340–343, 2010.

D'ASSONVILLE, J.A.; JANOVSky, E.; VERSTER, A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 73-80, 1996.

DEMELER, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERN, G.; SANGSTER, N.C. Measuring the effect of avermectins and milbemycins on somatic muscle contraction of adult *Haemonchus contortus* and on motility of *Ostertagia circumcincta* *in vitro*. **Parasitology** v. 141, p.948–956, 2014.

DEMELER, J. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.58-64, 2010.

DOUCH, P.G.C.; GAHAGAN, H.M. Metabolism of niclosamide and related compounds by *Moniezia expansa*. **Xenobiotica**, n. 7, p. 301-307, 1977.

DROGEMULLER, M.; SCHNIEDER, T.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Beta-tubulin complementary DNA sequence variations observed between cyathostomins from benzimidazole-susceptible and -resistant populations. **Journal of Parasitology**, v.90, p. 868–870, 2004.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYATT, Z. N. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p.1512-1518, 1964.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.62, p.199–206, 1996.

ELARD, L.; COMES, A. M.; HUMBERT, J. F. Sequences of beta-tubulin cDNA from benzimidazole susceptible and -resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.79, p. 249–253, 1996.

ELARD, L.; HUMBERT, J. F. Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. **Parasitology Research**, v.85, p. 452–456, 1999.

ELOFF, J. N.; MCGAW, L. J. Methods for Evaluating Efficacy of Ethnoveterinary Medicinal Plants. In: KATERERE, D. R.; LUSEBA, D. **Ethnoveterinary botanical medicine: herbal medicine for animal health**, 450p., 2010..

EL-SHERBINI, G. T. Anthelmintic activity of unripe *Mangifera indica* L. (Mango) against *Strongyloides stercoralis*. **International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine**. v. 1, n.4, p. 73-79, 2013.

EMBRAPA. **ABC da Agricultura Familiar: Criação de caprinos e ovinos**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2007. 98p.

FALBO, M.K. et al. Atividade anti-helmíntica do troclorfon e closantel naturalmente infectados por *Haemonchus* sp. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.3, p. 926-930, 2009.

FALZON, L.C.; MENZIES, P.I.; SHAKYA, K.P.; JONES-BITTON, A.; VANLEEUEWEN, J.; AVULA, J.; STEWART, H.; JANSEN, J.T.; TAYLOR, M.A.; LEARMOUNT, J.; PEREGRINE, A.S. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology** v.193, p.150–162, 2013.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 502p

FELLOWES, R. et al. Classical neurotransmitters in the ovijector of *Ascaris suum*: localization and modulation of muscle activity. **Parasitology**, v.121, p. 325-336, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, FAOSTAT – FAO Statistics Division/ProdSTAT: livestock (primary and processed) (2011). Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>> Acesso em: 01/11/2014

FORTES, F.S.; KLOSTER, F.S.; SCHAFER, A.S.; BIER, D.; BUZATTI, A.; YOSHITANI, U.Y.; MOLENTO, M.B. Evaluation of resistance in a selected field strain *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the larval migration on agar test. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p.183-187, 2013.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4ed. São Paulo: Ícone, 2004. 608p

GATONGI, P.M.; NJOROGI, J.M.; SCOTT, M.E.; RANJAN, S.; GATHUMA, J.M.; MUNYUA, W.K.; CHERUIYOT, H.; PRICHARD, R.K. Susceptibility to IVM in a field strain of *Haemonchus contortus* subjected to four treatments in a closed sheep-goat flock in kenya. **Veterinary Parasitology**. v.110, p.235-240, 2003.

GHISI, M.; KAMINSKY, R.; MASER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.144, p. 313–320, 2007.

GILL, J.H.; REDWIN, J.M.; VAN WYK, J.A.; LACEY, E. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*—effects of ivermectin resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 463–470, 1995.

GILLEARD J.S. Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics. **International Journal for Parasitology**, v.36, p.1227-1239, 2006.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Commonw Sci and Indust Organization**, v.12, p. 50-62, 1939.

GUIMARÃES, A.D.S.; GOUVEIA, A.M.G.; CARMO, F.B.; GOUVEIA, G.C.; SILVA, M.X.; VIEIRA, L.S.; MOLENTO, M.B. Management practices to control gastrointestinal parasites in dairy and beef goats in Minas Gerais; Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.176, p. 265-269, 2011.

GRIFFITHS, A J. F. et al. **Introdução a Genética**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 712p.

GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 47-64, 1996.

HAMMERSCHMIDT, J.; BIER, D.; FORTES, F. S.; WARZENSAKY, P.; BAINY, A. M.; MACEDO, A. A. S.; MOLENTO, M. B. Avaliação do sistema integrado de controle parasitário em uma criação semi-intensiva de caprinos na região de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 64, n. 4, p. 927-934, 2012.

HODGKINSON, J. E. et al. The role of polymorphisms at b-tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.1149–1160. 2008.

HOWELL, S. B.; BURKE, J. M.; MILLER, J. E. ; TERRILL, T. H.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; ZAJAC, A. M.; KAPLAN, R. M. Anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States, **Journal of the American Veterinary Medical Association** , n. 233, p.1913–1919, 2008.

HUMBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v. 130, p. 442-446, 1992.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal (Economia, Agropecuária, Produção Pecuária)**. Disponível em: < www.ibge.gov.br/> Acesso em: 15 de setembro de 2014.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, n. 186, p. 70–78, 2012.

KAPLAN, R.M.; VIDYASHANKAR, A.N.; HOWELL, S.B.; NEISS, J.M.; WILLIAMSON, L.H.; TERRILL, T.H. A novel approach for combining the use of *in vitro* and *in vivo* data to measure and detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats. **International Journal for Parasitology**. v.37, p.795-804, 2007.

KATIKI, L. M.; CHAGAS, A. C. S.; BIZZO, H. R.; FERREIRA, J. F. S.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 103-108, 2011.

KERBOEUF, D., BLACKHALL, W., KAMINSKY, R., SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.3, p.332-346, 2003.

KETTLE P. R.; VLASSOFF A.; REID T. C.; HORTON C. T. A survey of nematode control of measures used by milking goat farmers and of anthelmintic resistance on their farms. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 31, n. 8, p.139-143, 1983.

KEYYU, J.D.; MAHINGIKA, H.M.; MAQWISHA, H.B.; KASSUKU, A.A. Efficacy of albendazole and levamisole against gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Morogoro, Tanzania. **Tropical Animal Health and Production**. v.34, p.115–120, 2002.

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

KOTZE, A.C.; LE JAMBRE, L.F.; O'GRADY, J. A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with *Trichostrongylidae* parasites. **Veterinary Parasitology**. v.137, p. 294–305, 2006.

KOTZE, A. C.; COWLING, K.; BAGNALL, N. H.; HINES, B. M.; RUFFELL, A. P.; HUNT, P. W.; COLEMAN, G. T. Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v.2, p. 92–97, 2012.

KUMSA, B.; ABEBE, G. Multiple anthelmintic resistance on a goat farm in Hawassa (Southern Ethiopia). **Tropical Animal Health and Production** v.41, p.655–662, 2009.

KWA, M. S. G.; VEENSTRA, J. G.; ROOS, M. H. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation in b-tubulin isotype 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.63, p.299–303, 1994.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulina, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for Parasitology**, v.20, p.105-111, 1988.

LACEY, E.R. A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. In: Boray, J.C. (Ed.), **Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs**. New Jersey: MSD AGVET DIVISION-MERCK & CO, 1991. p. 177–184.

LANUSSE, C.E. **Farmacologia dos compostos anti-helmínticos**. In: CHARLES, T.P. Controle de nematoides gastrintestinais em ruminantes. Juiz de Fora : Terezinha Padilha, 1996. p.1-44.

LANUSSE, C.E.; ALVARES, L.I.; LIFSCHITZ, A.L. Princípios farmacológicos da terapia anti-helmíntica. In: CAVALTANTE, A.C.R.; VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M.B. (Org.). **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa, cap. 22, p. 549-595. 2009.

LEITE, E.R.; SIMPLICIO, A.A. Mercado e comercialização. Sobral: EMBRAPA, 2006. Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br> >. Acessado em 11 de setembro de 2014.

LIMA, M.M.; FARIAIS, M.P.O.; ROMEIRO, E.T.; FERREIRA, D.R.A.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M. A. G. Eficácia da moxidectina, ivermectina e albendazol contra helmintos gastrintestinais em propriedades de criação caprina e ovina no estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 94-100, 2010.

MAHARSHI, A. K., SWARNKAR, C. P., SINGH, D., MANOHAR. G. S., 2011. Correlation between Status of Benzimidazole Resistance in *Haemonchus Contortus* on Bio and Molecular Assays. **Indian Journal of Animal Science**, v.81, p.110–115, 2011.

MAINGI, N.; BJØRN, H.; DANGOLLA, A. The relationship between faecal egg count reduction and the lethal dose 50% in the egg hatch assay and larval development assay. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p.133–145, 1998.

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

MARTÍNEZ-VALLADARES et al. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. **Parasites & Vectors**. 6:2-9. 2013.

McMANUS, C.; LOUVANDINI, H.; VERDOLIN, V.; TORRES, S.; BRITO, D.; DE MELO, C. B.; SEIXAS, L. **Determinação de Endoparasitas na Pastagem e nos Animais na Pastagem e nos Animais**. 2010. Disponível em: <http://inctpecuaria.com.br/images/informacoes-tecnicas/serie_tecnica_endoparasitas_ovinos.pdf> Acesso em: 07 nov. 2014.

MELO, A.C.F.L.; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; VIEIRA, L.S.; ECHEVARRIA, F.A.M.; MEOL, L.M. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Cienc. Rural**. v.33, p.339-344, 2003.

MELO, A.C.F.L. **Caracterização ecológica de cepa do parasito *Haemonchus contortus* resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis**. 2005. 95f. Tese (Doutorado em ciências veterinárias). UECE, Fortaleza-CE, 2005.

MELO, A.C.F.L.; BEVILAQUA, C.M.L; REIS, I.F. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestino brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 294-300, 2009.

MELO, A. C. F. L. Nematodeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2003.

MELVILLE, L. A.; SYKES, A. M.; McCARTHY, J. S. The beta-tubulin genes of two *Strongyloides* species. **Experimental Parasitology**, v.112, p.144–151, 2006.

MOLENTO, M.B.; FORTES, F.S.; PONDELEK, D.A.S.; BORGES, F.A.; CHAGAS, A.C.C.; TORRES-ACOSTA, J.F.F.; GELDHOF, P. Challenges of nematode control

in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v.180, p. 126– 132, 2011.

MOLENTO, M.B. **Resistência parasitária**. In: CAVALTANTE, A.C.R.; VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M.B. (Org.). Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília: Embrapa, 2009. cap. 15, p.332.

MOLENTO, M.B. Resistência parasitária. In: CAVALTANTE, A.C.R.; VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M.B. (Org.). **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa, 2009. cap. 15, p.332.

MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R.K. Nematode control and the possible development of anthelmintic resistance. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, p.75-86, 1999.

MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R.K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.117-121, 2001.

MOLENTO, M.B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p. 82-86, 2004.

MOLENTO, M.B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1469-1477, 2005.

MORAES, F.R.; MORETTO, L.H.; BRESOLIN, W.S.; GABRIELLI, I.; KAUFER, L.; ZANCHET, I.K.; SONAGLIO, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do Alto Irani (Amai), Oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 559-565, 2007.

MORGAN-JONES, G.; RODRÍGUES-KÁBANA, R. **Infections events in the fungus nematode system**. In: POINAR O. G.; BORNE J. H. (Ed.) Diseases of nematodes. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 59-62.

MOTTIER, M. D.; PRICHARD, R. K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.18, p.129–140, 2008.

MOTTIER, L; LANUSSE, C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos anti-helmínticos. **Revue Médecine Veterinaire**, v.82, n.2, p.74-85, 2001.

NERY, P. S.; DUARTE, E. R.; MARTINS, E. R. Eficácia de plantas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 330-338, 2009.

NICIURA, S. C. M., VERÍSSIMO, C. J., GROMBONI, J. G. G., ROCHA, M. I.P., MELLO, S. S., BARBOSA, C.M.P.; CHIEBAO, D.P.; CARDOSO, D.; SILVA, G.S.; OTSUK, I. P.; PEREIRA, J. R.; AMBROSIO, L. A.; NARDON, R. F.; UENO, T.E.H.; MOLENTO, M. B. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance, **Veterinary Parasitology**. v.190, p.608-612, 2012.

NICIURA, S.C.M.; VERÍSSIMO, C.J.; MOLENTO, M.B. **Determinação da Eficácia Antihelmíntica em Rebanhos Ovinos: Metodologia da Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zossanitário**. São Paulo: EMBRAPA Pecuária Sudeste, 27p., 2009. (EMBRAPA. Documento 91).

O'GRADY, J.; KOTZE, A. C. *Haemonchus contortus*: in vitro drug screening assays with the adult life stage. **Experimental Parasitology**, v. 106, n. 3-4, p. 164-172. 2004.

OLIVEIRA, L. D. R. **Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes *in vitro* e *in vivo***. 2013. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2013.

OLIVEIRA-FILHO, R. D **Purificação parcial e Caracterização de Amostras Lectínicas de Folhas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken**. 2013. 42f. Monografia (Graduação em Biotecnologia), Universidade Federal Rural do Semi Árido, 2013.

PETERSEN, M.; WENGEL, J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p.74–81, 2003.

PRESIDENTE, P.J.A. Methods for the detection of resistance to anthelmintics. In: ANDERSON, N., WALLER, P.J. (Eds.) **Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs. Division of Animal Health**. Australia : CSIRO, 1985. p. 13–27.

PRICHARD, R. K. Biochemistry of anthelmintic resistance. Round Table Conf. In VII **Internacional Congress of Parasitology**, Paris, p. 141-146, 1990.

PRICHARD, R.K.; ROULET, A. ABC transporters and b-tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. **Parasitology Research**. v.134, p. 1123–1132, 2007.

RABEL, B.; MCGREGOR, R.; DOUCH, P.G. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. **International Journal for Parasitology**. v.24, p. 671-676, 1994.

- RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; AVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; DALAGNOLL, C. A.. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.34, p. 1889-1895, 2004.
- RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; SOUZA, A. P. Resistência de parasitas gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 473-777, 2002.
- RANGE, V.B. **Resistência de *Haemonchus placei* (PLACE, 1893), *Cooperia punctata* (VON LINSTOW, 1907) e *Oesophagostomum radiatum* (RUDOLPHI, 1803) às ivermectinas em bovinos, em propriedade rural de Minas Gerais.** – 2008. 76f. Tese (Doutor em Ciência Animal)- Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- RINALDI, L.; MORGON, E.R.; BOSCO, A.; COLES, G.C.; CRINGOLI, G. The maintenance of anthelmintic efficacy in sheep in a Mediterranean climate. **Veterinary Parasitology**, v.203, p.139–143, 2014.
- RIALCH, A.; STUTI, V.; RAJEEV, R.K. Detection of benzimidazole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats of sub-Himalyan region of northern India using different tests. **Veterinary Parasitology**.v.198, p. 312–318, 2013.
- ROBINSON, M.; TRUDGETT, A.; FAIRWEATHER, I.; MCFERRAN, N. Benzimidazole binding to *Haemonchus contortus* tubulin: a question of structure. **Trends Parasitology**, v.18, p. 153–154, 2002.
- ROBERTS, F.H.S.; O’SULLIVAN, J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Research**, v.1, p.99, 1950.
- RONAGHI, M.; KARAMOHAMED, S.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M; NYREN, P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Analytical Biochemistry**, v.242, p.84–89, 1996.
- RONAGHI, M.; UHLEN, M.; NYREN, P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v. 281, p. 363–365, 1998.
- ROOS, M. H. The role of drugs in the control of parasitic nematode infections: must we do without? **Parasitology**, v.13, p.137–114, 1997.
- ROTHWELL, J.T.; SANGSTER, N.C. An *in vitro* assay utilising parasitic larval *Haemonchus contortus* to detect resistance to closantel and other anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, v.23, n. 5, p. 573-578, 1993.

RUFENER, L.; KAMINSKY, R.; MASER, P. In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of α -tubulin. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.168, p.120–122, 2009.

SAEED, M.; IQBAL, Z.; JABBAR, A.; MASOOD, S.; BABAR, W.; SADDIQI, H.; YASEEN, M.; SARWAR, M.; ARSHAD, M. Multiple anthelmintic resistance and the possible contributory factors in beetal goats in an irrigated area (Pakistan). **Research in Veterinary Science**, v.88, p. 267–272, 2010.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V.; BLACKHALL W. Will technology provide solutions for drug resistance in veterinary helminths? **Veterinary Parasitology**. v. 132, n. 3-4, p. 223-39. 2005.

SANGSTER, N.; BATTERHAM, P.; CHAPMAN, H. D.; DURAISINGH, M.; LE JAMBRE, L.; SHIRLEY, M.; UPCROFT, J.; UPCROFT, P. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. **Int J Parasitol**. 32: 637- 653, 2002.

SANTOS, R.L. dos. **Diagnóstico da cadeia produtiva da caprinocultura de corte no Estado da Bahia**. 2001. 40 p. Monografia (Especialização em Administração em Agribusiness) – Faculdade São Francisco de Barreiras, Barreiras, 2001.

SANTOS, J.M.L.; MONTEIRO, J.P.; RIBEIRO, W.L.C.; MACEDO, I.T.F.; CAMUÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIERIA, L.S.; BEVILAQUA, C.M.L. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**. 199: 160–164. 2014.

SANTIAGO, M.A.M., COSTA, U.C. Resistencia de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriforme* e *Ostertagia* spp. ao levamisol. *Ciência Rural*, v.9, p.315-318, 1979.

SCHWAB, A. E., BOAKYE, D. A., KYELEM, D.; PRICHARD, R. K. Detection of benzimidazole resistance-associated mutations in the filarial nematode *Wuchereria bancrofti* and evidence for selection by albendazole and ivermectin combination treatment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, p.234–238, 2005.

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

- SILVESTRE, A.; HUMBERT, J. F. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. **Experimental Parasitology**, v. 95, p.271–276, 2000.
- SOTOMAIOR, C. S.; MORAES, F. R.; SOUZA, F. P.; MILCZESKI, V.; PASQUALIN, C. A. **Parasitoses gastrintestinais de ovinos e caprinos: alternativas de controle**. Curitiba: Instituto Emater, 2009. 38p.
- SOUZA, M. L.; CEOLIN, A. C.; ABICHT, A. M. **Caracterização do estado atual da caprinocultura no Nordeste do Brasil e em Pernambuco**. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural – VIII SOBER Nordeste. 2013.
- SPRENGER, L. K. **Utilização de extrato de artemisia annua no controle de eimeria em aves e nematódeos gastrintestinais em caprinos**. 2013. 165f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, 2013
- TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.183-194, 2002.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary parasitology**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 2007. 874 p
- THEODORIDES V. J.; SCOTT G. C.; LADERMAN M. Efficacy of parbendazole against gastrointestinal nematodes in goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 31, n. 5, p. 857-863, 1970.
- TERRIL, T.H. Anthelmintic resistance on goat farms in Georgia: efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in two selected goat herds. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n.4, p. 261-268, 2001.
- THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; SILVA, M. C. P. Resistance of Gastrointestinal Nematodes to Anthelmintics in Sheep (*Ovis aries*). **Brasilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.1, p.41-47, 2004.
- TIWARI, J., KUMAR, S., KOLTE, A.P., SWARNKAR, C.P., SINGH, D., PATHAK, K.M., 2006. Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. **Veterinary Parasitology**, 138, 301–307.
- TORRES-ACOSTA, J.F.J.; DZUL-CANCHE, U.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; RODRÍGUEZ- VIVAS, R.I. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatan, Mexico. **Veterinary Parasitology**. v.114, p. 33–42, 2003.

TYDÉN, E.; DAHLBERG, J.; KARLBERG, O.; HOGLUND, J. Deep amplicon sequencing of preselected isolates of *Parascaris equorum* in β -tubulin codons associated with benzimidazole resistance in other nematodes. **Parasites & Vectors**, v.7, n.410, p.1-8, 2014.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokio: Japan International Cooperation, 1998. 143p.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J.A.M. Primer3plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v.35, p.71-74, 2007.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 273 p.

URQUHART, G.M. ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**, 2a ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan: 1998, 292p.

VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; BATH, G.F. **Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa – what are the options?** In: WORKSHOP OF MANAGING ANTHELMINTIC RESISTANCE IN ENDOPARASITES, 1997, Sun City, South Africa. Proceedings... Sun City, 1997. p.51-63.

VASCONCELOS, A.L.C.F. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematoides gastrintestinais de ovinos**. 2006. 83f.(Doutorado em Ciências Veterinárias). UECE, Fortaleza, 2006.

VERÍSSIMO, C.J.; NICIURA, S.C.M.; ALBERTI, A.L.L.; RODRIGUES, C.F.C.; BARBOSA, C.M.P.; CHIEBAO, D.P.; CARDOSO, D.; SILVA, G.S.; PEREIRA JR; MARGATHO, L.F.F.; COSTA, R.L.D.; NARDON, R.F.; UENO, T.E.H.; CURCI, V.C.L.M.; MOLENTO, M.B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state. Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.187, p. 209–216, 2012.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. et al. TaqMan minor groove binder real-time PCR analysis of beta-tubulin codon 200 polymorphism in small *Strongyles* (*Cyathostomin*) indicates that the TAC allele is only moderately selected in benzimidazole-resistant populations. **Parasitology**, v.127, p.489–496, 2003.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; BLACKHALL, W. Will technology provide solutions for drug resistance in veterinary helminths?. **Veterinary Parasitology**, v. 132, p. 223-39, 2005.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; BLACKHALL, W. J.; MCCARTHY, J. S.; SKUCE, P. J. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. **Parasitology**, v.134, p.1077–1086, 2007.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; WALSH, T.K.; DONNAN, A.A.; CARRIE, S.; JACKSON, F.; SKUCE, P. J.; ROHN, K.; WOLSTENHOLME, A. J. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. **Parasitology**, v. 136, p. 349–358. 2009.

VIEIRA, P. A. F. **Caracterização dos resíduos de manga (*Mangifera indica* L.) e efeitos sobre o desempenho e os parâmetros bioquímicos em frangos de corte.** 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

VIEIRA, L. S. **Atividade ovicida *in vitro* e *in vivo* dos benzimidazóis; oxfendazole, fenbendazole, albendazole e thiabendazole em nematódeos gastrintestinais de caprinos.** 1986. 115f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1986.

VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R. Resistência antihelmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará., **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, p.99-103, 1999.

VIEIRA, L. S.; LÔBO, R. N. B.; CAVALCANTE, A. C. R.; NAVARRO, A. M. C.; BENVENUTI, C. L.; NEVES, M. R. M., ZAROS, L. G. **Panorama do controle de endoparasitoses em pequenos ruminantes.** Sobral: EMBRAPA-CNPC, 37p, 2010 (EMBRAPA-CNPC. Documento 48).

VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M.B. Nematóides gastrintestinais e pulmonares de caprinos. In: CAVALCANTE, A.C.R.; VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M.B. (Org.). **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle.** Brasília: Embrapa, 2009. cap. 2, p. 78.

WAGLAND, B.M.; JONES, W.O.; HRIBAR, L.; BENDIXSEN, T.; EMERY, D.L. A new simplified assay for larval migration inhibition, v.22, p.1183-1185, 1992.

WALLER, P.J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: general overview. **Veterinary Parasitology**. v.62, p.181–187, 1996.

WALSH, T. K.; DONNAN, A. A.; JACKSON, F.; SKUCE, P.; WOLSTENHOLME, A. J. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus*

contortus using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. **Veterinary Parasitology**, v.144, p. 304–312, 2007.

WHITLOCK, H.V. et al. *In vitro* screening for anthelmintic resistance in *Strongyles* of sheep and horses. **Veterinary Parasitology**. v.7, p.215–232, 1980.

WOOD, I.B. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**. 58, 181–213, 1995.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet**, v. 4, p.337-348, 2004.

YOSHIHARA, E. Uso de Fontes de Taninos Condensados no Controle de Nematódeos Gastrointestinais de Ovinos. *Pesquisa & Tecnologia*, São Paulo, v. 8, n. 2, p.1-5, 2011

APÊNDICE

APÊNDICE A – Questionário aplicado aos produtores rurais criadores de caprinos da região do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil.

1. Identificação		
Proprietário:		
Endereço:		Localidade:
Proprietário reside na fazenda?		
Área (ha):		Telefone de contato:
A propriedade é cercada?		
2. Total de caprinos:		
Raça:		
Reprodutores	Matrizes	Jovens (Não precisa separar por sexo)
Cria ovinos? Se sim qual o total de animais?	Cria bovinos? Se sim qual o total de animais?	Cria outras espécies animais na propriedade? Quais?
3. Manejo		
Tipo de criação		
Extensiva () Intensiva () Semi –intensiva ()		
Finalidade		
Carne () Leite () Mista ()		
Utiliza quarentena de recém-chegados?		Vermifuga animais recém-chegados?

Separa jovens de adultos?		
Uso vermífugo?	Como calcula a dose?	
Vermifuga em qual horário?		
Após a vermifugação os animais ficam presos?		
Quais os vermífugos utilizados nos últimos anos?		
Vermifuga quantas vezes por ano? Em que época ou em quais meses (periodicidade)?		
Vermifuga com base em que?		
Calendário pré-fixado () Mortalidades, Sintomas, Perdas produtivas()		
FAMACHA () Outro método () Qual?		
Troca o vermífugo anualmente?		
Faz descanso de pastagem? Por quanto tempo?		
Lembra quando fez a última vermifugação e qual o vermífugo que foi utilizado?		
Trocas de pasto após vermifugação?		
Usa vermífugo alternativo?		
Não () Sim () Qual? Fitoterápico?() Homeopático?()		
Possui esterqueira?		
Sim () Não (), onde coloca as fezes?		
Frequência de limpeza do aprisco?		
Possui aprisco com piso ripado suspenso?		
Presença de assistência técnica ao rebanho caprino?		Com que frequência?
Quais as doenças mais frequentes nos últimos anos?		

Alimentação:		
Constituída apenas a base de pasto?		Usa concentrados?
Nos últimos anos a eficácia do vermífugo tem:		
Melhorado ()	Piorado ()	Permanecido ()
Nº de tratamentos/ano:		