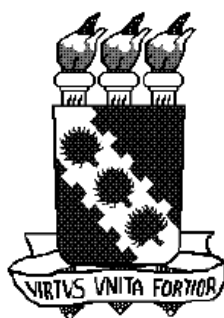


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E RESPOSTA IMUNE DE CAPRINOS
NATURALMENTE INFECTADOS POR NEMATÓIDES GASTRINTestinais**

MARIA ROSALBA MOREIRA DAS NEVES

**FORTALEZA - CE
OUTUBRO/2014**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E RESPOSTA IMUNE DE CAPRINOS
NATURALMENTE INFECTADOS POR NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS**

MARIA ROSALBA MOREIRA DAS NEVES

Zootecnista

FORTALEZA - CE

OUTUBRO/2014

MARIA ROSALBA MOREIRA DAS NEVES

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E RESPOSTA IMUNE DE
CAPRINOS NATURALMENTE INFECTADOS POR NEMATÓIDES
GASTRINTESTINAIS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Nonato Braga Lôbo

Co-Orientador: Dr. Jomar Patrício Monteiro

FORTALEZA - CE

OUTUBRO/2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- N425c Neves, Maria Rosalba Moreira das.
 Caracterização fenotípica e resposta imune de caprinos naturalmente infectados por nematoides
 gastrointestinais / Maria Rosalba Moreira das Neves. – 2014.
 79 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,
 Departamento de Zootecnia, Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Produção Animal.
 Orientação: Prof. Dr. Raimundo Nonato Braga Lôbo.
 Coorientação: Dr. Jomar Patrício Monteiro.
1. Citocinas. 2. Parasitologia veterinária. 3. Zootecnia. I. Título.

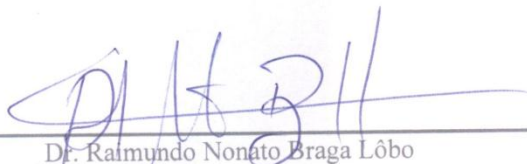
CDD 636.08

MARIA ROSALBA MOREIRA DAS NEVES

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E RESPOSTA IMUNE DE
CAPRINOS NATURALMENTE INFECTADOS POR NEMATÓIDES
GASTRINTESTINAIS**

Tese defendida e aprovada pela comissão examinadora em 31 de outubro de 2014.

Banca examinadora:



Dr. Raimundo Nonato Braga Lôbo

Embrapa Caprinos e Ovinos/Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia-PDIZ
(UFC/UFRPE/UFPB)



Dra. Lillian Giotto Zaros

Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)



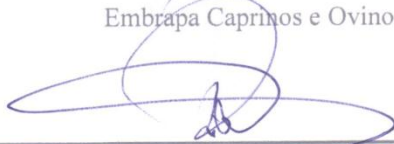
Dra. Lúcia Helena Sider

Embrapa Caprinos e Ovinos



Dr. Marcel Teixeira

Embrapa Caprinos e Ovinos



Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro

Embrapa Caprinos e Ovinos

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA ROSALBA MOREIRA DAS NEVES – Nasceu na cidade de Ubajara, Estado do Ceará no dia 01 de fevereiro de 1981. Recebeu o título de Licenciatura em Pedagogia (2002) e Bacharel em Zootecnia (2007), pela Universidade Estadual Vale do Acaraú. Mestre em Zootecnia na área de Produção Animal, pela Universidade Estadual Vale do Acaraú (2010). Doutoranda em Zootecnia na área de Produção Animal no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia pela Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal Rural do Pernambuco - UFC/UFRPE/UFPB. Possui experiência em docência (fundamental e superior) e na produção animal com ênfase em doenças parasitárias de pequenos ruminantes. Atuando principalmente no diagnóstico de infecções gastrintestinais e utilização de marcadores fenotípicos (parasitológicos, hematológicos e produtivos) para caracterização de animais com diferentes níveis de resistência às infecções parasitárias. Atualmente exerce atividades com biologia molecular na área da parasitologia.

Tudo o que acontece tem um significado.

*Compreenda: sempre que um ciclo se fecha,
outro se abre; ou seja, os obstáculos são portais
para fazer de cada dificuldade a entrada de uma
nova possibilidade.*

(Coen Sensei)

DEDICO

Aos meus pais, Maria Moreira e Domingos Prado (*in memorium*), alicerce e porto seguro, sempre presentes em todos os momentos de minha vida. Do campo tiraram o sustento e dessa união formou os filhos em homens e mulheres de caráter e personalidade. Não tenho palavras para descrever o meu AMOR e GRATIDÃO.

Aos meus irmãos Socorro, Geovânio, Sônia, Evandro e Ernando Prado, por todo o apoio, amor, preocupação e acima de tudo, união sempre.

Ao meu esposo Humberto de Queiroz Memória, pela compreensão, amor e carinho nos momentos difíceis - GRANDE COMPANHEIRO.

Aos meus queridos sogros (*in memorium*) Fernanda Bessa e Francisco José Caminha Memória, mesmos ausentes sempre estarão comigo em meus pensamentos - SAUDADES ETERNA!

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora de Fátima, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia (PDIZ), pela oportunidade oferecida para a realização deste doutorado. Obrigada pelo enriquecimento pessoal e profissional!

Ao Programa de Orientação e Operacionalização da Pós-Graduação Articulada à Graduação - PROPAG, pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de estudo.

À Embrapa Caprinos e Ovinos, por esses dez anos de trabalho; grande contribuidora para o meu enriquecimento profissional. Obrigada pelo fornecimento das instalações e equipamentos para a execução dos trabalhos de RT-qPCR.

Ao Prof. Dr. Raimundo Nonato Braga Lôbo, pela orientação, conselhos, sábias palavras e apoio nos momentos difíceis.

Ao Dr. Jomar Patrício Monteiro, pela co-orientação, ensinamentos, conversas, conselhos, risadas, broncas, pois foram fundamentais para o meu amadurecimento e aprendizado. Sempre com uma solução simples para os meus problemas que pareciam ser gigantes.

A Dra. Lilian Giotto Zaros, pelo treinamento para a montagem e leitura das lâminas histológicas, apoio financeiro e disponibilidade do laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Norte para a execução da contagem das células de defesa - “Um exemplo como pessoa e pesquisadora”.

Ao Prof. Dr. Luiz da Silva Vieira por acreditar na minha capacidade, pelos conhecimentos adquiridos e apoio financeiro. Responsável pela minha paixão parasitológica. MUITO OBRIGADA!

Ao Dr. Alessandro Francisco Talamini Amarante, por ter disponibilizado o laboratório do Instituto de Biociências (IBB) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu-SP, para a realização dos exames imunológicos.

Aos pesquisadores da Embrapa Caprinos e Ovinos, Raimundo Nonato Braga Lôbo, Luiz da Silva Vieira, Jomar Patrício Monteiro, Lúcia Helena Sider e Ana Maria Bezerra

Oliveira Lôbo, pela participação em minha banca de qualificação, grata pela colaboração de todos.

Aos animais experimentais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

Aos pesquisadores Raymundo Rizaldo Pinheiro e Francisco Selmo Fernandes Alves, por terem aberto as portas da Embrapa Caprinos e Ovinos.

Aos professores do PDIZ pelos ensinamentos transmitidos, meu carinho especial.

A secretária da coordenação do PDIZ, Francisca, pelos esclarecimentos e paciência.

A Roberta Lomonte pela amizade, disponibilidade e ajuda sempre.

A minha conterrânea e colega de Embrapa, Kelma Costa; estamos quase nos “aposentando na Embrapa”. Obrigada pelo ombro amigo.

Aos laboratoristas da Embrapa, Osmarilda, Nóbrega, Jamile, João Ricardo, Helena e Felipão, pelos momentos de descontração durante os cafezinhos, risadas, fofocas, enfim, pela amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XV
RESUMO GERAL.....	XVII
GENERAL ABSTRACT.....	XVIII
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Nematoides gastrintestinais.....	3
2.1.1. <i>Haemonchus contortus</i>	3
2.1.2. <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	4
2.2. Componentes do sistema imune em infecções por nematoides gastrintestinais.....	4
2.2.1. Células sentinelas.....	4
2.2.2. Imunoglobulinas (Igs).....	5
2.2.3. Leucócitos B e T.....	6
2.3. Citocinas.....	8
2.3.1. Interleucina 2 (IL-2).....	9
2.3.2. Interleucina 4 (IL-4).....	9
2.3.3. Interleucina 5 (IL-5).....	10
2.3.4. Interleucina 10 (IL-10).....	10
2.3.5. Interleucina 12 (IL-12).....	11
2.3.6. Interleucina 13 (IL-13).....	12
2.3.7. Interferon gama (IFN- γ).....	12
2.3.8. Quimiocinas.....	13
2.3.8.1. Interleucina 8(IL-8).....	13
2.3.8.2. Proteína quimioatraente de monócitos 1 e 2 (MCP-1 e MCP-2).....	13
2.4. Utilização da q-PCR na expressão de citocinas.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Comitê de ética.....	15
3.2. Manejo sanitário e nutricional dos animais.....	15

3.3. Caracterização parasitológica.....	15
3.3.1. Exames coproparasitológicos.....	17
3.3.2. Exames hematológicos.....	18
3.3.3. Escore Famacha.....	18
3.3.4. Contagem de nematoides gastrintestinais.....	18
3.4. Caracterização imunológica.....	19
3.4.1. Determinação dos níveis de imunoglobulinas.....	19
3.4.2. Exames histológicos.....	20
3.4.3. Expressão gênica.....	20
3.4.3.1. Extração de RNA.....	20
3.4.3.2. Quantificação do RNA.....	21
3.4.3.3. Escolha dos genes.....	22
3.4.3.4. Delineamento dos primers.....	23
3.4.3.5. Extração de DNA.....	24
3.4.3.6. RT-qPCR.....	25
3.4.3.7. Genes constitutivos.....	26
3.5. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Caracterização parasitológica.....	28
4.2. Contagem de nematoides gastrintestinais.....	37
4.3. Caracterização imunológica.....	37
4.3.1. Determinação dos níveis de imunoglobulinas.....	37
4.3.2. Análises histológicas.....	41
4.3.3. Expressão gênica.....	42
4.3.3.1. Quantificação do RNA.....	42
4.3.3.2. RT-qPCR.....	43
4.3.3.2.1. Eficiência da amplificação.....	43
4.3.3.2.2. Especificidade dos primers.....	47
4.3.3.2.3. Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro do abomaso de caprinos mestiços resistentes e susceptíveis as parasitoses gastrintestinais.....	48
5. CONCLUSÕES.....	50

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES.....	61

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Resultados da análise BLAST das sequências iniciais encontradas no GenBank contra o genoma caprino. As colunas representam: genes estudados, sequências usadas para as buscas, espécies a que pertencem essas sequências, valores do score e do e-value resultantes do BLAST, localização cromossômica (Chr) e as sequências finais obtidas do genoma caprino.....	22
Tabela 2. Genes, sequência dos primers, posição nos éxon e o tamanho dos produtos (pb).....	23
Tabela 3. Média semanal (SEM1, SEM2 e SEM3) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 1º desafio de infecção do lote experimental 1.....	28
Tabela 4. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM 4 e SEM 5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistente (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 2º desafio de infecção do lote experimental 1...	29
Tabela 5. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 1º desafio de infecção do lote experimental 2...	30
Tabela 6. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 2º desafio de infecção do lote experimental 2...	30
Tabela 7. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume	

globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 1º desafio de infecção do lote experimental 3...	31
Tabela 8. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 2º desafio de infecção do lote experimental 3...	31
Tabela 9. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 1º desafio de infecção do lote experimental 4...	33
Tabela 10. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 2º desafio de infecção do lote experimental 4...	33
Tabela 11. Média da contagem (\pm desvio padrão) de nematoides recuperados do abomaso e intestino delgado de caprinos mestiços ($\frac{1}{2}$ sangue Anglo-nubiana x $\frac{1}{2}$ sangue Saanen) caracterizados resistentes e susceptíveis aos nematoides gastrintestinais.....	37
Tabela 12. Média e desvio-padrão de eosinófilos do abomaso (Eosinófilos AB), eosinófilos do intestino delgado (Eosinófilos ID), leucócitos globulares do abomaso (Leuc. Glob. AB) e leucócitos globulares do intestino delgado (Leuc. Glob. ID) presentes na mucosa de caprinos mestiços resistentes (R) e susceptíveis (S) as parasitoses gastrintestinais.....	41
Tabela 13. Expressão genica relativa de tecidos do abomaso do grupo resistente (R) e susceptível (S) de caprinos mestiços naturalmente infectados por nematoides gastrintestinais.....	48

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Esquema da caracterização fenotípica dos caprinos mestiços.....	17
Figura 2. Porcentagem de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais identificadas em coproculturas de caprinos mestiços nos dois desafio de infecção no lote experimental 1.....	29
Figura 3. Porcentagem de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais identificadas em coproculturas de caprinos mestiços, nos dois desafios de infecção do lote experimental 2.....	31
Figura 4. Porcentagem de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais identificadas em coproculturas de caprinos mestiços, nos dois desafios de infecção do lote experimental 3.....	32
Figura 5. Porcentagem de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais identificadas em coproculturas de caprinos mestiços nos dois desafio de infecção do lote experimental 4.....	34
Figura 6. Níveis séricos de imunoglobulina tipo A (IgA) para <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> , obtidos do soro de caprinos mestiços (½ sangue Anglo-nubiana x ½ sangue Saanen) caracterizados como resistente (R) e susceptível (S) submetidos a dois desafios de infecção. A barra representa o desvio padrão. *Níveis de significância P<0,05.....	39
Figura 7. Níveis séricos de imunoglobulina tipo G (IgG) para <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> , obtidos do soro de caprinos mestiços (½ sangue Anglo-nubiana x ½ sangue Saanen) caracterizados como resistente (R) e susceptível (S) submetidos a dois desafios de infecção. A barra representa o desvio padrão. *Níveis de significância P<0,05.....	40
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação da integridade dos rRNAs (28S e 18S). As amostras dos poços (3, 4, 5, 7, 9 e 12) correspondem aos animais do grupo resistente (A). As amostras dos poços (13, 16, 18, 19, 20 e 24) que correspondem aos animais do grupo susceptível (B).....	43
Figura 9. Gráficos obtidos a partir da diluição seriada do DNA e Cts gerados	

- pelo RT-qPCR dos genes alvos: IL-2, IL-4, IL-5 e IL-8. Os valores das equações de regressão: slope, coeficiente de determinação (R^2) e eficiência (Ef) estão à direita do gráfico..... 44
- Figura 10.** Gráficos obtidos a partir da diluição seriada do DNA e Cts gerados pelo RT-qPCR dos genes alvos: IL-10, IL-12 p35, IL-12 p40 e IL-13. Os valores das equações de regressão: slope, coeficiente de determinação (R^2) e a eficiência (Ef) estão à direita do gráfico..... 45
- Figura 11.** Gráficos obtidos a partir da diluição seriada do DNA e Cts gerados pelo RT-qPCR dos genes alvos: MCP-1, MCP-2, IFN- γ e do gene constitutivo SDHA. Os valores das equações de regressão: slope, coeficiente de determinação (R^2) e a eficiência (Ef) estão à direita do gráfico..... 46
- Figura 12.** Verificação do tamanho dos produtos de RT-qPCR através da eletroforese em gel de agarose a 2%. A primeira, a do meio e a última canaleta para todos os genes refere-se o padrão molecular ladder 1 Kb plus (Invitrogen) (M). Os genes analisados (canaletas): IL-2 (1); IL-4 (2); IL-5 (3); IL-8 (4); IL-10 (5); IL-12 p35 (6); IL-12 p40 (7); IL-13 (8); MCP-1 (9); MCP-2 (10); IFN- γ (11) e SDHA (12)..... 47
- Figura 13.** Curva de *melting* do gene IL-10, gerada pelo aparelho MasterCycle (Eppendorf). O eixo y representa a primeira derivada negativa dos valores de fluorescência durante cada ciclo ($-[dF/dT]$) e o eixo x representa a temperatura de *melting*. Cada linha representa uma amostra cuja expressão foi quantificada..... 47

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E RESPOSTA IMUNE DE CAPRINOS
MISTIÇOS NATURALMENTE INFECTADOS POR NEMATOIDES
GASTRINTESTINAIS**

RESUMO GERAL - O objetivo deste estudo foi avaliar ferramentas fenotípicas, histológicas, imunológicas e moleculares para caracterizar caprinos mestiços quanto à resistência e susceptibilidade aos nematoides gastrintestinais. Para isso, foram utilizados 231 animais F₂, de ambos os sexos, com idade variando de cinco a dez meses, provenientes de quatro lotes experimentais. Semanalmente, foram coletadas amostras de fezes e sangue para realização dos exames: contagem de ovos por grama de fezes (OPG), coprocultura, volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT), eosinófilos sanguíneos (EOS) e determinação dos níveis de imunoglobulinas. Nos mesmos dias das coletas, também foi realizado o método Famacha. Os animais foram ordenados de acordo com os valores de OPG, os 12 animais que apresentaram as menores médias foram caracterizados como resistentes e os 12 animais que apresentaram as maiores médias foram caracterizados como susceptíveis. Os animais do lote experimental 4, como apresentaram a melhor caracterização fenotípica, foram necropsiados para a recuperação dos nematoides gastrintestinais e amostras de tecidos para análises histológicas e de expressão gênica. O OPG foi eficaz, nos quatro lotes, para a caracterização de caprinos resistentes e susceptíveis as parasitoses gastrintestinais nos dois desafios de infecção (P<0,05). No quarto lote, as variáveis: OPG, VG e PPT foram eficazes na identificação dos animais quanto a diferentes níveis de resistência. Nos demais lotes, o VG, a PPT, a contagem de eosinófilos e o Famacha não foram tão eficazes como o OPG, para diferenciar caprinos resistentes e susceptíveis às parasitoses gastrintestinais. Os níveis de IgA e IgG, em especial para *Haemonchus contortus*, nos dois desafios de infecção, e a contagem de eosinófilos no abomaso foram parâmetros eficazes na resposta imune, indicando que essas células de defesa apresentam um papel efetor no controle das infecções gastrintestinais. Na expressão gênica, a IL-5 e IL-10 apresentaram níveis superiores significativos no grupo susceptível, mostrando que a expressão destas citocinas na quinta semana de infecção pode ter papel em mecanismos de susceptibilidade a nematoides gastrintestinais.

Palavras-chave: citocinas, expressão gênica, OPG, resistência genética, verminose

**PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND IMMUNE RESPONSE OF GOAT
CROSSBREDS NATURALLY INFECTED BY GASTROINTESTINAL
NEMATODE**

GENERAL ABSTRACT – The aim of this study was to evaluate phenotypic, histologic, immunologic and molecular tools to characterize goat crossbred in resistant and susceptibility to gastrointestinal nematodes. For this purpose, we used 231 F₂ animals of both genders, of ages between five and ten months, from four different kidding seasons. Stool and blood samples were collected weekly for eggs per gram of feces (EPG) determinations, fecal culture, packed cell volume (PCV), total plasma protein (TPP), blood eosinophils (EOS) and immunological tests. Famacha scores were obtained on the same sample collection days. The animals were ranked according to EPG values and the 12 animals with lowest means were considered resistant while the 12 animals with the highest means were considered susceptible. The animals in the experimental lot 4, presented the best phenotypic characterization and were chosen for, recovery of gastrointestinal nematodes and tissue samples for histological and gene expression determinations. EPG, PCV and TPP were effective in the identification of resistant and susceptible. In the other lots, the PCV, TPP, eosinophil count and Famacha were not as effective as EPG. IgG and IgA levels, particularly for *Haemonchus contortus* infection in both challenges, showed significant differences in some of the studied timepoints. Resistant animals presented higher eosinophil counts in the abomasum, indicating that these cells participate in the control of gastrointestinal infections. IL-5 and IL-10 gene expression levels were significantly higher in the susceptible group, showing that the expression of these cytokines in the fifth week of infection may have a role in mechanisms of susceptibility to gastrointestinal nematodes.

Key-words: cytokines, EPG, gene expression, genetic resistance, worm

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A criação de caprinos apresenta grande importância sócio-econômica no Nordeste brasileiro. O efetivo do rebanho nacional de caprinos é de aproximadamente 8,7 milhões de cabeças. A região Nordeste possui o maior rebanho do país, representando 98,9% do efetivo e o Ceará detém 11,72% deste total (IBGE, 2013).

A caprinocultura é utilizada como uma das alternativas mais viáveis para a região semiárida nordestina, em consequência da sua resistência às intempéries climáticas e por sua capacidade de aproveitamento de forragens de baixa qualidade no período seco (SILVA et al., 2007). Nessa região, a introdução de raças exóticas, como a Anglo-nubiana e a Saanen, ocorre em virtude da busca de melhoria da produtividade do rebanho e a obtenção de animais mestiços mais produtivos e também adaptados às condições da região semiárida. Entretanto, deve-se realizar um controle no processo de introdução de novos grupos genéticos para evitar que ocorra descaracterização e extinção de raças nativas. Nessa descaracterização, poderia se perder uma possível resistência dos animais nativos frente às infecções parasitárias (SANTOS et al., 2005).

De fato para a exploração das raças, Anglo-nubiana e Saanen, na região semiárida, preconiza-se a utilização de manejo sanitário, nutricional e reprodutivo adequados para redução das infecções parasitárias, que se caracteriza como um dos principais fatores limitantes na produção de caprinos (VIEIRA, 2008). O controle parasitário é realizado, principalmente, por meio da utilização de antihelmínticos pertencentes a diversos grupos químicos. Entretanto, o uso indiscriminado destes produtos químicos tem favorecido o desenvolvimento de populações de nematoides resistentes, sendo um dos mais importantes e atuais problemas no controle de parasitos (MELO et al., 2003).

Conseqüentemente, se faz necessária a busca de estratégias que promovam o uso mínimo de compostos químicos na produção animal, de forma que os alimentos oriundos dessa atividade sejam isentos de compostos químicos ou contenham concentrações mínimas aceitáveis, evitando riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Nesse contexto, o sistema integrado de controle parasitário, que consiste na adoção integrada de várias estratégias de manejo parasitário (MOLENTO et al., 2004), tais como o manejo correto da pastagem, a suplementação nutricional, a vermifugação seletiva associado aos uso de

vacinas e a seleção genética de animais resistentes (LÔBO et al., 2009), devem ser preconizados.

Para a seleção de animais resistentes em um rebanho, alguns marcadores fenotípicos podem ser utilizados, tais como contagem de ovos por grama de fezes - OPG (BASSETO et al., 2009), avaliação do volume globular - VG, contagem do número de eosinófilos circulantes - EOS (SOTOMAIOR et al., 2007), proteína plasmática total – PPT (ZAROS et al., 2014) e concentração de anticorpos circulantes - AC (BRICARELLO et al., 2007) como também o diagnóstico do grau da anemia dos animais pelo método Famacha (MOLENTO et al., 2004).

Outras abordagens complementares a caracterização fenotípica são utilizadas, como os estudos de expressão gênica (ZAROS et al., 2007; BRICARELLO et al., 2008) e a identificação de polimorfismos associados com a resistência às endoparasitoses gastrintestinais (SAYERS et al., 2005). Essas ferramentas são utilizadas para estudar o sistema imune do hospedeiro e entender a ação dos linfócitos T, que são as principais células condutoras dessa resposta imunológica, e os mecanismos de resistência ou susceptibilidade em infecções por nematoides gastrintestinais (IBELLI et al., 2011).

No entanto, essas estratégias têm sido avaliadas, muitas vezes, de forma isolada, sem considerar suas complementariedades no mesmo experimento, especialmente para os caprinos. Em virtude disso, neste estudo propõe-se avaliar ferramentas fenotípicas, histológicas, imunológicas e moleculares para caracterizar caprinos mestiços quanto à resistência e susceptibilidade aos nematoides gastrintestinais.

Para tanto foram propostos os seguintes objetivos específicos: caracterização fenotípica de caprinos mestiços ($\frac{1}{2}$ sangue Anglo-nubiana e $\frac{1}{2}$ sangue Saanen) quanto à resistência e susceptibilidade as verminoses gastrintestinais; determinação dos níveis de imunoglobulinas (IgA e IgG); quantificação das células de defesa (eosinófilos e leucócitos globulares) e avaliação da expressão de genes envolvidos nas infecções gastrintestinais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Nematoides gastrintestinais

Os principais nematoides que parasitam o abomaso dos ruminantes são *Haemonchus* sp., *Ostertagia* sp. e *Trichostrongylus axei*. No intestino delgado encontram-se *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia* sp., *Bunostomum* sp., *Strongyloides* sp. e *Nematodirus* sp., e no intestino grosso *Oesophagostomum* sp. e *Trichuris* sp. (RUAS; BERNE, 2001).

As espécies *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides papillosus* e *Oesophagostomum columbianum* são endoparasitoses que apresentam maior prevalência, sendo consideradas as principais causadoras de prejuízos econômicos na exploração de pequenos ruminantes (VIEIRA, 2008). *Haemonchus contortus* se destaca como o parasito de maior patogenicidade para caprinos e ovinos, especialmente em regiões de clima tropical e subtropical (MILLER; HOROHOV, 2006) seguido por *Trichostrongylus colubriformis* (AMARANTE, 2004). Nas culturas fecais de trabalho realizado com ovinos Somalis na região Nordeste o gênero predominante foi *Haemonchus* sp. (88%) seguido por *Trichostrongylus* sp. (8%) e *Oesophagostomum* sp. (4%) (ZAROS et al., 2014).

2.1.1. *Haemonchus contortus*

Em pequenos ruminantes, *Haemonchus contortus* é o principal responsável por infecções de elevada intensidade (COSTA et al., 2009). A patogenicidade deste parasito está relacionada com sua hematofagia, que é responsável por ocasionar lesões na região do abomaso do hospedeiro. Esse parasito tem capacidade de sugar cerca de 0,05 mL de sangue ao dia (TAYLOR et al., 2007). Em infecções elevadas, um animal pode perder cerca de 140 mL de sangue por dia. A perda contínua de sangue leva a um esgotamento das reservas de ferro e proteínas séricas (RUAS; BERNE, 2007) e por consequência, a hipoalbuminemia, com o desenvolvimento de edemas particularmente na face, “edema sub-mandibular” (HOLMES, 1985).

Na fase aguda da infecção, *Haemonchus contortus* ocasiona danos à produtividade dos animais como perda de peso, anemia, desidratação, fraqueza, apatia, pelos arrepiados e sem brilho. Em infecções hiperagudas, facilmente se nota as mucosas ocular, gengival e vulvar extremamente pálidas, associadas com alterações no consumo de alimentos, na função gastrintestinal, nos metabolismos proteico, energético e mineral e na composição

corpórea (FOX, 1997). Quando a infecção não é controlada podem ocasionar elevados índices de mortalidade (VIEIRA, 2008).

2.1.2. *Trichostrongylus colubriformis*

As infecções por *Trichostrongylus colubriformis* compromete as funções reprodutivas dos animais e diminuição gradativa no sistema de produção de carne, leite e lã (CHARLES, 1992). No intestino delgado, este parasito causa atrofia nas vilosidades, erosão do epitélio intestinal e espessamento de mucosa, com conseqüente redução na absorção de nutrientes. Isto ocasiona perda de peso, diarreia e debilidade do animal em função de uma anemia secundária devido à má absorção nutricional (GREGORY et al., 1985). As lesões epiteliais ocasionadas em decorrência da exsudação de proteínas séricas totais para a luz intestinal resultam em significativas diminuições na concentração de albuminas, causa de graves quadros de hipoalbuminemia nos animais (STEEL et al., 1980).

2.2. Componentes do sistema imune em infecções por nematoides gastrintestinais

2.2.1. Células sentinelas

As células sentinelas são ativadas na presença de patógenos, após a ativação essas células sintetizam e secretam citocinas e outras moléculas, como as lectinas (colectinas e galectinas), a qual desencadeia a inflamação, enquanto inicia a intensificação da imunidade adquirida. As principais células sentinelas ativadas em infecções gastrintestinais são eosinófilos, mastócitos leucócitos globulares (TIZARD, 2008).

Os eosinófilos são produzidos na medula óssea e encontrados em número reduzido na circulação sanguínea. Nas infecções por helmintos, o número destas células aumenta no sangue (eosinofilia) pela ação, principalmente, da interleucina 5 (IL-5), proveniente de linfócitos Th2. Por meio de quimiorreceptores liberados por mastócitos, os eosinófilos chegam aos tecidos do trato gastrintestinal, liberando mediadores inflamatórios extremamente potentes que danificam a cutícula ou até mesmo matam os helmintos recobertos com a imunoglobulina IgE. Contudo, a presença dos eosinófilos no tecido, por si só, não é suficiente e depende da interação com outros fatores, como a ação de mastócitos e IL-4 (BALIC et al., 2006). Os eosinófilos e mastócitos são as principais células efetoras, tipicamente associadas com infecções helmínticas (BALIC et al., 2000).

Assim como os eosinófilos, os mastócitos amadurecem nos tecidos e quando presentes nas mucosas respondem especificamente à invasão por parasitas. O número de mastócitos pode aumentar em infecções por nematoides gastrintestinais devido a ação da interleucina 3 (IL-3) (LANTZ et al., 1998; TIZARD, 2008). Quando estas células são ativadas, devido a ação de IgE, liberam mediadores inflamatórios como histamina, leucotrienos, serotonina, proteoglicanos, proteases e diversas citocinas. Esses mediadores no hospedeiro ocasionam a contração da musculatura lisa, o aumento da permeabilidade vascular e da produção de muco. A somatória destes eventos favorecem o desalojamento e a expulsão de helmintos gastrintestinais (TIZARD, 2002).

Os leucócitos globulares também são produzidos na medula óssea. Em infecções parasitárias liberam enzimas para a luz e tecidos epiteliais dos órgãos gastrintestinais, afetando os nematoides, porém, com efeitos mínimos aos tecidos do hospedeiro (BALIC et al., 2000).

Em trabalho realizado com cordeiros da raça Romney e mestiços Romney x Suffolk infectados por *Trichostrongylus colubriformis*, observou-se uma elevada contagem de eosinófilos, mastócitos e leucócitos globulares na mucosa (SHAW et al., 1998). Em outro trabalho com ovinos Romney, observou-se aumento do número de mastócitos e leucócitos globulares na mucosa do intestino delgado nos animais mais resistentes (BISSET et al., 1996). Mediante ao exposto, destaca-se a importância destas células na resposta imunológica contra estabelecimento dos parasitas no trato gastrintestinal.

2.2.2. Imunoglobulinas (Igs)

As imunoglobulinas ou anticorpos são glicoproteínas produzidas por linfócitos B, em resposta à estimulação antigênica. Elas possuem várias funções efetoras, como neutralização de antígenos, ativação de complemento, fagocitose e destruição de microrganismos (ABBAS et al., 2012). Em infecções helmínticas, as imunoglobulinas IgE, IgA, IgG1 e IgG2 atuam na resposta imune (AMARANTE et al., 2004).

Dentre as imunoglobulina, a IgE está envolvida em processos alérgicos e é um dos principais mecanismos de proteção contra as helmintoses (TIZARD, 2002). Esta imunoglobulina, juntamente com os mastócitos e basófilos, promove a reação inflamatória, por meio da liberação de mediadores químicos como histamina e fatores quimioatraentes (TIZARD, 2013). Shaw et al. (1997) reportaram aumento significativo de IgE em ovinos

infectados por *Trichostrongylus axei*, quando comparados com animais não infectados. Neste estudo, também foi observado que a cinética da resposta de IgE no soro foi similar a observada na mucosa do abomaso.

As imunoglobulinas IgA, IgG1 e IgG2 também exercem papel protetor nas infecções gastrintestinais, ao promoverem neutralização de proteases utilizadas pelas larvas infectantes (L₃) durante invasão tecidual, formação de imunocomplexos nas aberturas orais e anais dos parasitas, impedimento da ecdise, além da inibição do desenvolvimento larval (TIZARD, 2002).

Amarante et al. (2005) observaram que os níveis de IgA específica para nematoides gastrintestinais estavam inversamente associadas com a carga parasitária e a contagem de OPG em ovinos das raças Santa Inês, Suffolk e Ile de France. Este resultado evidencia que a produção desta imunoglobulina pode comprometer o desenvolvimento ou a fecundidade dos parasitos.

Em ovinos da raça Texel experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus*, a resposta de anticorpos IgA contra antígenos de L₃ e a resposta de IgG1 e IgG2 para antígenos de parasitos adultos foram maiores em infecções secundárias e estavam associadas a redução na produção de ovos pelos parasitos (SCHALLING et al., 1994). Em estudo posterior, com ovinos imunizados contra *Trichostrongylus colubriformis*, foi demonstrado no muco intestinal, que anticorpos IgG1 e IgA se ligavam ao antígeno cuticular de L₃, prevenindo o estabelecimento do parasito no hospedeiro (HARRISON et al., 2003).

2.2.3. Linfócitos B e T

Os linfócitos B são maturados no tecido linfoide gastrintestinal ou na medula óssea e tornam-se apresentadores de antígeno quando seus receptores de células B (BCRs) são ativados. Após a ligação do antígeno, os BCRs podem ser internalizados e degradados, ou transportados a um compartimento intracelular, onde moléculas recém-sintetizadas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e fragmentos desses antígenos interagem, ativando os linfócitos T que co-estimulam o linfócito B, permitindo sua total ativação (TIZARD, 2008). Os BCRs quando liberados nos fluídos corpóreos são denominados anticorpos (Ac) ou imunoglobulinas (IgA, IgE e IgG) (BALIC et al., 2000).

Os linfócitos T são considerados importantes reguladores e efetores da resposta

imune do hospedeiro. As células T são divididas em dois subconjuntos, com base em seus marcadores de superfície: $CD4^+$ e $CD8^+$. O resultado de muitas infecções parasitárias com relação à resistência ou à susceptibilidade pode ser determinado por uma resposta padrão envolvendo um subconjunto de células $CD4^+$ (BRICARELLO et al., 2008).

As células T $CD4^+$ são subdivididas em “T helper tipo 1” (Th1) e “T helper tipo 2” (Th2). As Th1 produzem interleucinas-1 (IL-1), IL-2, IL-8, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e proteínas quimioatrativas de monócitos 1 e 2 (MCP-1 e MCP-2). As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (LIEW, 2002).

Um terceiro subconjunto de células T auxiliares, denominadas de Th17, são abundantes nos tecidos da mucosa, principalmente no trato gastrintestinal, sugerindo que o ambiente tecidual influencia a diferenciação destas células. Atuam sintetizando proteínas reguladoras como fator de transformação de crescimento tecidual beta (TGF- β) e outras citocinas (IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23). A IL-17 e IL-22 desempenham um importante papel na imunidade de mucosas ao ativar a produção de peptídeos antimicrobianos e fatores de reparo tecidual por células epiteliais. A IL-23 pode ser mais importante para a proliferação e manutenção da Th17 que para a sua indução. A IL-21 produzida pelas células Th17 promove a diferenciação do fenótipo Th17. Por causa destes efeitos, as células Th17 representam um importante mecanismo de defesa contra infecções de mucosas, como do pulmão e do intestino (ABBAS et al., 2008).

Os produtos das células T podem agir como fatores de crescimento autócrino para posterior expansão dessas células, bem como agentes inibidores recíprocos para o tipo celular oposto. Como exemplo, a IL-4, produto da célula T, promove a expansão clonal de células Th2 e limita a proliferação de células Th1. Contrariamente, interferon-gama (IFN- γ) aumenta o crescimento de células Th1, mas diminui o desenvolvimento de Th2 (LIEW, 2002).

O tipo de célula a ser ativada, Th1 ou Th2, depende do tipo de patógeno ou antígeno que entra em contato com as células. Patógenos intracelulares, como bactérias, vírus e protozoários extracelulares direcionam uma resposta por células Th1, enquanto que helmintos e parasitos extracelulares induzem resposta Th2 (HUSE et al., 2006).

Os ruminantes desenvolvem imunidade contra nematoides gastrintestinais depois de várias infecções, sendo os animais jovens mais susceptíveis ao parasitismo. Esses parasitos

induzem uma resposta do tipo Th2 com produção de interleucinas, especialmente IL-4, IL-5 e IL-13 (MILLER; HOROHOV, 2006), de anticorpos IgA, IgG1 e IgE, aumento do número de mastócitos e eosinófilos (GILL et al., 2000).

Em ovinos, a resposta imune contra *Haemonchus contortus* foi caracterizada como uma típica resposta Th2, com elevação do nível de IgE sérica, do número de mastócitos (SCHALLING, 2000), da concentração das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e o recrutamento de células inflamatórias para mucosa da região fúndica do abomaso (TEREFE et al., 2007).

Cordeiros infectados com L₃ de *Haemonchus contortus* em infecções primária e secundária, observou-se aumento da expressão de mRNA para IL-4 e IL-13, do número de eosinófilos e mastócitos na mucosa abomasal e de níveis séricos de IgG e IgA, sendo esta resposta mais precoce na infecção secundária (LACROUX et al., 2006).

2.3. Citocinas

As células do sistema imune secretam uma grande variedade de glicoproteínas que regulam as respostas imunes por meio de sinalização entre as células. Essas proteínas são conhecidas pelo termo genérico de citocinas. Elas são secretadas por várias células do organismo por meio da modulação da resposta imunológica, que inclui ativação, proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose dos linfócitos (JANEWAY et al., 2002).

Estas proteínas são responsáveis pelo equilíbrio das funções do organismo como um todo, pela sinalização da resposta intercelular, enviando sinais estimulatórios, modulatórios ou inibitórios para diferentes células do sistema imunológico (GORCZYNSKI, 2001). Também promovem a interação entre o sistema imune inato (não específico) com o adaptativo (células T e B, específicas e de memória). São reguladoras das células dendríticas e do sistema de sinalização e são produzidas, principalmente, por leucócitos ativados, mas também por outras células do sistema imune inato, como macrófagos, mastócitos e células *Natural Killer* - NK (FRENCH et al., 2003).

As citocinas podem ser agrupadas de acordo com sua estrutura, constituindo quatro grupos: Grupo 1) representa o grupo das hematopoiéticas que inclui as interleucinas: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-13 e os interferons (IFN); Grupo 2) inclui a família dos fatores de necrose tumoral (TNF), família da IL-1 e TGF- β ; Grupo 3) abrange a família das quimiocinas (IL-8 e proteínas quimioatraentes para monócitos-

MCPs); e Grupo 4) a família onde as citocinas possuem diferentes motivos estruturais, e inclui a IL-12 (TIZARD, 2008). Algumas citocinas que exercem importante função na resposta imune serão melhor detalhadas a seguir.

2.3.1. Interleucina 2 (IL-2)

É uma citocina secretada pelas células Th1 e seus alvos são as células T, B, NK e macrófagos. A IL-2 é uma componente chave na resposta imune celular, onde sua produção determina se uma célula T irá se proliferar tornando-se uma célula efetora (JANEWAY et al., 2002).

A IL-2 induz a produção de IFN- γ e IL-5, também regula a expressão do receptor do TNF- α . Esta interleucina pode ativar os macrófagos, estimular sua secreção e potencializar a atividade citotóxica contra células cancerosas e bactérias intracelulares (TIZARD, 2002).

Em estudos realizados com bovinos, Zaros et al., (2010) verificaram não haver diferença na expressão de IL-2 entre os grupos, tanto nos nódulos linfáticos quanto na mucosa do abomaso, de bovinos resistentes e susceptíveis ao *Haemonchus placei*. Claerebout et al. (2005) não observaram diferenças na presença de IL-2 em linfonodos, nem na mucosa do abomaso, entre grupos de bezerros infectados e não infectados com *Ostertagia ostertagi*. Já Bricarello et al. (2008) verificaram aumento da expressão de IL-2 em bovinos susceptíveis a *Cooperia punctata*, indicando sensibilidade à infecção por endoparasitas. Mediante ao exposto, há muitas diferenças encontradas nos estudos de expressão de IL-2 e que não há um perfil definido na expressão desta citocina em bovinos.

2.3.2. Interleucina 4 (IL-4)

São produzidas pelas células T e mastócitos. A IL-4, considerada uma citocina chave na resposta Th2, é o principal estímulo para ativação das células B, produção de anticorpos IgE e o desenvolvimento das células Th2, a partir de células virgens T CD4⁺ (ABBAS et al., 2008).

A IL-4 também pode agir como uma molécula efetora ativando células B e potencializando o desenvolvimento de células T citotóxicas, além de contribuir para o crescimento das células Th na ausência da IL-2. Ela induz a proliferação de mastócitos e reduz a produção de IL-1, IL-6 e TNF- α (TIZARD, 2002).

A IL-4 é típica da inflamação mediada por células tipo Th2, associada à alergia e a estados parasitários, principalmente em infecções por parasitos gastrintestinais (MEEUSEN et al., 2005). Citocinas Th2 presentes na mucosa intestinal durante infecções por nematoides, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, aumentam a permeabilidade intestinal e induzem a hipercontratilidade de células musculares (ZHAO et al., 2003), produzindo alterações fisiológicas que possam dificultar o estabelecimento ou aderência dos parasitos na mucosa intestinal. No entanto, os mecanismos específicos regulados por essas citocinas para inibição do estabelecimento de nematoides gastrintestinais ou, em alguns casos, pelo aumento da lesão e conseqüentemente da patologia associada à infecção, ainda não foram claramente estabelecidos.

2.3.3. Interleucina 5 (IL-5)

É uma citocina pertencente à família das hematopoiéticas, que pode ser produzida pelas células Th2, eosinófilos e por mastócitos ativados. Age especificamente no eosinófilo, sendo responsável pela sua diferenciação e liberação da medula óssea para o sangue periférico (GREGORY et al., 2003).

A IL-5 é uma citocina importante na produção de IgA, produzida pela célula B, auxiliando na diferenciação destas em plasmócitos. Em infecções gastrintestinais, foi verificado que linfócitos obtidos de cordeiros resistentes produziram níveis significativos de IL-5 em resposta a antígeno de *Haemonchus contortus*, quando comparados às células de animais susceptíveis, bem como a produção de níveis elevados de anticorpos IgG1 e IgE e maior infiltração de mastócitos e eosinófilos na mucosa do abomaso (GILL et al., 2000).

A eosinofilia que está associada à elevação do nível de IL-5 geralmente atua sinergicamente com as quimiocinas IL-8, MCP-1 e 2 e com outras citocinas também produzidas durante a estimulação por IL-4 e IL-13 (CARA et al., 2000).

2.3.4. Interleucina 10 (IL-10)

É produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos T (Th0, Th1 e Th2) e B após a sua ativação (ABBAS et al., 2008). A IL-10 foi identificada pela supressão da resposta imune e inflamatória. Originalmente, foi descrita como uma citocina produzida

especificamente por células CD4⁺ Th2, porém, estudos posteriores mostraram que pode ser secretada tanto por células Th2 quanto Th1 (TRINCHIERI, 2007).

A IL-10 suprime muitas funções de células NK e de células T, por inibir a apresentação de antígenos e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ . O IFN- γ é amplamente produzido em humanos e camundongos com leishmaniose visceral, causada por *Leishmania donovani*, mas falha em controlar a infecção. A IL-10 foi associada à progressão da doença, por exercer um papel imunorregulador, inibindo os efeitos do IFN- γ e conseqüentemente a eliminação do parasito (GASIM et al., 1998).

2.3.5 Interleucina 12 (IL-12)

É uma citocina heterodimérica, constituída pelas subunidades p35 e p40. São produzidas pelas células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos, e células dendríticas e B). Exercem efeitos imunorregulatórios nas células T e NK, direcionando a resposta imune Th1, por meio da produção de IFN- γ e inibindo a resposta Th2 por suprimir a produção de IL-4. Em infecções por patógenos intracelulares, tem um importante papel na ativação da imunidade protetora do hospedeiro (JANEWAY et al., 2002).

Em trabalho realizado com camundongos com *knockout* (bloqueio) no gene IFN- γ foram tratados com IL-12 e averiguou-se que houve uma diminuição de IL-4 e IL-10 e aumento de IL-13 nos nódulos linfáticos mesentéricos. Estes resultados comprovam que IL-12 pode inibir a produção de algumas citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) e estimular a produção da IL-13, ambos na ausência de IFN- γ . Essa atividade é denominada como independente de IFN- γ (MOUNTEFORD; PEARLMAN, 1998). Desta maneira, o aumento ou supressão da resposta Th2 pela IL-12 pode depender do local da resposta imune, das citocinas presentes e do estado de maturação das células T.

A presença de IL-12 em infecções por nematoides gastrintestinais está relacionada à susceptibilidade do hospedeiro, a não expulsão dos parasitas e ao conseqüente desenvolvimento da cronicidade da infecção. Grecis (2001) comprovou este fato por meio da administração da IL-12 a cobaias resistentes ao *Trichuris muris* e verificou o desenvolvimento da fase crônica da infecção. Provavelmente, o estabelecimento desta cronicidade pode ser explicado porque a presença da IL-12 (citocina Th1) inibe a produção de citocinas Th2. Bricarello et al. (2008) verificaram expressão da IL-12 no intestino delgado de bovinos Nelore susceptíveis a *Cooperia punctata*.

2.3.6. Interleucina 13 (IL-13)

É uma citocina pertencente à família das hematopoietinas, sendo produzida por células T. Apresenta algumas funções como, auxiliar no desenvolvimento de células B, polarizar resposta Th2 e inibir a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos e células Th1 (JANEWAY et al., 2002).

A IL-13 compartilha algumas atividades biológicas com a IL-4, podendo atuar sinergicamente ou mesmo substituí-la na indução de vários aspectos da resposta Th2. O sinergismo entre a IL-13 e IL-4 pode ser justificado pelo fato de essas citocinas compartilharem um receptor comum. Alguns trabalhos relataram a atuação da IL-4 e IL-13 na mucosa intestinal, aumentando o ritmo de contração muscular e a proliferação das células epiteliais intestinais. A produção de citocinas Th2, especialmente IL-4 e IL-13, são essenciais para o desenvolvimento da resposta imune protetora contra nematoides gastrintestinais levando à expulsão dos parasitas (ZHAO et al., 2003).

Terefe et al. (2007) observaram nos nódulos linfáticos de ovinos, níveis elevados de mRNA para IL-13 nos animais mais resistentes ao *Haemonchus contortus* que nos animais mais susceptíveis. Craig et al. (2007) observaram aumento significativo de expressão de IL-13 em ovinos infectados com *Teladorsagia circumcincta*.

2.3.7. Interferon gama (IFN- γ)

Pertencente à família dos interferons, IFN- γ é produzido por células T, células dendríticas, macrófagos e células NK e tem a função de induzir a síntese de óxido nítrico, ativando funções microbidas (REINER; LOCKSLEY, 1995).

A presença de IFN- γ é caracterizada por conferir resistência às infecções contra vírus e bactérias (JANEWAY et al., 2002). Após a administração de IFN- γ em bovinos infectados por *Strongyloides pappilosus*, foi observada diminuição na contagem de OPG e aumento na expulsão de helmintos (NAKAMURA et al., 2002). Meeusen et al., (2005) observaram diferenças nos padrões de expressão gênica, com apenas aumento de IFN- γ e IL-5 no terceiro dia pós-infecção, e altos níveis de IL-4 no quinto dia. Em virtude disso, a variação da expressão de IFN- γ frente a diferentes infecções por helmintos, em bovinos e ovinos, pode ser explicada pelo fato da resposta Th1/Th2 não ser conservada (WALDVOGEL et al., 2004).

2.3.8. Quimiocinas: Interleucina 8 e proteína quimioatraente de monócitos 1 e 2 (MCP-1 e MCP-2)

São proteínas pertencentes à classe de citocinas que apresentam propriedades quimiotáticas. Apresentam algumas funções como atrair leucócitos, monócitos, neutrófilos e outras células efectoras do sangue para os locais da infecção, atuando como guias para as células envolvidas na imunidade inata e para os linfócitos da imunidade adaptativa. Podem também participar do desenvolvimento de linfócitos (JANEWAY et al., 2002).

2.3.8.1. Interleucina 8 (IL-8)

É uma quimiocina também conhecida por CXCL8. Recebe esta denominação por apresentar dois resíduos de cisteínas (C) intercalados por um aminoácido qualquer (X). A IL-8 está envolvida na resposta inflamatória local, auxiliando o recrutamento de neutrófilos, basófilos e células T para o local da infecção. A IL-8 apresenta um duplo papel no recrutamento de tais células, atuando no rolamento de leucócitos nas células endoteliais presentes no local da infecção e direcionando a migração dos leucócitos por meio de um gradiente de quimiocina, com concentrações crescentes na direção do local da infecção (JANEWAY et al., 2002). Esta quimiocina é produzida e secretada por fibroblastos, macrófagos, linfócitos, granulócitos, hepatócitos e queratinócitos (TIZARD, 2002).

2.3.8.2. Proteína quimioatraente de monócitos 1 e 2 (MCP-1 e MCP-2)

A MCP-1 também é chamada de quimiocina CC ligante 2 (CXCL2) e a MCP-2 é chamada de quimiocina CC ligante 8 (CCL8) (JANEWAY et al., 2002). Estudos demonstraram pela primeira vez que a MCP-1 desempenha um papel importante no desenvolvimento de resistência à infecção pelo nematoide gastrointestinal *Trichuris muris*. A deficiência de MCP-1 está associada a uma diminuição do recrutamento de macrófagos para o local da infecção. Além disso, a ausência desta quimiocina contribui para o aumento da IL-12 e reduz os níveis de citocinas Th2, levando a falha na expulsão do *Trichuris muris* (DESCHOOLMEESTER et al., 2003). Em trabalho realizado com ovinos, observou-se na mucosa do abomaso, aumento nos níveis de expressão de MCP-1 e MCP-2. Estas quimiocinas estão envolvidas na resposta imune à infecção por helmintos e no recrutamento de leucócitos para o trato gastrointestinal, além de serem importantes mediadores da inflamação e defesa do hospedeiro (DUNPHY et al., 2001).

2.4. Utilização da q-PCR na expressão de citocinas

A q-PCR é uma metodologia amplamente utilizada em estudos de expressão gênica, possibilitando o melhor entendimento de doenças, mecanismos imunes e de processos metabólicos dos organismos em geral. É muito utilizada para diagnósticos, podendo diferenciar diversos tipos de câncer, identificar e detectar bactérias, fungos, identificar mutações e até mesmo validar resultados de outras técnicas, como os microarranjos (NOLAN et al, 2006).

A q-PCR também é amplamente utilizada em estudos de imunologia, tais como na expressão de citocinas (BRICARELLO et al., 2008). Esta técnica permite a quantificação de transcritos raros, além de detectar pequenas mudanças na expressão gênica. É rápida, fácil de ser executada e produz resultados confiáveis e reproduzíveis. Suas principais restrições estão relacionadas ao seu elevado custo, limitação quanto à extensão da sequência possível de ser amplificada, e esta sujeita a resultados não confiáveis em função da incorporação errônea de bases durante a replicação e a contaminação da amostra por DNA estranho (PFAFFL, 2014). É possível observar que muitos fatores podem influenciar nos resultados das quantificações e estes não estão estritamente relacionados à falha de equipamentos, mas às variações que ocorrem devido a erros de manipulação e normalização dos dados (BUSTIN; NOLAN, 2004).

Para que o experimento seja bem sucedido, a qualidade do RNA e a quantificação correta são imprescindíveis, de forma que são necessários cuidados para que não haja degradação do RNA, e também que estes sejam quantificados em um mesmo equipamento, pois é relatado que amostras-padrão de RNA quantificadas em diferentes equipamentos podem apresentar diferentes valores de concentração (NOLAN et al, 2006).

As amostras devem ser padronizadas de acordo com as quantidades iniciais de RNAs utilizados na síntese dos cDNAs, garantindo quantidades padronizadas de cDNA na reação de PCR (BUSTIN; NOLAN, 2004). O delineamento dos primers e a padronização das reações também devem ser realizados adequadamente, pois a formação de dímeros de primers, por exemplo, pode influir nos resultados (IBELLI et al., 2011).

É necessária uma acurada normalização dos dados, que deve ser feita por quantificação dos genes controle, ou seja, genes constitutivamente expressos. É de fundamental importância que mais de um gene controle seja testado e que o mais estável, com menor variação seja escolhido para ser o gene controle do experimento (PFAFFL,

2014). O motivo disso é porque já foi relatado que, muitos genes como o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a β -actina e as ubiquitinas, considerados constitutivos, podem apresentar expressão variável em determinados tratamentos e até mesmo entre diferentes tecidos (GOOSSENS et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comitê de ética

O presente trabalho teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Vale do Acaraú- UVA, sob número 020.12 em 26 de novembro de 2012.

3.2. Manejo sanitário e nutricional dos animais

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental Santa Rita, pertencente a Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no Município de Sobral, Ceará. No manejo nutricional, os animais tiveram acesso a 200 m² de pastagem cultivada e irrigada, constituída por *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia, dividida em cinco piquetes de 40 m². Cada piquete foi pastejado durante cinco dias, tendo um período de descanso de 20 dias. Os animais foram suplementados com concentrado constituído por milho e soja, contendo 18% de proteína bruta. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

Antes do início do experimento, os animais foram vermifugados, em dias alternados, com antihelmínticos de quatro grupos químicos diferentes: Closantel (10mg/kg); Ivermectina (0,2mg/kg); Levamisol (7,5mg/kg) e Moxidectin (0,2mg/kg). Este procedimento foi realizado para eliminar as infecções já existentes.

3.3. Caracterização parasitológica

As raças Anglo-nubiana e Saanen, consideradas resistentes e susceptíveis respectivamente (RICHARD et al., 1990; COSTA et al., 2000), foram utilizadas neste estudo. Foi realizado um primeiro cruzamento entre quatro machos da raça Anglo-nubiana com 100 fêmeas da raça Saanen, formando uma população de indivíduos F₁ (½ Anglo-nubiana x ½ Saanen). Animais F₁ não aparentados foram acasalados entre si para gerar a população de animais F₂. Destes 231, animais de ambos os sexos, foram utilizados no estudo. Estes animais foram provenientes de quatro estações de parição constituindo quatro

lotes experimentais, conforme descrição: lote experimental 1) composto por 72 animais de oito a dez meses de idade, formado entre junho e julho de 2007 (a fase experimental do primeiro e segundo desafio ocorreu durante três e cinco semanas de infecção, respectivamente); lote experimental 2) composto por 44 animais de cinco a seis meses de idade, formado entre janeiro e fevereiro de 2008 (a fase experimental do primeiro e segundo desafio ocorreu por cinco semanas de infecção, cada); lote experimental 3) composto por 56 animais de cinco a seis meses de idade, formado em agosto, setembro e outubro de 2008 (a fase experimental do primeiro e segundo desafio ocorreu por cinco semanas de infecção, cada); lote experimental 4) composto por 59 animais de cinco a seis meses de idade, formado entre julho e agosto de 2009 (a fase experimental do primeiro e segundo desafio ocorreu por cinco semanas de infecção, cada).

Dentro de cada experimento, os animais foram vermifugados e, após a confirmação que os animais estavam livres de infecção por meio de OPG foram alocados na área experimental naturalmente contaminada por larvas de trichostrongilídeos. Neste período, o OPG foi monitorado e o estudo foi considerado iniciado a partir da semana em que a contagem média do grupo foi diferente de zero, geralmente na terceira semana após a vermifugação, que corresponde ao período pré-patente, ou seja, o momento em que ocorreu a contaminação do pasto.

Semanalmente, para todos os lotes experimentais, foram coletadas amostras de fezes, para realização de exames coproparasitológicos (OPG e coprocultura) e amostras de sangue para exames hematológicos (volume globular, proteína plasmática total e eosinófilos sanguíneos). No mesmo dia, os animais também foram submetidos à avaliação pelo método Famacha.

Com base na contagem média de OPG, quando o rebanho eliminou em média 800 ovos/g de fezes, foram realizadas coletas de fezes durante três dias consecutivos, para certificar o nível de infecção e encerrar o primeiro desafio (McEWAN, 1994). Posteriormente, os animais foram vermifugados com os mesmos compostos químicos utilizados no início do experimento. A contagem de OPG foi acompanhada semanalmente até que esses valores estivessem zerados. A partir deste momento, os animais foram submetidos a um segundo desafio natural, visando novamente discriminar os diferentes níveis de resistência frente à infecção parasitária. Este segundo desafio seguiu os mesmos procedimentos do primeiro (Figura 1).

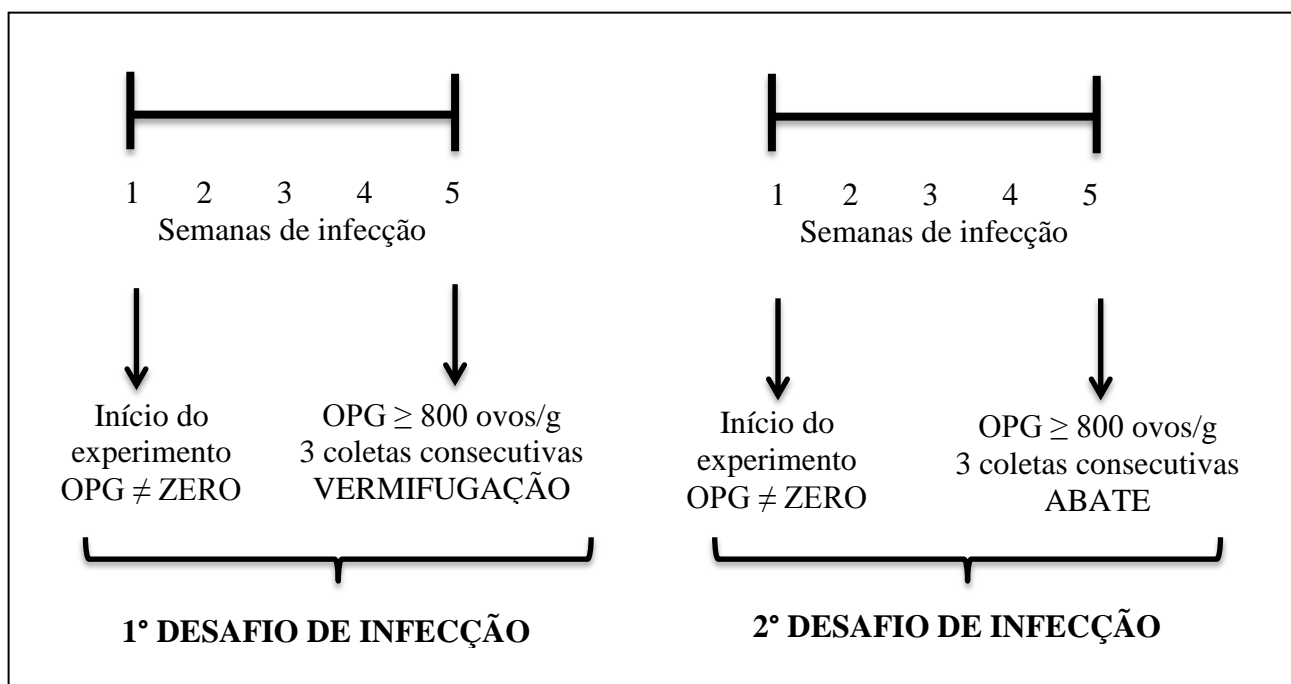


Figura 1. Esquema da caracterização fenotípica dos caprinos mestiços.

Ilustração: Maria Rosalba M. das Neves

Procedeu-se uma análise de cluster para a média das três mensurações em dias consecutivos de OPG, após transformação por $\text{LOG}_{10}(\text{OPG})$, para cada um dos desafios dentro de cada lote. Utilizou-se o método da variância mínima de Ward (1963). O objetivo deste procedimento foi separar os animais em dois clusters, de acordo com seus valores de OPG. Desta forma, foram selecionados, dentro de cada lote experimental, 12 animais que estavam no cluster de menor OPG, nos dois desafios, que foram considerados como resistentes, e 12 animais que estavam no cluster de maior OPG, também nos dois desafios, que foram considerados como susceptíveis às parasitoses gastrintestinais.

3.3.1. Exames coproparasitológicos

Amostras de fezes foram coletadas semanalmente, diretamente da ampola retal de cada animal e colocadas em sacos plásticos devidamente identificados e transportados ao Laboratório de Parasitologia, para a realização dos exames coproparasitológicos. Em cada amostra foi feita a contagem de OPG, de acordo com a técnica descrita por Gordon e Whitlock (1939) e modificada por Ueno e Gonçalves (1998). As culturas de fezes foram

realizadas de acordo com método de Roberts e O'Sullivan (1950) e a identificação de larvas foi feito de acordo com as características morfológicas descritas por Keith (1953).

3.3.2. Exames hematológicos

Foram coletadas amostras de sangue, a cada sete dias, direto da veia jugular em tubos de 5 mL, tipo vacutainer, contendo o anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), para determinação do volume globular, proteína plasmática total e contagem de eosinófilos sanguíneos.

O volume globular foi realizado por meio do método do micro-hematócrito, em que a leitura dos tubos capilares foi conduzida com o auxílio do cartão de micro-hematócrito (JAIN, 1993).

Para determinação da proteína plasmática total, foi utilizado um refratômetro ocular manual para mensurar o plasma sanguíneo de cada tubo de micro-hematócrito e procedeu-se a leitura segundo procedimento descrito por Wolf et al. (1962).

Os eosinófilos sanguíneos foram quantificados em câmara de Neubauer. Foi utilizada uma solução de Carpentier (3% formol; 2% eosina), onde 180 μ L de solução foi homogeneizada com 20 μ L de sangue com a finalidade de corar os eosinófilos. As amostras preparadas foram colocadas nas câmaras de Neubauer e a leitura foi realizada em microscópio óptico com objetiva de 10 vezes (DAWKINS et al., 1989). Os resultados foram expressos em número de células por μ L de sangue.

3.3.3. Escore Famacha

Semanalmente, a conjuntiva ocular dos animais foi avaliada para averiguar as diferentes tonalidades. Estas por sua vez podem variar de vermelho-rosado até o branco pálido, numa escala de 1 a 5, (1 = vermelho robusto, 2 = vermelho rosado, 3 = rosa, 4 = branco e 5 = branco pálido). Por meio deste método, os animais foram selecionados e classificados em uma das cinco categorias (VAN WYK; BATH, 2002).

3.3.4. Contagem dos nematoides gastrintestinais

Dentro de cada lote experimental, os 12 animais considerados como resistentes e os 12 animais considerados como susceptíveis foram necropsiados para a recuperação dos nematoides gastrintestinais e coleta dos tecidos do abomaso e intestino delgado. Na

necropsia, o trato gastrointestinal foi removido, sendo o abomaso e o intestino delgado separado por ligaduras duplas, usando-se barbantes. Em seguida, os compartimentos foram abertos para obtenção, lavagem e conservação de seus conteúdos em solução de Railliet (5% formol, 2% ácido acético e 93% solução fisiológica). Para a realização das contagens, foram retiradas alíquotas de aproximadamente 30 mL dos conteúdos do abomaso e do intestino delgado e colocados em placas de Petri. Por meio da utilização de uma lupa, foi possível observar os parasitos e realizar a contagem dos nematoides gastrintestinais presentes no material coletado do trato gastrointestinal (UENO; GONÇALVES, 1998).

3.4. Caracterização imunológica

3.4.1. Determinação dos níveis de imunoglobulinas

As amostras de sangue foram coletadas em tubos vacutainers de 5 mL sem EDTA. Posteriormente estas amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 minutos para obtenção do soro. Este foi aliquoteado em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20 °C, para posterior realização da técnica ELISA, para determinar os níveis séricos dos anticorpos IgG e IgA contra antígenos totais de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* adultos dos animais resistentes e susceptíveis.

Soros dos animais com contagens de OPG \leq 500 ovos/g foram utilizados como controle negativo e dos animais que apresentaram OPG $>$ 2500 ovos/g foram utilizados como padrão positivo para *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. A produção de antígenos foi descrita por Amarante et al. (2009).

Testes específicos para cada parasito foram realizados em microplacas de poliestireno (Nunc, USA). Os poços das placas foram revestidos com antígeno alvo, aplicando 100 μ L de solução de antígeno (5 μ g/mL) diluído em tampão bicarbonato de sódio (0,6 mM Na₂CO₃; pH 9,6) e armazenado a 4 °C por 12 horas. Todas as incubações subsequentes foram realizadas por 1 hora a 37 °C, utilizando em cada poço um total de 100 μ L de reagentes. Entre cada etapa, as placas foram lavadas três vezes com água ultra pura (EASYpure II UV, Barnstead, USA), contendo 0,05% de Tween 20 (ProPure® - Amresco). Após a lavagem, foi utilizado o tampão bloqueio PBS-GT, constituído de PBS (*phosphate buffered saline* - 0,13M NaCl; 0,003 M KCl; 0,10 M Na₂HPO₄; 0,0018 M KH₂PO₄), com pH 7,2, acrescido de 0,1% de gelatina (Amresco, USA) e 0,05 % de Tween 20 (ProPure® - Amresco). As amostras de soro foram diluídas em PBS-GT 1:500 e 1:2 para

IgG e a IgA, respectivamente e aplicadas em duplicata nos poços. Em seguida, as placas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-IgG de ovelha, diluído a 1:10.000 (A130-101P, Bethyl Laboratories, Inc. USA) e com anticorpo policlonal de coelho anti-IgA de ovelha, diluído a 1:5.000 (A130-108P, Bethyl Laboratories, Inc. USA). Finalmente a solução de substrato OPD (0,67 mg/mL de dicloridrato 1,2-fenilenodiamina; Dako, Denmark) foi adicionada em cada poço e a reação enzimática ocorreu em temperatura ambiente, no escuro por 15 minutos. A reação foi paralisada com a utilização de solução de ácido sulfúrico a 5%. As placas foram lidas imediatamente, utilizando leitor de ELISA automático (Biotrak II, Amersham-Biosciences, UK) a 492 nm. Os resultados foram expressos em porcentagens, com referência ao valor de densidade óptica (OD) (KANOBANA et al., 2002).

3.4.2. Exames histológicos

Os tecidos do abomaso e do intestino delgado foram coletados durante a necropsia e posteriormente fixados em formalina 10% por 36 horas. Em seguida foram lavados com água corrente e então armazenados em etanol 70%. Depois foram desidratados por um período de 1 hora, em soluções com concentrações crescentes de etanol (70%, 90%, 95% e 100%). Posterior à desidratação foi realizada a diafanação, para que o etanol presente nas amostras fosse substituído por xilol (LUNA, 1968).

Os eosinófilos e os leucócitos globulares foram contados nas secções de tecido (5 µm) coradas com H&E (hematoxilina e eosina) utilizando-se um microscópio óptico. Foram contados 30 campos aleatórios em cada lâmina, com a finalidade de quantificar as células de defesa presentes na superfície do abomaso e do intestino delgado (AMARANTE et al., 2005).

3.4.3. Expressão gênica

3.4.3.1. Extração de RNA

Os tecidos do abomaso (aproximadamente 2 g) foram coletados e imediatamente adicionados em uma solução de estabilização do RNA (RNA Holder, Bioagency, São Paulo). Em seguida, os tecidos foram armazenados a 4 °C por 12 horas. No dia seguinte, as amostras foram removidas do refrigerador e estocadas no -20 °C.

A extração de RNA total foi realizada segundo Chomczynski e Sacchi (1987). Os tecidos foram retirados da solução RNA Holder e macerados em nitrogênio líquido, com o auxílio de um almofariz e pistilo autoclavados. O reagente Trizol[®] foi utilizado para a extração de RNA; sendo que 1 mL deste foi adicionado em aproximadamente 50 mg de tecido macerado e então homogeneizados por meio da utilização do vórtex e incubados por 5 minutos a temperatura de 25 °C. Em seguida acrescentou-se 200 µL de clorofórmio nos tubos, com homogeneização e incubação a temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 x g e 4 °C. O sobrenadante (fase aquosa), onde se encontra o RNA, foi removido e aproximadamente 0,5 mL deste foi adicionado em um tubo (Eppendorff) limpo, juntamente com 0,5 mL de isopropanol. Estes foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente; em seguida procedeu-se a centrifugação a 12.000 x g a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, seguido de adição de 1 mL de etanol a 75% ao RNA precipitado. As amostras foram homogeneizadas em vórtex, seguido de nova centrifugação a 7.500 x g a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o RNA foi rapidamente seco por 5 minutos, em temperatura ambiente. Finalmente, foi ressuscitado em 20-50 µL de água DEPC (dietil-pirocarbonato) e armazenado no -80 °C, para uso posterior.

3.4.3.2. Quantificação do RNA

Uma alíquota da amostra de RNA foi dissolvida em tampão de eluição - TE Tris-EDTA (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 8,0) na proporção de 1:100 (2 µL de RNA: 198 µL TE). O espectrofotometro GeneQuant (Amershan Bioscience) foi utilizado para averiguar o grau de pureza do RNA, estimado pela razão das absorbâncias de 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), e para quantificação das amostras, por meio da absorbância de 260 nm (A_{260}) (SAMBROOK; RUSSEL, 2002; PFAFFL et al., 2002).

A integridade do RNA extraído das amostras foi avaliada após eletroforese em gel de agarose 1%. A eletroforese foi realizada por 30 minutos, a 120 V e com tampão TBE 1X (90 mM Tris-HCl, 88 mM ácido bórico, 2,6 mM EDTA; pH 8,3). Para a visualização das bandas, foi utilizado um transluminador (UV), no qual foi possível verificar a integridade das bandas dos RNAs ribossomais (rRNA) 18S e 28S (NOLAN et al., 2006).

3.4.3.3. Escolha dos genes

Os genes de interesse (IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, IL-13, MCP-1, MCP-2 e IFN- γ) foram escolhidos por estarem envolvidos na resposta imune de ruminantes em infecções por nematoides gastrintestinais (BRICARELLO et al., 2008; ZAROS et al., 2014). As sequências dos genes de interesse e respectivos cDNAs para caprinos, ovinos e bovinos foram obtidas no banco de dados FASTA disponível no GenBank (Tabela 1). Estas sequências foram utilizadas como referência e os genes caprinos equivalentes foram obtidos do genoma caprino (<http://www.goat.kiz.ac.cn/GGD/>) por meio do nucleotide blast (*basic local alignment search tool*). Para evitar a seleção de isoformas ou genes similares, foram considerados os maiores valores de score e os menores de e-value, evitando chances do alinhamento entre as duas sequências terem ocorrido por acaso (ALTSCHUL et al., 1990). Estas comparações foram feitas para cada cromossomo presente na base de dados, o que permitiu a determinação da sequência alvo para caprinos. Em seguida, a comparação das sequências caprinas foi feita utilizando nucleotide blast, blastx e tblastx, contra a base de dados não redundante (nr) do GenBank, para confirmar a identidade destes genes.

Tabela 1. Resultados da análise BLAST das sequências iniciais encontradas no GenBank contra o genoma caprino. As colunas representam: genes alvos estudados, sequências usadas para as buscas, espécies a que pertencem essas sequências, valores do score e do e-value resultantes do BLAST, localização cromossômica (Chr) e as sequências finais obtidas do genoma caprino.

Gene	Sequência inicial	Espécie	Score	E-value	Chr	Sequência final
IL-2	EF056469	Caprinos	7458	0,0	17	ENSP00000226730.1
IL-4	U34273	Caprinos	313	3e-84	7	ENSBTAP00000021215.1
IL-5	U35038.1	Ovinos	320	2e-86	7	ENSBTAP00000041739.1
IL-8	NM173925	Bovinos	1667	0,0	6	ENSBTAP00000026275.1
IL-10	AJ458378.1	Caprinos	390	7e-108	16	ENSBTAP00000008793.1
IL-12 p35	AF003542	Caprinos	316	4e-85	1	ENSP00000303231.1
IL-12 p40	AF007576	Caprinos	500	2e-140	7	ENSBTAP0000006222.1
IL-13	DQ679798	Ovinos	1665	0,0	7	ENSP00000304915.1
MCP-1	M84602.1	Bovinos	792	0,0	19	ENSP00000367832.1
MCP-2	S67954.1	Bovinos	847	0,0	19	ENSP00000378118-D2.1
INF- γ	U34232	Caprinos	646	0,0	5	ENSBTAP00000016634.1

Tabela 1. Resultados da análise BLAST das sequências iniciais encontradas no GenBank contra o genoma caprino. As colunas representam: genes de referência estudados, sequências usadas para as buscas, espécies a que pertencem essas sequências, valores do score e do e-value resultantes do BLAST, localização cromossômica (Chr) e as sequências finais obtidas do genoma caprino.

Gene	Sequência inicial	Espécie	Score	E-value	Chr	Sequência final
GAPDH	AJ431207	Caprinos	675	0,0	2	GLEAN_10020602.1
SDHA	NM_174178.2	Bovinos	408	1e-112	20	ENSP00000026
RPL-19	NM_001040516	Bovinos	1207	0,0	1	GLEAN_10004187

3.4.3.4. Delineamento dos primers

Após a determinação das sequências dos genes de interesse, procedeu-se o delineamento dos primers, por meio do programa Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi.bin/primer3plus.cgi>). Para efeitos de teste, foram delineados dois pares de primers para cada gene alvo e gene referência (GAPDH, SDHA e RPL-19). Adotou-se os seguintes critérios para a escolha do par de primer utilizado neste estudo: o par de primer delineado dentro de um mesmo éxon, para permitir a utilização de DNA genômico na construção da curva padrão; conteúdo GC entre 50 e 60% e temperatura de anelamento (Tm) de 57 °C; evitou-se repetições de 3 ou mais Gs ou Cs, pois estas podem promover dímeros de primers em regiões ricas em G ou C. Os genes, as sequências dos primers, éxon e o tamanho dos produtos encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Genes, sequência dos primers, posição nos éxon e o tamanho dos produtos (pb).

Gene	Primers	Éxon	pb
IL-2	F –TTGCACTAACTCTTGCACTCG R- TCCAGCAGCAATGACTTCAC	1	91
IL-4	F-GTACCAGCCACTTCGTCCAT R-TGAGGATGTTTCAGCGTTTTG	1	75
IL-5	F-TGGAGCTGCCTATGTTTGTG R-CAGAGTTTGATGCGTGGAGA	1	94
IL-8	F-CGATGCCAATGCATAAAAAC R- TCTGAATTTTCGCAGTGTGG	2	98
IL-10	F- GCCAAGCCTTGTCAGAAATG R- TTCACGTGCTCCTTGATGTC	3	91
IL-12 p35	F- GCCCTGGAAGAACTGGATTT R- TCTGTCGATGGTCACTGCAC	5	90

Tabela 2. Genes, sequência dos primers, posição nos éxon e o tamanho dos produtos (pb).

Gene	Primers	Éxon	pb
IL-12 p40	F- GTCAGCTGGGAGTACCCTGA R- TTGTTCTTTCCCTGGACCTG	5	86
IL-13	F- TGATCAGCATCTCCAACCTGC R- TTAGCTGAGGGCTTGTGAGG	3	82
MCP-1	F-TGCAATTAACCTCCCAAATCG R- TGCTGGTGGTACTCTTCTG	2	92
MCP-2	F- AGCGGACAAGGAGGTCTGT R-TTGGTCCAGGAGCTTTATGG	3	70
IFN- γ	F- GCGCAAAGCCATAAAATGAAC R-GGCCTCGAAAGAGATTCTGA	4	98
GAPDH	F-GGTTGTGGATCTGACCTGCT R-TGACACCTGCTTCATCACCT	1	76
SDHA	F-TCTGGAACACTGACCTGGTG R-CTCCGCTCCGTAGATGGTCT	11	80
RPL-19	F-CTGCTCAGACGATACCGTGA R-TTGTCTGCCTTCAGCTTGTG	1	131

3.4.3.5. Extração de DNA

Amostras de sangue (60 mL) de uma cabra foram coletadas em tubos vacutainers de 5 mL com EDTA e armazenadas a -20 °C, por 48 horas, para lisar as hemácias. Após este período, os tubos foram removidos e colocados a 4 °C para descongelar. A primeira centrifugação do sangue foi realizada a 3.000 x g por 10 minutos, para remoção do sobrenadante. Nas demais centrifugações, sobre as amostras, foram adicionados 1500 μ L de PBS (0,13 M NaCl; 0,003 M KCl ; 0,008 M Na₂HPO₄; 0,0015 M KH₂PO₄). Este procedimento foi repetido por aproximadamente 3 vezes, até o pellet de células brancas ficar claro. Sobre este, adicionou-se 1500 μ L da solução de lise (0,2% SDS - *sodium dodecyl sulfate*; 50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl) e 15 μ L de RNase (10mg/mL). Em seguida, o mix foi transferido para micro tubos (Eppendorfs) e incubado em banho seco a 65 °C por 1 hora e a cada 5 minutos foi homogeneizado. As amostras foram removidas do banho seco e adicionadas 1500 μ L de acetato de potássio a 5 mM, armazenadas na geladeira por 2 horas e centrifugadas a 13.000 x g por 15 minutos a 25 °C. De cada amostra, foram retirados aproximadamente 600 μ L do sobrenadante (DNA) e adicionados em 600 μ L de isopropanol. Após 5 minutos de incubação, à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 13.000 x g por 15 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi removido, o DNA foi incubado à temperatura ambiente para secagem e diluído em 100 μ L de TE (1

mM EDTA, 10mM Tris-HCL; pH 8,0) para a junção de todas as amostras em um único tubo. Adicionou-se 500 µL de fenol equilibrado (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0):clorofórmio (1:1), seguido de homogeneização. Na bancada, a reação agiu por aproximadamente 15 minutos e a amostra foi centrifugada a 13.000 x g por 15 minutos a 25 °C. Desta, 400 µL do sobrenadante foi coletada e adicionada em 100 µL de TE; neste mesmo tubo acrescentou-se 500 µL de fenol: clorofórmio e em seguida foi centrifugado a 13.000 x g 15 minutos a 25 °C. Aproximadamente 400 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo, com 400 µL de isopropanol e centrifugado a 13.000 x g por 30 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi suspenso em 200 µL de etanol a 75% e centrifugado a 13.000 x g por 15 minutos a 25 °C. Em seguida descartou-se novamente o sobrenadante e o pellet foi suspenso em 100 µL de TE. Um espectrofotômetro foi utilizado para estimar o grau de pureza (A_{260}/A_{280}) e quantificação (A_{260}) do DNA. Para avaliar a integridade do DNA, foi realizada a eletroforese em gel de agarose.

3.4.3.6. RT-qPCR

As amostras foram tratadas com DNase (Promega-USA) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. Em seguida procedeu-se o processo transcrição reversa e amplificação do qPCR em um único passo. O procedimento foi conduzido com a utilização do kit comercial Superscript® (Invitrogen by Life Technologies, EUA). As reações de RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 20 µL como descrito a seguir para RNA total e DNA. Para RNA total: 3,0 µL de RNA (300 ng); 5,7 µL de H₂O livre de DNase e RNase (Sigma, Aldrich, Brasil); 10 µL de Syber® GreenER™ qPCR Super Mix Universal (1x); 0,5 µL de Super Script® Mix for One-Step GreenER™; 0,4 µL de Forward Primer (10 µM); 0,4 µL de Reverse Primer (10 µM). Para DNA genômico, a composição de cada reação foi: 2,0 µL de DNA; 6,7 µL de H₂O livre de DNase e RNase (Sigma, Aldrich, Brasil); 10 µL de Syber® GreenER™ qPCR Super Mix Universal (1x); 0,5 µL de Super Script® Mix for One-Step GreenER™; 0,4 µL de Forward Primer (10 µM); 0,4 µL de Reverse Primer (10 µM). As reações com DNA genômico foram montadas a partir de diluições seriadas, contendo número de genoma final variando de 100 a 100.000 cópias por reação. A massa molecular de 1 genoma de cabra foi estimada de acordo com o tamanho do genoma de 2,66 Gb (DONG et al., 2013). Os 20 µL foram colocados em microtubos com tampas ópticas (Masterclear cap strips, Hamburg, Germany). Todas as etapas da

reação foram realizadas no mastercycle egradient S (Eppendorf, Germany) para a reação de transcriptase reversa e amplificação em um único passo. As temperaturas utilizadas foram 50 °C por 5 minutos, 95 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de PCR cada um composto de 95 °C por 15 s; 57 °C por 1 minuto, 95 °C por 15 minutos; 60 °C por 15 minutos e 95 °C por 15 minutos. Cada conjunto de amostras submetido à amplificação foi acompanhado de um controle negativo, o qual continha todos os reagentes e água livre de DNase e RNase.

Os valores de Ct das reações de diluição seriada de DNA genômico foram utilizados para a construção de uma curva padrão (valores de Ct vs. número de cópias) cujo valor de inclinação (R) nos permite determinar a eficiência da reação de amplificação, utilizando a equação $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ (PFAFFL, 2001), onde E é a eficiência da reação e slope é a inclinação angular da reta da regressão linear (BUSTIN et al., 2009). Desta maneira foi possível determinar o número de cópias nas amostras de RNA total ao plotarmos os valores de Ct de RNA na curva padrão de DNA.

3.4.3.7. Genes constitutivos

Foram testados três genes constitutivos: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína ribomassal L-19 (RPL-19) e succinate dehydrogenase (SDHA) (HUGGETT et al., 2005; DE JONGE et al., 2007). Após a obtenção dos valores de Ct de todos os genes para cada grupo estudado foi utilizado análises não paramétricas usando o Relative Expression Software Tool-REST[®] 2009, com o objetivo de testar as significâncias dos transcritos pelo teste de *Pair Wise Fixed Rellocation Randomisation* (teste de casualização por meio da realocação fixa aos pares) para verificar as possíveis variações de expressão de mRNA entre os grupos analisados.

3.5. Análise estatística

Para a caracterização parasitológica os dados foram analisados pelo Proc GLM do software SAS (SAS Institute, 1996), aplicando uma ANOVA com medidas repetidas no tempo e entre grupos (resistentes x susceptíveis), utilizando o teste de Bonferroni para comparação de médias ($P < 0,05$). Os dados de OPG, volume globular, proteína plasmática total, eosinófilos e Famacha foram analisados quanto à normalidade de suas distribuições pelo teste Shapiro-Wilk e Bartlett. Para o atendimento das pressuposições de uma

ANOVA, as variáveis foram analisadas, para cada lote experimental, após as seguintes transformações: lote experimental 1) $\log_{10}(\text{EOS})$ e $1/\log_{10}(\text{OPG}+10)$; lote experimental 2) $(\text{EOS}+1)^{0,3}$, $1/\log_{10}(\text{PPT})$ e $\log_{10}(\text{OPG}+10)$; lote experimental 3) $\log_{10}(\text{EOS}+1)$ e $\log_{10}(\text{OPG}+10)$; e, lote experimental 4) $\log_{10}(\text{EOS}+1)$ e $\log_{10}(\text{OPG}+10)$.

Nas análises de dosagens de imunoglobulinas, os dados de densidade óptica para IgA do *Haemonchus contortus* (IgA Hc), IgA do *Trichostrongylus colubriformis* (IgA Tc), IgG do *Haemonchus contortus* (IgG Hc) e IgG do *Trichostrongylus colubriformis* (IgG Tc) foram analisados pelo Proc GLM do software SAS (SAS Institute, 1996), utilizando ANOVA com medidas repetidas no tempo e entre grupo de animais (resistentes x susceptíveis). Para atender as pressuposições de uma análise de variância, algumas características foram analisadas após transformação. As transformações foram: $\log_{10}(\text{IgA Hc} +100)$, $1/(\text{IgA Tc}+100)$ e $\log_{10}(\text{IgG Hc} +10)$.

Nas análises histológicas, os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Com isso foi aplicada ANOVA, a fim de testar as hipóteses de igualdade de médias dos grupos, considerando-se o nível de 5% de significância (SAS Institute, 1996).

Os resultados obtidos pela técnica de RT-qPCR foram analisados pelo software Relative Expression Software Tool - REST 2009, as diferenças entre os transcritos foram verificadas pelo teste de *Pair Wise Fixed Rellocation Randomisation*. O modelo matemático utilizado para a obtenção das expressões relativas baseou-se na quantificação do gene alvo em relação ao gene constitutivo (SDHA), com a finalidade de se minimizar as possíveis variações quanto à quantidade de RNA utilizada e a eficiência obtida na RT-qPCR. A expressão relativa foi dada pela razão entre as diferenças de média do grupo controle (resistente) e grupo tratamento (susceptível) para os genes alvo e referência, conforme a seguinte equação (PFAFFL, 2001):

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{Ct alvo}}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta\text{Ct referência}}}$$

Em que E representa a eficiência da amplificação; Ct, o ciclo limiar (ponto inicial da detecção da amplificação do produto desejado) e ΔCt , a diferença do Ct das amostras (controle e tratamento) de cada gene alvo e o Ct do gene referência; $\Delta\text{Ct alvo} = \text{Ct médio}$

do grupo resistente – Ct médio do grupo susceptível; Δ Ct referência = Ct médio do grupo resistente – Ct médio do grupo susceptível.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização parasitológica

Os animais caracterizados como resistentes apresentaram menores valores médios semanais na contagem de OPG e Famacha, e maiores médias de eosinófilos sanguíneos, porcentagem de volume globular e proteína plasmática total, que o grupo susceptível, no 1º desafio do lote experimental 1 (Tabela 3). A diferença na contagem de OPG foi significativa ($P < 0,05$) entre os grupos analisados, a partir da segunda semana de infecção. As diferenças nas contagens de eosinófilos sanguíneos e proteína plasmática total não foram significativas ($P > 0,05$) entre os grupos resistentes e susceptíveis. A diferença no volume globular foi significativa ($P < 0,05$) na terceira semana de infecção e aquela para o Famacha na primeira semana.

No 2º desafio, do lote experimental 1, observou-se que a partir da terceira semana de infecção, o valor médio do OPG para o grupo resistente foi inferior ($P < 0,05$) ao grupo susceptível (Tabela 4). As contagens de eosinófilos sanguíneos, volume globular, proteína plasmática total e Famacha não diferiram ($P > 0,05$) entre os grupos analisados, neste desafio.

Tabela 3. Média semanal (SEM1, SEM2 e SEM3) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e escore Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 1º desafio de infecção do lote experimental 1.

	SEM 1		SEM 2		SEM 3	
	R	S	R	S	R	S
OPG	136,36 ^a	341,67 ^a	350,00 ^b	3116,67 ^a	633,33 ^b	7191,67 ^a
EOS	1602,08 ^a	1258,33 ^a	1375,00 ^a	1052,08 ^a	1814,58 ^a	1322,92 ^a
VG	28,17 ^a	26,83 ^a	28,08 ^a	25,67 ^a	28,25 ^a	25,50 ^b
PPT	7,00 ^a	6,94 ^a	7,10 ^a	6,99 ^a	7,24 ^a	7,23 ^a
FAM	1,67 ^b	2,17 ^a	1,92 ^a	2,25 ^a	-	-

^{a, b} Médias diferentes, entre grupos, na mesma semana, diferem pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$)

Tabela 4. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM 4 e SEM 5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e escore Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistente (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 2° desafio de infecção do lote experimental 1.

	SEM 1		SEM 2		SEM 3		SEM 4		SEM 5	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
OPG	25,00 ^a	18,18 ^a	16,67 ^a	0 ^a	109,09 ^b	527,27 ^a	258,33 ^b	2100,0 ^a	233,33 ^b	2308,3 ^a
EOS	797,9 ^a	647,92 ^a	988,6 ^a	656,2 ^a	1695,8 ^a	1679,1 ^a	1540,0 ^a	1514,5 ^a	1254,1 ^a	1681,2 ^a
VG	25,67 ^a	25,75 ^a	26,27 ^a	26,08 ^a	26,92 ^a	27,58 ^a	25,92 ^a	25,83 ^a	26,08 ^a	25,17 ^a
PPT	7,38 ^a	7,37 ^a	7,31 ^a	7,43 ^a	7,19 ^a	7,55 ^a	7,60 ^a	7,48 ^a	7,36 ^a	7,58 ^a
FM	1,92 ^a	1,83 ^a	2,08 ^a	2,08 ^a	1,67 ^a	1,75 ^a	1,83 ^a	1,92 ^a	-	-

^{a, b} Médias diferentes, entre grupos, na mesma semana, diferem pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$)

Nas culturas fecais, o gênero predominante foi *Haemonchus* sp., seguido por *Trichostrongylus* sp. (Figura 2).

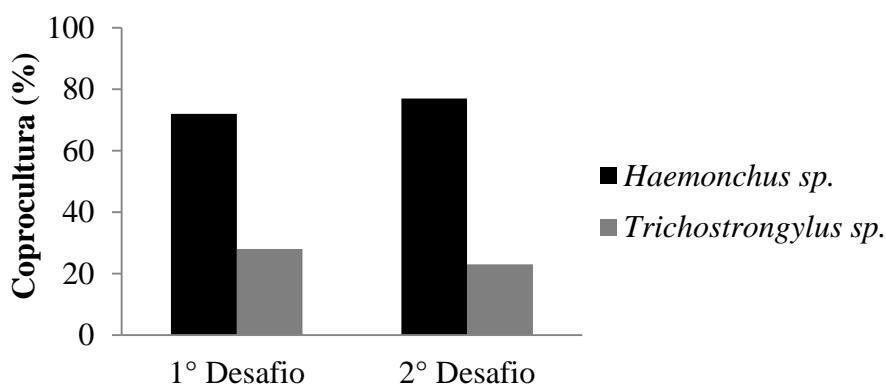


Figura 2. Porcentagem de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais identificadas em coproculturas de caprinos mestiços, nos dois desafios de infecção no lote experimental 1.

A contagem de OPG foi inferior no grupo resistente, sendo esta diferença significativa ($P < 0,05$) a partir da terceira semana de infecção (Tabelas 5 e 6) no lote experimental 2. A diferença nos níveis de eosinófilos sanguíneos diferiu na primeira semana de infecção, no 1° e 2° desafio. As diferenças nos níveis de proteína plasmática total e escore Famacha, nos dois desafios de infecção, não diferiram entre os grupos analisados ($P > 0,05$). A diferença na porcentagem do volume globular, tanto no 1° como no

2º desafio, foi significativo ($P < 0,05$), na terceira e quinta semana de infecção do lote experimental 2.

Tabela 5. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e escore Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 1º desafio de infecção do lote experimental 2.

	SEM 1		SEM 2		SEM 3		SEM 4		SEM 5	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
OPG	9,08 ^a	58,33 ^a	18,18 ^a	36,36 ^a	90,91 ^b	363,64 ^a	1333,3 ^b	3458,3 ^a	879,17 ^b	4708,3 ^a
EOC	177,0 ^a	114,58 ^b	143,7 ^a	91,67 ^a	212,50 ^a	152,27 ^a	87,50 ^a	68,75 ^a	427,08 ^a	433,33 ^a
VG	26,92 ^a	24,42 ^a	26,75 ^a	24,58 ^a	27,25 ^a	24,18 ^b	24,08 ^a	20,92 ^a	24,67 ^a	19,58 ^b
PPT	7,22 ^a	7,32 ^a	6,73 ^a	6,85 ^a	6,87 ^a	6,83 ^a	6,67 ^a	6,61 ^a	6,77 ^a	6,62 ^a
FAM	1,92 ^a	2,00 ^a	1,58 ^a	1,67 ^a	1,75 ^a	2,08 ^a	2,08 ^a	1,92 ^a	-	-

^{a, b} Médias diferentes, entre grupos, na mesma semana, diferem pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$)

Tabela 6. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e escore Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 2º desafio de infecção do lote experimental 2.

	SEM 1		SEM 2		SEM 3		SEM 4		SEM 5	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
OPG	8,33 ^a	25,00 ^a	54,54 ^a	63,64 ^a	16,67 ^b	258,33 ^a	666,67 ^b	1766,6 ^a	666,67 ^b	2758,3 ^a
EOC	100,0 ^b	245,83 ^a	212,6 ^a	183,3 ^a	263,64 ^a	225,00 ^a	188,64 ^a	147,92 ^a	477,08 ^a	300,00 ^a
VG	28,75 ^a	25,92 ^a	28,9 ^a	27,33 ^a	27,18 ^a	24,50 ^b	25,36 ^a	24,75 ^a	25,92 ^a	21,33 ^b
PPT	7,31 ^a	7,38 ^a	6,79 ^a	7,25 ^a	7,21 ^a	7,24 ^a	6,85 ^a	6,84 ^a	6,75 ^a	6,96 ^a
FAM	1,75 ^a	1,42 ^a	1,67 ^a	1,67 ^a	1,75 ^a	1,54 ^a	1,75 ^a	2,00 ^a	-	-

^{a, b} Médias diferentes, entre grupos, na mesma semana, diferem pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$)

Nas coproculturas do lote experimental 2, *Trichostrongylus* sp foi o gênero predominante, seguido por *Haemonchus* sp. e *Oesophagostomum* sp. (Figura 3).

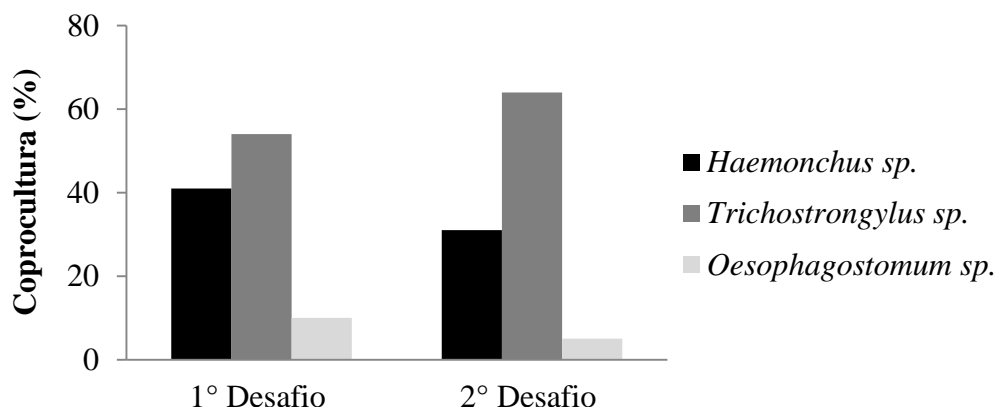


Figura 3. Porcentagem de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais identificadas em coproculturas de caprinos mestiços, nos dois desafios de infecção do lote experimental 2.

As diferenças nas contagens de OPG, eosinófilos sanguíneos, volume globular, proteína plasmática total e Famacha não foram significativas entre os grupos analisados ($P > 0,05$), nos dois desafios de infecção do lote experimental 3 (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e escore Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 1º desafio de infecção do lote experimental 3.

	SEM 1		SEM 2		SEM 3		SEM 4		SEM 5	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
OPG	36,36 ^a	27,27 ^a	150,0 ^a	166,6 ^a	366,67 ^a	363,64 ^a	858,33 ^a	781,82 ^a	2209,0 ^a	1266,6 ^a
EOC	729,1 ^a	464,58 ^a	791,6 ^a	670,8 ^a	627,08 ^a	554,17 ^a	327,27 ^b	552,08 ^a	597,92 ^a	481,25 ^a
VG	25,50 ^a	23,92 ^a	24,33 ^a	24,08 ^a	23,27 ^a	23,55 ^a	22,42 ^a	22,75 ^a	23,08 ^a	21,67 ^a
PPT	7,04 ^a	7,17 ^a	6,60 ^a	6,82 ^a	6,89 ^a	6,91 ^a	6,94 ^a	7,01 ^a	6,57 ^a	6,82 ^a
FAM	1,75 ^a	2,00 ^a	1,75 ^a	1,92 ^a	2,00 ^a	1,83 ^a	2,00 ^a	2,08 ^a	-	-

^{a, b} Médias diferentes, entre grupos, na mesma semana, diferem pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$)

Tabela 8. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e escore Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 2º desafio de infecção do lote experimental 3.

	SEM 1		SEM 2		SEM 3		SEM 4		SEM 5	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
OPG	9,09 ^a	636,64 ^a	50,00 ^a	16,67 ^a	400,00 ^a	363,64 ^a	383,33 ^a	275,00 ^a	1536,3 ^a	1183,3 ^a
EOC	808,3 ^a	577,08 ^a	814,5 ^a	610,4 ^a	331,25 ^a	333,33 ^a	325,00 ^a	356,25 ^a	372,92 ^a	395,83 ^a
VG	23,00 ^a	22,33 ^a	24,17 ^a	23,50 ^a	23,33 ^a	23,42 ^a	21,33 ^a	22,27 ^a	18,42 ^a	19,58 ^a
PPT	7,23 ^a	7,34 ^a	7,32 ^a	7,45 ^a	7,59 ^a	7,87 ^a	7,55 ^a	7,66 ^a	7,01 ^b	7,39 ^a
FAM	2,00 ^a	1,75 ^a	1,83 ^a	1,83 ^a	1,75 ^a	1,75 ^a	2,33 ^a	2,08 ^a	2,42 ^a	1,83 ^b

^{a, b} Médias diferentes, entre grupos, na mesma semana, diferem pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$)

Nas culturas fecais do lote experimental 3, o gênero predominante foi *Trichostrongylus* sp., seguido por *Haemonchus* sp. (Figura 4).

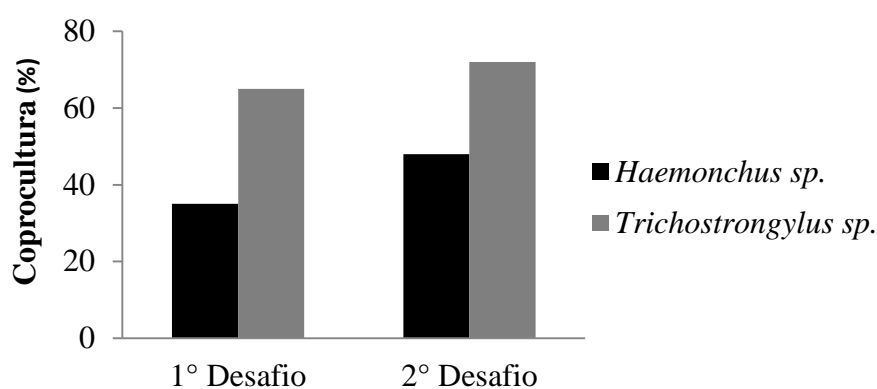


Figura 4. Porcentagem de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais identificadas em coproculturas de caprinos mestiços, nos dois desafios de infecção do lote experimental 3.

No 1º desafio de infecção do lote experimental 4, a diferença na contagem de OPG entre os grupos analisados foi significativa ($P < 0,05$) a partir da terceira semana (Tabela 9). No 2º desafio deste lote experimental, a diferença no OPG entre os grupos diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) na quarta e quinta semana (Tabela 10). Nos dois desafios de infecção, as diferenças nos níveis de eosinófilos sanguíneos não diferiram ($P > 0,05$) entre os dois grupos. A diferença no volume globular diferiu entre os grupos ($P < 0,05$) na quarta semana, enquanto aquela para os níveis de proteína plasmática total diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) na quarta e quinta semana de infecção. A diferença no escore Famacha diferiu entre os grupos ($P < 0,05$) apenas na terceira semana do 1º desafio de infecção.

Tabela 9. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e escore Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 1° desafio de infecção do lote experimental 4.

	SEM 1		SEM 2		SEM 3		SEM 4		SEM 5	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
OPG	63,64 ^a	100,00 ^a	772,7 ^a	1200,0 ^a	583,3 ^b	3366,6 ^a	954,54 ^b	4825,0 ^a	3600,0 ^b	5827,2 ^a
EOS	175,0 ^a	135,42 ^a	425,0 ^a	439,58 ^a	452,0 ^a	560,42 ^a	470,83 ^a	370,45 ^a	825,00 ^a	689,58 ^a
VG	28,50 ^a	28,67 ^a	27,00 ^a	25,92 ^a	26,75 ^a	24,92 ^a	25,50 ^a	22,27 ^b	25,33 ^a	22,92 ^a
PPT	6,66 ^a	6,59 ^a	6,34 ^a	6,27 ^a	6,12 ^a	5,94 ^a	6,06 ^a	5,58 ^b	6,06 ^a	5,40 ^b
FAM	1,33 ^a	1,67 ^a	1,83 ^a	1,92 ^a	1,83 ^b	2,25 ^a	2,00 ^a	2,17 ^a	1,83 ^a	2,00 ^a

^{a, b} Médias diferentes, entre grupos, na mesma semana, diferem pelo teste de Bonferroni (P<0,05)

Tabela 10. Média semanal (SEM1, SEM2, SEM3, SEM4 e SEM5) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), eosinófilos (EOS), volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e escore Famacha (FAM) de caprinos mestiços caracterizados como resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais, submetidos ao 2° desafio de infecção do lote experimental 4.

	SEM 1		SEM 2		SEM 3		SEM 4		SEM 5	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
OPG	58,33 ^a	9,09 ^a	55,55 ^a	83,33 ^a	725,00 ^a	618,18 ^a	525,00 ^b	2016,6 ^a	908,33 ^b	2250,0 ^a
EOS	1052,0 ^a	662,5 ^a	620,8 ^a	650,0 ^a	1083,3 ^a	1295,4 ^a	722,73 ^a	477,27 ^a	645,45 ^a	647,92 ^a
VG	25,83 ^a	26,08 ^a	27,67 ^a	27,83 ^a	26,25 ^a	24,67 ^a	26,67 ^a	23,00 ^b	24,08 ^a	22,08 ^a
PPT	6,72 ^a	6,98 ^a	6,61 ^a	6,58 ^a	6,46 ^a	6,07 ^a	6,82 ^a	6,41 ^b	6,55 ^a	5,92 ^b
FAM	1,83 ^a	1,92 ^a	2,36 ^a	2,18 ^a	1,58 ^a	2,08 ^a	1,83 ^a	2,00 ^a	-	-

^{a, b} Médias diferentes, entre grupos, na mesma semana, diferem pelo teste de Bonferroni (P<0,05)

Nas culturas fecais do lote experimental 4, o gênero predominante foi *Haemonchus* sp., seguido por *Trichostrongylus* sp. e *Oesophagostomun* sp. (Figura 5).

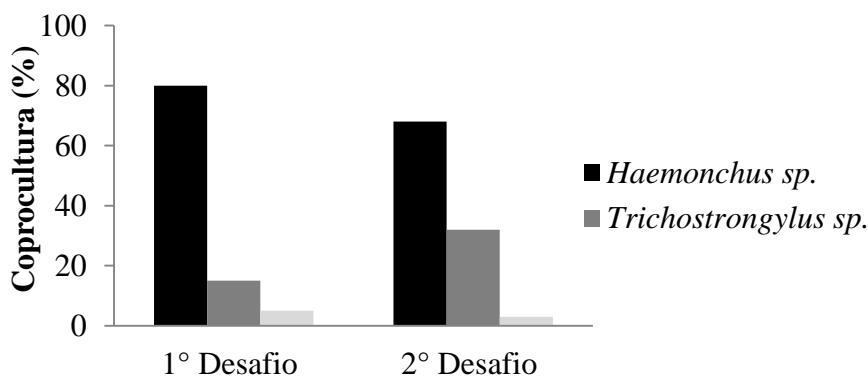


Figura 5. Porcentagem de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais identificadas em coproculturas de caprinos mestiços, nos dois desafios de infecção do lote experimental 4.

De acordo com os resultados encontrados nos quatro lotes experimentais, observou-se, por meio das contagens médias de OPG, que foi possível selecionar animais quanto à resistência e à susceptibilidade, nos dois desafios de infecção. Apesar das variações nas médias de OPG entre os grupos, principalmente nas primeiras semanas de infecção, observou-se que a contagem de OPG aumentou acentuadamente a partir da terceira semana de infecção, principalmente no grupo susceptível, indicando uma maior sensibilidade desses animais às endoparasitoses gastrintestinais. Em outros estudos, a contagem de OPG também foi um marcador fenotípico eficiente na identificação de animais com diferentes níveis de resistência (MILLER et al., 2006; ZAROS et al., 2014).

Basseto et al. (2009) utilizaram a contagem média de OPG para caracterizar ovinos resistentes e susceptíveis às parasitoses gastrintestinais. No estudo deles, os dez animais que apresentaram as maiores contagens médias de OPG (3.640 ovos/g) foram caracterizados como susceptíveis e os dez animais com as menores contagens médias de OPG (885 ovos/g) foram caracterizados como resistentes.

Trabalho conduzido na Embrapa Caprinos e Ovinos demonstrou que é possível aumentar a resistência de ovinos da raça Santa Inês aos parasitos gastrintestinais selecionando para menores valores de OPG (LÔBO et al., 2009). Em outro trabalho, o OPG também foi utilizado para caracterizar caprinos Anglo-nubiana, Bhuj e Canindé quanto à resistência aos nematoides gastrintestinais (COSTA et al., 2000). Este parâmetro foi eficaz na seleção, tanto de animais como também de raças mais resistentes às parasitoses.

As coproculturas foram realizadas para identificar e quantificar os gêneros dos strongilídeos presentes no trato gastrintestinal dos animais analisados. Em trabalhos conduzidos com caprinos e ovinos, *Haemonchus* sp. foi o gênero que apresentou maior prevalência (ROCHA et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; BASSETO et al., 2009), o que está de acordo com os resultados das coproculturas do primeiro e quarto lote experimental, sendo que neste último também observou-se a presença de *Oesophagostomum* sp. No

segundo e terceiro lote, o gênero predominante foi o *Trichostrongylus* sp., mas o *Haemonchus* sp. também apresentou elevada prevalência.

A contagem de eosinófilos sanguíneos, nos dois desafios dos lotes experimentais, não foi uma ferramenta eficaz para a caracterização dos animais quanto aos diferentes níveis de resistência ($P > 0,05$). Os eosinófilos são considerados por muitos investigadores um elemento importante na resposta inflamatória contra helmintos (BUDDLE et al., 1992). Nestas infecções, os eosinófilos desempenham importante papel, principalmente na produção de enzimas tóxicas à cutícula dos helmintos (SOUZA et al. 2006).

Em concordância com o presente estudo, Sotomaior et al. (2007) não encontraram diferença na média do número de eosinófilos em grupos de ovinos da raça Hampshire Down e ovelhas mestiças resistentes e susceptíveis às parasitoses gastrintestinais. Zaros et al. (2014) também não observaram diferença significativa na contagem de eosinófilos em grupos de ovinos Somalis Brasileiro resistentes e susceptíveis ao *Haemonchus contortus*. Já Buddle et al. (1992) em trabalho realizado com cordeiros Romney, observaram correlação negativa (baixa a moderada) entre contagem de eosinófilos e a manifestação da resistência ao *Trichostrongylus colubriformis*, bem como diferenças significativas entre valores de OPG (menor no grupo resistente) e contagens de eosinófilos (maior no grupo resistente). A separação dos grupos experimentais em linhagens de progenitores e a utilização de rebanhos selecionados para resistência e susceptibilidade com base em valores de OPG foram fatores importantes para os resultados observados e que diferem do presente estudo.

A diferença na porcentagem média do VG, nos dois desafios, não diferiu ($P > 0,05$) entre os grupos, na maioria das semanas experimentais, exceto na terceira e quinta semana ($P < 0,05$) do lote experimental 2 e na quarta semana ($P < 0,05$) do lote experimental 4. O valor médio de VG do grupo resistente aumentou na maioria dos lotes experimentais, o que demonstra que este grupo estava reagindo ao aumento da infecção. Esta observação coincidiu com a elevação da contagem de OPG do grupo susceptível. Amarante et al. (1998) verificaram uma relação inversamente proporcional entre a contagem de OPG e os valores de VG, o que está de acordo com os dados obtidos no presente estudo.

Sotomaior et al. (2007) em trabalho realizado com caprinos mestiços durante 11 meses, na região sul do Brasil, os valores médios de VG foram 29,7% para os animais resistentes e 22,83% para os susceptíveis. Basseto et al. (2009), em trabalho realizado

durante 8 meses, com ovelhas resistentes e susceptíveis aos nematoides gastrintestinais, observaram que o VG do grupo resistente foi mais elevado do que o susceptível.

A diferença do nível de PPT, não diferiu estatisticamente ($P > 0,05$) entre os grupos analisados, na maioria dos lotes experimentais, exceto na quarta e quinta semana de infecção ($P < 0,05$), nos dois desafios, do lote experimental 4.

Ovelhas mestiças da raça Somalis Brasileira, naturalmente infectadas por *Haemonchus contortus*, foram avaliadas, durante 98 dias, quanto ao perfil parasitológico (OPG) e hematológico (VG e PPT; ZAROS et al., 2014). Observou-se que os animais do grupo resistente apresentaram menores valores de OPG (508 ovos/g) que o susceptível (1.311 ovos/g). Os valores de VG e PPT foram maiores no grupo resistente (27.2 % e 6,1 g/dL, respectivamente). Bricarrello et al. (2002), em trabalho realizado com ovinos Corriedale e Crioula, infectados por nematoides gastrintestinais, observaram uma diminuição gradativa na PPT, a partir do início do experimento (6,0 a 7,5 g/dL, respectivamente) até seis semanas pós-infecção (4,98 a 5,14 g/dL, respectivamente).

Mediante ao exposto, observou-se que o VG e a PPT, quando avaliados em um período superior a três meses, são parâmetros eficazes para caracterização de animais quanto à resistência ou susceptibilidade às parasitoses gastrintestinais. Possivelmente, no presente trabalho, estas ferramentas não apresentaram maior eficácia devido ao curto período de infecção a que os animais dos lotes experimentais foram submetidos.

Os animais de todos os lotes iniciaram o experimento com graus Famacha variando entre 1 e 2, indicando que estes animais não estavam anêmicos. Na maioria dos lotes não houve coleta na última semana de infecção, exceto na quinta semana, do 2º desafio, do lote experimental 3 e na quinta semana, do 1º desafio, do lote experimental 4. Para o grupo resistente, o Famacha apresentou valores mínimo e máximo de 1 e 2, e o susceptível, com 1 e 3, respectivamente. Nenhum animal apresentou Famacha 4 ou 5. Em ambos os grupos, o Famacha foi composto por quedas e picos nos dois desafios analisados.

O Famacha permite diagnosticar clinicamente animais com diferentes graus de anemia em infecções por *Haemonchus contortus* (MOLENTO et al., 2004). No presente estudo, este método não foi eficaz, possivelmente em virtude dos animais experimentais compartilharem a mesma área com outros animais que receberam tratamento antihelmíntico contra *Haemonchus* sp. Isso pode ter contribuído para o baixo valor do grau Famacha entre os grupos analisados.

4.2. Contagem de nematoides gastrintestinais

Após a análise das variáveis, os animais pertencentes ao lote experimental 4, apresentaram a melhor caracterização fenotípica. Estes foram necropsiados para contagem dos nematoides gastrintestinais no abomaso e intestino delgado (Tabela 11) e para caracterização imunológica.

Tabela 11. Média da contagem (\pm desvio padrão) de nematoides recuperados do abomaso e intestino delgado de caprinos mestiços ($\frac{1}{2}$ sangue Anglo-nubiana x $\frac{1}{2}$ sangue Saanen) caracterizados como resistentes e susceptíveis aos nematoides gastrintestinais.

Grupos	Abomaso	Intestino delgado
Resistente	1.452,92 (\pm 1225,28) ^a	135,16 (\pm 79,72) ^a
Susceptível	4.023,33(\pm 2712,54) ^b	178,91 (\pm 54,21) ^a

Letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente a 5% ($P < 0,05$) pela ANOVA

A carga parasitária do abomaso diferiu ($P < 0,05$) entre grupos, sendo superior nos animais caracterizados como susceptíveis. Não houve diferenças significativas entre os grupos para a carga parasitária, no intestino delgado ($P > 0,05$).

4.3. Caracterização imunológica

4.3.1. Determinação dos níveis de imunoglobulinas

As imunoglobulinas IgA, IgG1, IgG2 e IgE destacam-se nas infecções helmínticas nos ovinos (AMARANTE et al., 2004). A análise da imunoglobulina do tipo A (IgA) para *Haemonchus contortus* no soro de caprinos mestiços naturalmente contaminados indicou diferença significativa entre os grupos resistentes e susceptíveis ($P < 0,0001$) somente na terceira semana de infecção, no 1º desafio do lote experimental 4. Já a diferença entre os grupos para níveis de IgA para *Trichostrongylus colubriformis* foi significativa ($P < 0,0001$) apenas na primeira semana de infecção, no 1º desafio deste mesmo lote experimental (Figura 6). Não houve diferença significativa ente os grupos no 2º desafio.

Segundo Bricarello et al. (2008), elevados níveis de IgA em bovinos resistentes às parasitoses gastrintestinais revelaram o possível papel efetor desta imunoglobulina na expulsão de parasitas na superfície da mucosa. Kanobana et al. (2002) também observaram que o aumento significativo de IgA e IgG1 foi associado a expulsão de *Cooperia oncophora* em bovinos experimentalmente infectados. Em estudo com ovinos Merino,

observou-se a eliminação do *Trichostrongylus colubriformis* entre o 3° e o 14° dia após as infecções, concomitante com aumento de IgA e IgG2 (McCURE et al., 1992). No México, foi constatado que ovinos Blackbelly resistentes e Columbia susceptíveis às parasitoses gastrintestinais mostraram níveis de IgA para *Haemonchus contortus* semelhantes (MUÑOZ-GUZMÁN et al., 2012).

Com relação aos níveis da imunoglobulina do tipo G (IgG) para *Haemonchus contortus*, houve diferenças significativas entre os grupos na primeira ($P < 0,0001$) e segunda ($P < 0,05$) semana de infecção, no 1° e 2° desafio do lote experimental 4. Níveis de IgG para *Trichostrongylus colubriformis* diferiram apenas na primeira semana de infecção do 1° desafio ($P < 0,0001$) (Figura 7).

Em trabalho conduzido com ovinos, averiguou-se associação entre os níveis séricos de IgG e a resistência, no qual foi observada uma redução nos níveis de IgG e no número de eosinófilos no tecido abomasal em animais caracterizados como susceptíveis ao *Haemonchus contortus* (MUÑOZ-GUZMÁN et al., 2006). Resposta semelhante também foi encontrada com cordeiros geneticamente resistentes, desafiados com *Trichostrongylus colubriformis*; a resposta imune protetora foi do tipo Th2 com a produção de anticorpos IgG1 e IgE (ANDRONICOS et al., 2010).

Apesar do padrão de diferença entre os grupos não ter sido significativo em todas as semanas, o grupo resistente, em ambos os desafios, apresentou, na maioria das semanas de infecção, maiores níveis de IgA e IgG, tanto para *Haemonchus contortus* como para *Trichostrongylus colubriformis*, do que aqueles no grupo susceptível. Mediante ao exposto, sugere-se que deve haver um mecanismo específico na variação da resposta imune entre diferentes raças e espécies, que são hospedeiros de nematoides gastrintestinais, e que estas imunoglobulinas podem ter papel efetor em controlar as infecções gastrintestinais.

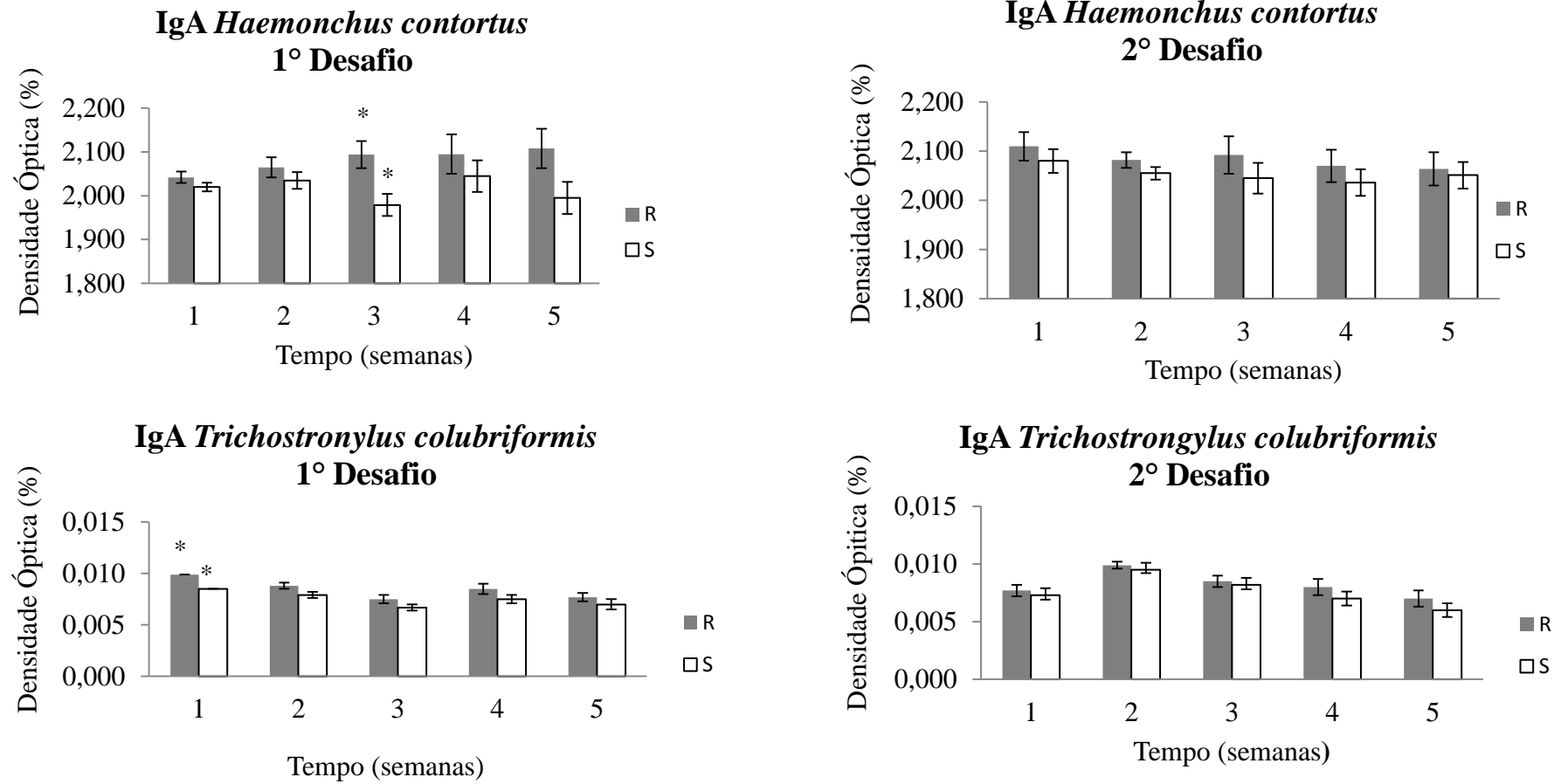


Figura 6. Níveis séricos de imunoglobulina tipo A (IgA) para *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, obtidos do soro de caprinos mestiços (½ sangue Anglo-nubiana x ½ sangue Saanen), caracterizados como resistente (R) e susceptível (S), submetidos a dois desafios de infecção. A barra representa o desvio padrão. *Níveis de significância P<0,05.

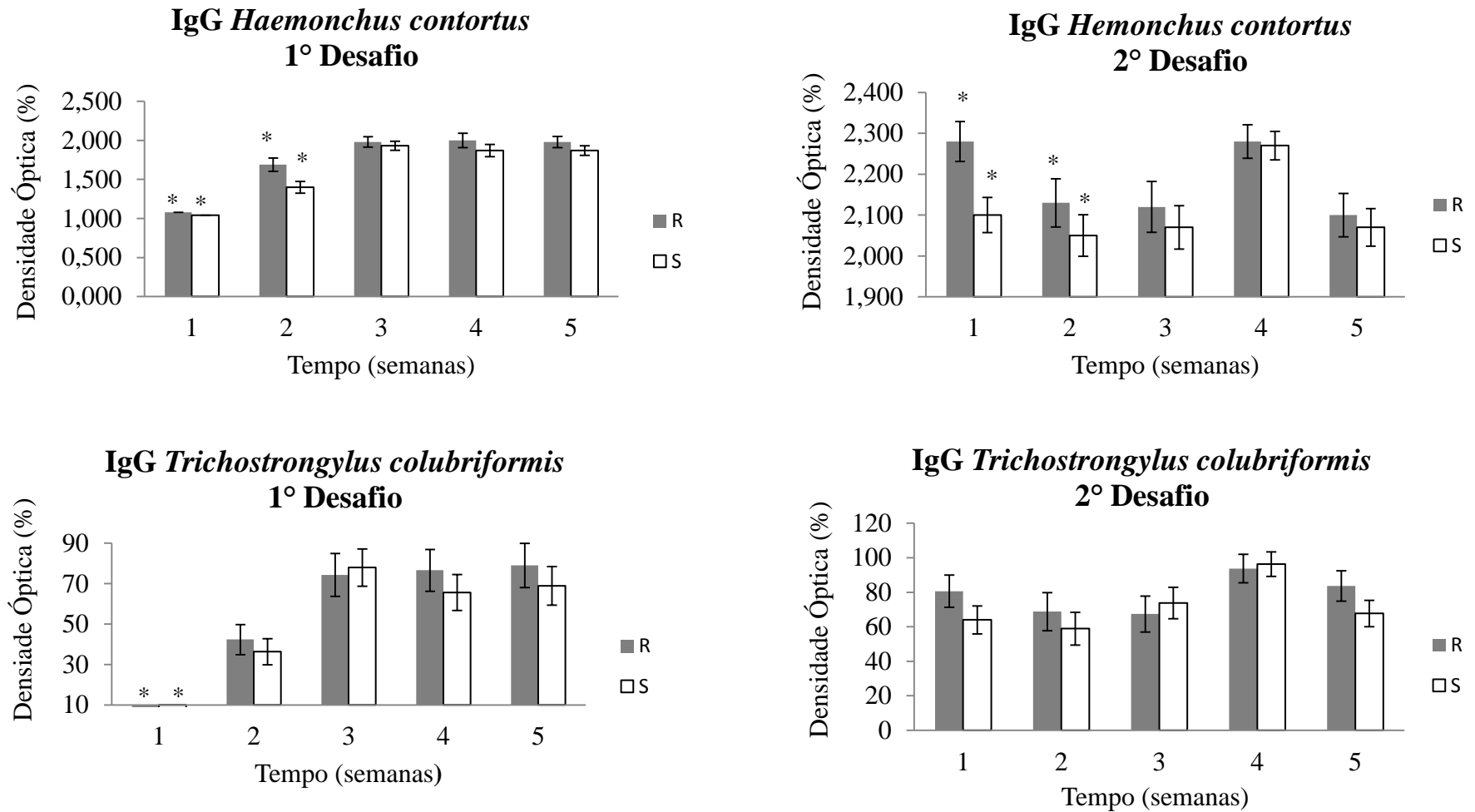


Figura 7. Níveis séricos de imunoglobulina tipo G (IgG) para *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, obtidos do soro de caprinos mestiços (½ sangue Anglo-nubiana x ½ sangue Saanen), caracterizados como resistente (R) e susceptível (S) submetidos a dois desafios de infecção. A barra representa o desvio padrão. *Níveis de significância $P < 0,05$

4.3.2. Análises histológicas

As análises histológicas indicaram maior contagem de eosinófilos no abomaso do grupo resistente às infecções gastrintestinais ($P < 0,05$; Tabela 12). No intestino delgado, as contagens de eosinófilos não diferiram entre os dois grupos analisados ($P > 0,05$). Os leucócitos globulares no abomaso também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$). Já no intestino delgado, as contagens de leucócitos globulares foram superiores no grupo susceptível ($P < 0,05$).

Tabela 12. Média e desvio-padrão de eosinófilos do abomaso (Eosinófilos AB), eosinófilos do intestino delgado (Eosinófilos ID), leucócitos globulares do abomaso (Leuc. Glob. AB) e leucócitos globulares do intestino delgado (Leuc. Glob. ID) presentes na mucosa de caprinos mestiços resistentes (R) e susceptíveis (S) às parasitoses gastrintestinais.

Grupos	Eosinófilos AB	Eosinófilos ID	Leuc. Glob. AB	Leuc. Glob. ID
R	30,25 ^a ± 11,09	32,50 ^a ± 10,03	52,58 ^a ± 23,05	47,91 ^a ± 14,27
S	17,81 ^b ± 8,23	26,41 ^a ± 16,76	55,54 ^a ± 18,82	72,08 ^b ± 26,86

^{a,b} letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente a 5% ($P < 0,05$) pela ANOVA

Os eosinófilos são importantes células de defesa em infecções por helmintos e estão frequentemente associados com a expressão da resistência às parasitoses (BALIC et al., 2006). Estas células podem criar um ambiente desfavorável aos nematoides, o que resulta em sua expulsão do trato gastrintestinal (TEREFE et al., 2005). Isso está de acordo com os resultados deste estudo, já que verificou-se menor quantificação na carga parasitária no grupo resistente ($P < 0,05$; Tabela 11), que apresentou também, conseqüentemente, maior contagem de eosinófilos no abomaso ($P < 0,05$) em relação ao grupo susceptível (Tabela 12).

As diferenças observadas entre os grupos com relação às contagens de leucócitos globulares no abomaso ($P > 0,05$) e intestino delgado ($P < 0,05$) podem ser devidas às diferentes interações entre o parasita e o hospedeiro, como também à resposta imune que pode variar de acordo o local, o tipo e o período da infecção (ZAROS et al, 2010).

Em trabalho com ovelhas Corriedale e Crioula Lanada, em infecções naturais por *Haemonchus contortus*, o número de eosinófilos e leucócitos globulares no abomaso foram mais elevados em ovinos Crioula lanada, caracterizados como mais resistentes às infecções

gastrintestinais, por meio de contagem do OPG e da carga parasitária em relação aos ovinos Corriedale (BRICARELLO et al., 2004). Os resultados de nosso estudo foram similares a este último apenas para a contagem de eosinófilos no abomaso.

As contagens de leucócitos globulares, em bovinos com diferentes graus de resistência em infecção natural por *Cooperia punctata*, foram maiores no primeiro segmento do intestino delgado de animais resistentes (BRICARELLO et al., 2008), diferente do observado no presente estudo.

A contagem de eosinófilos em ovinos imunizados contra *Trichostrongylus colubriformis* foi similar àquela de um grupo controle em ovinos Rommey (DOUCH et al., 1996). Bricarello et al. (2008) também não encontraram diferenças significativas com relação a contagem média de eosinófilos no intestino delgado de bovinos. Esses resultados foram semelhantes aos aqui encontrados para caprinos.

4.3.3. Expressão gênica

4.3.3.1. Quantificação do RNA

Após a extração individual para cada animal, foi realizada a quantificação do RNA e os valores da razão das absorbâncias de 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) variaram entre 1,9 a 2,11. Segundo Pfaffl et al. (2002), para se obter uma amostra de RNA puro, os valores de A_{260}/A_{280} devem ser igual ou superior a 1,8 e 2,0.

A integridade do RNA total foi confirmada por meio da eletroforese em gel de agarose a 1%. Mediante os resultados obtidos na eletroforese, foram escolhidos seis animais do grupo caracterizado como resistente e seis animais do grupo caracterizado como susceptível, que apresentaram as melhores integridades do RNA ribossômico (rRNA), por meio da visualização das bandas rRNAs 28S e 18S (Figura 8).

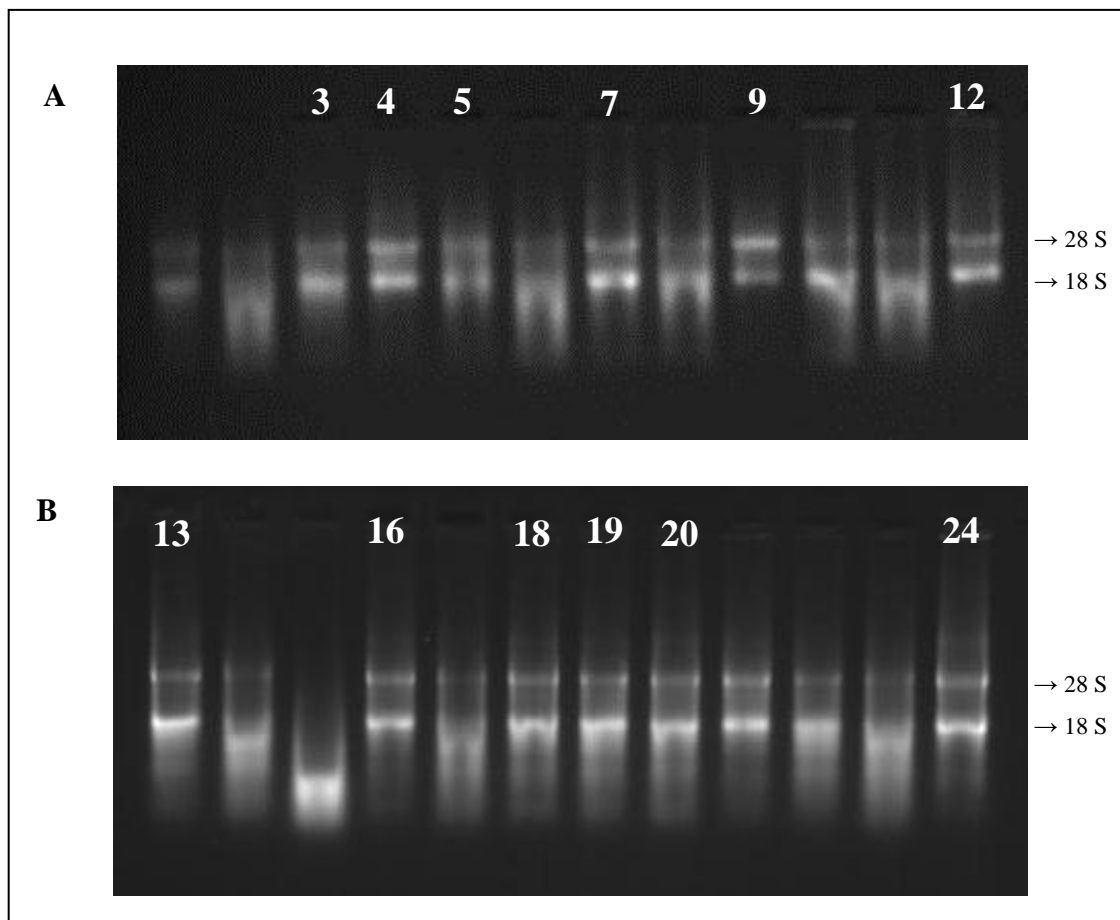


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação da integridade dos rRNAs (28S e 18S). As amostras dos poços (3, 4, 5, 7, 9 e 12) correspondem aos animais do grupo resistente (A). As amostras dos poços (13, 16, 18, 19, 20 e 24) correspondem aos animais do grupo susceptível (B).

4.3.3.2. RT-qPCR

4.3.3.2.1. Eficiência da amplificação

A eficiência da amplificação foi avaliada para todos os genes de interesse (IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12 p35, IL-12 p40, IL-13, MCP-1, MCP-2 e IFN- γ). Para isto, foi construída uma curva de diluição seriada a partir dos valores de Ct das amostras de DNA genômico.

Os valores de inclinação da curva padrão (slope), a eficiência da amplificação (Ef) e o coeficiente de determinação (R^2) podem ser visualizados nas figuras 9, 10 e 11.

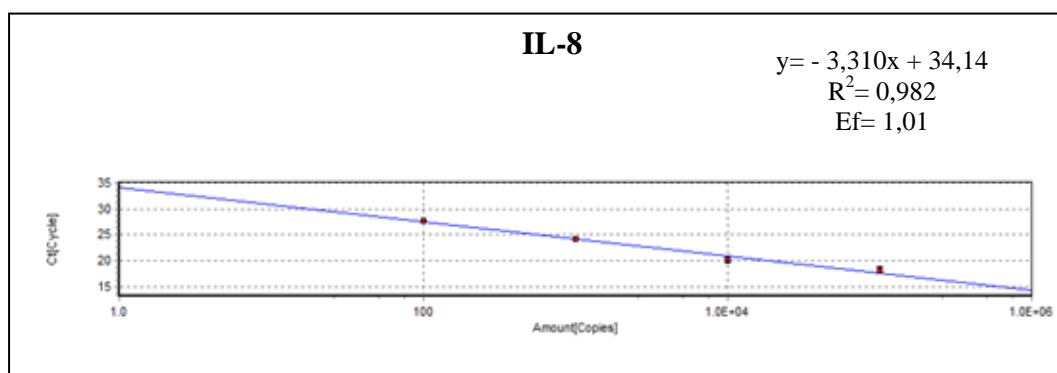
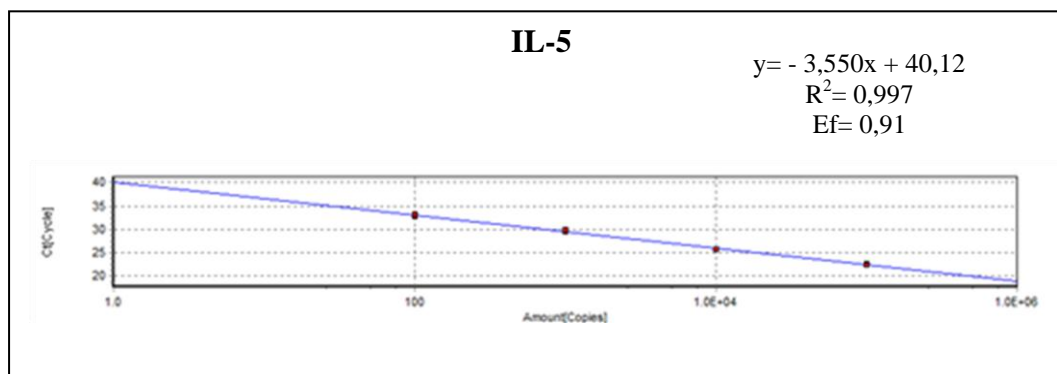
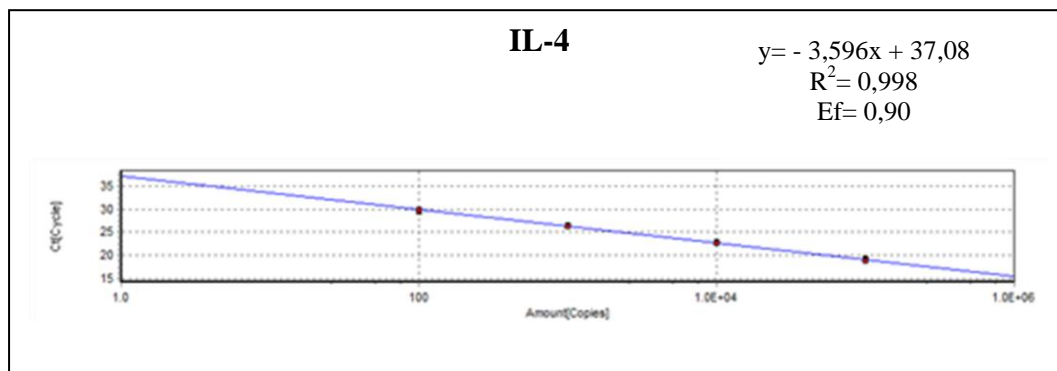
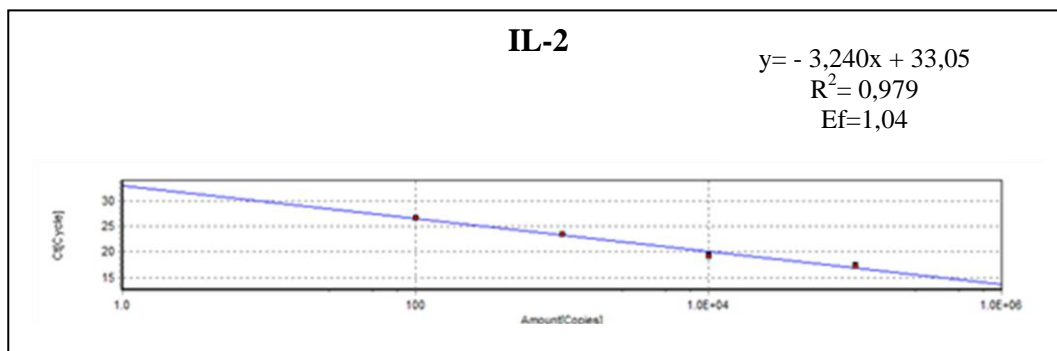


Figura 9. Gráficos obtidos a partir da diluição seriada do DNA e Cts gerados pelo RT-qPCR dos genes alvos: IL-2, IL-4, IL-5 e IL-8. Os valores das equações de regressão: slope, coeficiente de determinação (R^2) e eficiência (Ef) estão à direita do gráfico.

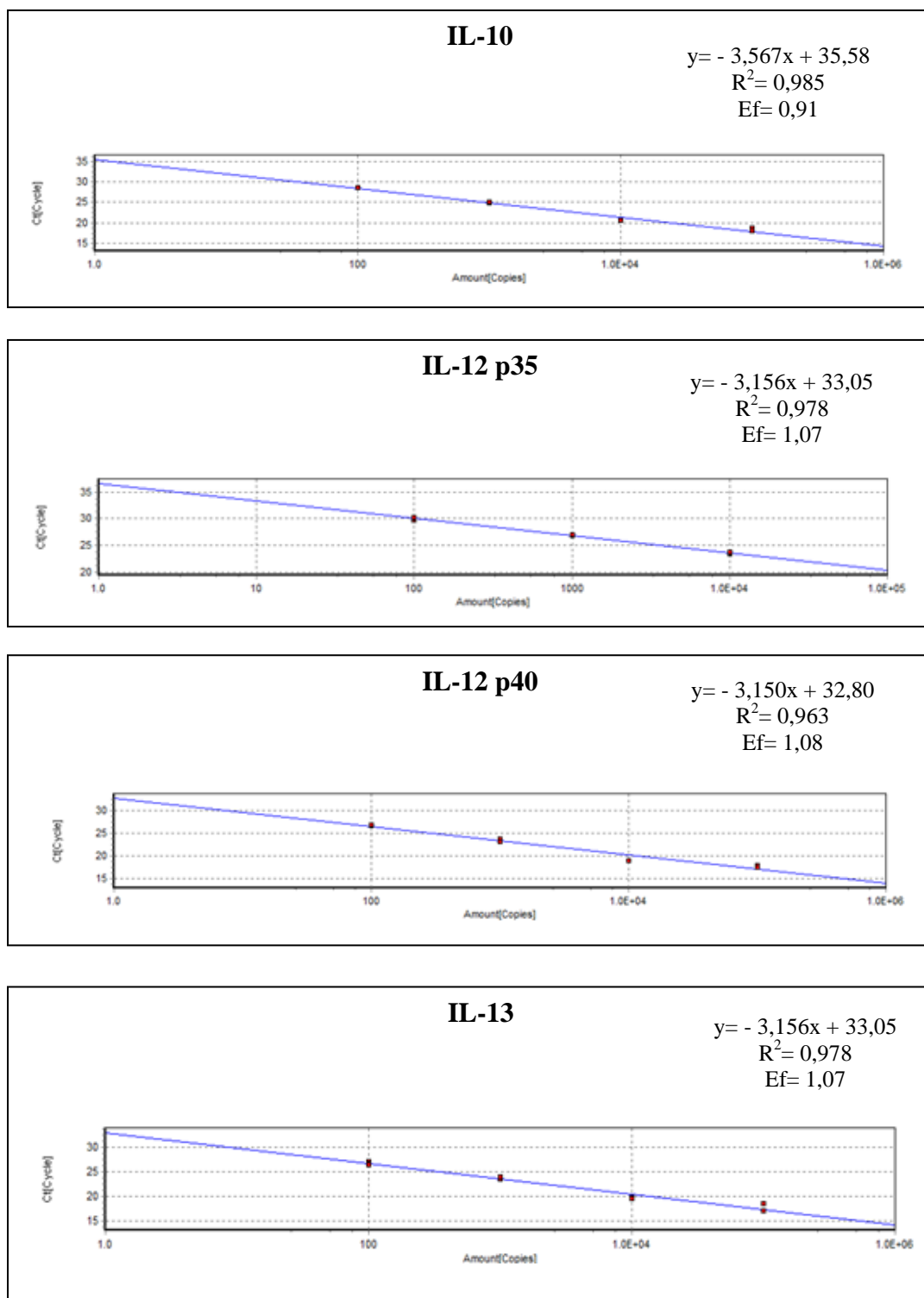


Figura 10. Gráficos obtidos a partir da diluição seriada do DNA e Cts gerados pelo RT-qPCR dos genes alvo: IL-10, IL-12 p35, IL-12 p40 e IL-13. Os valores das equações de regressão: slope, coeficiente de determinação (R^2) e a eficiência (Ef) estão à direita do gráfico.

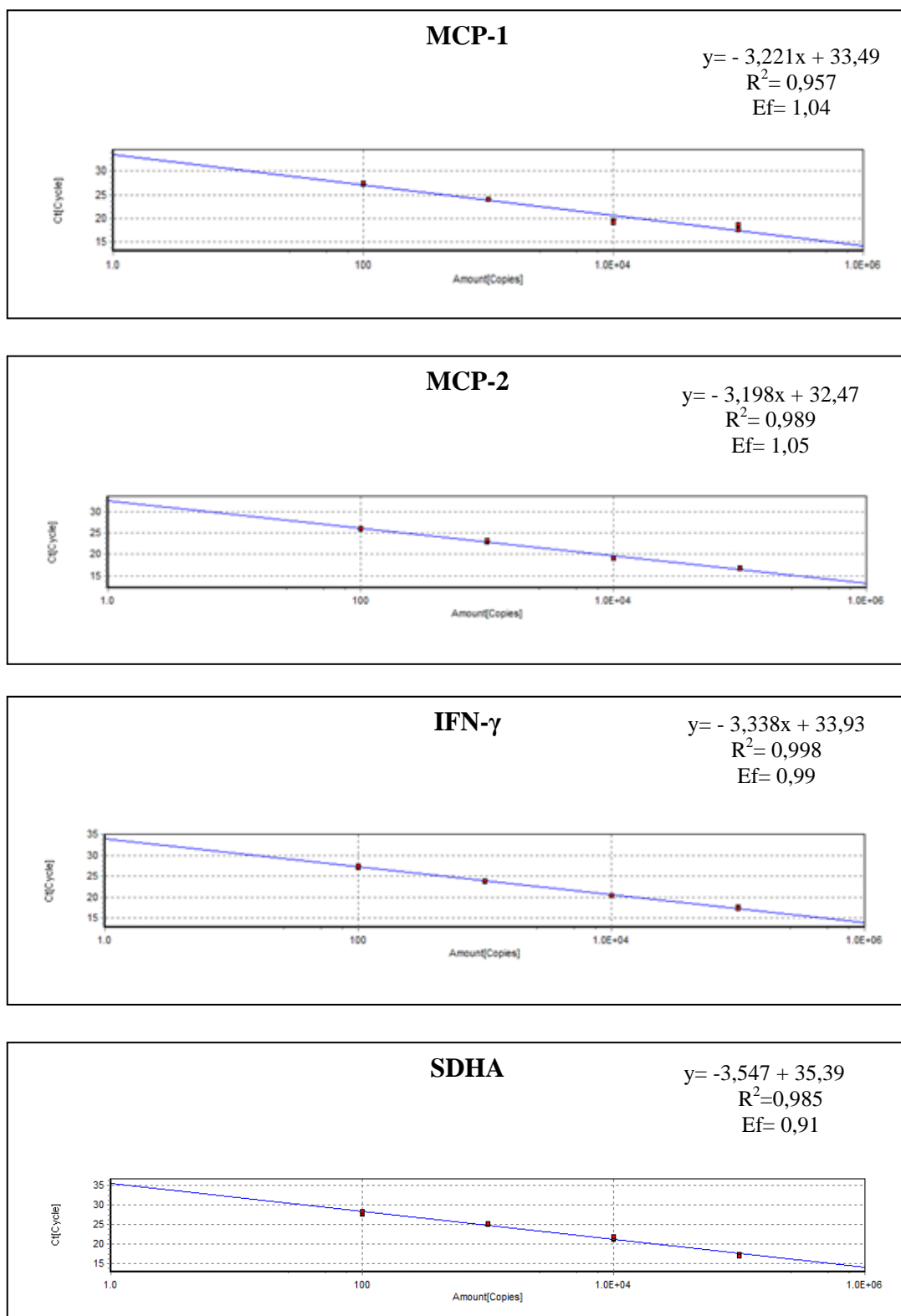


Figura 11. Gráficos obtidos a partir da diluição seriada do DNA e Cts gerados pelo RT-qPCR dos genes alvos: MCP-1, MCP-2 e IFN- γ e do gene constitutivo SDHA. Os valores das equações de regressão: slope, coeficiente de determinação (R^2) e a eficiência (Ef) estão à direita do gráfico.

4.3.3.2.2. Especificidade dos primers

A especificidade dos primers foi confirmada por meio da realização da eletroforese em gel de agarose a 2%, no qual foi observado o tamanho do produto (pb) e a presença de uma única banda para todos os genes (Figura 12) e também foi analisada a curva de *melting* (Figura 13).

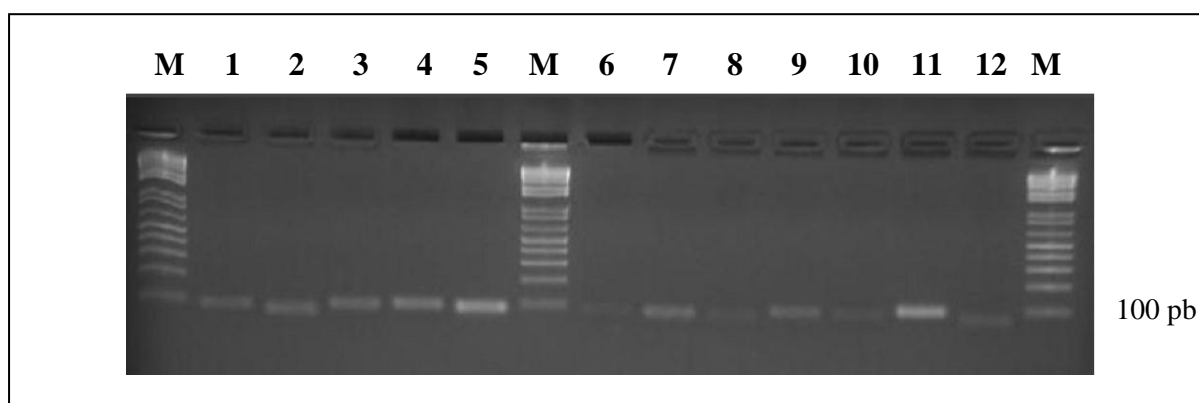


Figura 12. Verificação do tamanho dos produtos de RT-qPCR por meio da eletroforese em gel de agarose a 2%. A primeira, a do meio e a última canaleta para todos os genes referem-se ao padrão molecular ladder 1 Kb plus (Invitrogen) (M). Os genes analisados (canaletas): IL-2 (1); IL-4 (2); IL-5 (3); IL-8 (4); IL-10 (5); IL-12 p35 (6); IL-12 p40 (7); IL-13 (8); MCP-1 (9); MCP-2 (10); IFN- γ (11) e SDHA (12).

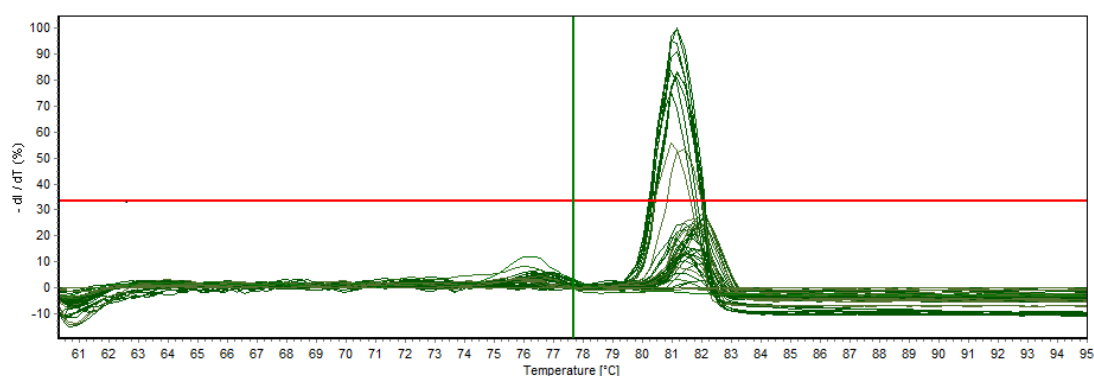


Figura 13. Curva de *melting* do gene IL-10, gerada pelo aparelho MasterCycle (Eppendorf). O eixo y representa a primeira derivada negativa dos valores de fluorescência durante cada ciclo ($-[dF/dT]$) e o eixo x representa a temperatura de *melting*. Cada linha representa uma amostra cuja expressão foi quantificada.

4.2.3.2.3. Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro do abomaso de caprinos mestiços caracterizados como resistentes e susceptíveis às parasitoses gastrintestinais

Neste estudo, os valores de Cts foram obtidos para os genes alvo: IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12 p35, IL-12 p40, IL-13, MCP-1, MCP-2 e IFN- γ . O SDHA foi escolhido como o gene de controle interno (gene referência) devido ter apresentado menor variação em relação ao GAPDH e RPL-19, ou seja, não apresentou diferença significativa na média dos valores de Cts, entre os grupos, durante toda a análise. A quantificação relativa foi realizada no software REST (PFAFFL et al., 2002). Nessa análise, foi gerada a razão entre grupo tratamento (resistente) e grupo controle (susceptível; Tabela 13).

Tabela 13. Expressão gênica relativa de tecidos do abomaso do grupo resistente (R) e susceptível (S) de caprinos mestiços naturalmente infectados por nematoides gastrintestinais.

Genes	Expressão RS	Erro Padrão	Valor de P
IL-2	0,462	0,10-2,03	0,272
IL-4	0,492	0,26-0,92	0,056
IL-5	0,365	0,18-0,86	0,017
IL-8	0,837	0,29-2,57	0,702
IL-10	0,181	0,03-0,93	0,026
IL-12 p35	1,052	0,33-4,04	0,927
IL-12 p40	0,211	0,02-1,39	0,136
IL-13	0,391	1,10-1,29	0,101
MCP-1	0,405	0,10-1,81	0,191
MCP-2	0,369	0,09-1,52	0,152
IFN- γ	1,545	0,07-40,77	0,737
SDHA	0,932	-	

De acordo com as análises da expressão gênica realizada na mucosa do abomaso, pôde-se verificar diferenças nos níveis de expressão de IL-5 ($P < 0,017$) e IL-10 ($P < 0,026$), que apresentaram maior expressão no grupo susceptível.

A expressão de IL-5, no grupo susceptível, foi 2,7 x maior do que aquela do grupo resistente. A IL-5 é importante na resposta imune às infecções parasitárias, uma vez que esta citocina estimula e ativa a produção de eosinófilos (SANDERSON, 1992). Em infecções gastrintestinais, a regulação da IL-5 no abomaso e nos gânglios linfáticos ocorre aproximadamente no 3º dia (MEEUSEN et al, 2005; LACROUX et al, 2006).

Níveis de expressão de IL-5 foram examinados no abomaso de ovinos imunizados, sendo notada uma maior expressão entre o 5º e 7º dias do desafio. Já após o 28º dia pós-infecção níveis destas citocinas decresceram expressivamente (ROBINSON et al., 2011). Balic et al. (2002) também encontraram um aumento IL-5 no tecido do abomaso de ovelha após o 3º dia em infecção por *Haemonchus contortus*.

No grupo susceptível a IL-10 teve maior expressão (5,5 x) em relação ao resistente. A IL-10 é secretada tanto por células Th1 como por células Th2. As citocinas produzidas por células Th2 ajudam a desenvolver e manter a resposta típica as infecções por parasitas extracelulares. Algumas destas citocinas podem também regular negativamente a resposta imune, que é caracterizada por células T CD4⁺ que se diferenciam das células Th1.

Estudos mais recentes mostram que as células Th2 podem apresentar uma resposta ligeiramente modificada, com a expressão de IL-13, IL-5 e TNF- α , mas não de IL-4 e IL-10 (SCHALLIG, 2000; MEEUSEN et al., 2005; PERNTHANER et al., 2005). Essa resposta Th2 diferenciada foi observada em infecção experimental com *Trichostrongylus colubriformis*, no qual se verificou aumento nos níveis da IL-5, mas não da IL-10 em células de linfáticas intestinais de ovelhas geneticamente resistentes (PERNTHANER et al., 2005). Lacroux et al. (2006) relataram um aumento de IL-13, IL-5 e IL-4, mas nenhuma diferença foi observada para IFN- γ , IL-12, IL-10 e TNF- α em tecidos linfáticos e abomasais de cordeiros infectados por *Haemonchus contortus*.

Como se pôde observar, há algumas variações de resultados encontrados entre este e outros estudos, como a expressão da IL-5 no grupo susceptível. Possivelmente o período em que os tecidos foram coletados para análise foi superior ao esperado para a expressão desta interleucina no grupo resistente. Sabe-se que às citocinas são expressas em diferentes tipos, tempos e fases de infecção (JANEWAY et al., 2007). O tecido analisado também pode ter influenciado. De acordo com os resultados encontrados na literatura, verificou-se que há diferenças na expressão gênica nos tecidos do trato gastrintestinal (abomaso, nódulo do abomaso e intestino delgado), porém poucos genes apresentam expressão diferencial no abomaso (ZAROS et al., 2010; IBELLI et al., 2011). Esses fatores podem justificar a ausência de expressões diferenciadas entre os animais dos grupos resistente e susceptível.

5. CONCLUSÕES

Em todos os lotes experimentais, nos dois desafios de infecção, a OPG foi uma ferramenta fenotípica eficaz para a caracterização de caprinos quanto à resistência e susceptibilidade às parasitoses gastrintestinais.

Dentre os lotes analisados, o lote experimental 4 apresentou a melhor caracterização fenotípica. As variáveis OPG, VG e PPT foram eficazes na identificação dos animais quanto aos diferentes níveis de resistência. Nos demais lotes, o VG, a PPT, a contagem de eosinófilos e o escore Famacha não foram eficazes para diferenciar caprinos resistentes e susceptíveis às parasitoses gastrintestinais.

Os animais caracterizados como resistentes apresentaram melhor resposta as infecções gastrintestinais que os animais caracterizados como susceptíveis. Estes últimos apresentaram maior número de parasitas, *Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus* sp., no abomaso e intestino delgado respectivamente.

Os níveis de IgA e IgG, em especial para *Haemonchus contortus*, nos dois desafios de infecção, e a contagem de eosinófilos no abomaso foram parâmetros eficazes na resposta imune indicando que essas células de defesa apresentam um papel efetor no controle das infecções gastrintestinais.

IL-5 e IL-10 apresentaram níveis superiores significativos no grupo susceptível, mostrando que a expressão destas citocinas na quinta semana de infecção pode ter papel em mecanismos de susceptibilidade a nematóides gastrintestinais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier, 2012.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier Ltda; 2008. 564 p.

ALMEIDA, A. F. T.; CASTRO, A. A.; SILVA, F. J. M.; FONSECA, A. H. Desenvolvimento, sobrevivência e distribuição de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de ruminantes, na estação seca da baixada fluminense. **Revista Brasileira Parasitológica**, v. 14 (3), p. 89-94, 2005.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215 (3), p. 403-410, 1990.

AMARANTE, A. F. T.; SUSIN, I.; ROCHA, R. A.; SILVA, M. B.; MENDES, C. Q.; PIRES, A. V. Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 273-280, 2009.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; HUNTLEY, J. F., MAZZONLIN, L. P., GOMES, J. C. Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 99-107, 2005.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p. 91-106, 2004.

AMARANTE, A. F. T. Controle da verminose gastrintestinal no sistema de produção de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECIALIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA, v.1, Paraná. **Anais...** 2004.

AMARANTE, A. F. T.; GODOY, W. A. C.; BARBOSA, M. A. Nematode egg counts, packed cell volume and body weight as parameters to identify sheep resistant and susceptible to infections by gastrointestinal nematodes. **ARS Veterinária**, v. 14 (3), p. 331-339, 1998.

ANDRONICOS, N.; HUNT, P.; WINDON, R. Expression of genes in gastrointestinal and lymphatic tissues during parasite infection in sheep genetically resistant or susceptible to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 40 (4), p. 417-429, 2010.

BALIC, A.; CINNINGHAM, C. P.; MEEUSEN, E. N. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 107-115. 2006.

BALIC, A.; BOWLES, V. M.; MEEUSEN, E. N. T. The Immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. **Advances Parasitology**, v. 45, p.181-241, 2000.

BASSETTO, C. C.; SILVA, B. F.; FERNANDES, S.; AMARANTE, A. F. T. Contaminação da pastagem com larvas infectantes de nematoides gastrintestinais após o pastejo de ovelhas resistentes ou susceptíveis a verminose. **Revista Brasileira de Prsitologia Veterinária**, v. 18 (4), p. 63-68, 2009.

BISSET, S. A.; VLASSOFF, A.; DOUCH, P. G. C.; JONAS, W. E.; WEST, C. J.; GREEN, R. S. Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 249-263, 1996.

BRICARELLO, P. A.; ZAROS, L. G.; COUTINHO, L. L.; ROCHA, R. A.; SILVA, M. B.; KOOYMAN, F. N. J.; DE VRIES, E.; YATSUDA, A. P.; AMARANTE, A. F. T. Immunological responses and cytokine gene expression analysis to *Cooperia punctata* infections in resistant and susceptible Nelore cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 95-103, 2008.

BRICARELLO, P. A.; ZAROS, L. G., COUTINHO, L. L.; ROCHA, R. A.; KOOYMAN, F. N. J.; VRIES, E.; GONÇALVES, J. R. S.; LIMA, L. G.; PIRES, A. V.; AMARANTE, A. F. T. Field study on nematode resistance in Nellore-breed cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 30, p. 272–278, 2007.

BRICARELLO, P. A.; GENNARI, S. M.; SEQUEIRA, T. C.; VAZ, C. M. S. L.; GONÇALVES, I. G.; ECHEVARRIA, F. A. M. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *H. contortus*. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 75-83, 2004.

BRICARELLO, P. A.; GENNARI, S. M.; OLIVEIRA-SIQUEIRA, T. C.; VAZ, C. M.; GONÇALVES DE GONÇALVES, I.; ECHEVARRIA, F. A. Response of Corriedala and Crioula Lanada sheep to artificial primary infection with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Research Communications**, v. 26 (6), p. 447-457, 2002.

BUDDLE, B. M.; JOWETT, G.; GREEN, R. S.; DOUCH, P. G.; RISDON, P. L. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. **International Journal for Parasitology**, v. 22 (7), p. 955-960, 1992.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines, Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 611-622, 2009.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, p. 155–166, 2004.

CARA, D. C.; NEGRÃO-CORRÊA, N.; TEIXEIRA, M. M. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance *in vivo*. **Histology and Histopathology**, v. 15, p. 899-920, 2000.

CHARLES, T. P. Vermínoses dos bovinos de leite. In: CHARLES, T. P.; FURLONG, J. (Ed.). **Doenças parasitárias dos bovinos de leite**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL. p. 55-110, 1992.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CLAEREBOUT, E.; VERCAUTEREN, I.; GELDHOF, P.; OLBRECHTS, A.; ZARLENGA, D. S.; GODDEERIS, B. M. Cytokine response in immunized and non-immunized calves after *Ostertagia ostertagi* infection. **Parasite Immunology**, v. 27, p. 325-331, 2005.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido Brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29 (7), p. 563-568. 2009.

COSTA, C. A. F., VIEIRA, L. S., BERNE, M. E. A., SILVA, M. U. D., GUIDONI, A. L., FIGUEIREDO, E. A. P. Variability of resistance in goats infected with *Haemonchus contortus* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 153-158, 2000.

CRAIG, M. N.; MILLER, H. R. P.; SMITH, W. D.; KNIGHT, P. A. Cytokine expression in naive and previously infected lambs after challenge with *Trichostrongylus circumcincta*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 120 (1-2), p. 47-54, 2007.

DAWKINS, H. J. S.; WINDOW, R. G.; EAGLESON, G. K. Eosinophil responses in sheep select for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v. 19, p. 199-205, 1989.

DE JONGE, H. J. M.; FEHRMANN, R. S. N.; BONT, E. S. J. M.; HOFSTRA, R. M. W.; GERBENS, F.; KAMPS, W. A.; VRIES, E. G. E.; VAN DER ZEE, A. G. J.; TE MEERMAN, G. J.; TER ELST, A. Evidence based selection of housekeeping genes, **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-5, 2007.

DESCHOOLMEESTER, M. L.; LITTLE, M. C.; ROLLINS, B. J.; ELSE, K. J. Absence of CC chemokine ligand 2 results in an altered Th1/Th2 cytokine balance and failure to expel *T. muris* infection. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 4693-4700, 2003.

DONG, Y.; XIE, M.; JIANG, Y.; XIAO, N.; DU, X.; ZHANG, W.; TOSSER-KLOPP, G.; WANG, J.; YANG, S.; LIANG, J.; CHEN, W.; CHEN, J.; ZENG, P.; HOU, Y.; BIAN, C.; PAN, S.; LI, Y.; LIU, X.; WANG, W.; SERVIN, B.; SAYRE, B.; ZHU, B.; SWEENEY, D.; MOORE, R.; NIE, W.; SHEN, Y.; ZHAO, R.; ZHANG, G.; LI, J.; FARAUT, T.; WOMACK, J.; ZHANG, Y.; KIJAS, J.; COCKETT, N.; XU, X.; ZHAO, S.; WANG, W.

Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). **Nature Biology**, v. 31, p. 135-141, 2013.

DOUCH, P. G. C.; MORUM, P. E.; RABEL, B. Secretion of anti-parasite substances and leukotrienes from ovine gastrointestinal tissues and isolated mucosal mast cells. **International Journal for Parasitology**, v. 26 (2), p. 205-211, 1996.

DUNPHY, J.; HORVATH, A.; BARCHAM, G.; BALIC, A.; BISCHOF, R.; MEEUSEN, E. Isolation, characterization and expression of mRNAs encoding the ovine CC chemokines, monocyte chemoattractant protein (MCP-1 e 2). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, p.153-164, 2001.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 285-308, 1997.

FRENCH, A. R.; YOKOYAMA, W. M. Natural killer cells and viral infections. **Current Opin in Immunology**, v. 15, p. 45-51. 2003.

GASIM, S.; ELHASSAN, A. M.; KHALIL, E. A.; ISMAIL, A.; KADARU, A. M.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T. G. High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clinical Experimental Immunology**, v. 111 (1), p. 64-69, 1998.

GILL, H. S.; ALTMANN, K.; CROSS, M. L.; HUSBAND, A. J. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Immunology**, v. 99 (3), p.458-463, 2000.

GOOSSENS, K.; VAN POUCKE, M.; VAN SOOM, A.; VANDESOMPELE, J.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L. C. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. **BMC Developmental Biology**, v. 5: 27, 2005.

GORCZYNSKI, R. S. J. **Mediadores solúveis da imunidade: citocinas**. In: AFONSO, R. E (ed). *Imunologia Clínica*. Rio de Janeiro: Reichmanni e Afonso. p. 96-108. 2001.

GORDON, H. McL.; WHITLOCK, H. V. A new for coating nematoda eggs in sheep faeces. **Journal Council Science Industrial Research**, v. 12 (1), p. 50-52, 1939.

GREGORY, B.; KIRCHEM, A.; PHIPPS, S.; GEVAERT, P.; PRIDGEON, C.; RANKIN, S. M.; ROBINSON, D. S. Differential Regulation of Human Eosinophil IL-3, IL-5 and GM-CSF Receptor - Chain Expression by Cytokines: IL-3, IL-5and GM-CSF Down-Regulate IL-5 Receptor Expression with Loss of IL-5 Responsiveness, but Up-Regulate IL-3 Receptor Expression. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 5359-5366, 2003.

GREGORY, P. C.; WENHAM, G., POPPI, D.; COOP, R. L.; MACRAE, J. C.; MILLER, S. J. The influence of a chronic subclinical infection of *Trichostrongylus colubriformis* on gastrointestinal motility and digesta flow in sheep. **Parasitology**, v. 91, p.381-396, 1985.

GRENCIS, R. K. Cytokine regulation of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection: from host to parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 100, p. 45-50, 2001.

HARRISON, G. B.; PULFORD, H. D.; HEIN, W. R.; BARBER, T. K.; SHAW, R. J.; MCNEILL, M.; WAKEFIELD, S. J.; SHOEMAKER, C. B. Immune rejection of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep; a possible role for intestinal mucus antibody against an L3-specific surface antigen. **Parasite Immunology**, v. 25 (1), p.45-53, 2003.

HOLMES, P. H. Pathogenesis of Trichostrongylosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.18 (2), p. 89-101, 1985.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes Immunology**, v. 6, p. 279-284, 2005.

HUSE, M.; LILLEMEIER, M. F.; KUHNS, M. S.; CHEN, D. S.; DAVIS, M. M. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretions. **Nature Immunology**, v. 7, p. 247-255, 2006.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pecuária 2013- Rebanho caprino**. Disponível em www.ibge.gov.br. Acesso em 06 de junho de 2014.

IBELLI, A. M. G.; NAKATA, L. C.; ANDRÉO, R.; COUTINHO, L. L.; OLIVEIRA, M. C. S.; AMARANTE, A. F. T.; FURLONG, J.; ZAROS, L. G.; REGITANO, L. C. A. mRNA profile of Nellore calves after primary infection with *Haemonchus placei*. **Veterinary Parasitology**, v. 176, p. 195-200, 2011.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 470p.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, W.; SHOLOMCHIMK, M. J. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed. 824 p. 2007.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHOLOMCHIMK, M. J. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5ª ed. Porto Alegre: Artemed, 2002. 767 p.

KANOBANA, K.; PLOEGER, H. W.; VERVELDE, L. Immune expulsion of the trichostrongylid *Cooperia oncophora* is associated with increased eosinophilia and mucosal IgA. **International Journal Parasitology**, v. 32, p.1389-1398, 2002.

KEITH, R. K. The differentiation of infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal Zoology**, v. 1, p. 223-235, 1953.

LACROUX, C.; NGUYEN, T. H. C.; ANDREOLETTI, O.; PREVOT, F.; GRISEZ, C.; BERGEAUD, J. P.; GRUNERI, L.; BURNL, J. C.; FRANCOIS, D.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs

elicits an unequivocal Th2 immune response. **Veterinary Research**, v. 37, p. 607-622, 2006.

LANTZ, C. S.; BOESIGER, J.; SONG, C. H.; MACH, N.; KOBAYASHI, T.; MULLINGAN, R. C.; NAWA, Y.; DRANOFF, G.; GALLI, S. J. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and immunity to parasites. **Nature**, v. 392, p. 90-93, 1998.

LIEW, F. Y. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 55-60, 2002.

LÔBO, R. N. B.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, A. A.; MUNIZ, E. N.; SILVA, J. M. Genetics parameters for faecal egg count, packed-cell volume and body-weight in Santa Ines. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32 (2), p. 288-294, 2009.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3^a ed. New York: Mac Graw Hill, 1968. 258p.

McCLURE, S. J.; EMERY, D. L.; WAGLAND, B. M.; JONES, W. O. A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. **International Journal Parasitology**, v. 22, p. 227-234, 1992.

McEWAN, J. C. Worm FEC-Breedings sheep resistant to roundworm infection: Breeders`Manual. **AgResearch Invermay**, Mosgiel, New Zealand, 1994.

MEEUSEN, E. N. T.; BALIC, A.; BOWLES, V. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p.121- 125, 2005.

MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILÁQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematoides resistentes a antihelmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37 (2), p. 339-344, 2003.

MILLER, J. E.; BISHOP. S. C.; COCKETT, N. E.; McGRAW, R. A. Segregation of natural and experimental gastrointestinal nematode infection in F₂ progeny of susceptible Suffolk and resistant Gulf Coast Native sheep and its usefulness in assessment of genetic variation. **Veterinary Parasitology**, v. 140 (1-2), p. 83-89, 2006.

MILLER, J. E.; HOROHOV, D. W. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 84 (13), p.124-132, 2006.

MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecções por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Animal**, v. 34, p. 1139-1145, 2004.

MOUNTEFORD, A. P.; PAERLMAN, E. IL-12 and the host response to parasitic helminths; the paradoxical effects on protective immunity and immunopathology. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 509-517, 1998.

MUÑOZ-GUZMÁN, M. A.; CUENCA-VERDE, C.; VALDIVIA-ANDA, G.; CUÉLLAR-ORDAZ, J. A.; ALBA-HURTADO, F. Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 185 (2–4), p. 175–180, 2012.

MUÑOZ-GUZMÁN, M. A.; CUÉLLAR-ORDAZ, J. A.; VALDIVIA-ANDA, A. G.; BUENDÍA-JIMÉNEZ, J. A.; ALBA-HURTADO, F. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 86 (3), p. 363–371, 2006.

NAKAMURA, Y.; STOUJY, T.; ONODERA, T.; KAWASHIMA, K.; NUMARU, S.; YOKOMYZO, Y. Effects of recombinant bovine interferon on *Strongyloides papillosus* infection in calves. **Journal of Helminthology**, v. 76, p. 59-64, 2002.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, v. 1 (3), p.1559 – 1582, 2006.

PERNTHANER, A.; COLE, S. A.; MORRISON, L.; HEIN, W. R. Increased of interleukin-5 (IL-5), IL-13 and tumor necrosis factor alpha genes in intestinal lymph cells of selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. **Infections and Immunity**, v. 73 (4), p. 2175-2183, 2005.

PFAFFL, M. **Relative quantification**. Disponível em: <<http://www.genequantification.de/pfaffl-rel-quan-book-ch3.pdf>>. Acesso em 07 de abril de 2014.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, 30 (9): e36, 2002.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 29 (9): e45, 2001.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Reviews Immunology**, v. 13, p. 151-177, 1995.

RICHARD, S.; CABARET, J.; CABORG, C. Genetic environmental factors associated with nematode infection of dairy goats in Northwestern rance. **Veterinary Parasitology**, v. 36, p. 237-243, 1990.

ROBERTS, F. H. S.; O`SULLIVAN, S. P. Methods for egg counts and larvae cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 1, p. 99-102, 1950.

ROBINSON, N.; PLEASANCE, J.; PIEDRAFITA, D.; MEEUSEN, E.N. The kinetics of local cytokine and galectin expression after challenge infection with the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 41 (5), p. 487- 493, 2011.

ROCHA, R. A.; AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 65-75, 2004.

RUAS, J. L.; BERNE, M. E. A. Parasitoses por nematódeos gastrintestinais em bovinos e ovinos. In: RIET-CORREA F.; SCHILD A. L.; MENDEZ M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e equinos**. São Paulo, 2001. cap.5, p.89-105.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. 2.700 p.

SANDERSON, C. J. **Interleukin-5, eosinophils and disease**. *Blood*. v. 79 (12), p. 3101-3109, 1992.

SANTOS, F. C. B.; SAOUZA, B. B.; ALFARO, C. H. P.; CÉZAR, M. F.; PIMENTA FILHO, E. C.; ACOSTA, A. A. A.; SANTOS, J. R. S. Adaptabilidade de caprinos exóticos e naturalizados ao clima semi-árido do nordeste brasileiro. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 29 (1), p.142-149, 2005.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT. **User's Guide, version 6.11**. 4th Ed., v. 2. Cary: SAS Institute Inc..1996. 842p.

SAYERS, G.; GOOD, B.; HANRAHAN, J. P.; RYAN, M.; SWEENEY, T. Intron 1 of the interferon c gene: Its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 191–196. 2005.

SCHALLIG, H. D. F. H. Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 120 (7), p. 63-72, 2000.

SCHALLIG, H. D. F. H.; VAN LEEUWEN, M. A.; BERNADINA, W. E.; HENDRIKX, W. M. Serum antibody responses of Texel sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 57 (1), p. 63-68, 1994.

SHAW, R. J.; GATEHOUSE, T. K.; McNEILL, M. M. Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal Parasitology**, v. 28, p. 293-302, 1998.

SHAW, R. J.; McNEILL, M. M.; GATEHOUSE, T. K.; DOUCH, P. G. Quantification of total sheep IgE concentration using anti-ovine IgE monoclonal antibodies in an enzyme immunoassay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57 (3-4), p. 253-265, 1997.

SILVA, R. G.; NEIVA, J. N. M.; CANDIDO, J. D.; LOBO, R. N. B. Aspectos comportamentais e desempenho produtivo de ovinos mantidos em pastagem de capim-tanzânia manejado sob lotação intermitente. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8 (4), p. 609-620, 2007.

SOTOMAIOR, C. S.; CARLI, L. M.; TANGLEICA, L.; KAIBER, B. K.; SOUZA, F. P. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. **Revista Acadêmica**, v. 5 (4), p. 397-412, 2007.

SOUZA, C.; LOPES, S. T. A.; BATINA, P. N.; CECIM, M.; CUNHA, C. M.; CONRADO, A. C.; BECK, A. Estresse parasitário em cabras Saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. **Veterinária Notícias**, v. 12 (2), p. 17-23, 2006.

STEEL, J. W.; SYMONS, L. E. A.; JONES, W. O. Effects of level of larval intake on the productivity and physiological and Metabolic responses of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, p. 821-838, 1980.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasites of sheep and goats. **Veterinary Parasitology**. Third edition, p. 152-165, 2007.

TEREFE, G.; LACROUX, C.; ANDREOLETTI, O.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; BERGEAUD, J. P.; PENICAUD, J.; ROUILLON, V.; GRUNER, L.; BRUNEL, J. C.; FRANCOIS, D.; BOUX, J.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 415-424, 2007.

TEREFE, G., YACOB, H. T., GRISEZ, C., PREVOT, F., DUMAS, E., BERGEAUD, J. P., DORCHIES, P., HOSTE, H., JACQUIET, P. *Haemonchus contortus* egg excretion and female length reduction in sheep previously infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 271–283, 2005.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology**. Elsevier Saunders, 9th ed. 533 p, 2013.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**, 5^a ed., São Paulo: Elsevier, 587 p., 2008.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária – uma introdução**. 6^a ed. São Paulo: Roca, 2002.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204 (2), p. 239-43, 2007.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4^a ed. Tokkyu: Japan. Internacional Cooperation Agency, 1998, 143p.

VAN WYK, J. A.; BATH, G. F. The FAMACHA system from managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, p. 509-529, 2002.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Revista Ciência & Tecnologia Agropecuária**, v. 2, p. 28-31, 2008.

ZAROS, L. G.; NEVES, M. R. M.; BENVENUTI, C. L.; NAVARRO, A. M. C.; SIDER, L. H.; COUTINHO, L. L.; VIEIRA L. S. Response of resistant and susceptible Brazilian

Somalis crossbreed sheep naturally by *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, v. 1, p. 1432-1955, 2014.

ZAROS, L. G.; BRICARELLO, P. A.; AMARANTE, A. F. T.; ROCHA, R. A.; KOOYMAN, F. N. J.; VRIES, E. D. E; COUTINHO, L. L. Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 68-73. 2010

ZAROS, L. G.; BRICARELLO, P. A.; AMARANTE, A. F. T.; COUTINHO, L. L. Quantification of bovine cytokine expression using real-time RT-PCR methodology. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 575-579, 2007.

ZHAO, A.; MCDERMOTT, J.; URBAN JUNIOR, J. F.; GAUSE, W.; MADDEN, K. B.; YEUNG, K. A. MORRIS, S. C.; FINKELMAN, F. D.; SHEADONOHUE, T. Dependence of IL-4, IL-13 and nematode induced alterations in murine small intestine smooth muscle contractility. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 948-954, 2003.

WALDVOGEL, A. S.; LEPAGE, M. F.; ZAKHER, A.; REICHEL, M. P.; EICHER, R.; HEUSSLER, V. T. Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, p. 53-63, 2004.

WARD, J. H. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. **Journal of the American Statistical Association**, v 58, p. 236 -244, 1963.

WOLF, A. V.; FULLER, J. B.; GOLDMAN, E. J.; MAHONY, T. D. New refractometric methods for determination of total protein in serum and in urine. **Clinical Chemistry**, v. 8 (2), p. 158-165, 1962.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

O desenvolvimento da resistência contra os nematoides está associado com a resposta imunológica mediada por linfócitos T e B e também por células sentinelas.

Os estudos na literatura tem avaliado a ação destas células de defesa e demonstrado que animais caracterizados como resistentes às infecções gastrintestinais induzem uma resposta do tipo Th2, com expressão de mRNA de citocinas, especialmente IL-4, IL-5 e IL-13, no abomaso e linfonodos mesentéricos, e aumento sérico de IgG1, IgG2 e IgE. Também sido observado aumento local do número de eosinófilos e mastócitos, nessas infecções. A expressão de IFN- γ , IL-2 e IL-12 esta mais relacionada a animais susceptíveis.

Contudo, a expressão de citocinas apresenta alta variabilidade e depende de inúmeros fatores, como o tipo, tempo e fases da infecção, o que explica os resultados encontrados neste estudo com caprinos. Ainda assim foi detectada maior expressão de IL-5 e IL-10 no grupo susceptível após cinco semanas de infecção. Estes resultados podem ser usados em estudos futuros para localização de marcadores genéticos associados a esta situação biológica.