Efeito da suplementação com zinco na expressão do gene PgP-10 em *Haemonchus contortus*

Palavras-Chave: Resistência, nematoide, expressão gênica.

Autores(as):

Rillary Moscardine Schuindt (Bolsista)-IZ ;

Bruna Gonçalves Santos (Mestranda), Cnpq- CENA/USP;

Rodrigo Giglioti (Pesquisador)- IZ;

Prof(ª). Dr(ª). Luciana Morita Katiki (orientadora)- IZ.

INTRODUÇÃO:

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

O zinco é um micromineral essencial, com papel importante no sistema imunológico. Sua deficiência em ruminantes está associada à redução da ingestão alimentar,conversão alimentar, crescimento comprometido, alterações ósseas e imunossupressão (Fernandes, 2005; Cruz *et al*., 2011). O zinco desempenha um papel importante na defesa do organismo, influenciando na proliferação e maturação das células de defesa, sendo assim, os indivíduos que possuem deficiência de zinco acabam sendo mais suscetíveis a infecções (Fernandes, 2005).

A resistência aos anti-helmínticos é uma preocupação crescente, agravada pelo uso intensivo e frequente desses medicamentos. Dentre os principais mecanismos envolvidos, destaca-se a superexpressão de glicoproteínas-P (PgPs), transportadores de efluxo celular que atuam na eliminação de compostos tóxicos, incluindo fármacos (Molento *et al*., 2004; Jin *et al*., 2012). Essas proteínas utilizam a energia da hidrólise de ATP para bombear substratos para fora da célula, contribuindo para a diminuição da eficácia dos tratamentos.

Existem várias isoformas de glicoproteína P, sendo elas classificadas em classes I, II e III. As classes I e II são referentes à resistência a múltiplas drogas, a classe III está relacionada ao transporte de fosfolipídios (Van Helvoort *et al*. 1996; Dey 2006).

Dessa forma, as PgPs usam a energia de hidrólise do ATP para bombear o substrato através da membrana (Jin *et al*., 2012). A presença de PgP foi observada em todas as fases de vida de *H. contortus*, desde ovos até parasitas adultos (Kerboeuf *et al*., 2003). De acordo com Riou et al. (2005) a PgP também foi verificada na cutícula de larvas de primeiro e terceiro(L1-L3) estágios, com essa presença de PgP constitui um mecanismo protetor bioquímico durante todo o desenvolvimento do parasita.

Estudos sugerem que a expressão da PgP-10 se destaca em maior expressão nos estágios larvais, especialmente no L4, em isolados resistentes de *H. contortus*. No entanto, sua participação na resistência anti-helmíntica em vermes adultos pode ser limitada, e seu papel pode ser mais relevante em fases do ciclo de vida com menor atividade metabólica, como nas larvas e estágios iniciais, nas quais a eficácia dos fármacos tende a ser reduzida (Reyes-Guerrero *et al*., 2020; Rodrigues *et al*., 2024).

Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a expressão e interação do gene PgP-10 em *H. contortus* provenientes de ovinos submetidos a diferentes formas de tratamento (Zn-Micro, Zn-NP e grupo Placebo) e analisar as interações entre eles, buscando compreender os possíveis efeitos do mineral sobre a resistência anti-helmíntica.

METODOLOGIA:

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

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

Eutanásia: Os animais foram eutanasiados com procedimentos aceitos CEUA CENA-USP 001-2021(insensibilização com pistola de dardo cativo e posteriormente sangria) para coleta de parasitas na região do abomaso.

Coleta de adultos de *H. contortus*: No momento do abate, aproximadamente 10 fêmeas de *H. contortus* contidos no abomaso de cada animal foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração do RNA total, de acordo com Aboshady et al. (2019).

Extração do RNA: Foram adicionados TRI Reagent® em amostras de aproximadamente 10 fêmeas adultas de *H. contortus* por animal, divididos em três tratamentos: Placebo, Zn-Micro e Zn-NP utilizando TRI Reagent® e lise com TissueRuptor. Após extração com 1-bromo-3-cloropropano, isopropanol e lavagens com etanol, o RNA foi

ressuspenso em água ultrapura. A pureza foi avaliada por BioDrop e gel de agarose. As amostras de RNA foram tratadas com DNase livre de RNase RQ1.

PCR e sequenciamento de cDNA: As sequências iniciadoras para o ensaio de PCR e para o sequenciamento de cDNA foram baseadas na sequência que flanqueiam os genes da PgP que produz cerca de 770 pares de bases utilizando PrimerQuest e avaliados por NetPrimer, OligoAnalyzer, BLAST e Primer-Blast. O cDNA de fêmeas adultas de *H. contortus* foi amplificado por PCR, seguido de eletroforese em gel de agarose e purificação com kit PureLink®. O sequenciamento foi feito com BigDye Terminator v3.1 e analisado no ABI Prism 3730XL. As sequências foram alinhadas no CLUSTAL/W' e comparadas via GenBank e BLAST.

Análise da expressão gênica: Os genes Fosfoglicose isomerase (PGI), Ácido graxo e proteína de ligação ao retinol (FAR), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Actina (ACTIN) e 18S ribossômico (18S) foram testados como referência. Foram utilizadas três ferramentas distintas: geNorm, NormFinder e BestKeeper. Além disso, uma classificação final de gene mais estável foi avaliada através da ferramenta RankAggregated. As reações de RT-qPCR foram realizadas no CFX96 (BioRad), utilizando QuantiNova SYBR® Green, primers, água ultrapura e cDNA. A termociclagem incluiu 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos, com análise de temperatura de fusão ao final.

Análise estatística: A CL50 foi determinada no SAS Probit após transformação logarítmica das doses. A expressão gênica foi analisada por modelo misto descrito por Steibel et al. (2009), considerando os efeitos dos tratamentos, variações entre amostras e erro residual. O modelo foi ajustado no SAS (SAS Institute, Cary, NC). As comparações entre tratamentos foram feitas por contrastes, avaliando diferenças na expressão do gene PgP-10 entre os grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Em relação à expressão gênica, não foram observadas diferenças significativas para o gene PgP-10 entre os grupos. A Tabela 1 apresenta os resultados da análise estatística comparativa entre os tratamentos: Zn Micro vs Placebo, Zn Nano vs Micro, Zn Nano vs Placebo e Zinco vs Placebo. Observa-se que, independentemente da forma de suplementação com o mineral, não houve expressão da PgP-10 demonstrando que não há resposta diferencial frente aos tratamentos propostos para essa PgP.

Tabela 1- Valores de obtidos na comparação da expressão gênica da Glicoproteína-P 10 (PgP) de *Haemonchus contortus* entre os tratamentos.

Gene	Zn Micro vs Placebo	Zn nano vs Micro	Zn Nano vs Placebo	Zinco vs Placebo
PgP-10	0,0575	0,2353	0,4256	0,0844

As nanopartículas de zinco possuem potencial para expressar propriedades antiparasitárias. Morsy et al. (2019) relataram efeitos de nanopartículas de ZnO no nematóide *Parascaris equorum*, incluindo danos à cutícula.

Em estudo com *Haemonchus contortus*, concentrações de 1 a 16 ppm mostraram, em baixas doses, aumento da atividade antioxidante (SOD, CAT e GSH-Px), e em doses altas, perda de motilidade, mortalidade e supressão desses mecanismos, além de danos ao DNA (Esmaeilnejad *et al.*, 2018; Do Carmo Neto *et al*., 2022). A eficácia das nanoparticulas de ZnO pode ser reduzida se os sistemas antioxidantes não forem inibidos, possibilitando resistência.

O genoma de *H. contortus* já foi integralmente sequenciado, e ao menos 10 genes ABC transportadores foram identificados (Laing *et al*., 2013). A glicoproteína-P (PgP), um desses transportadores, está associada à resistência por promover o efluxo de substâncias tóxicas. Estudos apontam aumento na expressão da PgP frente à IVM (Pacheco *et al*., 2022; Giglioti *et al*., 2022), o que dificulta a ação dos fármacos. Alterações nos genes da PgP reduzem a concentração do composto no alvo, favorecendo a resistência anti-helmíntica (Reyes-Guerrero *et al*., 2020; Katiki *et al*., 2023).

Em um isolado multirresistente Wallangra (benzimidazol, levamisol, ivermectina e moxidectina), a PgP-10 apresentou expressão mais de 100 vezes maior em larvas L4 quando comparado ao isolado suscetível Kirby, indicando forte associação com a resistência à ivermectina nesse estágio (Raza *et al*., 2016; Reyes-Guerrero *et al.*, 2020; Jakobs *et al*., 2024). Expressão aumentada também foi detectada em larvas L1, L3 e adultos de isolados resistentes (Reyes-Guerrero *et al*., 2020; Giglioti *et al*., 2022), sugerindo que PgP-10 atua de forma contínua ao longo do ciclo. Esses resultados reforçam a complexidade envolvida na regulação de genes de resistência e indicam a necessidade de investigações adicionais, considerando ainda as diferentes formas de exposição ao zinco e outras fases do ciclo parasitário. Embora na literatura aponte PgP-10 como um marcador importante na resistência, os achados deste estudo sugerem que a suplementação com zinco, nas condições avaliadas, não foi capaz de modular significativamente a expressão desse gene em *H. contortus*.

CONCLUSÕES:

A ausência de diferença significativa na expressão do gene PgP-10 entre o grupo placebo e os tratamentos com Zn-Micro e Zn-NP sugere que a suplementação com zinco, nas formas e concentrações utilizadas, não influencia a resistência anti-helmíntica associada à PgP-10 em fêmeas adultas de cepa sensível de *H. contortus.*

BIBLIOGRAFIA

ABOSHADY, Hadeer., et al. Transcriptome variation in response to gastrointestinal nematode infection in goats. **PLoS One**, Petit Bourg, v.14, p.e0218719, 2019.

AMARANTE, Alessandro, et al. Os parasitas de ovinos. **Fundação Editora da UNESP,** Botucatu, p. 266, 2014.

ANDERSEN, Claus., et al. Normalization of real-time quantitative reverse transcriptionPCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v.64, p.5245-5250, 2004.

CRUZ, Josilaine. Uma revisão sobre o zinco. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Campo Grande, v.15, p.207-222, 2011.

DEY, Surajit. Single nucleotide polymorphisms in human P-glycoprotein: its impact on drug delivery and disposition. **Expert Opin Drug Deliv,** v. 3, p. 23-35, 2006.

DO CARMO NETO, José., et al. Antiprotozoal and anthelmintic activity of zinc oxide nanoparticles. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 2127-2141, 2022.

ESMAEILNEJAD, Bijan., et al. Assessment of oxidative/nitrosative stress biomarkers and DNA damage in *Haemonchus contortus,* following exposure to zinc oxide nanoparticles. **Acta parasitologica**, Urmia, v. 63, p. 563-571, 2018.

FERNANDES, Alicia. Zinco e câncer: uma revisão. **Revista Saúde. Com**, Rio de Janeiro, v.1, p.144-156, 2005.

GIGLIOTI, Rodrigo., et al. Potential of *Haemonchus contortus* first-stage larvae to characterize anthelmintic resistance through P-glycoprotein gene expression. **Small Ruminant Research**, Nova Odessa, v. 217, p. 106864, 2022.

JAKOBS, Natalie., et al. Differences in constitutive gene expression of cytochrome P450 enzymes and ATP-binding cassette transporter gene expression between a susceptible and a highly macrocyclic lactone-resistant *Haemonchus contortus* isolate in the absence of drug-inducible expression. **Parasites & vectors**, Berlim, v. 17, p. 505, 2024.

JIN, Heung., et al. Sulodexide prevents peripheral nerve damage in streptozotocin induced diabetic rats. **European journal of pharmacology**, Coreia do Sul, v.674, p.217-226, 2012.

KATIKI, Luciana M. **Atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* de compostos fitoquímicos para o controle de nematoides gastrintestinais de ovinos**. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p.135, 2011.

KATIKI, Luciana M., et al. Combined effects of Limonene and Ivermectin on P-glycoprotein-9 gene expression of lambs Infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, Nova Odessa, v. 324, p. 110069, 2023.

KERBOEUF, Dominique., et al. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Hannover, v.22, p.332-346, 2003.

LAING, Roz., et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. **Genome biology**,Glasgow, v. 14, p. R88, 2013.

MOLENTO, Marcelo., et al. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.1139-1145, 2004.

MORSY, Kareem., et al. Optimizing and evaluating the antihelminthic activity of the biocompatible zinc oxide nanoparticles against the ascaridid nematode, *Parascaris equorum in vitro*. **Acta Parasitologica**,Gizé, v. 64, p. 873-886, 2019.

PACHECO, Poliana Araújo., et al. Phytochemical modulation of P-Glycoprotein and its gene expression in an ivermectin-resistant *Haemonchus contortus* isolate *in vitro*. **Veterinary parasitology**, Piracicaba, v. 305, p. 109713, 2022.

RAZA, Ali et al. Effects of *in vitro* exposure to ivermectin and levamisole on the expression patterns of ABC transporters in *Haemonchus contortus* larvae. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Brisbane, v. 6, p. 103-115, 2016.

REYES-GUERRERO, David., et al. Comparative study of transcription profiles of the P- glycoprotein transporters of two *Haemonchus contortus* isolates: Susceptible and resistant to ivermectin. **Molecular and biochemical parasitology**, México, v.238,p.111281, 2020.

RIOU, Michael., et al. Immunolocalisation of an ABC transporter, P-glycoprotein, in the eggshells and cuticles of free-living and parasitic stages of *Haemonchus contortus.* **Parasitol Res,** Nouzilly, v.96, p.142–148, 2005.

ROBERTO, Francisca Fernanda da Silva., et al. Nematoides gastrintestinais na ovinocultura de corte sob regime de pastejo. **Pubvet**, Rio Grande do Norte, v. 12, p. 147, 2018.

RODRIGUES, Janaelia., et al. Expression of transporter genes in anthelmintic resistant isolates of *Haemonchus contortus.* **Genetics and Molecular Biology**, Sobral, v. 47, n. 3, p. e20230350, 2024.

STEIBEL, Juan., et al. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, Lansing, v.94, p.146-152, 2009.

VAN HELVOORT, Ardy., et al. MDR1 Pglycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. **Cell**, Amsterdã, v.87, p. 507-517, 1996.