

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES LOCAIS
ASSOCIADAS AO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA
PARASITÁRIA EM CORDEIROS DA RAÇA MORADA NOVA**

João Henrique Barbosa Toscano

Médico Veterinário

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES LOCAIS
ASSOCIADAS AO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA
PARASITÁRIA EM CORDEIROS DA RAÇA MORADA NOVA**

João Henrique Barbosa Toscano

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina de Souza Chagas

Coorientadora: Dra. Cintia Hiromi Okino

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (área: Medicina Veterinária Preventiva)

2019

T713c

Toscano, João Henrique Barbosa

Caracterização de respostas imunes locais associadas ao fenótipo de resistência parasitária em cordeiros da raça Morada Nova / João Henrique Barbosa Toscano. -- Jaboticabal, 2019

94 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Ana Carolina de Souza Chagas

Coorientadora: Cintia Hiromi Okino

1. Haemonchus contortus. 2. Raça Morada Nova. 3. Resistência do hospedeiro. 4. Resposta imune local. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES LOCAIS ASSOCIADAS AO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA PARASITÁRIA EM CORDEIROS DA RAÇA MORADA NOVA

AUTOR: JOÃO HENRIQUE BARBOSA TOSCANO

ORIENTADORA: ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS

COORIENTADORA: CINTIA HIROMI OKINO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:



Pesquisadora Dra. ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS

Departamento de Sanidade Animal / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - São Carlos/SP



Profa. Dra. MARCIA CRISTINA DE SENA OLIVEIRA

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA / São Carlos/SP



Prof. Dr. ALESSANDRO FRANCISCO TALAMINI DO AMARANTE

Departamento de Parasitologia / Instituto de Biociências - Unesp de Botucatu

Jaboticabal, 12 de abril de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

João Henrique Barbosa Toscano nasceu em Taquaritinga, no dia 30 de maio de 1992. Em março 2012 iniciou sua graduação na FCAV/Unesp – Campus de Jaboticabal, obtendo o título de Médico Veterinário em fevereiro de 2017. Ao longo dos anos de 2012 e 2013, participou como membro da comissão organizadora do Grupo de Estudos em Animais Selvagens (GEAS). Foi estagiário (12/2013 a 11/2015) no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR/FCAV/Unesp), auxiliando em testes de eficácia terapêutica e segurança clínica de antiparasitários e em projetos de pesquisa na área de Parasitologia Veterinária. Entre agosto de 2014 e julho de 2015, desenvolveu projeto de iniciação científica, com bolsa fornecida pela FAPESP, na área de Patologia Animal (Parasitologia Veterinária), sob orientação do Prof. Dr. Alvimar José da Costa. Participou, no ano de 2016, do projeto de extensão "Implementação da Liga Acadêmica de Saúde Pública Veterinária na FCAV/Unesp Jaboticabal e ações na Estratégia Saúde da Família do Município", com bolsa outorgada pela pró-reitoria de extensão universitária (PROEX). Foi professor voluntário do Cursinho Pré-Vestibular Ativo da FCAV/UNESP entre março de 2016 e julho de 2017, ministrando a disciplina de física nos períodos vespertino e noturno. Entre julho e novembro de 2016, realizou estágio curricular na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP), atuando na área de biologia molecular aplicada ao diagnóstico das parasitoses em ruminantes, sob supervisão da pesquisadora Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira. Em março de 2017 ingressou no curso de mestrado do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária (área de Medicina Veterinária Preventiva) pela FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal, desenvolvendo a parte experimental de seu projeto na EMBRAPA Pecuária Sudeste, com bolsa outorgada pela FAPESP.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha mãe **Rita de Cássia Boreggio Barbosa**, meu pai **Carlos Augusto Toscano** (*in memoriam*), à minha irmã **Ana Beatriz Barbosa Toscano** e à minha avó **Maria Conceição Boreggio Bilia**. Sem o amor, apoio e ensinamentos de vocês ao longo dos anos, nada disso teria sido possível.

Ao meu namorado **Mário Sérgio Teodoro da Silva Junior (Juju, Loirinho)** pelo amor, pelo companheirismo e, principalmente, pela paciência em meus momentos de crise.

À **Dra. Ana Carolina de Souza Chagas** pela oportunidade, pela amizade, pela dedicação na orientação e por acreditar em meu trabalho em todos os momentos.

À **Dra. Cintia Hiromi Okino** por todos os inúmeros ensinamentos em imunologia e biologia molecular e pela convivência no laboratório. Sem sua coorientação, amizade e paciência este trabalho não seria possível.

À **Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira**, sempre simpática, gentil e elegante, pela utilização das dependências e estruturas do Laboratório de Sanidade Animal.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de mestrado (processo n. 2017/00373-2) e do auxílio financeiro (processo n. 2017/01626-1).

A todos os pós-graduandos e bolsistas de Iniciação Científica do Laboratório de Parasitologia Veterinária (LPV): **Isabella** (amiga desde os tempos de CPPAR), **Amanda, Alemán, Marei, Carolzinha, Luciana, Matheus e Louyse, Derba e Leandro**. A amizade e o auxílio de vocês nas “colheitas infinitas” e na execução das análises parasitológicas da criançada fizeram meus dias na Embrapa muito mais prazerosos!

Ao **Dr. Sérgio Novita Esteves** e aos funcionários de campo da Embrapa Pecuária Sudeste pela manutenção dos cordeiros e pelo auxílio nas colheitas de campo.

Ao **Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante** pelo fornecimento dos antígenos e anticorpos para realização dos testes sorológicos e ao **Dr. César Cristiano Bassetto** por toda a ajuda na padronização dos testes de ELISA.

SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Potencial da raça Morada Nova no Brasil	2
2.2. Impacto dos nematódeos gastrintestinais na ovinocultura	3
2.3. Resistência de ovinos aos nematódeos gastrintestinais	5
2.4. Resposta imune inata nas infecções por nematódeos gastrintestinais.....	6
2.4.1. Receptores de reconhecimento de padrões	6
2.4.2. Resposta inflamatória e controle da inflamação	7
2.4.3. Células epiteliais da mucosa e o papel das citocinas “alarminas”	8
2.5. Resposta imune adaptativa nas infecções por nematódeos gastrintestinais	9
2.5.1. Apresentação de antígenos, ativação e diferenciação de linfócitos naíve	9
2.5.2. Diferenciação dos linfócitos T CD4+ e polarização Th1/Th2.....	10
2.5.3. Anticorpos e resposta imune humoral.....	11
3. OBJETIVOS	13
3.1. Geral	13
3.2. Específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Animais experimentais e manejo animal	14
4.2. Fenotipagem: parâmetros parasitológicos, sanguíneos e produtivos	15
4.3. Avaliação das respostas imunes locais.....	16
4.3.1. Amostragem	16
4.3.2. Seleção dos genes-alvo e desenho dos “primers”	17
4.3.3. Extração de RNA.....	18

4.3.4. Síntese do cDNA.....	19
4.3.5. Desenvolvimento e otimização dos ensaios de qPCR	19
4.3.6. Avaliação da eficiência dos primers desenhados	20
4.3.7. Quantificação relativa da expressão gênica	20
4.3.8. Preparo do antígeno larval de <i>H. contortus</i>	21
4.3.9. Preparo das amostras de muco abomasal.....	21
4.3.10. Mensuração dos anticorpos locais	22
4.3.11. Histopatologia do abomaso e contagem de eosinófilos e mastócitos.....	23
4.4. Análise estatística	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Fenotipagem: parâmetros parasitológicos, sanguíneos e produtivos	24
5.1.1. Estado sob infecção natural (desmame) e classificação dos fenótipos	24
5.1.2. Parâmetros parasitológicos: Contagem de OPG	26
5.1.3. Parâmetros sanguíneos: VG e redução percentual do VG	29
5.1.4. Parâmetros produtivos: peso corporal.....	33
5.2. Avaliação das respostas imunes locais	36
5.2.1. Seleção dos extremo de infecção por <i>H. contortus</i>	36
5.2.2. Otimização dos ensaios de qPCR.....	37
5.2.3. Avaliação da eficiência dos primers desenhados	40
5.2.4. Quantificação relativa da expressão de genes associados à resposta imune	43
5.2.5. Mensuração dos anticorpos locais	63
5.2.6. Histopatologia do Abomaso e Contagem de eosinófilos e mastócitos	67
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS	75

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO****PRT Nº 04/2017**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DE RESPOSTAS IMUNES ASSOCIADAS AO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA PARASITÁRIA EM REBANHO OVINO DA RAÇA MORADA NOVA**, registrado com o nº 04/2017 sob a responsabilidade do pesquisador científico Ana Carolina de Souza Chagas, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE.

São Carlos,

Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

Reunião de 31/7/2017

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril/2017 a março 2019
Espécie/linhagem/raça	Ovinos Morada Nova
Nº de animais	494
Peso/Idade	15-40 Kg
Sexo	174 M e 320 F
Origem	CPPSE

CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES LOCAIS ASSOCIADAS AO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA PARASITÁRIA EM CORDEIROS DA RAÇA MORADA NOVA

RESUMO - Tendo em vista o impacto da infecção por *Haemonchus contortus* na ovinocultura, é crescente o número de estudos acerca da resistência a esse parasita, sendo essencial a compreensão dos mecanismos imunes diretamente relacionados. A resposta a infecções por helmintos é predominantemente de perfil Th2, embora o conjunto de mecanismos imunes que conferem resistência aos ovinos não sejam completamente elucidado. O presente estudo objetivou avaliar as respostas imunes locais (abomaso) associados à resistência à infecção por *H. contortus* em cordeiros Morada Nova, raça considerada resistente. Um rebanho composto por 287 ovinos foi fenotipado, por meio de contagens de ovos nas fezes, volume globular e peso corporal, após dois desafios parasitários com 4000 L₃. Os 20 extremos de infecção (10 mais resistentes e 10 mais susceptíveis) foram submetidos a um terceiro desafio e abatidos sete dias após. Foram quantificados, por RT-qPCR, os níveis de expressão de 22 genes associados às respostas imunes, em abomaso e linfonodos abomasais. Além disso, eosinófilos e mastócitos foram quantificados, e os níveis de IgG e IgA no muco abomasaal mensurados. Genes relacionados à resposta inata (TLR2 e CFI) foram superiormente expressos na região pilórica dos animais resistentes. Esses animais também apresentaram, na região fúndica, IL33 (promotor da polarização Th2) e MS4A2 (receptor de IgE) em níveis superiores aos verificados nos susceptíveis. Marcadores pró-inflamatórios (TNF α e IL1 β) foram superiormente expressos na região fúndica do abomaso dos animais susceptíveis. IL4 (resposta Th2) foi superiormente expressa nos linfonodos abomasais dos animais susceptíveis. Os cordeiros resistentes apresentaram maior quantidade de eosinófilos na região fúndica do abomaso e níveis superiores de IgA local. Como esperado, animais susceptíveis apresentaram resposta inflamatória exacerbada, enquanto que os resistentes apresentaram resposta mediada por eosinófilos e IgE. Além disso, os resultados evidenciaram importância da resposta inata na resistência desses cordeiros à infecção por *H. contortus*, mediada por TLR2 e sistema complemento. Não obstante, esse é o primeiro estudo a associar, diretamente, o fenótipo de resistência parasitária em animais de produção com altos níveis de IL33.

Palavras-chave: *Haemonchus contortus*, raça Morada Nova, resistência do hospedeiro, resposta imune local

CHARACTERIZATION OF LOCAL IMMUNE RESPONSES ASSOCIATED WITH THE PARASITIC RESISTANCE PHENOTYPE IN MORADA NOVA LAMBS

ABSTRACT - Considering the impact of *Haemonchus contortus* infection on sheep breeding, there is an increasing number of studies addressing host resistance against to this parasite, and the understanding of directly related immune mechanisms is essential. The response to helminth infections is predominantly Th2-polarized, although the immune mechanisms that confer resistance to sheep are not fully elucidated. The present study aimed to evaluate the local immune responses (abomasum) associated with resistance to *H. contortus* infection in Morada Nova lambs, a breed considered resistant. A 287 sheep flock was phenotyped, by means of fecal egg counts, packed cell volume and body weight, after two parasitic challenges with 4000 L₃. The 20 extremes of infection (10 most resistant and 10 most susceptible) were submitted to a third challenge and slaughtered seven days later. 22 immune-related genes were quantified (RT-qPCR) in abomasum and abomasal lymph nodes. In addition, abomasal eosinophils and mast cells were quantified, and IgG and IgA levels were measured (ELISA) in abomasal mucus. Genes related to innate response (TLR2 and CFI) were superiorly expressed in the pyloric region of the resistant animals. IL33 (Th2 polarization promoter) and MS4A2 (IgE receptor) were also at higher levels in this group. Proinflammatory cytokines (TNF α and IL1 β) were superiorly expressed in the fundic region of the susceptible group, which also had IL4 (Th2 response) superiorly expressed in their abomasal lymph nodes. Resistant lambs had higher eosinophils counts in abomasal fundic region, and higher levels of local IgA. As expected, susceptible animals had an exacerbated inflammatory response, whereas the resistant ones had a response mediated by eosinophils and IgE. In addition, the results evidenced importance of the innate response in sheep resistance against *H. contortus* infection, mediated by TLR2 and complement system. Nevertheless, this is the first study to directly associate the parasite resistance phenotype in production animals with higher levels of IL33.

Keywords: *Haemonchus contortus*, host resistance, local immune response, Morada Nova breed

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ Id	– Diferença de idade
AIC	– Critério de Informação de Akaike
APC	– Célula apresentadora de antígenos
BCR	– Receptor de células B
BIC	– Critério de Informação Bayesiano
BLAST	– “Basic Local Alignment Search Tool”
C7	– Componente 7 do sistema complemento
CD	– Grupo de diferenciação
cDNA	– DNA complementar
CEUA	– Comissão de Ética no Uso de Animais
CFI	– Fator I do sistema complemento
CONCEA	– Conselho Nacional de Experimentação Animal
CPPSE	– Centro de Pesquisas de Pecuária do Sudeste
Cq	– Ciclo quantitativo
DAMP	– Padrões moleculares associados a danos
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DNAse	– Desoxirribonuclease
dpi	– Dia pós-infecção
E	– Escore
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	– Ensaio imunoenzimático
Embrapa	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Fc ϵ RI	– Receptor de alta afinidade para IgE
Fc ϵ RII	– Receptor de baixa afinidade para IgE
GAPDH	– Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GIN	– Nematódeos gastrintestinais
GMD	– Ganho médio diário
HE	– hematoxilina-eosina
IFN	– Interferon
Ig	– Imunoglobulina

IKK – $\text{I}\kappa\beta$ quinase

IL – Interleucina

IL2RA – Cadeia alpha do receptor de IL2

ILC2 – Células linfoides inatas tipo 2

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

$\text{I}\kappa\beta$ – Proteína inibitória kappa beta

L₁ – Larva de primeiro estágio

L₂ – Larva de segundo estágio

L₃ – Larva de terceiro estágio

L₄ – Larva de quarto estágio

L₅ – Larva de quinto estágio

M – Marcador de peso molecular

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade

MS4A2 – “Membrane Spanning 4-Domains A2” (codifica $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$)

$\text{NF}\kappa\beta$ – Fator nuclear kappa beta

NO – Óxido nítrico

NTC – Controle negativo

OD – Densidade óptica

OPD – 1,2-fenilenodiamina

OPG – Ovos por grama de fezes

P_{AJ} – Peso ajustado

PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos

pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

PRR – Receptor de reconhecimento de padrões

PV – Peso vivo

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

RCF – Força centrífuga relativa

RNA – Ácido ribonucleico

RNase – Ribonuclease

RT – Transcrição reversa

SC – Soro de coelho

SP – São Paulo

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

Tc – T citotóxica

TCR – Receptor de células T

TGF – Fator de transformação do crescimento

Th – T auxiliar

TLR – Receptor tipo “toll”

Tm – Temperatura de dissociação

TNF – Fator de necrose tumoral

Treg – T regulatória

UV – Ultravioleta

VG – Volume globular

YWHAZ – Tirosina 3-monoxigenase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de fenotipagem dos 287 cordeiros quanto à resistência a *Haemonchus contortus*, do primeiro desafio parasitário (após o desmame) até a seleção e abate dos extremos de infecção para avaliação das respostas imunes locais 17
- Figura 2.** Distribuição de frequência dos 287 cordeiros em relação às contagens de OPG, VG (%) e peso (kg), ao desmame 25
- Figura 3.** Distribuição de frequência dos 287 cordeiros, de acordo com os fenótipos resistente (A), intermediário (B) e susceptível (C) à infecção por *Haemonchus contortus*, em relação ao valor do escore utilizado para ranqueamento 26
- Figura 4.** Média e erro padrão das contagens de OPG dos 287 cordeiros, de acordo com os fenótipos resistente, intermediário e susceptível à infecção por *Haemonchus contortus* (A) e de acordo com os sexos (B), no desmame e ao longo dos dois desafios parasitários 27
- Figura 5.** Média e erro padrão dos valores de VG (%) dos 287 cordeiros, de acordo com os fenótipos resistente, intermediário e susceptível à infecção por *Haemonchus contortus* (A) e de acordo com os sexos (B), no desmame e ao longo dos dois desafios parasitários 31
- Figura 6.** Média e erro padrão da redução percentual do VG (%) dos 287 cordeiros, de acordo com os fenótipos resistente, intermediário e susceptível à infecção por *Haemonchus contortus* (A) e de acordo com os sexos (B), ao longo dos dois desafios parasitários 32
- Figura 7.** Média e erro padrão dos pesos (kg) dos 287 cordeiros, de acordo com os fenótipos resistente, intermediário e susceptível à infecção por *Haemonchus contortus* (A) e de acordo com os sexos (B), no desmame e ao longo dos dois desafios parasitários 34
- Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose a 2,5% dos produtos de amplificação dos genes de referência e dos genes-alvo relacionados às respostas imunes, a partir de cDNA oriundo de “pool” de RNA extraído de abomaso de ovinos. (M) Marcador de peso molecular “50 bp DNA Ladder” (Ludwig Biotec); (NTC) controle negativo (todos

os componentes da reação, exceto o cDNA). As setas vermelhas indicam a presença de dímeros de “primers” 38

Figura 9. Curvas de dissociação das reações de amplificação dos dois genes de referência e dos 22 genes-alvo associados às respostas imunes, incluindo a temperatura de dissociação dos produtos amplificados. As setas vermelhas indicam dímeros de “primers” 39

Figura 10. Comparação entre os níveis de expressão (“fold-change”) de genes associados à resposta imune inata nas regiões fúndica (AF) e pilórica do abomaso (AP) e linfonodos abomasais (LA) dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney 43

Figura 11. Comparação entre os níveis de expressão (“fold-change”) de genes associados às respostas pró-inflamatória (A) e anti-inflamatória (B) nas regiões fúndica (AF) e pilórica do abomaso (AP) e linfonodos abomasais (LA) dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney 50

Figura 12. Comparação entre os níveis de expressão (“fold-change”) de genes associados à resposta T regulatória (A), marcador geral de linfócitos Th (B) e citocinas associadas as respostas de perfil Th1 (C) e Th2 (D) nas regiões fúndica (AF) e pilórica do abomaso (AP) e linfonodos abomasais (LA) dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney 53

Figura 13. Comparação entre os níveis de expressão (“fold-change”) de FcRI nas regiões fúndica (AF) e pilórica do abomaso (AP) e linfonodos abomasais (LA) dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney 60

Figura 14. Comparação entre os níveis de expressão (“fold-change”) de genes associados ao sistema complemento nas regiões fúndica (AF) e pilórica do abomaso (AP) e linfonodos abomasais (LA) dos extremos (mais resistentes e mais

susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney 62

Figura 15. Comparação entre os níveis de anticorpos dos isótipos IgG e IgA (OD a 492nm) no muco abomasal dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney 64

Figura 16. Fotomicrografia de cortes histológicos das regiões fúndica (A) e pilórica (B) do abomaso de animal resistente à infecção por *Haemonchus contortus* (HE, magnificação de 400X). Nas imagens, pode ser observado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com discreta presença de eosinófilos (*) e deposição de material fibrinoide (seta) 68

Figura 17. Contagem de eosinófilos e mastócitos (número de células mm^2 , em magnificação de 400X) na mucosa das regiões fúndica (AF) e pilórica (AP) do abomaso dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os fenótipos pelo teste de Mann-Whitney 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos “primers” utilizados para quantificação relativa da expressão gênica em cordeiros Morada Nova resistentes e susceptíveis à infecção por *Haemonchus contortus* pela técnica de RT-qPCR, incluindo: número de acesso, comprimento dos produtos amplificados, junção entre éxons abrangida, eficiência (E), coeficiente de correlação (R^2) e inclinação da reta (continua) 41

Tabela 1. Sequências dos “primers” utilizados para quantificação relativa da expressão gênica em cordeiros Morada Nova resistentes e susceptíveis à infecção por *Haemonchus contortus* pela técnica de RT-qPCR, incluindo: número de acesso, comprimento dos produtos amplificados, junção entre éxons abrangida, eficiência (E), coeficiente de correlação (R^2) e inclinação da reta (conclusão) 42

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura brasileira, assim como em outros países de clima tropical, apresenta um grande gargalo em seus sistemas de produção: a verminose. No país, em especial no estado de São Paulo, as infecções por nematódeos gastrintestinais (GIN) têm como principal agente etiológico o parasita *Haemonchus contortus*, espécie altamente patogênica e responsável por grandes perdas econômicas, tanto com a queda de produtividade e óbito de animais, quanto com o gasto com medicamentos utilizados para seu controle (Amarante et al., 2004, O'Connor et al., 2007).

Dentre os ovinos criados no Brasil, os deslanados são considerados resistentes à verminose, com destaque à raça Morada Nova. A raça em questão, quando comparada com outras, nativas e exóticas, apresentou menores taxas de infecção e menor impacto no estado geral de saúde e produtividade, mesmo em períodos críticos, como o parto (Facó et al., 2008; Issakowicz et al., 2016). Explorar o fenótipo de resistência desses animais pode ser ferramenta extremamente útil, permitindo reduzir, sobremaneira, os gastos com anti-helmínticos, para os quais a resistência é múltipla e encontra-se disseminada (Veríssimo et al., 2012).

O fenótipo de resistência à verminose em ovinos está sob controle genético, com herdabilidade moderada, variando entre 0,3 e 0,5 (Amarante, 2004). Tal característica depende substancialmente da imunidade do hospedeiro, sendo classicamente associada à resposta imune adaptativa de perfil Th2, com liberação local das citocinas IL4, IL5 e IL13 em associação a altos níveis de IgE e elevada quantidade de eosinófilos e mastócitos, atuando, em conjunto, no processo de citotoxicidade mediada por anticorpos (Else e Finkelman, 1998; MacDonald et al., 2002). Além disso, há aumento da motilidade e secreção intestinal, estimulados pela IL13, auxiliando na remoção mecânica dos parasitas (Finkelman et al., 1997). Contudo, os dados são relativamente escassos no tocante ao envolvimento de outros setores do sistema imune, em especial relativos ao papel da resposta inata. Ainda, ressalta-se a importância recentemente evidenciada das citocinas IL25 e IL33, denominadas “alarminas”, como linha de defesa inicial frente aos GIN (Barlow

et al., 2013; Pei et al., 2016; Koyasu e Moro, 2013), sobre as quais carecem estudos em todas as espécies de animais de produção.

Acerca da resposta imune aos GIN em ovinos, é importante ressaltar que grande parte dos trabalhos comparam diferentes raças ovinas, havendo pouca informação relativa à variabilidade intra-racial, especialmente em relação à raça Morada Nova. Destaca-se, ainda, que a compreensão dos mecanismos imunológicos associados aos diferentes fenótipos de resistência e susceptibilidade à verminose poderá fornecer valiosas informações para que futuro desenvolvimento e implementação de programas efetivos de seleção dessa característica, além do desenvolvimento de vacinas e outras medidas imuno-terapêuticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Potencial da raça Morada Nova no Brasil

No Brasil, existe grande diversidade de raças ovinas exóticas, tais como Texel, Ile de France, Suffolk e Dorper, e de seus cruzamentos, bem como de raças deslanadas adaptadas às condições tropicais, como Santa Inês e Morada Nova. As deslanadas são consideradas resistentes à verminose, característica extremamente importante diante do impacto dessa doença na ovinocultura (Amarante et al., 2004; Bricarello, 2004; Rocha et al., 2005).

Morada Nova é uma raça naturalizada de ovinos deslanados do Nordeste brasileiro, adaptada ao clima tropical, rústica, sexualmente precoce, não apresenta sazonalidade reprodutiva, é prolífica, com excelente habilidade materna e possui pele de excelente qualidade (Facó et al., 2008). Embora a raça ainda seja pouco disseminada, estudos ressaltam seu potencial para produção de carne, tendo em vista sua resistência aos parasitas gastrintestinais (Mcmanus et al., 2013). Estudo recente, realizado no estado de São Paulo, demonstrou que a infecção por GIN em ovinos deslanados ocorreu principalmente por *H. contortus*, com aumento das taxas de infecção no periparto. Entretanto, esse aumento, que normalmente causa bastante impacto nos sistemas de produção de países tropicais, não chegou a afetar

a saúde das matrizes Morada Nova, que tiveram baixa taxa de infecção no período de 30 dias pós-parto (Issakowicz et al., 2016).

Haemonchus contortus, parasita de maior importância clínica e econômica em nível mundial (Cavalcante et al., 2009; Chagas et al., 2013), é o predominante nos rebanhos do estado de São Paulo (Amarante et al., 2004; Chagas et al., 2008; Louvandini et al., 2006). O rebanho Morada Nova tem demonstrado elevada resistência à verminose, evidenciada pela baixa necessidade de vermifugações. Por meio de projeto piloto e monitoramentos mensais, Chagas et al. (2015a) observaram que o volume globular (VG) desses animais estão sempre elevados em relação às outras raças, nas mesmas condições de manejo, encontrando-se média de 36.3% para a raça Morada Nova, 29.5% para Santa Inês, 26.9% para Texel e 25.9% para Dorper. Tal fato destaca a possibilidade de melhor exploração da resistência do hospedeiro a *H. contortus*, o que poderá, no futuro, contribuir para o desenvolvimento de linhagens resistentes, promovendo maior interesse dos produtores na utilização da raça.

2.2. Impacto dos nematódeos gastrintestinais na ovinocultura

Os custos associados ao controle da verminose superam todos os gastos para o controle de doenças endêmicas, sendo a principal fonte de prejuízos econômicos aos ovinocultores nos países tropicais. As perdas são elevadas em decorrência de redução no consumo de alimentos, crescimento retardado, perda de peso, carcaças com baixo rendimento e qualidade, queda na produção de leite, baixa fertilidade e, nos casos de infecções maciças, altas taxas de mortalidade (O'Connor et al., 2007).

O ciclo biológico do parasita *H. contortus* é do tipo direto. Os hospedeiros ovinos se infectam ao ingerirem larvas infectantes (L₃) presentes na pastagem contaminada. Ao serem ingeridas, as larvas sofrem desembainhamento no interior do rúmen e, ao chegarem no abomaso, penetram a mucosa gástrica, originando a fase histotrófica do ciclo. Dentro de 9 a 12 dias após a ingestão, as L₃ mudam para L₄, as quais retornam ao lúmen gástrico, sofrendo a última muda, originando as L₅. Após cerca de 21 dias da infecção, os adultos sexualmente maduros podem ser encontrados (El-Ashram et al., 2017). Após a cópula, as fêmeas, altamente

prolíficas, colocam seus ovos, que são expelidos junto das fezes do hospedeiro, contaminando a pastagem. Em condições ideais, as larvas (L₁) eclodem dentro de algumas horas no ambiente e, após cerca de cinco a sete dias, duas mudas ocorrem, dando origem às L₃. As larvas infectantes, protegidas pela bainha remanescente do estágio anterior (L₂), possuem grande resistência aos fatores ambientais, podendo resistir por até um ano em condições de elevadas temperatura e umidade (O'Connor et al., 2006).

A hemoncose ovina acarreta em variados sinais clínicos, majoritariamente decorrentes da ação hematófaga do parasita. A perda de sangue decorrente do repasto sanguíneo acarretam em variados graus de anemia, a depender do estado fisiológico do hospedeiro e da carga parasitária. Em infecções severas e/ou em animais sem aporte nutricional adequado, a hemorragia resultante do parasitismo por *H. contortus* pode levar à morte. Além disso, a lesão das glândulas gástricas reduz a atividade das bombas de próton, com consequente aumento do pH gástrico, resultando em redução da conversão do pepsinogênio em pepsina, impedindo a digestão de proteínas, cuja absorção já se encontra prejudicada pela mucosa lesionada (Bowman et al., 2010). Em consequência, ocorre hipoproteinemia, acarretando em sinais clínicos característicos, com destaque para o edema submandibular. Presença de diarreia associada à hemoncose, contudo, é raramente observada.

A resistência dos parasitas aos medicamentos é um grande obstáculo ao crescimento da ovinocultura e tem feito com que alguns criadores abandonem a atividade no estado de SP (Amarante et al., 2004). Essa resistência está disseminada e ocorre para grande parte dos princípios ativos atualmente disponíveis (Winterrowd et al., 2003; Coles et al., 2006; Almeida et al., 2010), tendo sido detectada em grande parte dos rebanhos ovinos avaliados no estado de SP (Veríssimo et al., 2012). O monepantel, molécula recente e de elevado custo, constitui a única alternativa para o controle de helmintos em muitos rebanhos de todo o país. Essa situação poderá culminar em disseminação da resistência a esse grupo químico, a qual foi recentemente diagnosticada no país (Cintra et al., 2016; Albuquerque et al., 2017; Martins et al., 2017), em um breve intervalo de tempo.

A crescente resistência múltipla aos anti-helmínticos tem implicação direta na redução da produtividade dos rebanhos, acarretando em significativas perdas econômicas. Esse cenário, aliado à permanente e crescente preocupação com os potenciais riscos decorrentes dos resíduos de medicamentos no ambiente e em produtos de origem animal (Waller, 1999), evidenciam a importância da adoção de medidas alternativas para o controle da verminose, considerando os anti-helmínticos como recursos limitados e valiosos, sempre aliado a medidas auxiliares (Howell et al., 2008). Dessa forma, a seleção de ovinos resistentes às infecções por GIN constitui uma medida muito interessante, reduzindo a necessidade de vermifugações, facilitando o manejo e reduzindo os custos do sistema de produção. Sendo assim, a produtividade do rebanho seria aumentada e a eficácia dos princípios ativos mantida, viabilizando seu uso em situações de real necessidade.

2.3. Resistência de ovinos aos nematódeos gastrintestinais

De maneira geral, ovinos submetidos a repetidas infecções por GIN, dentre os quais *H. contortus*, adquirem certa imunidade à verminose (Miller et al., 1983; Barger et al., 1985). Contudo, o nível de resistência dos animais aos parasitas varia substancialmente entre e dentro das diferentes raças ovinas. As raças deslanadas, naturais de países com clima quente e úmido, ambiente favorável ao desenvolvimento dos helmintos, são, de maneira geral, mais resistentes a esses parasitas do que as raças lanadas, naturais de países de clima frio (Mugambi et al., 1997; Amarante et al., 2004; Bricarello et al., 2005; Amarante et al., 2009). A intensa variação intrarracial para o nível de resistência à verminose, por sua vez, se faz muito interessante na possibilidade de estudos relacionados ao melhoramento das raças quanto essa característica. Estudos tem demonstrado eficácia no aumento da resistência de raças ovinas mediante seleção, inclusive em raças inicialmente com alta susceptibilidade (Woolaston et al., 1990; Bisset et al., 1996; Gruner et al., 2002).

A capacidade do hospedeiro ovino em adquirir resposta imune protetora contra infecções por GIN está sujeita a múltiplos fatores, como idade, estado fisiológico, dentre outras características, estando, ainda, sob controle genético (Amarante et al., 2005; Andronicos et al., 2010; Hein et al., 2010). Animais jovens, por exemplo,

apresentam sempre maiores níveis de infecção em relação aos animais da mesmas raça quando adultos, em decorrência tanto da maturação do sistema imune quanto da aquisição de imunidade em animais constantemente expostos à larvas infectantes (Colditz et al., 1996; Vanimisetti et al., 2004). Com relação ao estado fisiológico, é notável o aumento das taxas de infecção em ovelhas nos períodos peri e pós-parto, no quais, por alterações hormonais e mudanças na demanda nutricional para produção de leite, as fêmeas apresentam acentuada queda na imunidade, resultando em aumento nos níveis de infecção e consequente contaminação da pastagem (Zajac et al., 1988; Woolaston, 1992).

O sistema imune é determinante no combate aos parasitas, e as respostas imunes são divididas, didaticamente, em inata e adaptativa. A primeira é exercida pelas células sentinelas de maneira não específica, tem início rápido e possui curta duração e não há formação de células de memória. A resposta adaptativa, por sua vez, é específica, tem início lento, possui longa duração e dependente de prévia exposição antigênica, originando célula de memória, resultando em resposta potencializada nas reinfecções (Tizard, 2009). Com relação aos GIN, em especial *H. contortus*, a compreensão dos mecanismos imunológicos diretamente associados à resistência às infecções por esses parasitas é fundamental, auxiliando no desenvolvimento de novas ferramentas de controle e tratamento.

2.4. Resposta imune inata nas infecções por nematódeos gastrintestinais

2.4.1. Receptores de reconhecimento de padrões

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções, e diversas células estão envolvidas no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e a danos (DAMP), por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), dentre os quais os receptores do tipo “toll” (TLR) são o grupo mais importante, expressos principalmente por células sentinelas das superfícies corpóreas, como macrófagos, mastócitos, células dendríticas e, também, em células epiteliais das superfícies mucosas (Glass, 2012). Existem diversos tipos de TLRs, cujo papel no reconhecimento de PAMPs de origem

fúngica e bacteriana já é relativamente bem documentado, carecendo informações quanto ao seu papel na defesa contra infecções por GIN, nas as quais TLR2, TLR4 e TLR9 parecem atuar, sendo superiormente expressos em ovinos resistentes a infecções por *H. contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* (Ingham et al., 2008; MacKinnon et al., 2009; Wang et al., 2014).

2.4.2. Resposta inflamatória e controle da inflamação

A principal via de sinalização envolvida na resposta inflamatória é a do fator nuclear κ B (NF κ B). Em situações fisiológicas, esse fator de transcrição encontra-se ligado a proteína inibitória κ B (I κ B). Sob estímulo pró-inflamatório, como a ligação dos PAMPs aos TLR, ocorre ativação da proteína I κ B quinase (IKK), levando à fosforilação e destruição do I κ B, liberando e ativando NF κ B, com consequente estímulo à síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL6, IL1 β e TNF α). Em animais que desenvolvem resposta efetiva contra nematódeos, essa resposta inflamatória inicial é seguida pela indução de atividade regulatória, caracterizada por aumento de IL10, TGF β (Maizels, 2005). Em ovinos, a resposta inflamatória aos GIN, como *H. contortus* e *Teladorsagia circumcincta*, parece seguir o mesmo padrão, sendo observado estado inflamatório crônico, com elevada expressão de membros da via de sinalização NF κ B (IKBKB e NFKBIA) e citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL6 e TNF α), além de atraso na expressão de marcadores anti-inflamatórios, como IL10 e TGF β em animais susceptíveis à infecção por GIN, em nível local (Ingham et al., 2008; Hassan et al., 2011a) ou sistêmico (Wang et al., 2014).

Na interface entre resposta imune inata e adaptativa existe a isoforma de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), cuja expressão pelas células sentinela é ativada pelas citocinas pró-inflamatórias e por produtos microbianos, levando à síntese de óxido nítrico (NO), agente oxidante com atividade citostática ou citotóxica contra vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e células tumorais (Macmicking et al., 1997; Colasanti et al., 2002). Ingham et al. (2008) encontraram iNOS superiormente expresso em ovinos resistentes a *H. contortus* e *T. colubriformis*.

2.4.3. Células epiteliais da mucosa e o papel das citocinas “alarminas”

Mais recentemente, tem sido destacado o papel das citocinas IL25 e IL33 na defesa contra infecções por GIN. Essas citocinas, denominadas “alarminas”, são constitutivamente expressas em células epiteliais das barreiras mucosas, dentre as quais o trato gastrointestinal, sendo as primeiras células a terem contato com agentes invasores. Em resposta à lesão do tecido epitelial pelas larvas dos parasitas, ocorre liberação das “alarminas” IL25 e IL33, (Yasuda et al., 2012), as quais são potentes estimuladoras de células CD4+ Th2-polarizadas, (Kondo et al., 2008), sendo o perfil de resposta imune associado à defesa contra infecções helmínticas, conforme será discutido na sequência.

Estudos têm evidenciado o papel de um grupo específico de células inatas recentemente descobertas na defesa contra infecções por GIN, as células linfoides inatas tipo 2 (ILC2), deficientes em marcadores celulares de superfície de linfócitos conhecidos (Fallon et al., 2006). Essas células atuam na indução de resposta Th2-polarizada, mesmo na ausência de resposta adaptativa desenvolvida contra os parasitas. As ILC2 respondem mediante estímulo das “alarminas”, e, após serem ativadas, proliferam-se e secretam citocinas Th2, principalmente IL5 e IL13 (Fort et al., 2001; Moro et al., 2010; Saenz et al., 2010). Sendo assim, essas células atuam como uma linha inicial de defesa contra infecções helmínticas, além de potencializarem a subsequente resposta imune adaptativa, sob dependência do estímulo por IL25 e IL33 (Neill et al., 2010; Barlow et al., 2013).

A importância das “alarminas” foi evidenciada em diversos estudos realizados com modelos murinos, tendo sido detectada, em animais com depleção de IL25, ineficaz controle das infecções helmínticas (Fallon et al., 2006; Owyang et al., 2006; Zhao et al., 2010). Essa inabilidade foi eliminada após administração de IL25 recombinante, de maneira aparentemente independente da atuação de células B e T (Fallon et al., 2006). IL33 tem demonstrado, igualmente, importante papel na indução de imunidade protetora contra infecções por GIN, sendo sua presença diretamente associada a elevadas produções de IL5 e IL13, eosinofilia e hiperplasia de células caliciformes na mucosa intestinal (Humphreys et al., 2008; Neill et al., 2010; Koyasu e Moro, 2013). Quanto à espécie ovina, são escassos os estudos

acerca do papel das alarminas no controle das infecções helmínticas, tendo sido encontrado apenas um estudo em relação ao papel da IL33, no qual Andronicos et al. (2012) detectaram aumento dessa citocina na mucosa intestinal após infecção por *T. colubriformis*. Quanto ao papel da IL25, contudo, nenhum estudo foi encontrado na literatura consultada, sendo esse o primeiro trabalho a avaliar, concomitantemente, a possível relação entre ambas as “alarminas” e a resistência aos GIN na espécie ovina.

2.5. Resposta imune adaptativa nas infecções por nematódeos gastrintestinais

2.5.1. Apresentação de antígenos, ativação e diferenciação de linfócitos naíve

A resposta imune adaptativa é específica, dependendo, para seu desenvolvimento, do reconhecimento de antígenos específicos, os quais são reconhecidos no sítio de infecção, por um conjunto de células denominado células apresentadoras de antígenos (APC), em especial macrófagos e células dendríticas. O reconhecimento ocorre após ligação dos antígenos a receptores de superfície das APC, principalmente via complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Essas células então migram aos linfonodos regionais ao sítio de infecção, apresentando os antígenos processados aos linfócitos “naíve”, levando à sua ativação, podendo desencadear dois segmentos básicos de resposta imune adaptativa: celular, mediada pelos linfócitos T, e humoral, mediadas pelos linfócitos B. Na imunidade celular, atuam principalmente três populações de linfócitos, os T citotóxicos (Tc, CD8+), os T auxiliares (Th, CD4+) e os T regulatórios (Treg, CD25+). Com relação à resposta imune frente aos GIN, os linfócitos T CD4+ são essenciais, e sua depleção impede o desenvolvimento de proteção contra esses parasitas (Jacobs et al., 1995; Gill et al., 1993a; Karanu et al., 1997), enquanto que os linfócitos T CD8+, parecem ter menor importância (Balic et al., 2002). Já a resposta imune humoral é caracterizada pela participação de anticorpos, os quais podem pertencer a um dos quatro principais isótipos de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM e IgE), secretadas por plasmócitos derivados de linfócitos B ativados (Chamizo et al., 2001).

2.5.2. Diferenciação dos linfócitos T CD4+ e polarização Th1/Th2

Os linfócitos T CD4+ naíve (Th0), a depender do estímulo para sua ativação, podem ser divididos em duas subpopulações celulares, Th1 (defesa contra patógenos intracelulares) e Th2 (defesa contra patógenos extracelulares), diferenciados em função de seu perfil de citocinas, sendo IFN γ associado ao perfil Th1 e IL4, IL5 e IL13 associados ao perfil Th2.

Infecções por GIN induzem uma resposta imune adaptativa de perfil Th2, acompanhada de elevada produção de IL4, IL5 e IL13, infiltrados de eosinófilos e mastócitos no sítio de infecção e produção de IgE (Else e Finkelman, 1998). Dessas citocinas, IL4 e IL13 induzem os linfócitos B a produzirem imunoglobulinas do isótipo IgE. A IL4, ainda, atua em um eixo de retroalimentação positivo sobre os linfócitos, aumentando ainda mais a produção das citocinas Th2 (Paul e Zhu, 2010). A IL5, por sua vez, estimula a produção de IgA local pelos linfócitos B (Harriman et al., 1988), além do desenvolvimento e ativação de eosinófilos, bem como a atração desses, a partir da medula óssea, ao sítio de infecção (Anthony et al., 2007). A IL13, por sua vez, estimula a hiperplasia de células caliciformes, com consequente incremento na produção de muco, além de aumento da permeabilidade do epitélio da mucosa e da contratilidade da musculatura lisa intestinal, facilitando, assim, a expulsão mecânica dos parasitas (Finkelman et al., 1997; Madden et al., 2002).

Estudos com modelos murinos tem sugerido a existência de dicotomia entre as respostas de perfil Th1 e Th2. As células Th0, ao serem diferenciadas em Th1, produzem grande quantidade de IFN γ , que atua em eixo de retroalimentação negativa para produção de IL4, com consequente inibição das células Th2 e estimulação das células Th1 (Pulendran, 2004; Tizard, 2009). Sendo assim, animais cuja resposta imune frente à infecções por GIN tenha polarização Th1 seriam mais susceptíveis, em teoria. De fato, diversos estudos têm associado esse antagonismo em bovinos naturalmente infectados com *Cooperia punctata* (Bricarello et al., 2008) e *H. placei* (Zaros et al., 2010), havendo superior expressão de IFN γ nos animais com maiores taxas de infecção. Com relação específica aos ovinos, embora o envolvimento de resposta imune com perfil seja evidente, dados acerca da

existência de uma dicotomia Th1/Th2 são inconclusivos. MacKinnon et al. (2015) detectaram superior expressão de IL13 em linfonodos abomasais de ovinos resistentes à verminose no início (3º dia pós-infecção – dpi) e final da infecção (27º dpi), com inferior expressão de IFN γ nesse grupo ao 27º dpi. Resultados semelhantes foram observados por Andronicos et al. (2010), que detectaram superior expressão de genes relacionados à resposta de perfil Th2 em ovinos resistentes a *T. colubriformis* e *H. contortus*. Os animais susceptíveis a *T. colubriformis*, por sua vez, apresentaram superior expressão de cxcl10, a qual é induzida por ação direta do IFN γ . Outros estudos encontraram concomitância de ambos os perfis, com elevado nível de expressão tanto de IL4 (Th2) quanto de IFN γ (Th1) em ovinos infectados com *H. contortus* (Meeusen et al., 2005; Pernthaner et al., 2005) e *O. ostertagi* (Canals et al., 1997; Gasbarre et al., 2001).

Outra subpopulação de linfócitos T, os Treg (CD25+), responsáveis pela tolerância imunológica, por meio de imunossupressão seletiva e controlada, têm demonstrado grande importância no controle das infecções por GIN, nas quais essas células encontram-se ativadas, sob ação de citocinas anti-inflamatórias, como IL10 e TGF β (Ohkura et al., 2013). No tocante aos ovinos, animais resistentes à verminose apresentam superior expressão de IL2RA (CD25) pouco tempo após a resposta inflamatória inicial (Hassan et al., 2011a; Maizels, 2005). Animais susceptíveis, por outro lado, apresentam atraso na expressão de IL2RA, mantendo, assim, um estado inflamatório crônico (Ingham et al., 2008; Hassan et al., 2011a).

2.5.3. Anticorpos e resposta imune humoral

A resposta imune humoral é desempenhada pelos linfócitos B, que, ao serem ativados pelo reconhecimento de antígenos apresentados pelas APC, mediante receptores de células B (BCR), são diferenciados em plasmócitos, células secretoras de anticorpos, pertencentes a quatro isótipos principais (IgA, IgG, IgE e IgM), a depender do estímulo antigênico e de citocinas dos linfócitos Th. Com relação à resistência de ovinos aos GIN, os isótipos IgA, IgG e IgE são os principais envolvidos.

Anticorpos do isótipo IgA, atuantes na defesa contra patógenos em superfícies mucosas, são associados à resistência de ovinos a infecções por *T. circumcincta* (Stear et al., 1995; McRae et al., 2014), *T. colubriformis* (Cardia et al., 2011) e *H. contortus* (Lacroux et al., 2006). Maiores níveis de IgA têm sido observados em animais resistentes à verminose (Strain et al., 2002; Hassan et al., 2011b), associados à redução de comprimento e fecundidade dos parasitas (Strain et al. 2002) e das cargas parasitárias (Bungiro et al. 2008). Contudo, o papel desse isótipo na defesa de ovinos contra *H. contortus* não é consenso entre os estudos, não tendo sido observada diferença nos níveis de IgA entre animais de raças resistentes e susceptíveis à hemoncose em alguns estudos (Amarante et al., 2004; Shakya et al., 2009).

A IgG é o anticorpo sérico predominante, associado à resposta secundária aos agentes patogênicos. Embora não tenha papel efetor tão importante quanto IgA e IgE, elevados níveis de IgG, em nível local ou sistêmico, tem sido associados à resistência de ovinos a *H. contortus* (Gill et al., 2000; Lacroux et al., 2006, Andronicos et al., 2010) e *T. colubriformis* (Andronicos et al., 2010).

O isótipo IgE, produzido por linfócitos B ativados mediante estímulo exercido pela IL4, é possivelmente um dos mais associados às infecções por GIN, com níveis superiores desses anticorpos, em nível sistêmico ou local, observados em ovinos resistentes à infecções por *H. contortus* (Kooyman et al., 2000) e *T. colubriformis* (Bendixsen et al., 2004). Esses anticorpos atuam em conjunto aos eosinófilos e mastócitos na destruição dos parasitas e, mediante receptores específicos para a porção Fc de IgE (FcεRI e FcεRII), essas células ligam-se aos helmintos, previamente recobertos pelas imunoglobulinas, sendo ativadas e liberando o conteúdo de seus grânulos tóxicos, em um processo denominado citotoxicidade mediada por anticorpos (Macdonald et al., 2002; Urb e Sheppard, 2012; Voehringer, 2013).

Estudos têm sugerido importante papel do sistema complemento em conjunto à resposta imune humoral. Eosinófilos ovinos expostos, *in vitro*, a L₃ de *H. contortus* e soro de animais imunizados (ricos em anticorpos) contra esse estágio do parasita, tiveram maior sucesso na imobilização larval quando foram adicionadas proteínas do sistema complemento (Rainbird et al., 1998). Essa atuação do complemento na

resistência a *H. contortus* foi reforçada em estudo recente (Guo et al., 2016), sendo observada superior expressão de 11 genes relacionados à ativação do complemento em animais resistentes à hemoncose, em especial o componente 7 (C7) e fator I (CFI).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar os mecanismos de respostas imunes locais associados à resistência a *H. contortus* em cordeiros da raça Morada Nova.

3.2. Específicos

- a)** Identificar, em cordeiros experimentalmente infectados com *H. contortus*, os extremos de infecção (mais resistentes e mais susceptíveis), por meio de contagem de OPG, VG e peso corporal.
- b)** Otimizar ensaios de RT-qPCR para quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes locais.
- c)** Quantificar a expressão de 22 genes relacionados às respostas imunes em abomaso e linfonodos abomasais dos extremos de infecção.
- d)** Avaliar os níveis de IgA e IgG anti-L₃ de *H. contortus* locais (ELISA) dos extremos de infecção.
- e)** Quantificar eosinófilos e mastócitos no abomaso dos extremos de infecção.
- f)** Correlacionar níveis de infecção por *H. contortus* (OPG), VG, desempenho (peso), níveis de expressão de genes relacionados às repostas imunes, títulos de anticorpos anti-L₃ de *H. contortus* e contagem de eosinófilos e mastócitos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais e manejo animal

O presente experimento foi conduzido no biotério da raça Morada Nova do Centro de Pesquisas de Pecuária do Sudeste (CPPSE/Embrapa – São Carlos, SP), e todos os procedimentos adotados foram aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da unidade, sob protocolo nº 04/2017, estando de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

O rebanho ovino da raça Morada Nova do CPPSE foi introduzido na unidade no ano de 2009, quando foram adquiridas matrizes de uma propriedade localizada na região de Franca, SP. A partir do referido ano, o rebanho tem sido criado na fazenda experimental, utilizando-se de reprodutores advindos de outras propriedades também da região de Franca, SP. No ano de 2014, foram adquiridos três novos reprodutores oriundos do Instituto de Zootecnia (IZ) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) de Nova Odessa – SP, selecionados fenotipicamente com base em características voltadas à produção de carne. Nenhum trabalho de seleção relacionado à resistência parasitária tem sido desenvolvido desde então.

Para execução do presente estudo, foram utilizados 287 cordeiros da raça Morada Nova, 146 machos e 141 fêmeas, com pesos ao nascer entre 1,10 kg e 4,20 kg (média de $2,74 \pm 0,58$ kg), produtos de 131 matrizes e 4 reprodutores, em duas estações de monta. Do total de cordeiros, 151 foram resultado da primeira estação de monta, nascidos entre abril e maio de 2017. Os 136 restantes foram obtidos na segunda estação de monta, nascidos entre março e maio de 2018.

Na fase de aleitamento, os cordeiros foram mantidos junto das mães e submetidos a manejo alimentar em sistema “creep feeding”, utilizando ração composta por 58,8% de milho em grãos moído, 39% de farelo de soja, 1,2% de calcário calcítico e 1,0% de sal mineral próprio para ovinos. A composição bromatológica do referido alimento foi de 22,2% de proteína bruta (PB), 71,8% de nutrientes digestíveis totais (NDT), 0,63% de cálcio e 0,43% de fósforo. Os animais

foram assim mantidos da primeira semana de vida aos 90 dias de idade, quando ocorreu o desmame. Os cordeiros desmamados foram mantidos em quatro piquetes, com pastagem de capim Aruana, capim estrela e braquiariinha, separados pelo sexo (machos e fêmeas) e por lote, agrupados pelo mês de nascimento, em cada ano do experimento. A alimentação foi exclusivamente a pasto, com exceção do período seco, quando os animais foram suplementados com silagem de milho ou silagem de capim adicionada de polpa cítrica peletizada. Água e sal mineral foram fornecidos à vontade durante todo o período experimental.

4.2. Fenotipagem: parâmetros parasitológicos, sanguíneos e produtivos

Os 287 cordeiros, imediatamente após o desmame, foram submetidos a colheita de fezes para contagem de OPG (Ueno e Gonçalves, 1998) e tratados com monepantel 2,5% (Zolvix, Novartis) na dose de 2,5 mg/kg, para zerar a infecção natural (confirmação feita por duas contagens de OPG pós-tratamento). Após 15 dias (dia zero), eles foram experimentalmente infectados com 4000 L₃ de *H. contortus* (isolado Echevarría 1991), de acordo com as recomendações da “World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology” (Wood et al., 1995). Vale ressaltar que, como os animais foram mantidos a pasto durante a fenotipagem, estavam também sujeitos a infecção natural por parasitas. Amostras fecais foram colhidas individualmente para contagem de OPG nos dias zero, 21, 28, 35 e 42. Logo após, os animais foram novamente tratados e, 15 dias após, submetidos a um segundo desafio parasitário, com 4000 L₃ de *H. contortus*, adotando-se o mesmo esquema de colheitas descrito anteriormente. Por ocasião do desmame e nos dias 42 de ambos os desafios parasitários foram realizadas coproculturas (Roberts e O'Sullivan, 1950) do “pool” de fezes, para identificação genérica das L₃. Amostras de sangue foram colhidas quinzenalmente para determinação do VG, nos dias zero, 14, 28 e 42 de cada desafio. Para evitar óbitos, animais com VG igual ou inferior a 20%, seriam vermifugados, independentemente da contagem de OPG. Para a avaliação do desenvolvimento ponderal dos cordeiros, os mesmos foram pesados ao nascimento, ao desmame e nos dias zero, 28, 56, 84 e 112, contados a partir do primeiro desafio parasitário. Tendo em vista a diferença de idade entre os cordeiros,

o peso (PV) foi ajustado em relação ao cordeiro mais velho de cada lote, considerando o ganho médio diário (GMD) do cordeiro e a diferença de idade (ΔId), em dias, entre esse e o cordeiro mais velho, naquela data de pesagem. O peso ajustado (P_{AJ}) foi calculado pela fórmula: $P_{AJ} = PV + GMD \cdot \Delta Id$.

A partir dos dados da fenotipagem, os cordeiros foram classificados fenotipicamente como resistentes (20%), intermediários (60%) ou susceptíveis (20%) à infecção por *H. contortus*, de acordo com ranqueamento por escore (E), no qual foram considerados a média de P_{AJ} , do desmame ao término do segundo desafio parasitário, a média da contagem de OPG dos dois desafios parasitários e a média de VG dos dois desafios parasitários, excluindo-se os dos dias zero (valores pós-vermifugação), de acordo com a fórmula: $E = (0,4 \cdot P_{AJ}) - (0,4 \cdot OPG) + (0,2 \cdot VG)$.

4.3. Avaliação das respostas imunes locais

Foram avaliadas as respostas imunes celular e humoral locais nos 20 cordeiros classificados como extremos de infecção (dez mais resistentes e dez mais susceptíveis), de acordo com o ranqueamento anteriormente descrito. A resposta imune celular foi avaliada pela quantificação relativa da expressão de genes associados às respostas imunes, por meio de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR), em amostras de abomaso e linfonodos abomasais, e pela contagem de mastócitos e eosinófilos na mucosa e submucosa do abomaso. A resposta imune humoral foi avaliada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), mensurando-se anticorpos dos isótipos IgG e IgA específicos em amostras de muco abomasal.

4.3.1. Amostragem

Os 20 cordeiros classificados como extremos de infecção foram alocados em baias com piso cimentado previamente higienizadas, de modo a evitar infecção por larvas presentes na pastagem. Esses animais foram submetidos a um terceiro desafio parasitário com 4000 L₃ de *H. contortus* e, sete dias após, abatidos por secção dos grandes vasos, após insensibilização com pistola pneumática, para

colheita de amostras de abomaso (regiões fúndica e pilórica) e linfonodos abomasais. Parte das amostras foi acondicionada em criotubos e submetida ao congelamento imediato em nitrogênio líquido (-196°C), sendo armazenadas a -80°C até o momento da extração de RNA. O restante das amostras foi fixado em formol a 10% v/v tamponado com fosfato (pH 7,2), para realização de exame histopatológico. Fragmentos de aproximadamente 4 cm^2 da região fúndica do abomaso foram colhidos e armazenados em tubos Falcon de 50mL, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C , para raspagem do muco abomasal, conforme descrito por Amarante et al. (2005). Na Figura 1 encontra-se esquematizada, de maneira simplificada, a fenotipagem e posterior seleção e abate dos extremos de infecção.

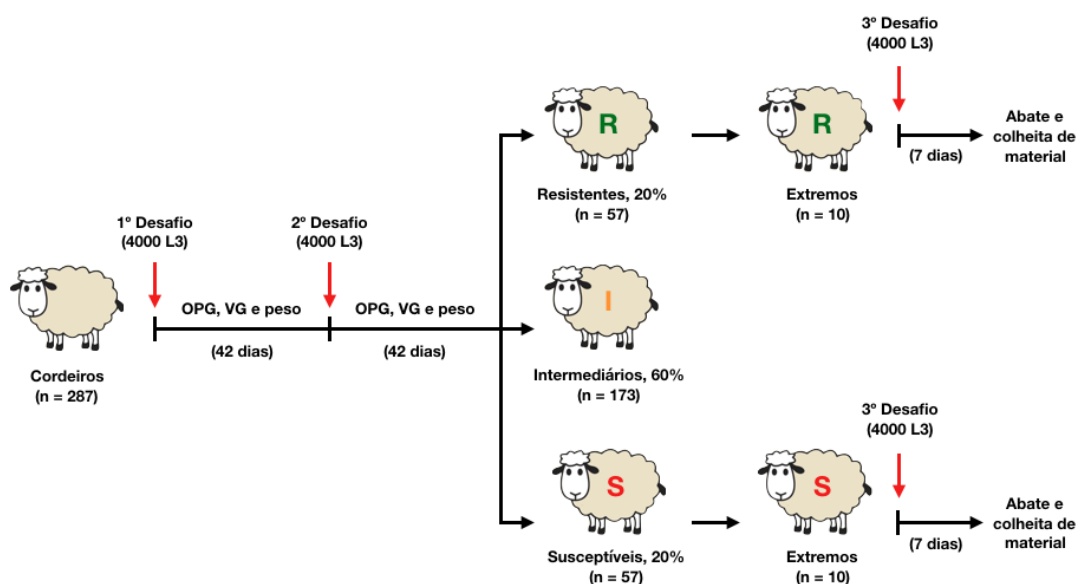


Figura 1. Esquema de fenotipagem dos 287 cordeiros quanto à resistência a *Haemonchus contortus*, do primeiro desafio parasitário (após o desmame) até a seleção e abate dos extremos de infecção para avaliação das respostas imunes locais.

4.3.2. Seleção dos genes-alvo e desenho dos “primers”

Com base no levantamento bibliográfico que fundamentou o presente trabalho, foram selecionados 22 genes relacionados às respostas imunes, para quantificação relativa por RT-qPCR. Foram avaliados genes relacionados às respostas: inata (TLR2, TLR4, TLR7, TLR10, NFKBIA, IKBKB, iNOS, IL25 e IL33);

pró-inflamatória (TNF α e IL1 β); anti-inflamatória (TGF β e IL10); T regulatória (IL2RA); imune humoral (MS4A2); adaptativa de perfis Th1 (IFN γ) e Th2 (IL4, IL5 e IL13); marcador de células Th (CD4) e componentes do sistema complemento (C7 e CFI).

Os oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio do programa computacional Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>), com base em sequências de RNA mensageiro ovino depositadas no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e sequências gênicas depositadas no Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), de modo a obter produtos entre 100 e 150 pares de base (pb). Sempre que possível, foram selecionados “primers” abrangendo pelo menos uma junção entre dois éxons adjacentes, de modo a evitar amplificação de DNA genômico. As sequências dos primers foram analisadas pelos programas Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimerServlet>) e Oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>), de modo a avaliar possível formação de estruturas secundárias. Para verificar a especificidade dos “primers” desenhados, as sequências esperadas dos produtos foram alinhadas com as depositadas nas bases de dados internacionais pelo programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.3.3. Extração de RNA

O RNA total dos tecidos foi extraído a partir de 0,1g das amostras de abomaso e 0,2g dos linfonodos abomaisais, com uso do QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen, Cat. 79306), seguindo as recomendações do fabricante, até separação da fase aquosa (contendo RNA) dos restos celulares, proteicos e componentes fenólicos. Logo após, procedeu-se à purificação do RNA em coluna de sílica, utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat. 74106). O RNA purificado foi eluído em 50 μ L de água livre de RNase.

A concentração e a pureza do RNA foram estimadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), por leitura de absorbância a 260nm e pela razão entre as leituras a 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280}), respectivamente. A integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão Tris-

Borato-EDTA (TBE) corado com brometo de etídio (0,2µg/mL no gel), a 100V por 40 minutos. O gel foi visibilizado em transiluminador UV Gel Doc™ XR (Bio-Rad).

4.3.4. Síntese do cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado em termociclador modelo T100™ (Bio-Rad), a partir de 1500ng de RNA total, com utilização do “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems™, Cat. 4368814) e “primers” oligo(dT), em volume final de 20µL, seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C. Para amplificação dos genes de éxon único (TLR2 e TLR10) e TLR7, para o qual não foi possível abranger junções éxon-éxon, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (ThermoFisher, cat. EN0521) antes da transcrição reversa.

4.3.5. Desenvolvimento e otimização dos ensaios de qPCR

Para a otimização dos ensaios de qPCR, foi utilizada amostra de cDNA sintetizada a partir de um “pool” de RNA extraído de fragmentos da região pilórica e da região fúndica do abomaso de um ovino, estocados a -80°C, previamente ao início do experimento. As reações foram conduzidas no termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com intercalante de DNA SYBR Green Tipo I, utilizando-se o “kit” Quantifast SYBR Green PCR (Qiagen, Cat. 204056), em microplacas ópticas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Cat. N8010560), seladas com adesivos ópticos MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Cat. 4311971). Em volume final de 15µL, foram adicionados 7,5µL de 2X Quantifast SYBR Green PCR Master Mix, 0,3µL de cada um dos *primers* diluídos a 10µM (3pmol por reação), 1,9µL de água ultrapura e 5µL do cDNA diluído a 4ng/µL (20ng por reação). As condições de ciclagem testadas consistiram em desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento mais extensão a 60°C por 35 segundos.

Para verificação da especificidade dos pares de *primers* avaliados, ao final de cada ciclo de amplificação foi efetuada curva de dissociação, com temperaturas entre 65°C e 95°C e incrementos de 0,5°C a cada cinco segundos. Além disso, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5% em tampão TBE corado com brometo de etídio (0,2µg/mL no gel), a 100V por 60 minutos, para verificar se os produtos amplificados apresentavam o tamanho esperado.

4.3.6. Avaliação da eficiência dos primers desenhados

As eficiências das reações otimizadas para os diferentes pares de “primers” desenhados foram determinados a partir de regressão linear, plotando-se os valores de Cq e a concentração de cDNA, a partir de diluições seriadas do cDNA puro (75ng/µL), com razão constante a depender do nível de expressão de cada gene, sendo igual a 10 para os mais expressos e igual a 5 para os menos expressos.

4.3.7. Quantificação relativa da expressão gênica

A normalização dos dados foi realizada pelo gene de referência YWHAZ (região pilórica do abomaso) e pela média geométrica dos valores de Cq dos genes GAPDH e YWHAZ (região fúndica do abomaso e linfonodos abomasais), selecionados em teste de estabilidade realizado anteriormente (Toscano et al., 2018). O nível de expressão gênica foi calculado pelo método do Cq comparativo ($\Delta\Delta Cq$), de acordo com Livak e Schmittgen (2001), para genes-alvo com eficiências semelhantes às do gene de referência, próximas de 100%, e pelo método da eficiência calibrada (Pfaffl, 2001), nos casos em que a diferença entre as referidas eficiências seja superior a 5%. Como amostra calibradora, foi utilizada a amostra com menor nível de expressão (maior ΔCq) para cada combinação gene/tecido avaliada.

4.3.8. *Preparo do antígeno larval de H. contortus*

Para a realização dos testes ELISA, foi utilizado antígeno solúvel obtido de L₃ de *H. contortus*, extraídas de coproculturas de hospedeiro ovino monoinfectado, e produzido de acordo com Amarante et al. (2009). As larvas foram desembainhadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,1%, sob constante monitoramento ao microscópio óptico. Logo após, as mesmas foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS, pH = 7,2) e centrifugadas por 10 minutos a 3000RCF, até desaparecer o cheiro do hipoclorito. As larvas foram fragmentadas em PBS suplementado com inibidor de protease (cOmplete™, Roche, Cat. 11697498001), a 4°C, com auxílio de sonicador modelo Vibra-Cell. O extrato obtido foi então centrifugado por 20 minutos, a 4°C, em velocidade de 15000RCF. O sobrenadante, contendo o antígeno bruto, foi recolhido, teve sua concentração proteica mensurada por kit comercial (Protal, Laborlab, Cat. 1770260), e foi armazenado a -80°C até a execução dos testes. O antígeno em questão foi gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante, Professor Titular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

4.3.9. *Preparo das amostras de muco abomasal*

As amostras de muco abomasal foram recuperadas de acordo com Kanobana et al. (2002). Os fragmentos da região fúndica do abomaso foram descongelados e o muco raspado da superfície da mucosa com auxílio de uma lâmina de microscopia. As amostras foram lavadas das lâminas com 3mL de PBS gelado, previamente adicionado de inibidor de protease (cOmplete™, Roche, Cat. 11697498001). Após agitação por 1 hora a 4°C, em banho de gelo, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos, a 4°C, em velocidade de 3000RCF. O sobrenadante foi recuperado e novamente centrifugado, por 30 minutos, a 4°C, em velocidade de 15000RCF. O sobrenadante foi recolhido e a concentração proteica das amostras de muco foi mensurada pelo “kit” comercial “BCA Protein Assay” (Pierce, Cat. 23225) e ajustada para 0,4g/dL, em PBS suplementado com inibidor de protease.

4.3.10. Mensuração dos anticorpos locais

Foram mensurados anticorpos anti-L₃ de *H. contortus* dos isótipos IgG e IgA em amostras de muco abomasal, por meio do teste ELISA, de acordo com metodologia descrita por Silva et al. (2012), com modificações.

Para execução dos testes, foram utilizadas placas de 96 poços MaxiSorp™ de fundo chato (Nunc, Cat. 442404) e filme selador em poliéster AxySeal (Axygen, Ref. PCR-SP). Foram utilizados 100µL do antígeno diluído (4µg/mL) em tampão carbonato-fosfato (pH = 9,6) pra sensibilização das placas, que foram seladas e incubadas “overnight” a 4°C e posteriormente lavadas seis vezes com água ultrapura adicionada de 0,05% de Tween 20, em lavadora automática de placas ELx405R (BioTek Instruments). Entre cada uma das etapas subsequentes, as placas foram lavadas de acordo com esse protocolo descrito. Para o bloqueio, foram utilizados 100 µL de soro de coelho a 1% em PBS adicionado de 0,05% de Tween 20 (PBS-SC), e a incubação foi feita a 37°C por 1 hora.

Para a execução dos testes, 100µL das amostras de muco abomasal diluídas (1:10) em PBS-SC foram adicionados, em duplicata, a cada poço da placa, que foi incubada a 37°C por 1 hora. Então, foram adicionados 100µL do anticorpo anti-IgG (Bethyl Laboratories, Cat. A130-101P) ou anti-IgA (Bethyl Laboratories, Cat. A130-108P) ovinos, conjugados com peroxidase, e diluídos a 1:20000 e 1:10000, respectivamente, em PBS-SC, e a incubação ocorreu a 37°C por 1 hora. Após, 100µL do substrato 1,2-fenilenodiamina (OPD – Sigma, Cat. P5412) diluído em tampão citrato (pH 5,0) e peróxido de hidrogênio (20µL para cada 50mL) foram adicionados, sendo a incubação feita em temperatura ambiente, no escuro, por 15 minutos. Logo após, sem lavagem das placas, a reação enzimática foi parada com 100µL de ácido sulfúrico a 3M e a leitura feita imediatamente depois, a 492nm, em leitora automática de microplacas modelo 550 (Bio-Rad). Os resultados foram calculados como sendo a diferença entre as densidades ópticas (OD) da amostra teste e do branco (reação conduzida sem amostra-teste).

4.3.11. Histopatologia do abomaso e contagem de eosinófilos e mastócitos

As amostras de abomaso fixadas em formol tamponado foram processadas por técnicas histológicas usuais de desidratação com concentrações crescentes de etanol, diafanização com xilol, inclusão em parafina e microtomia. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e azul de toluidina para contagem de, respectivamente, eosinófilos e mastócitos na mucosa e submucosa do abomaso. A referida quantificação foi expressa pelo número de células contadas em cinco campos microscópicos, sob magnificação de 400X. Esse serviço foi executado pelo laboratório de análises clínicas veterinárias VETPAT (Campinas, SP).

4.4. Análise estatística

Os valores de contagem de OPG foram transformados, após análise box-cox, em $(OPG + 1)^{0,37}$, de modo a normalizar os resíduos do modelo e estabilizar as variâncias. As contagens de OPG transformadas, os valores de VG, a redução percentual do VG (percentual de perda entre D0 e D42 de cada desafio parasitário) e as pesagens foram analisados por meio de modelo misto, com medidas repetidas do mesmo animal. O fenótipo (resistente, intermediário e susceptível à infecção por *H. contortus*), o sexo (macho e fêmea), o desafio parasitário (1º ou 2º desafio) e suas interações foram incluídos como efeitos fixos no modelo. Como efeito aleatório, foram incluídos a variável “animal” aninhada no “lote” (mês e ano de nascimento). Para avaliar a influência das datas de coleta, as mesmas foram incluídas como efeito fixo no modelo, sendo que, para as contagens de OPG e VG, a avaliação feita separadamente para cada desafio parasitário. Em todos os modelos, foi adotada matriz de covariância do tipo Auto-regressiva de Ordem 1, selecionada pelos critérios de informação de Akaike (AIC) e Bayesiano (BIC). As comparações múltiplas das médias ajustadas foram feitas pelo teste de Tukey. Os valores de expressão gênica relativa, OD (ELISA) e quantificação de eosinófilos e mastócitos entre os extremos de infecção por *H. contortus* foram comparados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para correlacionar as variáveis, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (fenotipagem) e Spearman (resposta imune).

Os resultados foram reportados como média $\pm$ erro padrão dos dados não transformados. Todas as análises foram realizadas pelo pacote estatístico R Studio (versão 1.1.463), adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os gráficos foram construídos utilizando o programa Graph Pad Prism (versão 7.0a). Ambos os programas foram executados em ambiente MacOS High Sierra (versão 10.13.6).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fenotipagem: parâmetros parasitológicos, sanguíneos e produtivos

5.1.1. Estado sob infecção natural (desmame) e classificação dos fenótipos

Ao desmame, os 287 cordeiros avaliados apresentaram, nos exames coproparasitológicos, contagens de ovos nas fezes entre 0 e 71350 OPG, com média e desvio padrão de 6643 ± 8994 OPG. Ovos de *Strongyloides papillosus*, *Moniezia* sp. e oocistos de *Eimeria* spp. foram observados nas fezes de diversos animais. No CPPSE, é realizado tratamento seletivo dos ovinos, os quais são vermifugados quando apresentam contagens de ovos nas fezes iguais ou superiores a 4000 OPG (Chagas et al., 2014). Com base nesse critério, dos 287 cordeiros utilizados no presente estudo, 137 animais (47,74%) receberiam tratamento anti-helmíntico ao desmame.

A coprocultura para identificação genérica dos estrongilídeos revelou predominância de *Haemonchus* sp. ($96,38 \pm 1,11\%$), seguido de *Cooperia* sp. ($2,13 \pm 0,48\%$) e *Trichostrongylus* sp. ($1,5 \pm 0,71\%$). A predominância do gênero *Haemonchus*, compreendendo quase que a totalidade de L₃ recuperadas nas coproculturas, já foi descrita anteriormente em ovinos pertencentes ao CPPSE, sob infecção natural (Chagas et al., 2008; Chagas et al., 2015b; Gonçalves et al., 2018), estando de acordo com outros estudos realizados em outras regiões do estado de São Paulo (Amarante et al., 2004; Louvandini et al., 2006).

Com relação aos exames hematológicos, foram observados valores de VG entre 17% e 45%, com média de $33,05 \pm 4,87\%$. Por se tratar de um parasita hematófago, o parasitismo por *H. contortus* (predominante nesse rebanho)

desencadeia variados graus de anemia. Em se tratando da espécie ovina, é considerado indicativo de anemia um valor de VG igual ou inferior a 24% (Feldman et al., 2000). No presente estudo, apenas 16 (5,57%) dos 287 cordeiros apresentaram, ao desmame, VG abaixo dos valores de referência para a espécie, representando apenas 11,68% dos 137 cordeiros com OPG ≥ 4000 , exibindo comportamento, portanto, de resiliência à infecção por *H. contortus*. Ou seja, 88,32% desses animais apresentaram VG dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie.

Quanto às pesagens, os animais foram desmamados com $17,59 \pm 3,54$ kg, quando iniciaram-se os desafios parasitários para a fenotipagem. A Figura 2 apresenta a distribuição de frequência dos cordeiros quanto às contagens de OPG, valores de VG e pesos, ao desmame.

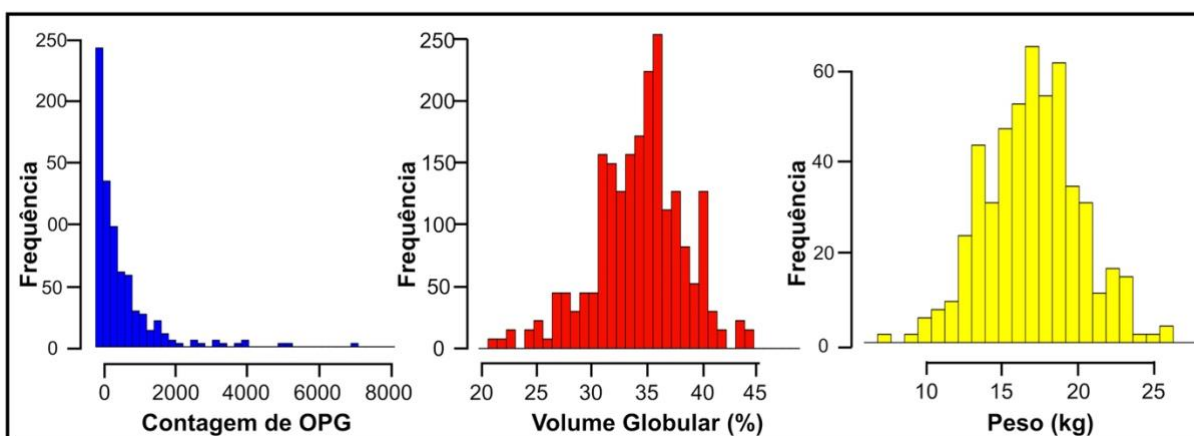


Figura 2. Distribuição de frequência dos 287 cordeiros em relação às contagens de OPG, VG (%) e peso (kg), ao desmame.

De acordo com o ranqueamento, com escore variando entre -14824,75 a 15,56 (Figura 3), os cordeiros foram agrupados em três fenótipos de resistência à infecção por *H. contortus*: aproximadamente 20% (57 animais) foram classificados como resistentes (E entre -587,13 e 15,56), 60% (173 animais) como intermediários (E entre -2885,60 e -587,57) e 20% (57 animais) como susceptíveis (E entre -14824,75 e -587,57).

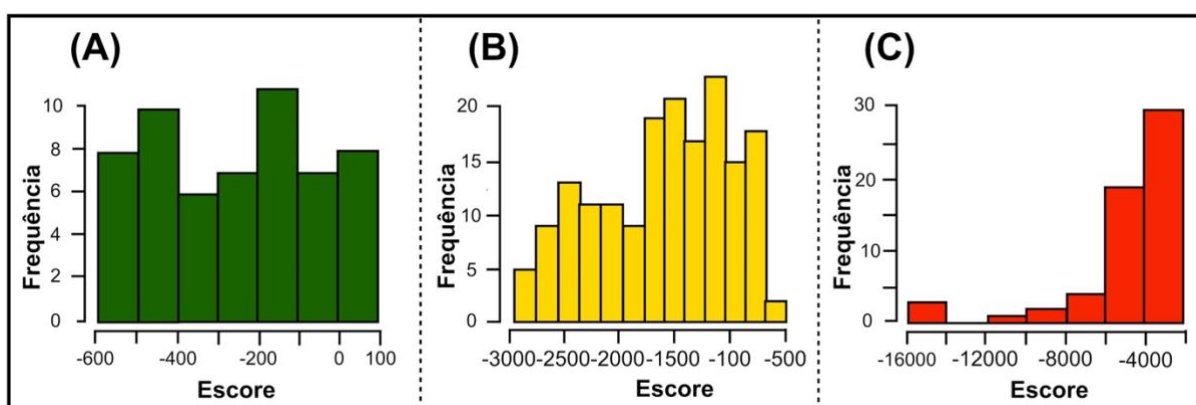


Figura 3. Distribuição de frequência dos 287 cordeiros, de acordo com os fenótipos resistente (A), intermediário (B) e susceptível (C) à infecção por *Haemonchus contortus*, em relação ao valor do escore utilizado para ranqueamento.

5.1.2. Parâmetros parasitológicos: Contagem de OPG

Em relação aos parâmetros parasitológicos, os níveis de infecção no desmame foram influenciados apenas pelo sexo ($p < 0,05$), sendo que os machos apresentaram maiores contagens de OPG em relação às fêmeas, com médias e erros padrões iguais a, respectivamente: $7431,96 \pm 811,98$ e $5843,48 \pm 705,14$. Embora não tenha havido diferença ($p > 0,05$) entre os fenótipos, as proporção de animais que seriam tratados ao desmame, de acordo com o tratamento seletivo, foram distintas. Dentre os 137 cordeiros com contagem de ovos nas fezes ≥ 4000 OPG, analisados em conjunto, 22 animais (16,06%) pertencem ao fenótipo resistente, 85 (62,04%) ao fenótipo intermediário e os 30 restantes (21,90%) ao fenótipo susceptível. Analisando os fenótipos em separado, 38,60% dos resistentes, 49,13% dos intermediários e 52,63% dos susceptíveis deveriam receber tratamento anti-helmíntico.

Considerando os dados dos desafios parasitários, as contagens de OPG foram influenciadas pelos diferentes fenótipos ($p < 0,0001$) e pelos sexos ($p < 0,0001$). Analisando a média geral dos dois desafios, as menores contagens de OPG foram observadas nos resistentes ($695,63 \pm 53,27$), seguidos dos intermediários ($4026,62 \pm 119,47$), e as maiores contagens foram encontradas nos animais susceptíveis ($11390,02 \pm 500,76$). As fêmeas apresentaram-se mais

resistentes que os machos, com médias iguais a, respectivamente: $3462,99 \pm 171,65$ e $6180,95 \pm 223,92$ OPG. Vale ressaltar que todas as coproculturas após realizadas ao final de cada desafio parasitário revelaram 100% de *Haemonchus*.

As médias de OPG diferiram ($p < 0,0001$) entre primeiro e segundo desafios parasitários, havendo uma interação significativa ($p < 0,0001$) entre fenótipo e desafio, motivo pelo qual os fenótipos foram então analisados em separado. Os cordeiros resistentes não diferiram, quanto às contagens de OPG, entre primeiro e segundo desafios parasitários. Com relação aos demais fenótipos, as contagens foram inferiores no segundo desafio parasitário, tanto para os intermediários, com médias de $5015,65 \pm 186,83$ (primeiro desafio) e $3047,80 \pm 139,68$ (segundo desafio), quanto para os susceptíveis, com médias de $14205,06 \pm 715,484$ (primeiro desafio) e $8537,28 \pm 648,52$ (segundo desafio). Quanto aos sexos, as médias diferiram entre primeiro e segundo desafios tanto nos machos ($7279,25 \pm 334,76$ e $5080,72 \pm 290,49$, respectivamente) quanto nas fêmeas ($4770,95 \pm 293,49$ e $2171,49 \pm 162,64$, respectivamente). As médias das contagens de OPG, do desmame ao final do segundo desafio parasitário, de acordo com os fenótipos e sexos, encontra-se representada na Figura 4.

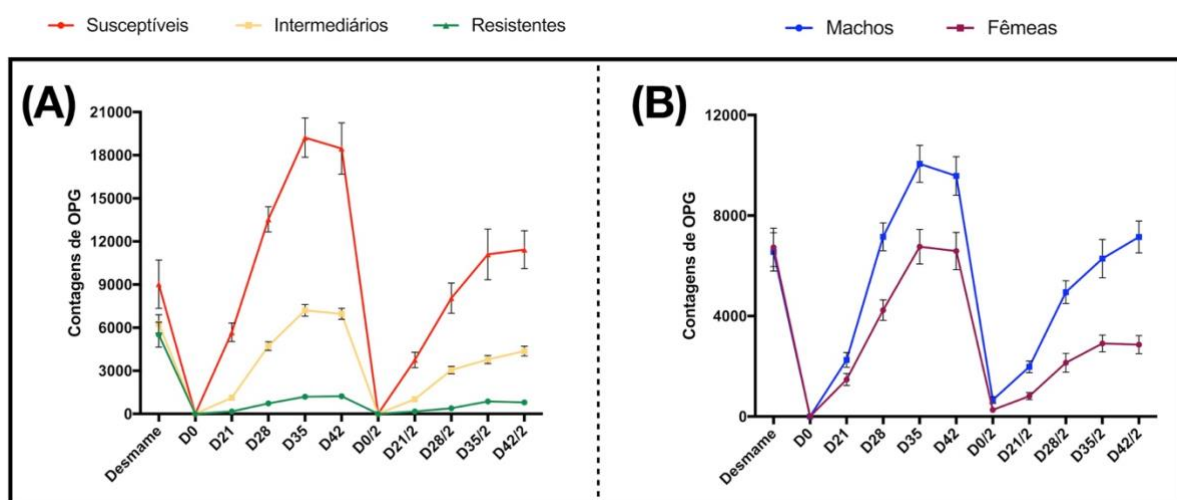


Figura 4. Média e erro padrão das contagens de OPG dos 287 cordeiros, de acordo com os fenótipos resistente, intermediário e susceptível à infecção por *Haemonchus contortus* (A) e de acordo com os sexos (B), no desmame e ao longo dos dois desafios parasitários.

Em se tratando dos cordeiros que necessitariam ser vermifugados, no D42 do primeiro desafio parasitário, 168 animais (58,54%) apresentaram contagem de ovos nas fezes ≥ 4000 OPG. Quando analisados os fenótipos em separado, constatou-se que 5,26% (3 animais) dos resistentes, 65,32% (113 animais) dos intermediários e 91,23% (52 animais) dos susceptíveis deveriam ser tratados. Além das diferenças entre fenótipos, observou-se maior proporção de animais com contagem de OPG ≥ 4000 nos machos (68,53%, 98 animais) em relação às fêmeas (50,00%, 70 animais). No segundo desafio, contudo, houve redução do número de animais necessitando tratamento anti-helmíntico, com 108 cordeiros (37,63%) nessa situação. A quantidade de animais com OPG elevado também diminuiu dentro dos três fenótipos, com a menor proporção observada nos resistentes (1,75%, 1 animal), seguido dos intermediários (38,73%, 67 animais) e dos susceptíveis, com a maior proporção (70,18%, 40 animais). Entre os sexos, também houve redução na proporção de animais com contagem de OPG elevada, nos machos (80 animais, 56,34%) e, mais intensamente, nas fêmeas (28 animais, 20,44%).

A verminose, principal causa de perdas econômicas nesses sistemas de produção, sofre grande influência de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos aos animais, incluindo raça, idade, estado fisiológico, nutrição, dentre outros. Dentre esses fatores que afetam os níveis de infecção parasitária, a idade dos animais e, principalmente, a prévia exposição aos parasitas, são importantíssimas causas de variação. Cordeiros sempre apresentam maior susceptibilidade aos helmintos em comparação aos ovinos adultos, considerando-se animais criados sob as mesmas condições (Colditz et al., 1996; Vanimisetti et al., 2004). Esse efeito da idade na resistência parasitária foi igualmente comprovada por Gamble e Zajac (1992), que não observaram diferença entre as contagens de OPG entre cordeiros de dois meses de idade oriundos de raças resistente e susceptível a *H. contortus*. Contudo, ao administrar a segunda infecção artificial, aos quatro meses de idade, foi possível observar a distinção entre os fenótipos, com base nas contagens de OPG. Esse resultado se assemelha ao observado no presente estudo, no qual os animais pertencentes aos três fenótipos (resistente, intermediário e susceptível) naturalmente primo-infectados, ao desmame, não diferiram entre si quanto aos níveis de infecção, devido à imaturidade do sistema imune. Entretanto, ao serem

artificialmente infectados (reinfecção), foi observada clara diferenciação dos três fenótipos logo no primeiro desafio parasitário.

Sabe-se, também, que exposição prévia aos parasitas é essencial para o desenvolvimento de imunidade efetiva contra GIN, permitindo considerável redução nos níveis de infecção em exposições repetidas. Ao avaliar o efeito de reinfecções por *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Teladorsagia circumcincta* em ovinos, foi observado que cordeiros reinfectados sempre apresentam significativa redução tanto nas contagens de OPG quanto nas cargas parasitárias, em comparação aos animais submetidos à primo-infecção (Gamble; Zajac, 1992; Aumont et al., 2003; Gruner et al., 2003). No presente estudo, o mesmo efeito foi observado ao longo do avançar da idade dos cordeiros e das reinfecções parasitárias. Foi observada redução de susceptibilidade no segundo desafio parasitário em ambos os sexos e praticamente todos os fenótipos, com exceção dos resistentes, que já apresentavam baixíssimos níveis de infecção desde o primeiro desafio.

Com relação à diferença observada entre os sexos no presente estudo, outros autores observaram igualmente, que fêmeas possuem superior resistência a infecções por diversos GIN, observados em várias espécies animais (Kamis et al., 1992; Evans, 2001; Selby et al., 1980; Behnke et al., 2000; Harder et al., 1992), incluindo os ovinos (Courtney et al., 1985; Gruner et al., 2003; Gauly et al., 2006). Um dos fatores apontados na causa dessa maior susceptibilidade dos machos frente às parasitoses é o efeito imunossupressor da testosterona, que ocasiona, *in vitro*, redução na expressão de IL4, IL5 e IL13 (D'Agostino et al., 1999; Bebo Junior et al., 1999; Wang et al., 1993) e menor taxa de degranulação de eosinófilos (Hamano et al., 1998). O mesmo efeito foi observado *in vivo*, sendo observada resposta Th2, protetora contra infecções helmínticas, mais pronunciada nas fêmeas (Huber et al., 1994).

5.1.3. Parâmetros sanguíneos: VG e redução percentual do VG

Para os valores de VG, ao desmame, apenas o sexo exerceu efeito significativo ($p < 0,05$), sendo que as fêmeas ($33,75 \pm 1,71\%$) apresentaram valores superiores aos machos ($32,50 \pm 1,71\%$). Mesmo os fenótipos não diferindo quanto

os valores de VG ao desmame, as proporções de animais com $VG \leq 24\%$ foram distintas. Dentre os 16 cordeiros com $VG \leq 24\%$, 2 animais (12,50%) pertencem ao fenótipo resistente, 9 (56,25%) ao fenótipo intermediário e 5 (31,25%) ao fenótipo susceptível. Analisando os fenótipos separadamente, constatou-se que apenas 3,51% dos resistentes, 5,20% dos intermediários e 8,77% dos susceptíveis apresentaram algum grau de anemia. Ainda, do total de cordeiros com valores de VG abaixo dos parâmetros de normalidade ao desmame, 15 animais (93,75%) eram animais com contagens de OPG superiores a 4000, os quais deveriam ser vermifugados. Apenas um animal (6,25%), posteriormente classificado como resistente, foi desmamado apresentando $VG \leq 24\%$, apesar de contagens de OPG inferior a 4000.

Ao longo dos desafios parasitários foi possível evidenciar efeitos significativos ($p < 0,0001$) tanto dos fenótipos, quanto dos sexos. Os animais resistentes apresentaram os maiores valores de VG ($35,20 \pm 0,39\%$), seguidos dos intermediários ($33,67 \pm 0,31\%$), e os menores valores foram observados nos animais susceptíveis ($31,10 \pm 0,39\%$). Com relação aos sexos, as fêmeas ($34,15 \pm 0,33\%$) apresentaram valores superiores aos machos ($32,49 \pm 0,33\%$).

Houve efeito significativo ($p < 0,01$) dos desafios parasitários sobre os valores de VG, com interações significativas entre fenótipo e desafio ($p < 0,01$) e entre sexo e desafio ($p < 0,01$). Os valores de VG dos animais resistentes não diferiram entre primeiro e segundo desafio parasitário. Quanto aos demais fenótipos, a média de VG dos intermediários no primeiro desafio parasitário ($33,30 \pm 0,34\%$) foi inferior em comparação ao segundo desafio ($34,03 \pm 0,34\%$), assim como nos susceptíveis, cujas médias de VG no primeiro e segundo desafios parasitários foram, respectivamente: $30,35 \pm 0,45\%$ e $31,86 \pm 0,45\%$. Quanto aos sexos, apenas as fêmeas diferiram entre primeiro ($33,51 \pm 0,36\%$) e segundo desafio ($34,80 \pm 0,36\%$). A Figura 5 apresenta as médias de VG no desmame e ao longo dos dias experimentais de cada desafio parasitário, de acordo com os fenótipos e sexos.

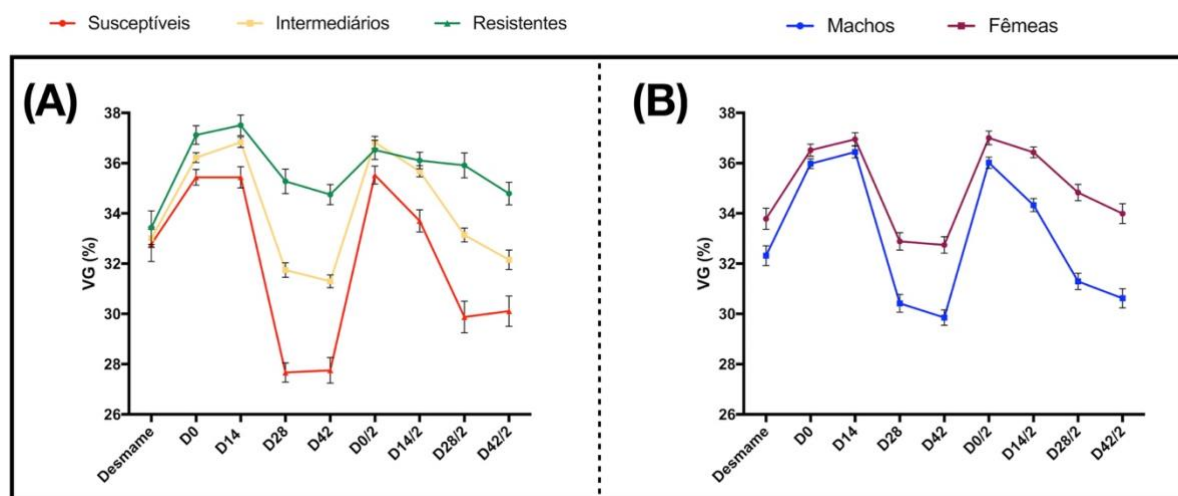


Figura 5. Média e erro padrão dos valores de VG (%) dos 287 cordeiros, de acordo com os fenótipos resistente, intermediário e susceptível à infecção por *Haemonchus contortus* (A) e de acordo com os sexos (B), no desmame e ao longo dos dois desafios parasitários.

Ao final do primeiro desafio parasitário, apenas uma pequena proporção dos cordeiros (5,23%, 15 animais) apresentou $VG \leq 24\%$, correspondendo a apenas 12,96% daqueles com contagem de OPG acima dos limites para tratamento. Analisando-se os fenótipos em separado, constatou-se que nenhum animal resistente, 2,31% (4 animais) dos intermediários e 19,30% (11 animais) dos susceptíveis apresentaram $VG \leq 24\%$ nessa data experimental. Foi observado, inclusive, que desses 15 animais com valores de VG abaixo do referencial, 14 (93,33%) eram machos. No segundo desafio, apesar da menor proporção de animais com contagens de OPG acima de 4000, a quantidade de animais com $VG \leq 24\%$ não diferiu em relação ao primeiro desafio, sendo que 13 (86,67%) desses 15 animais eram machos. Contudo, a proporção dentro dos fenótipos diferiu nesse segundo desafio, com ausência de animais com $VG \leq 24\%$ nos resistentes, 4,62% (8 animais) nos intermediários e 12,28% (7 animais) nos susceptíveis.

A redução percentual do VG entre o início (dia da infecção artificial) e final (D42) de cada desafio parasitário foi influenciada pelo fenótipo ($p < 0,0001$), pelo sexo ($p < 0,0001$) e pelo desafio parasitário ($p < 0,01$), não havendo interações significativas ($p > 0,05$). Os três fenótipos diferiram entre si para a característica, sendo que a média dos animais resistentes ($6,32 \pm 2,54\%$) foi inferior aos demais em cerca de duas vezes em relação aos intermediários ($12,25 \pm 2,41\%$) e três vezes

em relação aos susceptíveis ($18,97 \pm 2,53\%$). As fêmeas ($10,38 \pm 2,43\%$) apresentaram menor redução que o machos ($14,64 \pm 2,44\%$). Ao avaliar o rebanho como um todo, os animais apresentaram menor redução percentual do VG no segundo desafio ($11,23 \pm 2,44\%$), quando comparado ao primeiro ($13,79 \pm 2,44\%$). As médias das reduções percentuais do VG para os animais, de acordo com os fenótipos e com os sexos, em cada desafio parasitário, estão representadas na Figura 6.

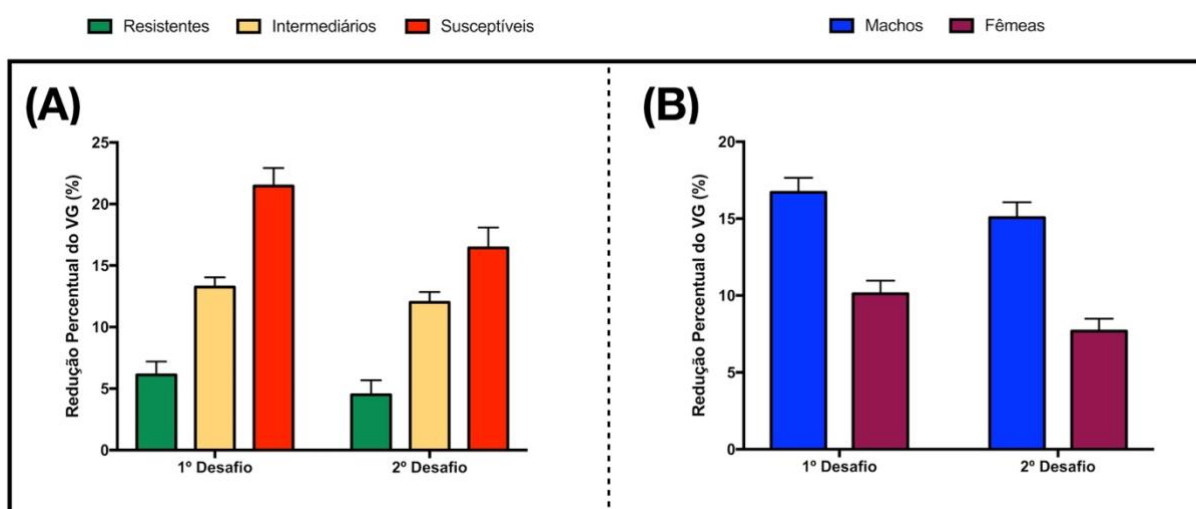


Figura 6. Média e erro padrão da redução percentual do VG (%) dos 287 cordeiros, de acordo com os fenótipos resistente, intermediário e susceptível à infecção por *Haemonchus contortus* (A) e de acordo com os sexos (B), ao longo dos dois desafios parasitários.

A infecção por *H. contortus* exerceu impacto sobre os parâmetros sanguíneos, sendo observado que, quanto mais alta a contagem de OPG, menor o VG, comportamento observado no desmame ($r = -0,61$; $p < 0,0001$) e durante os desafios parasitários ($r = -0,66$; $p < 0,0001$). Já para a redução percentual do VG, a correlação com as contagens de OPG foi positiva ($r = 0,39$; $p < 0,0001$).

Haemonchus contortus é um parasita hematófago. As larvas de último estágio (L₅) e os adultos podem ingerir, individualmente, cerca de 50µL de sangue por dia da mucosa do abomaso (Clark et al., 1962). Supondo uma infecção severa com carga parasitária igual a 5000 exemplares, as perdas sanguíneas diárias podem chegar a 250mL. Sendo assim, a avaliação de parâmetros hematológicos se faz uma medida

extremamente importante na avaliação do estado geral de saúde de ovinos parasitados por *H. contortus*, além dos exames coproparasitológicos. Nesse sentido, reduções dos valores de VG em animais infectados por esse parasita são esperadas, tendo sido observada em diversos estudos, avaliando infecções naturais (Lôbo et al., 2009; Reynecke et al., 2011; Zaragoza-Vera et al., 2019) e artificiais (Castillo et al., 2011; Bambou et al., 2013). Do mesmo modo, assim como observado no presente estudo, tem sido demonstrada correlação negativa entre os níveis de infecção por *H. contortus* e valores de VG, os quais sempre encontram-se elevados em animais de raças ou linhagens resistentes ao parasita (Amarante et al., 2009; Zaros et al., 2014; Pereira et al., 2016; Gonçalves et al., 2018). Ainda assim, existem animais com certa resiliência frente às infecções parasitárias, apresentando-se saudáveis mesmo infectados, como é o caso da raça Morada Nova. Alberts et al. (1987) observaram que os valores de VG de cordeiros da referida raça, em comparação a ovinos Santa Inês e Somalis brasileiro, apresentaram, mesmo quando as contagens de OPG eram elevadas e semelhantes entre os grupos, em infecção com predominância de *H. contortus*, mantiveram valores de VG dentro dos parâmetros de normalidade, ao longo de todo o experimento. Esse resultado destaca a resiliência da raça Morada Nova, que manteve-se clinicamente saudável apesar da infecção parasitária, assim como observado no presente estudo, evidenciado pela baixa proporção de animais com $VG \leq 24\%$ ao desmame e nos subsequentes desafios parasitários.

Tendo em vista essa correlação negativa entre a infecção por *H. contortus* e os parâmetros sanguíneos dos ovinos, o aumento dos valores de VG observado no segundo desafio parasitário já era esperado, tendo em vista a queda nos níveis de infecção ocorrida, decorrente da aquisição de imunidade devida ao aumento da idade dos animais e exposição prévia ao parasita.

5.1.4. Parâmetros produtivos: peso corporal

Os pesos ao desmame foram influenciados pelo fenótipo ($p < 0,05$) e pelo sexo ($p < 0,01$) dos cordeiros. Os pesos dos resistentes ($18,27 \pm 0,95$ kg) foram superiores aos dos susceptíveis ($16,55 \pm 0,94$ kg), enquanto que os pesos dos

intermediários ($17,68 \pm 0,87$ kg) não diferiram dos animais classificados nos outros fenótipos. Quanto aos sexos, os machos ($18,14 \pm 0,89$ kg) foram desmamados com pesagem superior às fêmeas ($16,86 \pm 0,89$ kg). Em decorrência dos desafios parasitários, os pesos foram influenciados tanto pelo fenótipo ($p < 0,01$), quanto pelo sexo ($p < 0,01$). No dia zero do primeiro desafio parasitário, os pesos dos animais de acordo com o fenótipo apresentaram o mesmo padrão observado no desmame. Contudo, a partir do D28, os resistentes e intermediários não diferiram entre si, e ambos apresentaram média de peso superior aos susceptíveis, comportamento este que foi mantido até o D112, pós-desafios, quando as médias de peso dos animais resistentes, intermediários e susceptíveis foram, $28,34 \pm 0,94$ kg, $27,65 \pm 0,47$ kg e $23,76 \pm 0,74$ kg, respectivamente. Deste modo, destaca-se fato de a seleção para resistência às infecções por *H. contortus* não apresentar evidências de prejuízo nos parâmetros produtivos, tendo em vista animais resistentes não diferirem em relação aos intermediários quanto ao peso corporal. Em relação ao sexo, os pesos dos machos foram superiores aos das fêmeas em todas as datas experimentais, sendo os respectivos pesos finais (D112) iguais a $28,16 \pm 0,69$ kg e $25,00 \pm 0,56$ kg. Na Figura 7 estão representadas as médias de peso no desmame e ao longo dos dias experimentais de cada desafio parasitário, de acordo com os fenótipos e sexos.

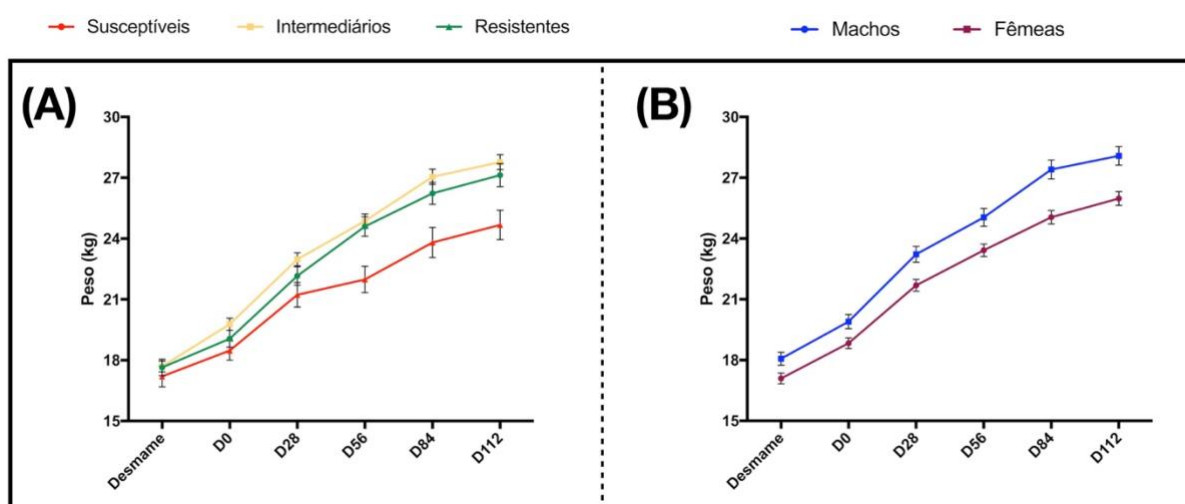


Figura 7. Média e erro padrão dos pesos (kg) dos 287 cordeiros, de acordo com os fenótipos resistente, intermediário e susceptível à infecção por *Haemonchus contortus* (A) e de acordo com os sexos (B), no desmame e ao longo dos dois desafios parasitários.

O peso ao nascer e, mais intensamente, o peso ao desmame exerceram influência positiva no peso final (D112) dos cordeiros, sendo as respectivas associações iguais a $r = 0,33$ ($p < 0,0001$) e $r = 0,73$ ($p < 0,0001$). Já em relação à infecção parasitária, a influência exercida no peso foi negativa. Altas contagens de OPG resultaram em menores pesos, tanto no desmame ($r = -0,23$; $p < 0,0001$) quanto no D112 ($r = -0,30$; $p < 0,0001$). Por outro lado, maiores valores de VG durante as infecções parasitárias, natural ou artificial, propiciaram maiores pesos, estando essas características positivamente associadas tanto no desmame ($r = 0,38$; $p < 0,0001$) quanto no D112 ($r = 0,34$; $p < 0,0001$).

A infecção por GIN traz inúmeros prejuízos à saúde dos animais, impactando significativamente o ganho de peso, sendo o emagrecimento o principal sinal clínico observado em animais com infecção subclínica, resultando em consideráveis perdas econômicas na ovinocultura. Em comparação a animais infectados, aqueles livres de parasitas gastrintestinais costumam apresentar-se mais produtivos. Ovinos infectados por GIN possuem menor performance, com reduzido ganho de peso diário e peso final (Coop et al., 1977, 1988). Resultados semelhantes foram observados ao comparar o efeito do tratamento anti-helmíntico no desempenho produtivo de cordeiros, sendo observado que os animais vermifugados tiveram ganho médio diário aproximadamente duas vezes superior ao grupo não tratado (Laurenson et al., 2016; Keegan et al., 2018). Com relação à diferença entre a produtividade de animais resistentes ou susceptíveis a infecções parasitárias, contudo, os resultados não são consenso. Enquanto alguns estudos evidenciam clara diferença no ganho de peso e peso final de cordeiros com diferentes graus de resistência (Greer et al., 2005; Idika et al., 2012; Hayward et al., 2014), outros estudos observam semelhança em tais parâmetros produtivos (Zaros et al., 2014; Cardia et al., 2011).

Essa diferença observada na avaliação do impacto da infecção parasitária no peso dos animais pode ser devida a fatores externos, como disponibilidade de alimento, suplementação, dentre outras. Nesse sentido, mesmo animais com superiores taxas de infecção, ao receberem suplementação adequada e suficiente, poderiam alcançar os parâmetros produtivos dos animais resistentes, mesmo que com elevada conversão alimentar. No presente estudo, ao avaliar animais de

mesmas raça, idade e condições de manejo, foi possível observar significativo impacto negativo da infecção artificial por *H. contortus* no peso dos animais ao longo do experimento, sendo evidenciado logo no início ao desmame, onde os animais susceptíveis apresentaram menor peso que os resistentes. A ausência de diferença de peso entre animais resistentes e intermediários ao longo do período experimental pode ser devida a considerável presença de animais resilientes no fenótipo intermediário, os quais puderam manter os parâmetros de saúde apesar de altas taxas de infecção, mantendo perfis produtivos semelhantes aos resistentes. Nesse sentido, apesar da manutenção dos parâmetros produtivos nesses animais resilientes, sabe-se que a demanda energética para tal é maior, sendo necessário maior consumo energético, tendo em vista a alta demanda desviada pelo sistema imune (Yu et al., 2000; Kyriazakis e Houdijk; 2006). Contudo, para confirmação dessa hipótese nos cordeiros da raça Morada Nova, novos estudos se fazem necessários, tendo em vista não ter sido possível calcular o consumo alimentar individual.

5.2. Avaliação das respostas imunes locais

5.2.1. Seleção dos extremos de infecção por *H. contortus*

De acordo com o ranqueamento previamente selecionado, os 20 extremos de infecção por *H. contortus* (10 mais resistentes e 10 mais susceptíveis) foram selecionados. Considerando-se os dois desafios parasitários em conjunto, o nível de infecção dos animais resistentes (média de $192,2 \pm 48,85$ OPG) foi significativamente inferior ($p < 0,0001$) ao dos susceptíveis (14981 ± 1938). Em relação ao VG, também houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre resistentes ($36,77 \pm 0,68\%$) e susceptíveis ($29,25 \pm 0,75\%$). Diferença significativa ($p < 0,001$) também foi observada para a redução percentual do VG, sendo que esse valor foi, em média, mais de três vezes superior nos susceptíveis ($21,16 \pm 3,21\%$) em relação aos resistentes ($5,81 \pm 1,94\%$), evidenciando o grande impacto da hemoncose na saúde dos animais. Quanto ao peso dos animais ao final do experimento (D112), contudo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os extremos.

5.2.2. Otimização dos ensaios de qPCR

As condições testadas para o tampão de reação, temperatura de anelamento (60°C) e número de ciclos (40) foram ideais para todos os pares de *primers* desenhados, permitindo-se a amplificação do produto desejado.

Todos os pares de *primers* apresentaram-se específicos para a amplificação dos fragmentos desejados, apresentaram o tamanho esperado de acordo com as sequências cadastradas no Genbank, conforme visibilizado pela eletroforese em gel de agarose a 2,5% (Figura 8). Tal especificidade foi igualmente confirmada pelas curvas de dissociação (Figura 9), sendo observada a presença de apenas um pico, o que indica a formação de um único produto. Foi evidenciada a formação de dímeros de *primers* nos controles negativos para as reações de amplificação dos genes TLR4, TLR10, IKBKB, TNF α , IL2RA e TGF β . Contudo, não houve amplificação de dímeros junto das amostras e em todos os casos foi possível a diferenciação pelas temperaturas de dissociação, que foram consideravelmente menores para os produtos inespecíficos em questão.

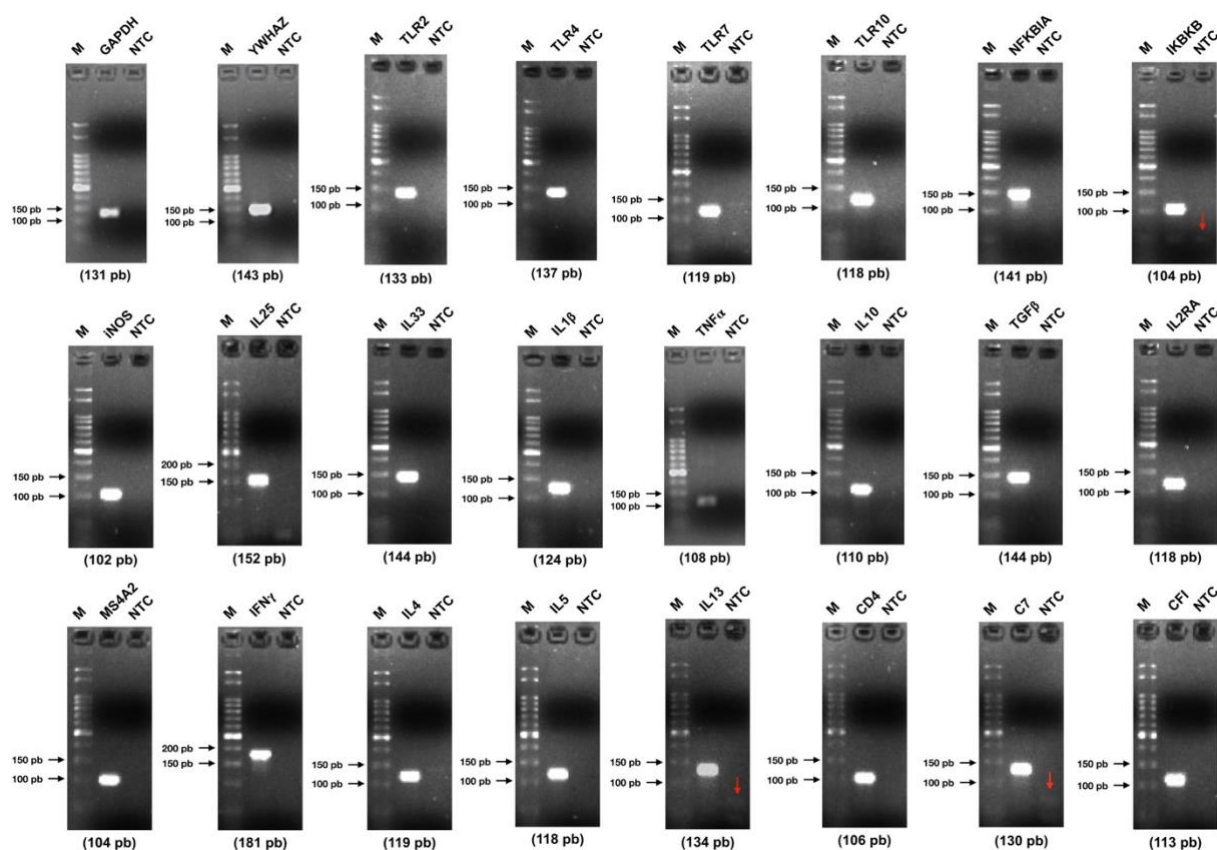


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% dos produtos de amplificação dos genes de referência e dos genes-alvo relacionados às respostas imunes, a partir de cDNA oriundo de “pool” de RNA extraído de abomaso de ovinos. (M) Marcador de peso molecular “50 bp DNA Ladder” (Ludwig Biotec); (NTC) controle negativo (todos os componentes da reação, exceto o cDNA). As setas vermelhas indicam a presença de dímeros de “primers”.

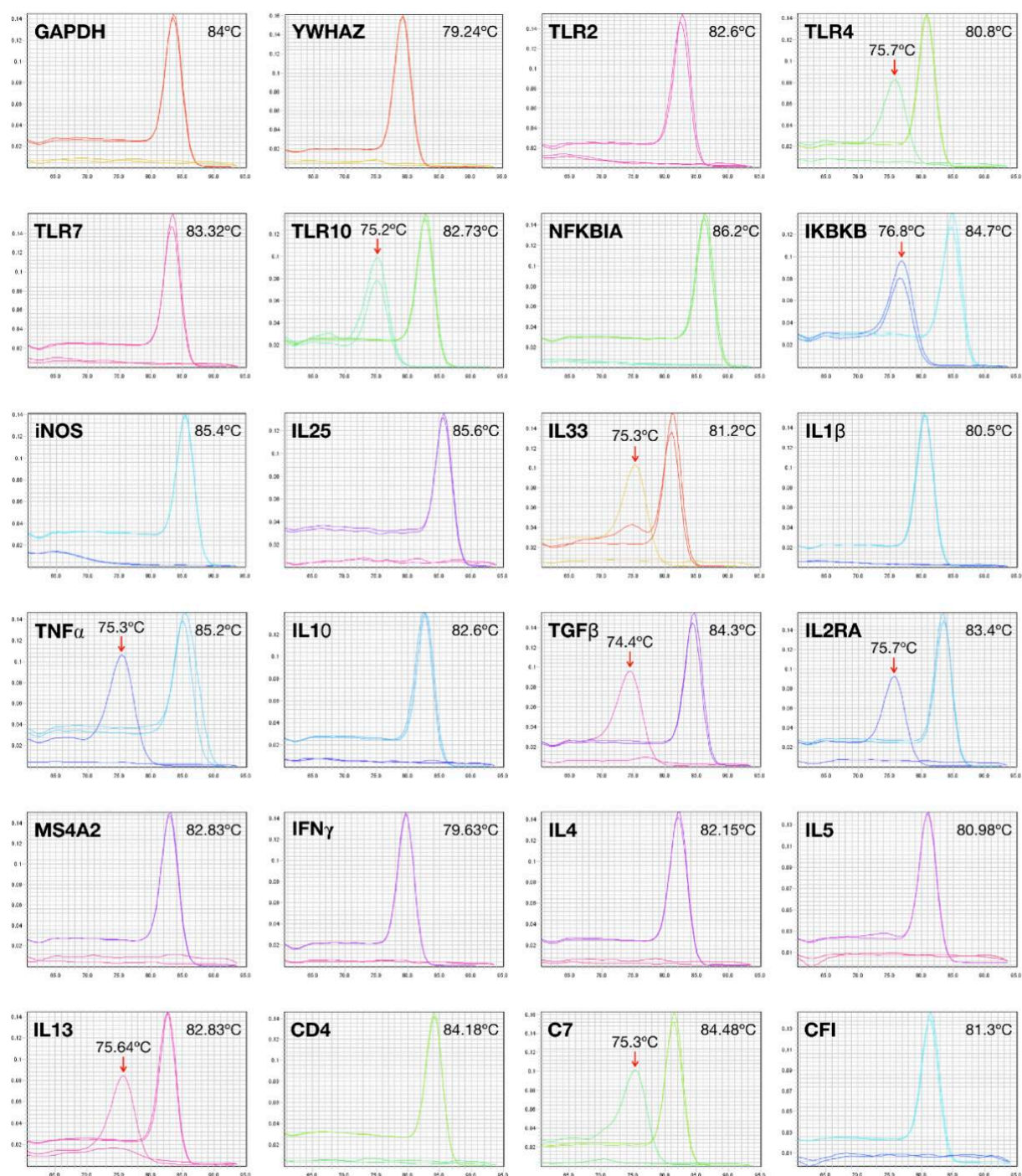


Figura 9. Curvas de dissociação das reações de amplificação dos dois genes de referência e dos 22 genes-alvo associados às respostas imunes, incluindo a temperatura de dissociação dos produtos amplificados. As setas vermelhas indicam dímeros de “primers”.

5.2.3. Avaliação da eficiência dos primers desenhados

Os pares de *primers* apresentaram valores de eficiência variando entre 92.31% e 105.533%, e coeficientes de correlação (R^2) com valores entre 0,928 e 0,999. Essas e as demais informações acerca dos pares de *primers* utilizados são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos “primers” utilizados para quantificação relativa da expressão gênica em cordeiros Morada Nova resistentes e susceptíveis à infecção por *Haemonchus contortus* pela técnica de RT-qPCR, incluindo: número de acesso, comprimento dos produtos amplificados, junção entre éxons abrangida, eficiência (E), coeficiente de correlação (R^2) e inclinação da reta (continua).

Gene	Número de acesso	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Junção	E (%)	R^2	Inclinação
GAPDH	NM_001190390.1	F: CAAGCTCATTTCTGGTACGAC R: TCTCTCTTCCTCTCGTGCTCCT	131	10/11	99.136	0,999	-3.343
YWHAZ	NM_001267887.1	F: CTGAGAAAGCCTGCTCTCTTGC R: GGTATCCGATGTCCACAATGTC	143	5/6	102.340	0,999	-3,267
TLR2	NM_001048231.1	F: CTCCCACTTCCGTCTCTTTGAT R: CTCCAGGTAGGTCCTGGTGTTT	133	Éxon único	96.378	0,999	-3,412
TLR4	NM_001135930	F: ACCCTTGCGTACAGGTTGTTC R: ATGGCTGCCTAAATGTCTCAGG	137	1/2	100,710	0,964	-3,300
TLR7	NM_001135059.1	F: TTGAGAAGCCCCCTTCAGAAGTC R: TCAGACACTGCCAGAAGTACGG	117	Nenhuma	101,823	0,994	-3,279
TLR10	NM_001135925.1	F: GTGGTTATCATGCTCGTTCTGG R: TCTTCCTAACCTGAGCCATGT	118	Éxon único	95,298	0,992	-3.440
NFKBIA	NM_001166184.1	F: CGAGACTTTTCGAGGAAATACCC R: GACACGTGTGGCCATTGTAGTT	141	3/4	95,848	0,999	-3,420
IKBKB	XM_015104530.1	F: AGGCTGCCGAGAAGAGTGAC R: CAAACTCTGGTCCTGCTCCTTC	104	23/24	92,421	0,986	-3,518
iNOS	AF223942.1	F: CACCTCTACTGGGAGGAGATGC R: GAACATAGACCTTGGGCTGGTC	102	24/25	99,905	0,999	-3,324
IL1 β	NM_001009465.2	F: AGTGGTGTCTGCATGAGCTTC R: CAGGGTCGGTGTATCACCTTTT	124	4/5	100,440	0,997	-3,311
TNF α	NM_001024860	F: CTCAGGTCATCTTCTCAAGCCT R: GAGGGCATTGGCATAACGAG	108	2/3	94,086	0,983	-3,472
IL2RA	NM_001009415.1	F: GAACAGTCAGGCTCCAGATGAA R: GTCTGTGGGCTTCTGGAAATCT	118	6/7 e 7/8	98,630	0,979	-3,355
IL10	NM_001009327.1	F: CTTTAAGGGTTACCTGGGTTGC R: TCACGTGCTCCTTGATGTCAG	110	2/3	102,305	0,995	-3,268
TGF β	NM_001009400	F: CAGCTCCACAGAAAAGAACTGC R: GTGTCCAGGCTCCAGATGTAGG	144	5/6	98,993	0,994	-3,346

Tabela 1. Sequências dos “primers” utilizados para quantificação relativa da expressão gênica em cordeiros Morada Nova resistentes e susceptíveis à infecção por *Haemonchus contortus* pela técnica de RT-qPCR, incluindo: número de acesso, comprimento dos produtos amplificados, junção entre éxons abrangida, eficiência (E), coeficiente de correlação (R^2) e inclinação da reta (conclusão).

Gene	Número de acesso	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Junção	E (%)	R^2	Inclinação
MS4A2	XM_004016510.3	F: CGCCAGTGCATCTGAAATTG R: AAACAGTCAGCCACGTTTGG	104	1/2	102,550	0,991	-3,262
IFN γ	NM_001009803.1	F: TTGGAAAGAGGAGAGTGACA R: CAGCCTTTTGAAGTCCTCCAGT	181	2/3	101,209	0,994	-3,293
IL4	NM_001009313	F: CCCAAAGAACGCAACTGAGAAG R: TGCTGAGATTCTGTCAAGTCC	119	2/3	94,049	0,985	-3,473
IL5	NM_001009783.1	F: CTCTTGGAGCTGCCTATGTTTG R: CAAGTTCCCATCACCTATCAGC	118	1/2	105,533	0,991	-3,196
IL13	NM_001082594	F: AAACCCTGTGCCTTCCTCTTC R: CACAGTACATGCTGCTCGTCAG	134	2/3	97,804	0,928	-3,359
C7	XM_012096998.2	F: CTATGAATGTGGGTCCTCCTTG R: CTCCCTACCAGCCACAGTGTA	130	16/17	102,74	0,990	-3,258
CFI	XM_004009622.3	F: ATGGAGTGTGCAGGTACAGATG R: CTCACAATACCCCAAACGTAAG	113	14/15	99,818	0,997	-3,326
IL25	NM_001195219.1	F: CCCTGGAGATATGAGTTGGACA R: ACGGTCTGGTTGTGGTAGAGC	152	2/3	92,986	0,995	-3,502
IL33	XM_012124983.2	F: GAAACAGATGGTGATGGTGGTC R: GAAGGCTTGTTCTGGCAACTG	144	6/7	97,561	0,988	-3,382
CD4	NM_001129902.1	F: AAGGTGGTGACAGAGCTGGAA R: ACTCTGACGGCAAGACCTCG	106	7/8	99,710	0,998	-3,329

5.2.4. Quantificação relativa da expressão de genes associados à resposta imune

Quanto à resposta imune inata, foram quantificados os níveis de expressão de PRRs (TLR2, TLR4, TLR7 e TLR10), genes associados à ativação da resposta imune (NFKBIA e IKBKB), à produção de NO (iNOS) e duas “alarminas” (IL25 e IL33). Foi observada diferença significativa entre os extremos de infecção por *H. contortus* para TLR2 ($p < 0,05$), superiormente expresso na região pilórica do abomaso dos animais resistentes, e para IL33 ($p < 0,05$), superiormente expressa na região fúndica, também dos resistentes. Os demais genes, contudo, não diferiram entre os extremos em nenhum dos tecidos avaliados (Figura 10).

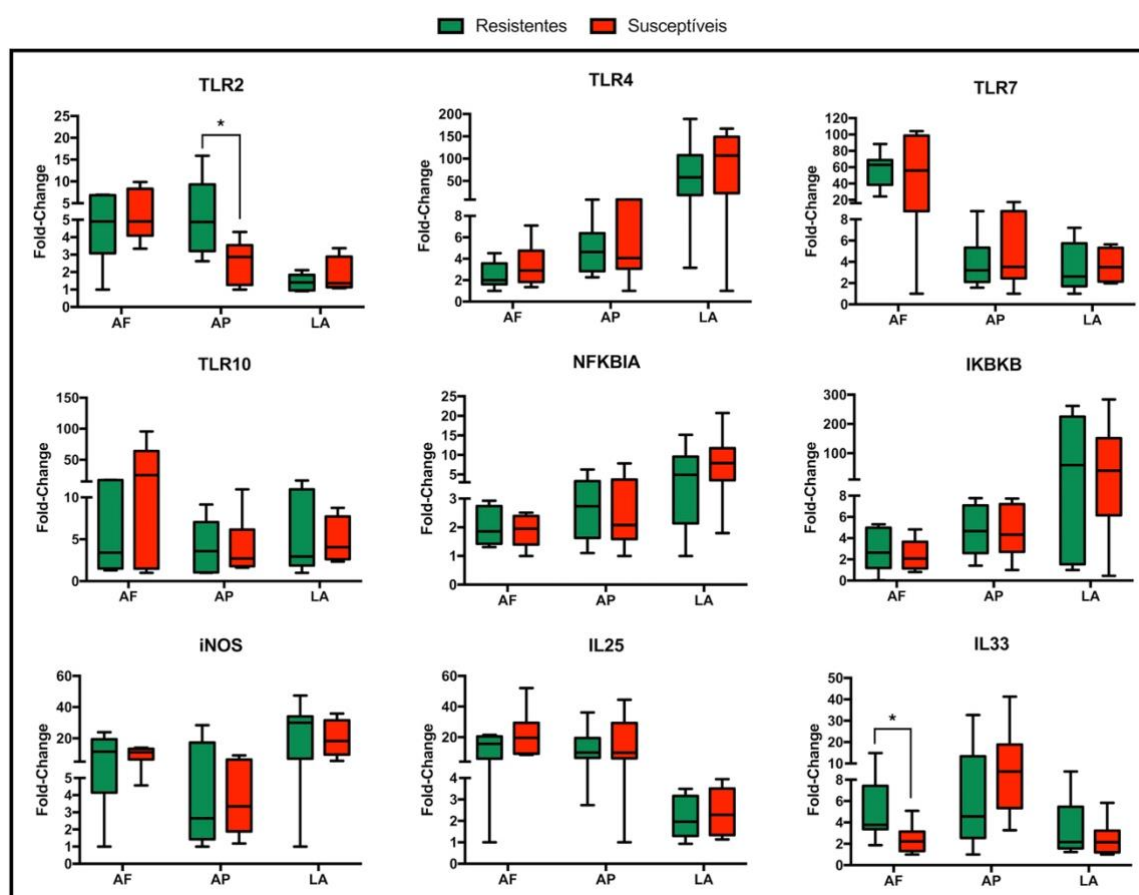


Figura 10. Comparação entre os níveis de expressão (“fold-change”) de genes associados à resposta imune inata nas regiões fúndica (AF) e pilórica do abomaso (AP) e linfonodos abomasais (LA) dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney.

A primeira etapa envolvida no desencadeamento da resposta imune consiste na identificação dos agentes invasores pelas células sentinelas, processo no qual os TLR são considerados vitais (O'Neill, 2006). Ingham et al. (2008) encontraram expressão diferencial para alguns TLR em ovinos no terceiro dia pós-infecção com *H. contortus*, evidenciando que TLR2, TLR4, TLR7 e TLR10 encontraram-se superiormente expressos em animais de linhagens resistentes a esse parasita, em comparação aos susceptíveis, em diferentes status quanto a infecção. Nos animais primo-infectados, TLR7 e TLR10 foram diferencialmente expressos (aumentados nos resistentes, em relação aos controles), enquanto TLR2 e TLR4 foram diferencialmente expressos (reduzidos nos susceptíveis) nos animais que tiveram contato prévio com os parasitas, mesma situação dos animais do presente estudo.

Embora seja incerto o papel da maioria dos TLR na resposta imune aos helmintos, TLR2, TLR4 e TLR9 têm sido associados à resposta efetiva contra algumas espécies de helmintos, como *Schistosoma mansoni* (Van der Kleij et al., 2002, Jenkins et al., 2005). Desses receptores, TLR4 tem demonstrado importância em relação à resposta contra GIN em modelos murinos, em infecções por *Strongyloides stercoralis* (Kerepesi et al., 2007) e *Trichuris muris* (Helmby e Grencis, 2003), com resultados distintos quanto ao efeito desse receptor. No primeiro estudo, TLR4 mostrou-se essencial no combate às larvas do parasita, enquanto Helmby e Grencis (2003) observaram que camundongos nocauteados para o gene TLR4 tiveram maior nível de resistência à infecção em comparação àqueles expressando o receptor funcional, diferença esta possivelmente explicada por serem respostas parasito-específicas. Outra hipótese sugere a importância de variações genéticas no gene TLR4 na diferença entre fenótipos de resistência a GINs. Estudo recente revelou que a presença ou ausência de duas formas variantes desse gene, com mutações localizadas na região de ligação aos PAMPs, estavam associadas a diferença entre os níveis de infecção por *Nematodirus* sp. e *Trichostrongylus* sp. (Lin et al., 2016). Tais variantes, por serem localizadas na região de reconhecimento dos agentes invasores, seriam responsáveis pela síntese de variantes proteicas com funcionalidade comprometida, prejudicando todo o desencadeamento subsequente da resposta imune. Quanto ao papel dos TLR na resposta imune ao *H. contortus* em

cordeiros da raça Morada Nova, foi possível encontrar resultados semelhantes aos trabalhos citados, com superior expressão de TLR2 no abomaso de animais resistentes, sugerindo a participação desses PRR no desencadeamento da resposta imune protetora contra o parasita em questão nessa raça ovina.

Ainda em relação à linha inicial de defesa contra os parasitas, após reconhecimento de padrões moleculares pelos TLR, ocorre ativação das vias de sinalização que irão dar início à resposta imune efetora propriamente dita, com destaque para o fator de transcrição NFκB, ativado sob dependência de IκBKB (Hoffmann e Baltimore, 2006). Em estudo realizado com células mononucleares periféricas (PBMC) caprinas estimuladas, *in vitro*, com galectinas recombinantes de *H. contortus*, Wang et al. (2014) detectaram aumento concomitante de TLR4 e NFκBIA, após 24 horas de incubação em meio de cultura. Esse resultado indica que, no início da infecção, ocorre ativação da via de sinalização NFκB, possivelmente em decorrência de reconhecimento de padrões moleculares do nematódeo via TLR4. Contudo, o estudo em questão não permite distinguir o padrão de ativação e expressão diferencial desses genes em animais com fenótipos distintos quanto à resistência a esse parasita.

Ainda em relação a via de sinalização via NFκB, Ingham et al. (2008) observaram que os animais susceptíveis apresentaram, no terceiro dia após infecção artificial com *T. colubriformis*, níveis aumentados na expressão desses genes na mucosa do abomaso. Os autores descrevem a possibilidade de esse aumento observado apenas nesse grupo, naquela data de colheita, estar associado a inferior expressão de TLR em relação aos animais resistentes, resultando em menor sensibilidade no reconhecimento dos GIN e consequente atraso na indução do processo inflamatório inicial. Vale ressaltar que esse aumento observado nessa data experimental também poderia estar relacionado a uma manutenção do perfil inflamatório nos susceptíveis, hipótese essa igualmente plausível. No presente estudo, contudo, não foi possível evidenciar distinção no padrão dessa via de sinalização entre os extremos de infecção por *H. contortus*, no sétimo dia da infecção experimental.

Um importante efector contra agentes invasores, classicamente associado aos seus efeitos antimicrobianos (Albina et al., 1995), são as formas reativas de

oxigênio, dentre as quais o NO merece destaque, e cuja produção é estimulada por iNOS, após ativação de células efetoras pela via de sinalização acima descrita. Peróxido de hidrogênio, espécie reativa de oxigênio, tal como NO, demonstrou, *in vitro*, efeito letal contra *H. contortus* (Kotze e McClure, 2001). Com relação ao NO especificamente, embora tenha sido associado a efeito citotóxico contra helmintos (Colasanti et al., 2002), seu efeito *in vivo* na resposta imune frente a esses parasitas permanece incerto. Rajan et al. (1996), em estudo com modelos murinos infectados com o nematódeo *Brugia malayi*, observaram que o tratamento de ratos com inibidor de iNOS implicou em impedimento na defesa contra esse parasita. Ao tratarem animais imuno-suprimidos com componente estimulante da síntese de NO, contudo, observaram reversão da susceptibilidade. Ganley et al. (2001), por outro lado, demonstraram que camundongos nocauteados para iNOS não diferiram do grupo controle quanto à resistência a esse mesmo parasita.

Com relação especificamente à resposta de ovinos à infecções por GIN, Menziels et al. (2009) conduziram estudo com ovinos provenientes de uma linhagem resistente a parasitas do gênero *Trichostrongylus*, avaliando, no abomaso desses animais, a expressão de diversos genes associados à resposta imune, em diferentes dias após infecção experimental com *H. contortus*. Os autores observaram leve aumento na expressão de iNOS (NOS2A) na mucosa do abomaso dos animais infectados no 7º dia pós-infecção (dpi), seguida de redução a níveis inferiores ao pré-desafio. Ao final do experimento (21º dpi), contudo, ocorreu aumento significativo na expressão desse gene. Wang et al. (2014), por outro lado, observaram significativa redução na expressão de genes indutores de espécies reativas de oxigênio, dentre os quais iNOS, em PBMC caprinas estimuladas com antígenos de *H. contortus*. Apesar desse incerteza quanto à participação de NO em relação ao combate às infecções helmínticas, Ingham et al. (2008) encontraram NOS2A diferencialmente expresso entre animais com diferentes níveis de resistência a *H. contortus*, estando aumentado nos resistentes e reduzido nos susceptíveis, em relação ao grupo controle, no 3º dpi. No presente estudo, contudo, não foi possível determinar o padrão de expressão desse marcador em função do combate à infecção por *H. contortus* nos cordeiros Morada Nova, no 7º dpi.

Quanto às citocinas IL25 e IL33, diversos estudos têm ressaltado a importância de ambas “alarminas”, liberadas principalmente por células epiteliais das barreiras mucosas após lesão celular, na ativação inicial da resposta Th2, mediante estimulação de células inatas ILC2 (Saenz et al., 2010; Barlow et al., 2013), basófilos e mastócitos (Kroeger et al., 2009), além de potencializarem a subsequente resposta adaptativa, por também estimularem células CD4⁺ Th2-polarizadas (Kondo et al., 2008).

A capacidade de IL25 em desencadear respostas Th2-polarizadas foi demonstrada em diversos estudos, sendo observada indução da síntese das citocinas IL4, IL5 e IL13, eosinofilia e altos níveis de IgE, local e sistemicamente, em camundongos transgênicos com superexpressão de IL25 (Pan et al., 2001; Kim et al., 2002), ou mediante administração de IL25 recombinante (Fort et al., 2001). Essa “alarmina”, comprovadamente indutora de resposta Th2, tem sido diretamente associada à defesa contra infecções helmínticas. Estudos evidenciaram que camundongos nocauteados para IL25 apresentam inabilidade em combater infecções por GIN, a qual foi revertida pela administração de IL25 exógeno, permitindo a aquisição de resposta imune efetora contra *Nippostrongylus brasiliensis* (Fallon et al., 2006; Zhao et al., 2010), *Trichinella spiralis* (Angkasekwina et al., 2013), *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (Pei et al., 2016) e *Trichuris muris* (Owyang et al., 2006). Em se tratando especificamente da resposta de ovinos às infecções por GIN, com destaque para *H. contortus*, não foram encontrados estudos acerca do papel de IL25 nesse fenótipo, sendo este o primeiro trabalho nesse sentido. Contudo, não foi observado perfil de expressão diferencial dessa citocina entre animais resistentes e susceptíveis à infecção por esse parasita, em nenhum dos tecidos avaliados. Ainda assim, a importância de IL25 no fenótipo de resistência de ovinos a infecções parasitárias não pode ser descartada, podendo estar envolvida nos momentos mais iniciais da infecção. Para confirmação dessa hipótese, futuros estudos se fazem necessários, avaliando a cinética dessa citocina em animais infectados, tendo em vista o presente estudo avaliar apenas uma data experimental, sete dias após a infecção artificial.

Tal como IL25, a capacidade de IL33 em provocar resposta Th2-polarizada tem sido evidenciada experimentalmente, sendo a estimulação *in vitro* de mastócitos

e basófilos com essa citocina capaz de desencadear síntese de IL4, IL5 e IL13, além de induzirem síntese de IgE em linfócitos B (Ho et al., 2007; Kondo et al., 2008; Kroeger et al., 2009). O mesmo potencial foi evidenciado em células Th2-polarizadas, que tiveram considerável aumento de IL4, IL5 e IL13 após estímulo com IL33, sendo que esse efeito não foi observado quando estimuladas células T CD4+ não polarizadas (Kondo et al., 2008). Esse efeito Th2-estimulante foi igualmente observado *in vivo*, com modelos murinos, nos quais a administração de IL33 exógeno levou a aumento da expressão de IL4, IL5 e IL13, com consequente eosinofilia tissular e hiperplasia de células caliciformes em diversos órgãos, dentre os quais a mucosa do trato gastrintestinal (Schmitz et al., 2005, Kondo et al., 2008). Foi também observado que IL33 tem ação direta na estimulação de eosinófilos *in vitro*, aumentando sua sobrevivência, atividade celular e degranulação (Suzukawa et al., 2008; Pecaric-Petkovic et al., 2009).

A importância de IL33 no combate a infecções por GIN tem sido demonstrado experimentalmente, sendo observada que em resposta estímulo dessa “alarminas”, camundongos produzem maiores quantidades de citocinas Th2, levando a hiperplasia de células caliciformes intestinais, eosinofilia e mastocitose no sítio de infecção, com consequente aumento na expulsão dos parasitas, como *Nippostrongylus brasiliensis* (Neil et al., 2010; Price et al., 2010; Hung et al., 2013) e *T. muris* (Humphreys et al., 2008). O envolvimento de IL33 na resposta frente os GIN parasitas de ovinos foi recentemente evidenciado. Larvas infectantes de *T. colubriformis* foram cultivadas, *in vitro*, com células epiteliais de linhagem humana ou obtidas de epitélio intestinal ovino, sendo observada indução de necrose celular pelo parasitismo, com aumento considerável na expressão de IL33, em relação ao grupo controle (Andronicos et al., 2012; Corvan et al., 2015). Foi demonstrado, inclusive, que produtos excretórios e secretórios das formas larvais foram suficientes para desencadear liberação dessa citocina. Andronicos et al. (2012) demonstraram, além dos estudos *in vitro*, que a infecção artificial de ovinos selecionados para resistência a *T. colubriformis* com esse parasita resultou em aumento de cerca de 15 vezes na expressão de IL33 na mucosa desses animais, no 14º dpi.

O presente estudo evidenciou, no sétimo dia da infecção artificial, superior expressão de IL33 na região fúndica do abomaso de cordeiros Morada Nova

resistentes à infecção por *H. contortus*, em comparação aos susceptíveis. Devido a ausência de grupo controle e outras datas de colheita de amostras teciduais, contudo, não foi possível determinar a cinética da liberação dessa citocina após o início da infecção. Ainda assim, trata-se do primeiro estudo a evidenciar perfil de expressão diferencial dessa citocina em fenótipos opostos quanto à resistência de ovinos frente a parasitas gastrintestinais. Essa diferença entre os extremos de infecção, inclusive, foi passível de detecção logo no 7º dpi, de maneira precoce ao observado por Andronicos et al. (2012) quanto ao aumento em relação a níveis basais, no 14º dpi. Possivelmente, animais resistentes respondem de maneira precoce e mais intensa na liberação de “alarminas” após lesão do epitélio gastrintestinal parasitado. Esse resultado inédito demonstrou um novo marcador fenotípico diretamente associado à resistência contra *H. contortus* na espécie ovina, fornecendo valioso subsídio para futuros estudos relacionados ao manejo imunoprolático dessa enfermidade.

Quanto às citocinas inflamatórias (Figura 11), foram quantificados os níveis de expressão gênica de $IL1\beta$ e $TNF\alpha$ (resposta pró-inflamatória) e $TGF\beta$ e $IL10$ (resposta anti-inflamatória). As citocinas pró-inflamatórias $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ foram as únicas com diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extremos de infecção, ambas superiormente expressas nos animais susceptíveis à infecção por *H. contortus*, quando avaliada a região fúndica do abomaso. Com relação à região pilórica e aos linfonodos abomasais, não houve diferença entre os grupos para nenhum dos genes avaliados.

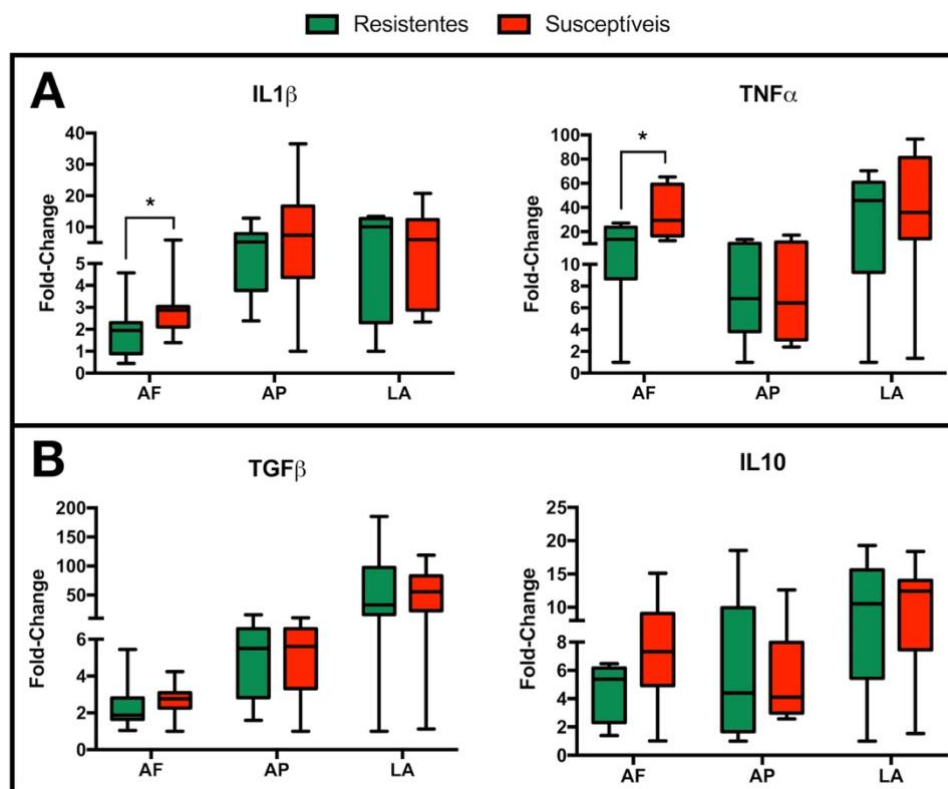


Figura 11. Comparação entre os níveis de expressão (“fold-change”) de genes associados às respostas pró-inflamatória (A) e anti-inflamatória (B) nas regiões fúndica (AF) e pilórica do abomaso (AP) e linfonodos abomasais (LA) dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney.

Estudo com infecção experimental por *H. contortus* demonstrou presença de inflamação do tecido abomasal, com aumento na produção de TNF α , a partir do 5º dpi, atingindo pico de expressão no 7º dpi, a partir do qual essa citocina apresentou declínio, sem, contudo, retornar a níveis basais, até o 28º dpi (Robinson et al., 2010). Apesar da presença de inflamação tecidual observada pelos autores, a mesma não estimulou a produção de citocinas anti-inflamatórias, com a expressão de TGF β não diferindo significativamente do grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Craig et al. (2007), os quais observaram que cordeiros experimentalmente primo ou reinfetados com *T. circumcincta* apresentaram aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL1 β) nos linfonodos abomasais desses animais, a partir do 5º dpi. Foi observado que IL1 β permaneceu elevada em ambos os grupos até o 10º dpi. TNF α , por sua vez, permaneceu elevada

apenas nos animais reinfectados. Com relação às citocinas anti-inflamatórias, ambos os grupos apresentaram aumento concomitante de TGF β (mais elevada nos primo-infectados) e IL10 no 5ºdpi. Esse aumento, contudo, não foi mais observado a partir do 10º dpi, para ambas citocinas. El-Ashram et al. (2017) também puderam observar superior TNF α superiormente expresso no abomaso ovinos experimentalmente infectados com *H. contortus* no 7º dpi. Ibelli et al. (2011), em estudo conduzido com bovinos experimentalmente infectados com *Haemonchus placei*, observaram padrão similar aos descritos apenas nos linfonodos abomasais desses animais, no 7º dpi, com aumento na expressão de TNF α . Com relação à mucosa abomaso, contudo, os autores observaram comportamento diferente, com redução na expressão dessa citocina. Ainda em relação à resposta inflamatória, El-Ashram et al. (2018) desenvolveram modelo *ex vivo* com fragmentos de mucosa abomasal incubados, em meio de cultura, com L4 de *H. contortus*, observando, de igual maneira aos estudos anteriores, aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, 6h após incubação com o parasita. Wang et al. (2014), por outro lado, detectaram redução na expressão de TNF α e IL1 β com concomitante aumento de TGF β e IL10 em PBMC caprinas estimuladas com proteínas recombinantes de *H. contortus*. Resultados discrepantes, contudo, foram obtidos por Lacroux et al. (2006), que não detectaram, em abomaso ou linfonodos abomasais de cordeiros primo ou reinfectados com *H. contortus*, diferença na expressão de TNF α e TGF β em relação ao grupo controle, em nenhuma data experimental (3º dpi, 7º dpi, 15º dpi e 28º dpi).

Conforme descrito, apesar de alguns estudos diferirem quanto ao padrão inflamatório local nas infecções por GIN, em geral, ao menos no início da infecção, na qual larvas de terceiro e quarto estágio encontram-se embebidas na mucosa, ocorre aumento de citocinas pró-inflamatórias, acompanhada de resposta anti-inflamatórias, de modo regulatório. Estudos comparando animais resistentes e susceptíveis às infecções por GIN têm confirmado a importância desse padrão de resposta imune. Ingham et al. (2008) demonstraram que cordeiros resistentes a *T. colubriformis* apresentaram superior expressão de ambas TGF β e IL10, em animais primo-infectados, logo no início da infecção (3º dpi). Zaros et al. (2014) observaram superior expressão de TNF α em abomaso e linfonodos abomasais de cordeiros

susceptíveis a *H. contortus*, naturalmente infectados, 98 dias após serem alocados em pasto contaminado. Jacobs et al. (2016) detectaram, igualmente, superior expressão de TNF α em abomaso de cordeiros susceptíveis à infecção por *H. contortus*, após 3, 5 ou 7 dias da infecção experimental. Buendía-Jiménez et al. (2015), por sua vez, detectaram superiores níveis de IL10, citocina anti-inflamatória, em animais com menores taxas de infecção por *H. contortus*, os quais haviam previamente sido tratados com concentrado vesicular de *Taenia hydatigena*. Em contrapartida, Bricarello et al. (2008) não detectaram diferença na expressão de TNF α na mucosa intestinal entre bovinos resistentes e susceptíveis a *C. punctata*, sob infecção natural, 108 dias após início do experimento. Resultados discrepantes foram igualmente obtidos por Li et al. (2007), em estudo conduzido com novilhas da raça Angus. Os autores detectaram, concomitantemente, citocinas pró (TNF α e IL1 β) e anti-inflamatórias (IL10) superiormente expressas nas regiões fúndica e pilórica do abomaso de animais resistentes, 7 dias após infecção artificial com *Ostertagia ostertagi*. Estes genes, contudo, não diferiram entre os grupos nos linfonodos abomasais.

Conforme evidenciado, parece existir forte associação entre o perfil pró-inflamatório exacerbado com fenótipo de susceptibilidade a parasitas gastrintestinais, em contrapartida ao perfil anti-inflamatório observado em animais resistentes. Contudo, com relação a esse perfil de resposta imune, a cinética do processo inflamatório parece exercer ainda maior influência na defesa contra GIN, conforme evidenciado por Hassan et al. (2011a). Os autores avaliaram animais de linhagens resistente e susceptível à infecção por *T. circumcincta*, observando que os animais resistentes apresentaram resposta inflamatória, com aumento de TNF α e IL1 β precocemente, no 3º dpi, com a expressão dessas citocinas substancialmente reduzida no 7º dpi, no qual foi observado aumento de citocinas anti-inflamatórias (TGF β e IL10). Com relação aos susceptíveis, houve atraso nesse padrão de resposta imune, com aumento de citocinas pró-inflamatórias no 7º dpi, e anti-inflamatórias apenas no 21º dpi.

No presente estudo, foi possível evidenciar maior atividade de resposta pró-inflamatória na região fúndica do abomaso dos cordeiros susceptíveis à infecção por *H. contortus*, no 7º dpi. Contudo, não foi possível evidenciar perfil diferencial na

expressão dos marcadores anti-inflamatórios avaliados, possivelmente devido ao nível dessas citocinas, nos resistentes, já ter reduzido e se igualado aos susceptíveis. Outra hipótese seria o caso oposto, no qual nessa data de colheita a expressão desses genes já ter sido estimulada e, conseqüentemente, seus níveis estavam aumentado nos susceptíveis, sem ter, contudo, provocado redução dos marcadores pró-inflamatórios.

Quanto à resposta imune adaptativa, tendo em vista a proteção contra infecção por GIN estar fortemente associada aos linfócitos Th, foram avaliados genes relacionados a resposta T regulatória (IL2RA-CD25), marcador geral de linfócitos Th (CD4) e citocinas associadas as respostas de perfil Th1 (IFN γ) e Th2 (IL4, IL5 e IL13). Houve diferença estatística ($p < 0,05$) apenas para IL4, que foi superiormente expresso nos linfonodos abomasais dos cordeiros susceptíveis à infecção por *H. contortus*, em comparação ao mesmo tecido dos resistentes (Figura 12).

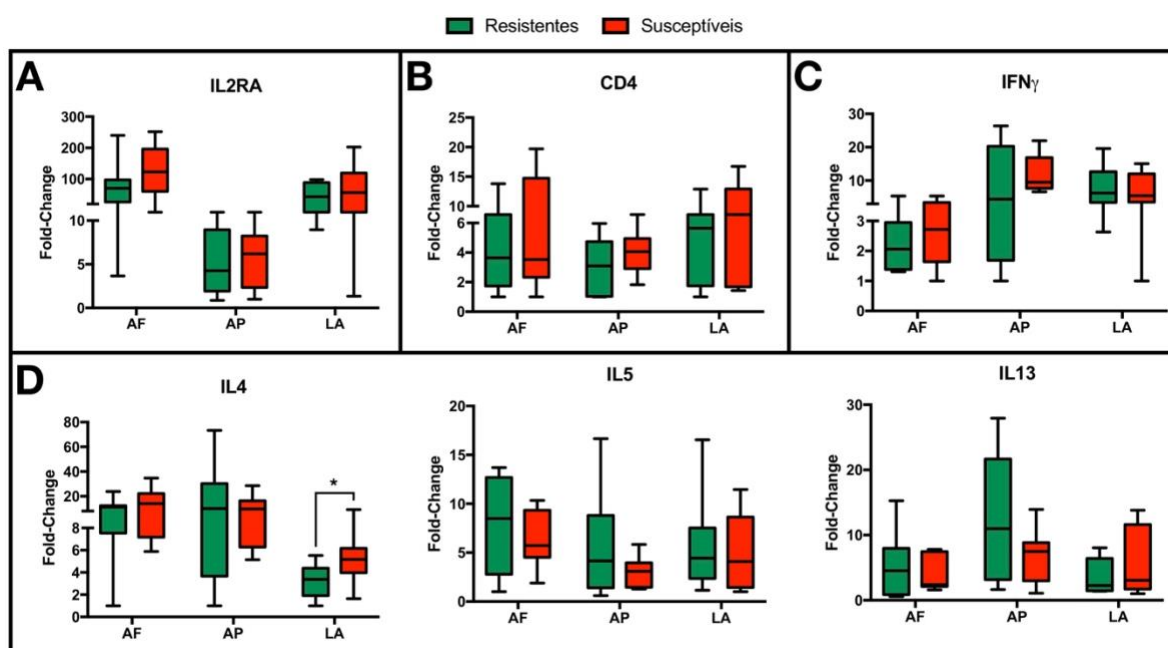


Figura 12. Comparação entre os níveis de expressão (“fold-change”) de genes associados à resposta T regulatória (A), marcador geral de linfócitos Th (B) e citocinas associadas as respostas de perfil Th1 (C) e Th2 (D) nas regiões fúndica (AF) e pilórica do abomaso (AP) e linfonodos abomasais (LA) dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney.

A resposta imune efetiva frente infecções por GIN é essencialmente dependente da atuação de linfócitos TCD4+, conforme evidenciado em diversos estudos. Ballic et al. (2002) observaram que a infecção artificial de cordeiros com *H. contortus* levou a elevação no número de células CD4+ na mucosa do abomaso e nos linfonodos abomasais, observado entre o 3º e 5º dpi, aumento este não observado para as células CD8+. Confirmando a dependência desse tipo celular frente infecções parasitárias, diversos estudos demonstraram que a sua depleção provoca incapacidade no desenvolvimento de resposta imune protetora contra infecção por *H. contortus* (Jacobs et al., 1995; Gill et al., 1993a; Karanu et al., 1997). No presente estudo, contudo, os extremos de infecção por *H. contortus* não diferiram entre si quanto aos níveis de expressão do marcador CD4, na mucosa do abomaso ou linfonodos abomasais.

Apesar do fundamental papel das células CD4+ na proteção contra GIN, vale destacar que mais importante que a sua simples presença é o seu perfil de ativação, sendo a polarização em células Th2 essencial na defesa contra as infecções parasitárias, sendo caracterizada pela síntese das citocinas IL4, IL5 e IL13 (Else e Finkelman, 1998). IL4 é responsável pela ativação e retroalimentação positiva das células Th2, após reconhecimento dos GIN pelas APC residentes na mucosa (Paul e Zhu, 2010), além de desencadear a síntese de IgE (Pène et al., 1998). IL5, por sua vez, é responsável pela manifestação de eosinofilia, em nível local e sistêmico, além de induzir a síntese de anticorpos do isótipo IgA (Anthony et al., 2007). Em associação a essas citocinas, IL13 provoca alterações fisiopatológicas no trato gastrointestinal de modo a facilitar a expulsão mecânica dos parasitas, incluindo aumento na produção de muco e na contratilidade da musculatura intestinal (Madden et al., 2002). Essas três citocinas têm demonstrado, *in vitro*, capacidade de promover ativação celular em eosinófilos (Dubois et al., 1997), sendo observado aumento considerável na letalidade contra L₃ de *H. contortus* quando da adição de IL5 em cultura celular de eosinófilos inativados (Rainbird et al., 1998). Foi observado também sinergismo entre IL4, IL5 e IL13 na referida estimulação celular (Luttmann et al., 1999).

Assim como o observado em diversos modelos animais, a infecção de ovinos com GIN provoca elevação nos níveis de citocinas de perfil Th2. Wang et al. (2014)

observaram, em estudo com PBMC caprinas, que a estimulação in vitro com antígenos provenientes de *H. contortus* resultaram em aumento na expressão de IL13, após 24 horas de cultura celular. Em estudos in vivo, Lacroux et al. (2006) evidenciaram que a infecção artificial de cordeiros com *H. contortus* levou ao aumento dos níveis de IL4, IL5 e IL13 na mucosa da região fúndica do abomaso, observado no 7º dpi para as três citocinas em animais primo-infectados. Foi ressaltado, ainda, que animais previamente infectados responderam de maneira precoce para IL4, com aumento no 3º dpi. Esses autores também avaliaram os níveis de expressão dessas citocinas em linfonodos abomasais, observando aumento de IL4 no 7º dpi para os primo-infectados e no 3º dpi para os reinfectedos. Incremento nos níveis de IL5 nesse tecido ocorreu apenas no 28º dpi em ambos os grupos, enquanto que para IL13 não houve alteração em relação ao grupo controle. A cinética de produção local das citocinas Th2 após infecção artificial com *H. contortus* também foi avaliada por Robinson et al. (2010). Os autores observaram aumento de IL4 na mucosa do abomaso logo no 1º dpi, mantendo-se elevado até 2º dpi, com novo incremento no 7º dpi. Com relação a IL5 e IL13, os níveis foram superiores ao grupo controle no 5º e 7º dpi. Nesse estudo em questão, não houve diferença em relação ao grupo controle nas datas subsequentes, até o 30º dpi. De modo semelhante, Craig et al. (2007) observaram aumento dessas três citocinas nos linfonodos abomasais cinco dias após infecção artificial com *T. circumcincta*, não havendo diferença em relação ao grupo controle em datas posteriores (10º e 21º dpi). Como pode ser observado nos estudos citados, a infecção parasitária acarreta em aumento dos níveis de citocinas Th2 nos momentos iniciais da infecção, indicando a sua importância nesse momento, de modo a combater as larvas infectantes e impedir o estabelecimento dos parasitas.

Uma resposta imune celular Th2-polarizada mais intensa tem sido associada a maior competência em relação ao combate às infecções por GIN em ovinos. Em estudo comparando duas raças com diferentes fenótipos de resistência a *H. contortus*, Terefe et al. (2007) não detectaram diferença nos níveis de IL4, IL5 e IL13 entre os grupos na mucosa da região fúndica do abomaso após infecção artificial. Contudo, nos linfonodos abomasais, a expressão das três citocinas foi superior nos animais resistentes, no 30º dpi. Gossner et al. (2013) avaliaram linfonodos

abomasais de animais submetidos a infecções seriadas com *T. circumcincta*, três vezes por semana, durante 12 semanas, observando superior expressão de IL4, IL5 e IL13 nos animais resistentes. Zaros et al. (2014) avaliaram cordeiros da raça Somalis classificados de acordo com o nível de resistência à infecção por *H. contortus*, abatidos após 98 dias da infecção natural. Os autores encontraram IL4 superiormente expresso no abomaso dos animais resistentes e, ao avaliarem os linfonodos abomasais, esses animais apresentaram maiores níveis de IL4 e IL13, em relação aos susceptíveis. De modo semelhante, MacKinnon et al. (2015) observaram superior expressão de IL13 na mucosa do abomaso de animais da raça resistente, três dias após a infecção artificial com *H. contortus*, mantendo-se elevados em relação aos susceptíveis até o 27º dpi. Observaram o mesmo perfil para esse gene nos linfonodos abomasais, além de níveis superiores de IL4 no grupo resistente, observado apenas no 3º dpi. Jacobs et al. (2016), por sua vez, compararam animais de raças resistente e susceptível ao *H. contortus*, experimentalmente infectados, observando que os resistentes apresentaram resposta Th2 precoce na mucosa do abomaso, com aumento de IL4 no 3º dpi, crescente até o 7º dpi. Com relação a IL5, não houve aumento dos níveis de expressão ao longo do tempo.

Embora a maioria dos estudos tenha evidenciado níveis superiores de citocina Th2 com resistência a parasitoses, alguns estudos recentes observaram perfil diferente, associando superiores níveis de IL4 ao fenótipo de susceptibilidade às infecções por GIN. MacKinnon et al. (2009), por exemplo, encontraram aumento de IL4 nos linfonodos abomasais de animais susceptíveis, 27 dias após infecção artificial com *H. contortus*. Hassan et al. (2011a) realizaram infecção artificial com *T. circumcincta* em cordeiros, que levou a superior expressão de IL4 no abomaso dos animais pertencentes ao genótipo susceptível, no 7º e 21º dpi. Contudo, esses autores também observaram IL13 (resposta Th2) superiormente expresso nos resistentes, nessas mesmas datas experimentais, e ambos os grupos apresentaram níveis semelhantes para essas duas citocinas no 35º dpi. Resultados semelhantes foram obtidos por Guo et al. (2016), que, apesar de observarem superior expressão de IL13 no abomaso dos animais resistentes, o perfil oposto ocorreu para IL4, elevada nos susceptíveis, após 20 dias da infecção artificial com *H. contortus*. No

presente estudo, os resultados obtidos se assemelham a esses trabalhos, sendo observado IL4 superiormente expresso nos linfonodos abomasais dos animais susceptíveis, no sétimo dia da terceira infecção artificial com *H. contortus*. Contudo, esse perfil pode ter ocorrido devido a um atraso na resposta imune dos susceptíveis em relação aos resistentes, sendo essa expressão elevada em consequência ao maior parasitismo, e não um marcador de susceptibilidade. Contudo, devido ao delineamento experimental adotado, tal hipótese não pode ser confirmada.

Ainda em relação às diferentes subpopulações de células CD4+, existem os linfócitos Th1, responsáveis pela resposta imune frente infecções por parasitas intracelulares, tendo IFN γ como principal citocina associada a esse perfil (Tizard, 2009). Diversos estudos tem sugerido uma dicotomia entre os perfis Th1 e Th2, relatando efeito inibitório da síntese de IL4 por parte de IFN γ , resultando em concomitante inibição da polarização em células Th2 e estímulo da resposta Th1 (Pulendran, 2004; Tizard, 2009). De modo semelhante, estudo *in vitro* demonstrou que estimulação de linfócitos B humanos com IFN γ resultou em inibição da síntese de anticorpos do isótipo IgE (Pène et al., 1988).

Com relação a dinâmica dessa citocina frente infecções parasitárias em ovinos, não há consistência nos resultados relatados. Craig et al. (2007) não observaram modificação nos níveis de IFN γ em abomaso de ovinos após infecção experimental com *T. circumcincta*. Lacroux et al. (2006) também não observaram diferença em relação ao grupo controle para IFN γ em abomaso ou linfonodos abomasais de ovinos após infecção artificial com *H. contortus*, tampouco diferenças entre animais primo ou reinfectados. Robinson et al. (2010), entretanto, observaram que a infecção artificial por *H. contortus* provocou aumento de IFN γ na mucosa do abomaso, observado no 7º dpi. Por outro lado, Gill et al. (2010) observaram que a estimulação de células retiradas de linfonodos abomasais de ovinos infectados com *H. contortus* com antígenos do parasita levou a redução significativa na expressão de IFN γ , em comparação às células retiradas dos animais não infectados. Resultados semelhantes foram obtidos por Wang et al. (2014), que observaram redução na expressão dessa citocina após estimulação de PBMC caprinas com antígenos de *H. contortus*.

Inferior expressão de IFN γ tem sido associada a maior resistência às infecções helmínticas em ovinos. Zaros et al. (2014) observaram superior expressão de IFN γ em abomaso e linfonodos de animais susceptíveis, naturalmente infectados com *H. contortus*. MacKinnon et al. (2015) também encontraram essa citocina superiormente expressa na mucosa e linfonodos abomasais de cordeiros susceptíveis ao *H. contortus*, que ocorreu 27 dias após infecção. A importância da cinética da produção de IFN γ em relação à resistência aos parasitas, assim como observado para outras citocinas, tem sido relatada. Ingham et al. (2008) evidenciaram que animais resistentes apresentaram IFN γ superiormente expresso nas mucosas do abomaso e do intestino delgado três dias após primo-infecção artificial com *H. contortus* e *T. colubriformis*, respectivamente. Os autores não avaliaram outras datas. Hassan et al. (2011a) também observaram superior expressão de IFN γ em animais resistentes a *T. circumcincta* no 3º dpi. Contudo, do 7º ao 21º dpi houve aumento dessa citocina nos susceptíveis, enquanto que os resistentes retornaram aos valores basais. Ainda assim, mesmo avaliando vários tempos de colheita, Terefe et al. (2007) e Shakya et al. (2009) não observaram diferença nos níveis de IFN γ após infecção artificial ou natural por *H. contortus*, respectivamente. No presente estudo, na data experimental avaliada (7º dpi de animais previamente infectados), não foi possível evidenciar diferença nos níveis de expressão dessa citocina entre os extremos de infecção em nenhum dos tecidos avaliados.

Além do fundamental papel das células CD4+, os linfócitos Treg (CD25+) desempenham importante papel no combate às parasitoses. Aumento dessas populações celulares tem sido relatado em infecções por GIN, sendo que a hiperplasia das células CD25+ não ocorre de imediato, levando 28 dias em camundongos infectados com *H. polygyrus* (Finney et., 2007). Balic et al. (2006) observaram hiperplasia dessas células no abomaso de ovinos infectados com *H. contortus*, no 5º dpi, aumento este que ocorreu apenas em animais previamente infectados com o parasita. Ingham et al. (2008) obtiveram resultado semelhante, evidenciando aumento na expressão de IL2RA-CD25 locais apenas em animais previamente infectados com *H. contortus* ou *T. colubriformis*.

Níveis superiores de IL2RA têm sido diretamente associados ao fenótipo de resistência parasitária, com superior expressão desse gene observada em abomaso e intestino delgado de animais resistentes ao *H. contortus* e *T. colubriformis*, respectivamente, no 3º dpi (Ingham et al., 2008). Guo et al. (2016) também encontraram esse marcador superiormente expresso em abomaso de animais resistentes à hemoncose, no 20º dpi. Ainda, tão importante quanto a quantidade desse marcador *per se* é a cinética de sua expressão. Hassan et al. (2011a) demonstraram que a infecção por *T. circumcincta* resultou em aumento precoce desse receptor no abomaso dos animais da linhagem resistente, que foi superior ao grupo controle no 7º dpi. Nos susceptíveis, por sua vez, esse aumento só ocorreu no 21º dpi, atingindo níveis superiores àqueles dos resistentes. No presente estudo, os extremos de infecção por *H. contortus* não diferiram entre si quanto aos níveis de expressão de IL2RA. Contudo, não foi possível evidenciar a cinética desse marcador em função da infecção, sendo avaliado apenas o sétimo dia da terceira infecção artificial.

Quanto à resposta imune humoral, foi avaliado o gene MS4A2, que codifica a subunidade beta do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI). Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extremos de infecção por *H. contortus* em apenas na região fúndica do abomaso, sendo esse gene superiormente expresso nos animais resistentes (Figura 13).

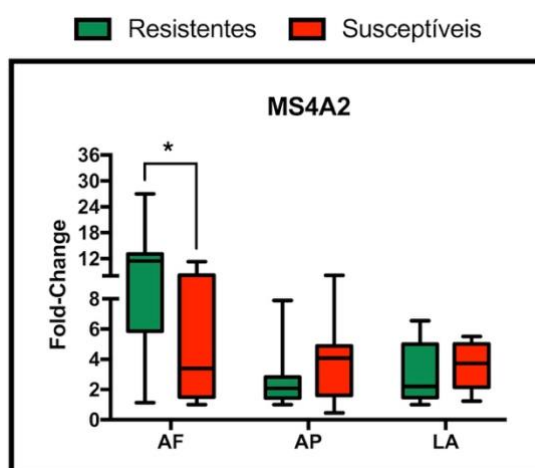


Figura 13. Comparação entre os níveis de expressão (“fold-change”) de FcεRI nas regiões fúndica (AF) e pilórica do abomaso (AP) e linfonodos abomasais (LA) dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney.

Anticorpos do isótipo IgE são considerados essenciais na defesa contra infecções helmínticas (Kooyman et al., 2000; Bendixsen et al., 2004). Essa imunoglobulina, encontrada em baixos níveis no sangue circulante, é primariamente associada a receptores de alta afinidade, constitutivamente expressos principalmente por eosinófilos, mastócitos e basófilos (Galli et al., 2011), sendo que a maior parte das IgE é específica para larvas infectantes dos GIN, sendo por isso associada à resposta imune inicial contra os parasitas (Huntley et al., 1998; Pernthaner et al., 2005). A importância da interação entre IgE e seu receptor de alta afinidade (FcεRI) é evidente quando da ativação das células efetoras mediante ligação do receptor à porção Fc das imunoglobulinas presentes nos parasitas recobertos, desencadeando rápida liberação dos conteúdos dos grânulos celulares, iniciando uma reação de hipersensibilidade comprovadamente lesiva aos parasitas, facilitando sua expulsão (Urb e Sheppard, 2012; Voehringer, 2013).

A importância de FcεRI no desenvolvimento de resistência a infecções parasitárias em ovinos tem sido demonstrada. Knight et al. (2011) evidenciaram que a infecção artificial por *T. circumcincta* desencadeou aumento na expressão desse receptor no abomaso desses animais, sendo mais intenso nos animais reinfetados, em comparação aos primo-infectados. Ingham et al. (2008) observaram superior

expressão de FcεRI em ovinos resistentes à infecção por *H. contortus*, tanto em animais primo quanto reinfectedos. MacKinnon et al. (2015) encontraram IgE superiormente expresso na mucosa abomasal dos animais resistentes, nos dias 0, 3 e 27 após a infecção artificial por *H. contortus*. Observaram esse mesmo aumento na mucosa abomasal, no dia 0 e no 3º dpi. Contudo, com relação aos níveis de FcεRI, os mesmos autores observaram diferença no perfil entre linfonodos abomasais e mucosa do abomaso, estando superiormente expresso nos sensíveis nos linfonodos (dia 0 e 3º dpi) e nos resistentes quando avaliado o abomaso (dia 0 e 3º dpi). Contudo, resultados distintos foram observados por Guo et al. (2016), os quais observaram esse gene aumentado em ambos animais resistentes e susceptíveis, contudo, sem diferença significativa entre os grupos. Vale ressaltar que esses animais foram abatidos no 20º dia após infecção por *H. contortus*.

Sabendo do crucial envolvimento da citotoxicidade mediada por anticorpos IgE no início da infecção por GIN, é de se esperar que animais com superior expressão desse gene logo no início da infecção desenvolvam resposta mais rápida e eficaz contra esses parasitas, conforme sugerido pelos resultados obtidos por MacKinnon et al. (2015). No presente estudo, foi observado superiores níveis de FcεRI (MS4A2) na região fúndica dos cordeiros resistentes, indicando seu papel na defesa contra a infecção parasitária nesses animais. Contudo, vale destacar que foi avaliado uma única data experimental (7º dpi), não se permitindo associar a cinética da expressão desse receptor em relação à resposta ao parasita.

Quanto aos genes do sistema complemento avaliados (C7 e CFI), houve diferença significativa ($p < 0,05$) para CFI, superiormente expresso na região pilórica dos cordeiros resistentes à infecção por *H. contortus* (Figura 14).

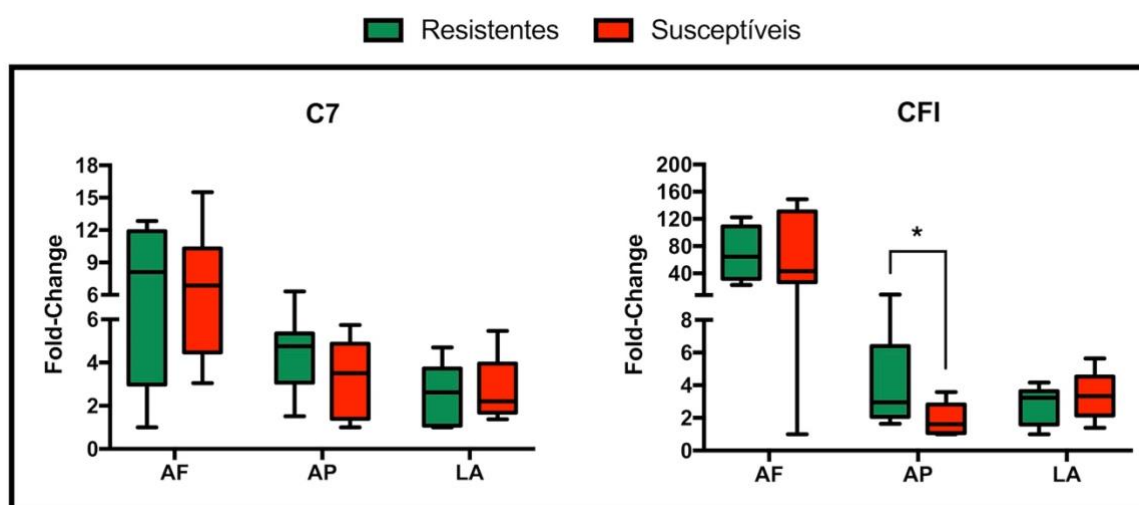


Figura 14. Comparação entre os níveis de expressão (“fold-change”) de genes associados ao sistema complemento nas regiões fúndica (AF) e pilórica do abomaso (AP) e linfonodos abomasais (LA) dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney.

O papel de moléculas do sistema complemento juntamente da resposta celular mediada por eosinófilos na destruição de formas larvais de parasitas gastrintestinais tem sido demonstrado. Eosinófilos ativados apresentam considerável aumento na expressão de receptores de superfície, dentre os quais aqueles para fatores do sistema complemento (Winqvist et al. 1982). Experimento conduzido *in vitro* demonstrou que eosinófilos ativados, obtidos de ovelhas experimentalmente infectadas com larvas desembainhadas de *H. contortus*, tiveram aumento significativo na taxa de imobilização de L₃ desse parasita, em meio adicionado de proteínas do complemento (Rainbird et al., 1998). Em modelo *ex vivo*, El-Ashram et al. (2018) observaram que o tecido abomasal obtido de ovinos apresentou, após inoculação com L₄ de *H. contortus*, aumento na expressão de fatores do complemento, dentre os quais C7, após 6h de incubação. Em outro estudo, foi observado aumento na expressão desse mesmo gene na mucosa abomasal de ovinos infectados com *H. contortus*, no 7º dpi (El-Ashram et al., 2017).

Em relação a ovinos com fenótipos opostos de resistência a GIN, estudos recentes tem demonstrado superior expressão de componentes do sistema complemento em animais resistentes. Guo et al. (2016) observaram 11 genes

relacionados à ativação do complemento aumentados em ovinos de raça resistente à hemoncose, em especial C7 e CFI, após 20 dias da infecção experimental com *H. contortus*. Zhang et al. (2019) detectaram superior expressão de CFI e de um receptor para o componente C3d (CR2) em abomaso de ovinos provenientes de linhagem resistente a *H. contortus* e *T. colubriformis*, três dias após primo-infecção artificial com *H. contortus*. Bhuiyan et al. (2017) puderam detectar superior expressão de fatores do complemento, como C3 e seu precursor, no abomaso de caprinos resistentes à hemoncose, experimentalmente infectados, no 42º dpi. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo com bovinos, no qual animais experimentalmente infectados com *O. ostertagi* apresentaram considerável aumento na expressão de C3, CFB e CFI na mucosa da região fúndica do abomaso, no 14º dpi, de maneira superior nos animais submetidos a múltiplas infecções, comparados aos primo-infectados (Li et al., 2010). Essa indução de fatores relacionados à ativação da via alternativa do complemento em infecções por GIN sugerem sua importância na resposta inicial a esses parasitas, tendo em vista a não participação de anticorpos no processo. No presente estudo, foram obtidos resultados semelhantes, sugerindo, igualmente, a importância da ativação do sistema complemento na defesa de cordeiros Morada Nova contra *H. contortus*, tendo em vista a maior expressão de CFI na região pilórica do abomaso de animais resistentes, no 7º dpi.

5.2.5. Mensuração dos anticorpos locais

Ao avaliar os níveis locais de anticorpos dos isótipos IgG e IgA (ELISA) no muco abomasal extraído dos extremos de infecção, no sétimo dia da terceira infecção artificial, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para o isótipo IgA, cujos níveis foram superiores nos resistentes (Figura 15).

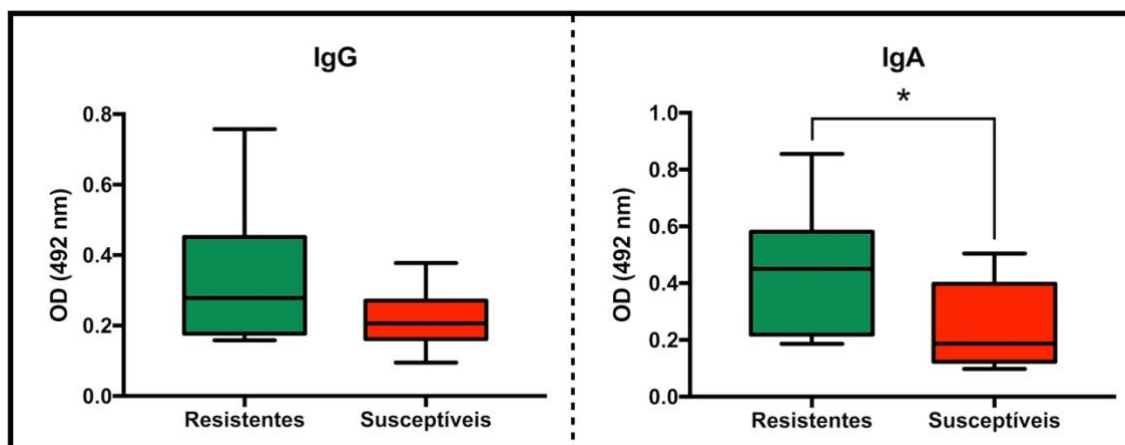


Figura 15. Comparação entre os níveis de anticorpos dos isótipos IgG e IgA (OD a 492nm) no muco abomasal dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney.

A resposta imune humoral, aliada à resposta celular, foi associada à destruição de formas larvais de GIN, de maneira interdependente (Rainbird et al., 1998). Os autores evidenciaram, *in vitro*, letalidade contra larvas de *H. contortus* ocasionada por eosinófilos, a qual ocorreu de maneira mais intensa quando da adição de soro rico em anticorpos específicos, oriundos de animais imunizados.

Com relação especificamente aos diferentes isótipos de anticorpos, IgG, predominantes na circulação sanguínea, não é o mais importante efector contra infecções por GIN, em contraste a IgA e IgE. Ainda assim, níveis mais elevados de IgG específica contra GIN tem sido encontrados em ovinos resistentes, em nível local ou sistêmico. Lacroux et al. (2006) observaram que a infecção por *H. contortus* levou a aumento de IgG sérico e local contra produtos excretórios e secretórios do parasita, observado apenas a partir do 15º dpi. Os autores também observaram correlação negativa entre os níveis séricos de IgG e carga parasitária, e correlação positiva com número de parasitas imaturos recuperados.

Ao comparar o perfil dessa imunoglobulina entre animais resistentes e susceptíveis aos GIN, Gill et al. (2000) observaram, *in vitro*, que a estimulação de células recuperadas de linfonodos abomasais com antígenos de *H. contortus* levou a uma maior produção de IgG nas culturas provenientes de ovinos resistentes. Esse perfil diferencial, contudo, foi observado apenas para as células recuperadas de

animais no 28º dia da infecção artificial. O mesmo grupo obteve resultado semelhante *in vivo*, em estudo anterior, observando superiores níveis séricos de IgG anti-L₃ de *H. contortus* em cordeiros resistentes, artificialmente infectados, a partir do 24º dpi. Ao avaliarem mensalmente ovelhas com idade inicial de 12 meses, sob infecção natural com predominância de *Haemonchus* sp., durante período de seis meses, Amarante et al. (2009) observaram níveis superiores de IgG sérica anti-L₃ e anti-adultos de *H. contortus* nos animais de raças classificadas como resistentes, em praticamente todas as datas experimentais. Nesse estudo, os animais Santa Inês (raça resistente) e suas cruzas com outras raças apresentaram de moderada a forte correlação negativa entre os níveis de IgG anti-*H. contortus* e contagens de OPG em várias datas de colheita. Andronicos et al. (2010), por sua vez, observaram superiores níveis de IgG anti-L₃ de *H. contortus* no abomaso e no soro de animais resistentes, de maneira bastante precoce em relação aos outros estudos citados, apenas três dias após a terceira infecção artificial.

No presente estudo, não foi observada diferença significativa entre os níveis de IgG no abomaso de animais resistentes e susceptíveis à infecção por *H. contortus*. Contudo, vale ressaltar que, com exceção do observado por Andronicos et al. (2010), os demais estudos citados detectaram perfil diferencial para os níveis desse isótipo de anticorpo entre fenótipos de resistência em datas mais tardias, a partir do 28º dpi quando artificialmente infectados (Gill et al., 1993b, 200; Lacroux et al., 2006). Quanto aos resultados obtidos por Amarante et al. (2009), contudo, não se sabe o início da resposta mediada por IgG nos animais avaliados, tendo em vista os mesmos já se apresentarem naturalmente infectados ao início do experimento. Ainda, vale ressaltar que os animais do presente estudo, foram abatidos sete dias após a terceira infecção parasitária, o que pode ter conferido aumento de IgG específica nos susceptíveis, igualando-se aos níveis dos resistentes, sem, contudo conferir-lhes resposta imune protetora.

Quanto ao isótipo IgA, localmente produzidos nas superfícies mucosas, foi evidenciado que infecções parasitárias em ovinos induzem grande aumento da produção local dessa imunoglobulina, fato observado após infecções seriadas, três vezes por semana, com *Trichostrongylus colubriformis*, que ocasionou aumento dos níveis séricos de IgA anti-L₃ na terceira semana, e anti-adultos a partir da quinta

semana (Cardia et al., 2011). Após treze semanas, os autores observaram aumento de ambos anticorpos específicos no muco intestinal dos ovinos abatidos. Em ovinos experimentalmente infectados com *Teladorsagia circumcincta*, também foi observado aumento de IgA local (abomaso), mensurado oito semanas após o desafio (Stear et al., 1995). Em estudo com o mesmo parasita, Halliday et al. (2007) observaram altos níveis de IgA local anti-L₄, mensurado na linfa recuperada dos linfonodos abomasais, entre o 6º e 8º dpi. Esses autores também observaram resposta mais intensa em animais previamente submetidos a infecção seriada com *T. circumcincta*, os quais apresentaram IgA local mais elevada que os primo-infectados a partir do 6º dpi, perfil mantido até o fim do experimento. Resultados semelhantes foram obtidos em animais experimentalmente infectados com *H. contortus*, ocorrendo aumento de IgA local anti-L₃ no 28º dpi em animais primo-infectados, enquanto que para animais previamente infectados, essa resposta foi bastante antecipada, a partir do 7º dpi (Lacroux et al., 2006).

Esse isótipo de imunoglobulina tem efeito deletério sobre os GIN, podendo ativar eosinófilos, importantes efetores na destruição desses parasitas, de maneira semelhante ao descrito para IgE (Prussin e Metcalfe, 2003), acarretando em redução no desenvolvimento e fecundidade dos mesmos. Níveis locais de IgA foram negativamente correlacionados a diversos parâmetros relacionados à infecção parasitária, como carga parasitária total (Bungiro et al., 2008), fecundidade e comprimento de fêmeas de *H. contortus* (Amarante et al., 2005; Lacroux et al., 2006; Hernández et al., 2016) e *T. circumcincta* (Stear et al., 1995; Strain et al. 2002; Hassan et al., 2011b).

Níveis mais elevados de IgA local têm sido associados ao fenótipo de resistência às infecções por GIN. Hassan et al. (2011b) observara que cordeiros portadores de alelo previamente associado à resistência a *Teladorsagia circumcincta* apresentaram superiores níveis de IgA no muco abomasal 35 dias após infecção com esse parasita, em comparação aos não portadores. Em infecção experimental com esse mesmo parasita, Ahmed et al. (2015) observaram aumento nos níveis locais de IgA em animais da raça resistente a partir do 7º dpi, com valores superiores aos susceptíveis. Esses autores também evidenciaram atraso na resposta dos susceptíveis, nos quais o aumento de IgA local ocorreu apenas no 14º

dpi. Com relação à infecção por *H. contortus*, Gill et al. (1993b) observaram superiores níveis de IgA anti-L3 nas fezes de ovinos resistentes ao parasita, mantendo-se elevados em relação aos susceptíveis no 17º, 24º, 31º e 38º dpi. Esses autores também observaram que tais níveis apresentaram pico no 24º dpi, declinando a partir dessa data experimental. Hernández et al. (2016) também avaliaram a resposta humoral de cordeiros de diferentes raças frente a infecção por *H. contortus*, observando que animais da raça resistente apresentaram maiores níveis locais de IgA contra formas adultas no 28º dpi, não havendo diferença significativa entre as raças para anticorpos contra L₃ no 7º ou 28º dpi. Amarante et al. (2005), por sua vez, obtiveram resultados distintos, não encontrando diferença nos níveis de IgA local contra L3 de *H. contortus*. Contudo, vale destacar que os autores avaliaram animais sob infecção natural com esse parasita, a qual perdurou por seis semanas, quando ocorreu o abate. Com relação ao presente estudo, níveis superiores de IgA anti-L₃ de *H. contortus* foram observados no muco abomasal de cordeiros resistentes a esse parasita, evidenciando o potencial dessa imunoglobulina como marcador fenotípico da resistência na raça Morda Nova.

5.2.6. Histopatologia do Abomaso e Contagem de eosinófilos e mastócitos

Ao exame histopatológico, as lesões observadas não distinguiram entre os extremos de infecção por *H. contortus* (Figura 16). Na região fúndica do abomaso, as principais alterações patológicas envolveram presença de infiltrado linfoplasmocitário e eosinofílico moderado, áreas de edema e leve deposição de material secretório e fibrinoide. Com relação à região pilórica, foi observada discreta irregularidade na arquitetura da mucosa, além de infiltrado inflamatório heterogêneo envolvendo a mucosa e a lâmina própria.

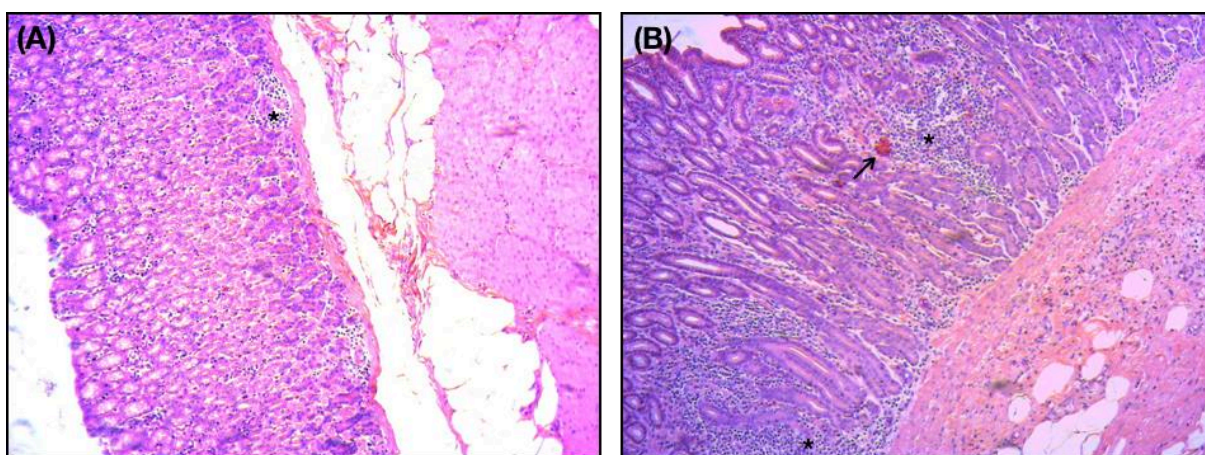


Figura 16. Fotomicrografia de cortes histológicos das regiões fúndica (A) e pilórica (B) do abomaso de animal resistente à infecção por *Haemonchus contortus* (HE, magnificação de 400X). Nas imagens, pode ser observado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com discreta presença de eosinófilos (*) e deposição de material fibrinoide (seta).

A contagem de eosinófilos (Figura 17) diferiu significativamente ($p < 0,05$) na região fúndica do abomaso dos extremos de infecção por *H. contortus*, sendo superior nos resistentes ($22,89 \pm 2,45$), em relação aos susceptíveis ($15,40 \pm 1,67$). Na região pilórica, os grupos não diferiram. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as regiões fúndica e pilórica do abomaso, quando ambos os grupo foram avaliados em conjunto. Contudo, quando analisados os extremos separados, tal diferença foi observada apenas nos resistentes, nos quais a contagem de eosinófilos foi superior na região fúndica do abomaso ($22,89 \pm 2,58$) em comparação à pilórica ($15,20 \pm 1,84$).

Quanto às contagens de mastócitos, não foram observadas diferenças significativas entre os extremos, tampouco entre as regiões fúndica e pilórica do abomaso, em ambos os grupos. Na Figura 18 encontram-se representadas as contagens de eosinófilos e mastócitos, em ambas as regiões do abomaso, comparativamente entre os extremos de infecção.

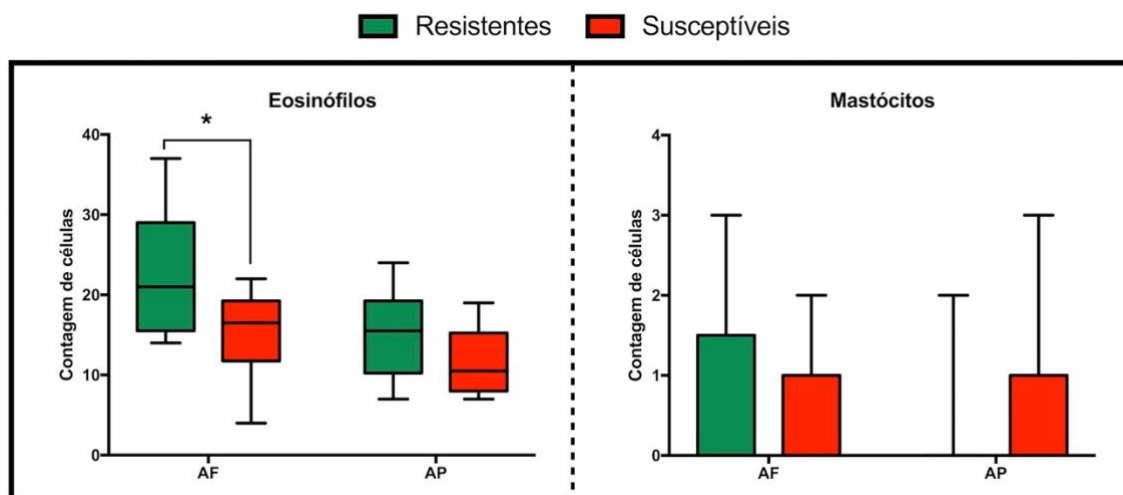


Figura 17. Contagem de eosinófilos e mastócitos (número de células mm², em magnificação de 400X) na mucosa das regiões fúndica (AF) e pilórica (AP) do abomaso dos extremos (mais resistentes e mais susceptíveis) de infecção por *Haemonchus contortus*. Asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os fenótipos pelo teste de Mann-Whitney.

Eosinófilos e mastócitos são as principais células responsáveis pela imunidade celular efetiva contra infecções por GIN. Mastócitos são células imunes de localização tecidual exclusiva, enquanto que eosinófilos, embora encontrados predominantemente nos tecidos, são também encontrados na corrente sanguínea, mais intensamente nas infecções parasitárias (Castillo et al., 2011). Infecções parasitárias provocam aumento dessas células no sítio de infecção, as quais promovem danos irreversíveis aos GIN, além de aumento na permeabilidade vascular e na contratilidade da musculatura lisa intestinal (Balic et al., 2000; Voehringer, 2013; Hassan et al., 2011a).

O papel dos eosinófilos no combate às formas larvais de parasitas gastrintestinais tem sido experimentalmente comprovada em estudos *in vitro*, com relação a *Fasciola hepatica* (Glauert et al. 1985), *Trichinella spiralis* (Venturiello et al. 1993) e *H. contortus* (Rainbird et al., 1998). Cordeiros artificialmente primo-infectados com *H. contortus* apresentaram, ao 5º dpi, eosinofilia na mucosa do abomaso, não sendo observado aumento nesse número a partir da data em questão (Balic et al., 2000). De mesma maneira, estudo recente evidenciou que cordeiros primo-infectados com *T. circumcincta* apresentaram eosinofilia na mucosa do abomaso, porém, mais tardia ao trabalho anteriormente citado, observada no 10º

dpi, com declínio na quantidade dessas células a partir dessa data, embora sempre com valores acima do grupo controle (Scott et al., 2017). Lacroux et al. (2006) demonstraram a cinética do recrutamento de eosinófilos ao abomaso de animais naïve ou previamente infectados por *H. contortus*. Os autores observaram que animais primo-infectados apresentam eosinofilia local a partir do 7º dpi, permanecendo elevada em relação ao grupo controle até o final do experimento. Evidenciaram, também, que animais reinfectedos apresentam resposta precoce, com aumento no número de eosinófilos a partir do 3º dpi, permanecendo superior em relação aos primo-infectados até o 7º dpi. Ainda, observaram correlações negativas entre quantidade de eosinófilos e contagens de OPG, comprimento total e fecundidade de fêmeas do parasita. Resultados semelhantes foram observados por Balic et al. (2003), em cordeiros infectados com *T. circumcincta*, sendo observado eosinofilia no abomaso dos animais previamente submetidos a infecções seriadas, no 3º após a última infecção, que ocorreu 12 semanas após os desafios.

Estudo conduzido por Balic et al. (2006) evidenciou, *in vivo*, a importância dos eosinófilos no combate às formas larvais de parasitas. Os autores avaliaram cordeiros submetidos a infecções seriadas com *H. contortus* e abatidos após nova infecção artificial, após 9 ou 22 semanas dos desafios iniciais. No grupo infectado 9 semanas após os desafios seriados, foi observado alto número de eosinófilos 24h após a infecção, os quais foram encontrados em estado de degranulação e rodeando as L₃, as quais apresentaram-se seriamente danificadas à microscopia eletrônica. No grupo que permaneceu livre de infecção por 22 semanas, contudo, foram observados poucos eosinófilos no tecido, além de L₃ intactas e L4 emergindo da mucosa, ressaltando a importância de desafios frequentes para a manutenção de resposta imune efetora. Vale destacar que essa resposta precoce observada pelos autores se deve ao fato de que a infecção artificial se deu com larvas desembainhadas, inoculadas diretamente no abomaso.

Diversos estudos tem evidenciado perfil diferencial relacionado ao número de eosinófilos locais entre ovinos resistentes e susceptíveis aos GIN. Terefe et al. (2007), embora tenham observado eosinofilia sanguínea mais intensa em animais de raça resistente ao *H. contortus*, não encontraram diferença na quantidade de eosinófilos no abomaso entre as raças, no 4º ou 30º dpi. Contudo, em estudo

posterior, Terefe et al. (2009) observaram que animais de raça resistente ao *H. contortus*, artificialmente infectados, apresentaram maior quantidade de eosinófilos teciduais em comparação aos susceptíveis, no 16º dpi, data experimental ausente no estudo anterior. Shakya et al. (2009) avaliaram cordeiros naturalmente infectados por *H. contortus*, observando superior contagem de eosinófilos na região fúndica abomaso dos animais da raça resistente, no 35º dpi, o que não foi observado para a região pilórica. Bricarello et al. (2004) obtiveram resultado semelhante, ao avaliaram cordeiros de duas raças sob infecção natural com *H. contortus*. Os autores encontraram superior contagem de eosinófilos na mucosa do abomaso dos animais da raça resistente, 10 semanas após o início da infecção. Ahmed et al. (2015) também observaram eosinofilia mais intensa no abomaso de animais de raça resistente a *T. circumcincta*, do 3º ao 35º dia após infecção artificial com esse helminto.

Contudo, os resultados em relação a utilização da contagem de eosinófilos teciduais como marcadores da resistência a parasitoses não são consenso entre os estudos. Amarante et al. (1999), por exemplo, não observaram diferença significativa para a contagem de eosinófilos no abomaso entre ovinos de raças resistentes e susceptíveis ao *H. contortus*, 30 dias após infecção artificial com esse parasita, em animais previamente submetidos a infecções naturais. De modo semelhante, estudo conduzido por Amarante et al. (2005) demonstrou que o número de eosinófilos locais não diferiu entre raças ovinas resistente e susceptível à infecção natural por *H. contortus*, no 42º dpi. No presente estudo, por sua vez, foi observado superior número de eosinófilos na mucosa da região fúndica do abomaso dos animais resistentes à infecção por *H. contortus*. Esses resultados, em conjunto à superior expressão de MS4A2 também encontrada nesses animais, evidenciam a importância da ação citotóxica dos eosinófilos no combate aos parasitas, conforme evidenciado nos demais trabalhos descritos. Não obstante, é importante destacar a influência no tipo de infecção e data de observação em relação às diferenças entre os resultados dos estudos apresentados.

Em relação às diferentes regiões anatômicas do abomaso, sabe-se que *H. contortus* possui alto tropismo pela região fúndica em especial as larvas infectantes e demais formas imaturas, que são praticamente ausentes na região pilórica (Dash,

1985; Rahman, 1990). Sendo assim, um maior recrutamento de células imunes efectoras na região fúndica possivelmente desempenha importante papel no combate ao parasita. Embora não seja grande o número de estudos avaliando concomitantemente as regiões fúndica e pilóricas do abomaso, diferenças entre a densidade do infiltrado eosinofílico entre essas regiões têm sido relatadas. Shakya et al. (2009) evidenciaram superior contagem de eosinófilos nos cordeiros resistentes à infecção por *H. contortus* apenas ao avaliarem a região fúndica do abomaso. Observaram, também, que no 35º dpi a referida contagem foi bastante superior nessa região em relação à pilórica, o que ocorreu apenas para o grupo resistente. Buendía-Jiménez et al. (2005) evidenciaram que animais previamente tratados com concentrado vesicular de *T. hydatigena* e experimentalmente infectados apresentaram menores contagens de OPG em relação ao grupo não tratado. Essa redução foi acompanhada de alta contagem de eosinófilos teciduais no 49º dpi, a qual foi superior na região fúndica do abomaso dos animais que receberam o concentrado antes da infecção. Foi evidenciado que, para esse grupo, que mostrou maior resistência ao parasita, a região fúndica apresentou eosinofilia mais intensa que a região pilórica. Contudo, resultados distintos foram observados em outros trabalhos. Terefe et al. (2009) e Muñoz-Guzmán et al. (2012) observaram maior quantidade de eosinófilos na região pilórica de animais resistentes a infecção por *H. contortus*, aos 16 dias e 15 semanas da infecção artificial, respectivamente. Contudo, é importante ressaltar que em todos os estudos o tropismo dos eosinófilos pelas diferentes regiões do abomaso estavam associadas à maior presença de parasitas. No presente estudo, os cordeiros Morada Nova foram submetidos a dois desafios parasitários e abatidos no sétimo dia do terceiro desafio, no início da infecção, sendo possível observar maior quantidade de eosinófilos na região fúndica do abomaso dos animais resistentes. Entretanto, não foi possível, de acordo com o delineamento experimental adotado, associar a infiltração de eosinófilos com a presença de larvas do parasita.

De modo similar aos eosinófilos, os mastócitos desempenham importante papel na defesa contra GIN. A estimulação dessas células ocorre predominantemente mediante ligação de seus receptores FcεRI aos anticorpos do isótipo IgE (Prussin e Metcalfe, 2003). Após ativadas, essas células liberam o

conteúdo de seus grânulos, ricos em mediadores tais como histamina e proteases (Anthony et al., 2007; Abraham e St John, 2010), desencadeando não apenas efeitos deletérios às estruturas dos parasitas, mas também uma reação de hipersensibilidade na mucosa do trato gastrointestinal, aumentando o fluxo sanguíneo local, a permeabilidade vascular e a contratilidade da musculatura lisa intestinal, facilitando a expulsão dos parasitas (Abraham e St John, 2010; Dawicki e Marshall, 2007).

Tem sido evidenciado o fato da infecção de ovinos com GIN estimula mastocitose tecidual. Lacroux et al. (2006) detectaram mastocitose na mucosa do abomaso 15 dias após infecção artificial com *H. contortus*, em animais primo-infectados. Observaram, também, que animais previamente infectados responderam mais rapidamente, com aumento na quantidade de mastócitos logo no 3º dpi, os quais se mantiveram superiores aos primo-infectados até o 28º dpi, quando esses grupos não mais diferiram entre si, embora mantenham-se elevados em relação aos controles. Em estudo recente, Scott et al. (2017) evidenciaram que a infecção artificial de cordeiros com larvas de *T. circumcincta* levou a aumento na contagem de mastócitos na mucosa da região fúndica do abomaso a partir do 30º dpi, o que não ocorreu na região pilórica. Os autores também evidenciaram que a inoculação intra-abomasal com formas adultas do parasita não provocaram aumento no número de mastócitos, após avaliação seriada por 72 horas. Balic et al. (2003), por sua vez, não observaram mastocitose na mucosa do abomaso após três ou cinco dias da infecção artificial com *T. circumcincta*. Ainda assim, correlações negativas com parâmetros da infecção têm sido observadas, em relação à carga parasitária, ao comprimento total e à fecundidade das fêmeas, além de correlação positiva com o número de parasitas imaturos na mucosa (Amarante et al., 2005; Bricarello et al., 2005; Lacroux et al., 2006).

Com relação à comparação entre as quantificações de mastócitos locais entre ovinos resistentes e susceptíveis aos GIN, resultados variados foram obtidos ao longo dos estudos. Terefe et al. (2007) observaram que cordeiros primo-infectados com *H. contortus* e resistentes a esse parasita apresentaram mastocitose na mucosa do abomaso no 4º dpi, de maneira precoce aos susceptíveis, nos quais esse aumento ocorreu apenas no 30º dpi. Esses autores observaram, também, que,

quando reinfectedos, os susceptíveis tiveram sua resposta antecipada, apresentando mastocitose no 4º dpi, embora menos intensa que a observada nos resistentes. Gill et al. (2000) também encontraram superiores contagens de mastócitos na mucosa de cordeiros resistentes, 28 dias após infecção artificial com *H. contortus*. Ahmed et al. (2015) detectaram maior número de mastócitos no abomaso de ovinos resistentes a *T. circumcincta*, no 7º e 14º dpi. Observaram, também, que apenas os animais resistentes possuíam mastócitos na mucosa abomasal no dia da infecção artificial (D0), o que indica capacidade de resposta mais rápida frente às larvas infectantes. Contudo, outros estudos não obtiveram os mesmos resultados. Muñoz-Guzmán et al. (2006), por exemplo, não evidenciaram diferença nas contagens de mastócitos abomasais entre ovinos de raças resistente e susceptível a *H. contortus*, 15 semanas após a infecção artificial. Resultados semelhantes a esses foram obtidos por Amarante et al. (1999), que observaram quantidades semelhantes de mastócitos no abomaso de ovinos de raças com diferentes fenótipos de resistência parasitária, após 30 dias da infecção artificial com *H. contortus*, avaliando animais que com prévio contato com infecções naturais. Em outro estudo mais recente, esse mesmo grupo de pesquisa também não encontrou diferença entre raças resistente e susceptível à infecção por *H. contortus*, naturalmente infectados, ao 42º dpi (Amarante et al., 2005).

No presente estudo, apesar de terem sido observados poucos mastócitos na mucosa do abomaso dos animais infectados por *H. contortus*, sem diferença entre os fenótipos extremos, não se pode descartar sua atuação na defesa contra a infecção, tendo em vista ter sido avaliada apenas uma data experimental (7º dpi). Nesse sentido, pode ter havido mastocitose em momentos mais iniciais da infecção, conforme destacado por Ahmed et al. (2015), o que não pode ser avaliado no presente delineamento experimental. Ainda, sabe-se que assim como para os eosinófilos, a simples presença de mastócitos no sítio de infecção não garante ação efetiva contra os parasitas, e o estado de ativação dessas células seria uma medida interessante em relação à sua efetividade. Embora não tenha sido possível mensurar diretamente o estado dessas células, uma maior quantidade de receptores celulares, vide FCεRI, superiormente expresso nos resistentes, poderia ser um

indicativo de maior ativação das células efetoras no sítio de infecção dos cordeiros resistentes.

6. CONCLUSÕES

- O esquema de fenotipagem adotado permitiu estratificação do rebanho em três fenótipos distintos: resistentes, intermediários e susceptíveis à infecção por *H. contortus*;
- Apesar do impacto da infecção nos parâmetros sanguíneos, um número relativamente baixo de animais apresentou valores de VG abaixo dos padrões, evidenciando certo caráter resiliente nos animais;
- Foi evidenciada a importância da resposta inata na resistência dos cordeiros à infecção por *H. contortus*, mediada por TLR2 e componente do sistema complemento (CFI);
- Foi evidenciada resposta imune mediada por IgE nos animais resistentes, que apresentaram superior expressão de MS4A2 (receptor de alta afinidade para IgE) na região fúndica do abomaso;
- O presente estudo foi o primeiro a associar, diretamente, o fenótipo de resistência parasitária em animais de produção com altos níveis de IL33 locais (região fúndica do abomaso);
- Os cordeiros susceptíveis apresentaram resposta inflamatória exacerbada na região fúndica do abomaso, caracterizada por superior expressão de TNF α e IL1 β ;
- Maiores contagens de eosinófilos e níveis locais de IgA (muco abomasal) foram observadas nos cordeiros resistentes à infecção por *H. contortus*.

7. REFERÊNCIAS

Abraham SN, St John AL (2010) Mast cell - orchestrated immunity to pathogens. **Nat Rev Immunol** 10:440-452.

Ahmed A, Sebastiano S et al. (2015) Breed differences in humoral and cellular responses of lambs to experimental infection with the gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta*. **Veterinary Research** 46:8-16.

Albers GA, Gray GD, Piper LR, Barker JS, Le Jambre LF, Barger IA (1987) The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young merino sheep. **Int J Parasitol** 17:1355-1363.

Albina JE, Reichner JS (1995) Nitric oxide in inflammation and immunity. **New Horizons** 3:46-64.

Albuquerque ACA, Bassetto CC, Almeida FA, Amarante AFT (2017) Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. **Veterinary Parasitology** 246:112-117.

Almeida FA, Garcia KC, Torgerson PR, Amarante AFT (2010) Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International** 59:622-625.

Amarante AFT (2004) Resistência genética a helmintos gastrointestinais. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga:SBMA, p. 1-5.

Amarante AFT, Bricarello PA, Huntley JF, Mazzolin LP, Gomes JC (2005) Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. **Veterinary Parasitology** 128:99-107.

Amarante AFT, Bricarello PA, Rocha RA, Gennari SM (2004) Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology** 120:91-106.

Amarante AFT, Craig TM et al. (1999) Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbred lambs. **Vet. Parasitol.** 80:311-324.

Amarante AFT, Susin I, Rocha RA, Silva MB, Mendes CQ, Pires AV (2009) Resistance of Santa Inês and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology** 165:273-280.

Andronicos NM, Hunt P, Windon R (2010) 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** 40: 417-429.

Andronicos NM, McNally J, Kotze AC, Hunt PW, Ingham A (2012) *Trichostrongylus colubriformis* larvae induce necrosis and release of IL33 from intestinal epithelial cells in vitro: Implications for gastrointestinal nematode vaccine design. **International Journal For Parasitology** 42:295-304.

Angkasekwina P, Srimanote P, Wang YH, Pootong A, Sakolvaree Y, Pattanapanyasat K, Chaicumpa W, Chaiyaroj S, Dong C (2013) Interleukin-25 (IL-25) Promotes Efficient Protective Immunity against *Trichinella spiralis* Infection by Enhancing the Antigen-Specific IL-9 Response. **Infection And Immunity** 81:3731-3741.

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ & Gause WC (2007) Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nat Rev Immunol** 7:975-987.

Aumont G, Gruner L, Hostache G (2003) Comparison of the resistance to sympatric and allopatric isolates of *Haemonchus contortus* of Black Belly sheep in Guadeloupe (FWI) and of INRA 401 sheep in France. **Vet Parasitol** 116:139-150.

Balic A, Bowles VM, Meeusen EN (2000) Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. **Vet Immunol Immunopathol** 75:109-120.

Balic A, Bowles VM, Meeusen ENT (2002) Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Parasite Immunology** 24:29-46.

Balic A, Cunningham CP, Meeusen ENT (2006) Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. **Parasite Immunology** 28:107-115.

Balic, A, Bowles VM, Li YS, Meeusen EN (2003) Local immune responses in sensitized sheep following challenge infection with *Teladorsagia circumcincta*. **Parasite Immunol** 25:375-381.

Bambou JC, Larcher T, Ceï W, Dumoulin PJ, Mandonnet N (2013) Effect of Experimental Infection with *Haemonchus contortus* on Parasitological and Local Cellular Responses in Resistant and Susceptible Young Creole Goats. **BioMed Research International** 2013:1-9.

Barger IA, Le Jambre LF, Georgi JR, Davies HI (1985) Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep exposed to continuous infection. **Int J Parasitol** 15:529-533.

Barlow JL, Peel S et al. (2013) IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology** 132:933-941.

Bebo Junior BF, Schuster JC, Vandenbark AA, Offner H (1999) Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. **J Immunol** 162:35-40.

Behnke JM, De Clercq D, Sacko M, Gilbert FS, Ouattara DB e Vercruysse J (2000) The epidemiology of human hookworm infections in the southern region of Mali. **Trop Med Int Health** 5: 343-354.

Bendixsen T, Windon RG, Huntley JF, MacKellar A, Davey RJ, McClure SJ, Emery DL (2004) Development of a new monoclonal antibody to ovine chimeric IgE and its detection of systemic and local IgE antibody responses to the intestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Vet Immunol Immunopathol** 97:11-24.

Bhuiyan A, Li J, Wu Z et al. (2017) Exploring the Genetic Resistance to Gastrointestinal Nematodes Infection in Goat Using RNA-Sequencing. **International Journal of Molecular Sciences** 18:751-767.

Bisset SA, Vlassoff A, Douch PG, Jonas WE, West CJ, Green RS (1996) Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. **Vet Parasitol** 61:249-263.

Bowman DD (2010) **Georgis: Veterinary Parasitology**. Saunders: Elsevier, 783 p.

Bricarello PA, Zaros LG, Coutinho LL, Rocha RA, Silva MB, Kooyman FN, De Vries E, Yatsuda AP, Amarante AFT (2008) Immunological responses and cytokine gene expression analysis to *Cooperia punctata* infections in resistant and susceptible Nelore cattle. **Veterinary Parasitology** 155:95-103.

Bricarello PA, Gennari SM, Oliveira-Sequeira TCG, Vaz CMSL, Gonçalves de Gonçalves I, Echevarria FAM (2004) Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research** 51:75-83.

Buendía-Jiménez JA, Muñoz-Guzmán MA, Vega-López MA, Cuenca-Verde C, Martínez-Labat JP, Cuéllar-Ordaz JA, Alba-Hurtado F (2015). Partial protection and abomasal cytokine expression in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* and pre-treated with *Taenia hydatigena* vesicular concentrate. **Veterinary Parasitology** 211:60-66.

Canals A, Zarlenga DS, Almeria S, Gasbarre LC (1997) Cytokine profile induced by a primary infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. **Vet Immunol Immunopathol** 58:63-75.

Cardia DFF, Rocha-Oliveira RA, Tsunemi MH, Amarante AFT (2011) Immune response and performance of growing Santa Ines lambs to artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections. **Veterinary Parasitology** 182:248-258.

Castillo JA, Medina RD, Villalobos JM, Gayosso-Vazquez A, UlloaArvizu R, Rodriguez RA, Ramirez HP, Morales RA (2011) Association between major histocompatibility complex microsatellites, fecal egg count, blood packed cell volume and blood eosinophilia in Pelibuey sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Vet Parasitol** 177:339-344.

Cavalcante ACR, Vieira LS, Chagas ACS, Molento MB (2009) **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 603 p.

Chagas ACS, Domingues LF Gaínza YA, Barioni-Júnior W, Esteves SN, Niciura SCM (2015b) Target selected treatment with levamisole to control the development of anthelmintic resistance in a sheep flock. **Parasitology Research** 115:1131-1139.

Chagas ACS, Katiki LM, Silva IC, Giglioti R, Esteves SN, Oliveira MCS, Barioni Júnior W (2013) *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International** 62:1-6.

Chagas ACS, Oliveira MCS, Esteves SN (2014) Modelo para monitoramento da resistência parasitária e tratamento antihelmíntico seletivo em rebanhos experimentais de ovinos e caprinos, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Pecuária Sudeste**. 36:22-33.

Chagas ACS, Oliveira MCS, Esteves SN, Oliveira HN, Giglioti R, Giglioti C, Carvalho C, Ferrezini J, Schiavone D (2008) Parasitismo por nematóides gastrintestinais em matrizes e cordeiros criados em São Carlos, São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 17:126-132.

Chagas ACS, Zaia MG, Domingues LF, Rabelo MD, Politi FAZ, Anibal FF, Chagas JR (2015a) Desparasitación racional: estudio comparativo de técnicas para la detección de la anemia causada por nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes. In: VII Congreso Argentino de Parasitología, **Libro de Resúmenes...** La Plata: Asociación Parasitológica Argentina, p. 109.

Chamizo C, Rubio JM, Moreno J, Alvar J (2001) Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by a single tube RT-PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 83:191-202.

Cintra MC, Teixeira VN, Nascimento LV, Sotomaior CS (2016) Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Veterinary Parasitology** 216:4-6.

Clark CH, Kiesel GK, Goby CH (1962) Measurement of blood loss caused by *Haemonchus contortus*. **Am J Vet Med** 23:977-980.

Colasanti M, Gradoni L, Mattu M, Persichini T, Salvati L, Venturini G, Ascenzi P (2002) Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). **International Journal of Molecular Medicine** 9:131-134.

Colditz IG, Watson DL, Gray GD, Eady SJ (1996) Some relationships between age, immune responsiveness and resistance to parasites in ruminants. **Int J Parasitol** 26:869-877.

Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruysse J (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology** 136:167-185.

Coop RL, Jackson F, Graham RB, Angus KW (1988) Influence of two levels of concurrent infection with *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus vitrinus* on the growth performance of lambs. **Res Vet Sci** 45:275-280.

Coop RL, Sykes AR, Angus KW (1977). The effect of a daily intake of *Ostertagia circumcincta* larvae on body weight, food intake and concentration of serum constituents in sheep. **Res Vet Sci** 23:76-83.

Corvan SM, Agnew L, Andronicos NM (2015) *Trichostrongylus colubriformis* induces IgE-independent CD13, CD164 and CD203c mediated activation of basophils in an in vitro intestinal epithelial cell co-culture model. **Veterinary Parasitology** 207:285-296.

Courtney CH, Parker CF, McClure KE, Herd RP (1985) Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology** 15:101-109.

Craig NM, Miller HRP, Smith WD, Knight PA (2007) Cytokine expression in naïve and previously infected lambs after challenge with *Teladorsagia circumcincta*. **Vet Immunol Immunopathol** 120: 47-54.

D'Agostino P, Milano S et al. (1999) Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. **Ann N Y Acad Sci** 876:426-429.

Dash KM (1985) Distribution of trichostrongylid nematodes in the abomasum of sheep. **International Journal for Parasitology** 15:505-510.

Dawicki W, Marshall JS (2007) New and emerging roles for mast cells in host defence. **Curr Opin Immunol** 19:31-38.

Dubois GR, Schweizer RC, Versluis C, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Bruijnzeel PLB (1998) Human Eosinophils Constitutively Express a Functional Interleukin-4 Receptor: Interleukin-4 –Induced Priming of Chemotactic Responses and Induction of PI-3 Kinase Activity. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 19:691-699.

El-Ashram S, Al Nasr I, El-Kemary M, Mehmood R, Hu M, Suo X (2017) Early and late gene expression profiles of the ovine mucosa in response to *Haemonchus contortus* infection employing Illumina RNA-seq technology. **Parasitology International** 66:681-692.

El-Ashram S, Li C et al. (2018) An ex vivo abomasal ovine model to study the immediate immune response in the context of *Haemonchus contortus* larval-stage. **Veterinary Parasitology** 254:105-113.

Else KJ, Finkelman FD (1998) Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. **International Journal for Parasitology** 28:1145-58.

Evans MJ, Eckert A, Lai K, Adelman SJ, Harnish DC (2001) Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NFκB activity in vivo. **Circ Res** 89: 823-830.

Facó O, Paiva SR, Alves LRN, Lobo RNB, Villela LCV (2008) **Raça Morada Nova: origem, características e perspectivas**. Sobral: Embrapa Caprinos, 43 p.

Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, McIlgorm A, Jolin HE, McKenzie AN (2006) Identification of an interleukin (IL)-25–dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. **The Journal Of Experimental Medicine** 203:1105-1116.

Feldman BV, Zinkl JG et al. (2000) **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1206 p.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban Junior JF (1997) Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annual Review of Immunology** 15:505-533.

Finney CA, Taylor MD, Wilson MS, Maizels RM (2007). Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. **Eur J Immunol** 37:1874-1886.

Fort MM, Cheung J et al. (2001) IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies *in vivo*. **Immunity**. 15:985-995.

Galli HR, Borregaard N, Wynn TA (2011) Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. **Nat. Immunol** 12:1035-1044.

Gamble HR, Zajac AM (1992) Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. **Vet Parasitol** 41:211-225.

Ganley L, Babu S, Rajan TV (2001) Course of *Brugia malayi* infection in C57bl/6j Nos2^{+/+} and ^{-/-} mice. **Exp Parasitol** 98:35-43

Gasbarre LC, Leighton EA, Sonstegard T (2001) Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. **Vet. Parasitol** 98:51-64.

Gauly M, Schackert M, Hoffmann B, Erhardt G (2006). Influence of sex on the resistance of sheep lambs to an experimental *Haemonchus contortus* infection. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift** 113:178-81.

Gil HS, Watson DL, Brandon MR (1993a) Monoclonal antibodies to CD4⁺ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. **Immunology** 78:43-49.

Gill HS, Altmann K, Cross ML, Husband AJ (2000) Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Immunology** 99:458-463.

Gill HS, Gray GD, Watson DL, Husband AJ (1993b) Isotypespecific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. **Parasite Immunol** 15:61-67.

Glass EJ (2012) The molecular pathways underlying host resistance and tolerance to pathogens. **Front Genet** 3:263-274.

Glauert AM, Lammas DA, Duffus WPH (1985) Ultrastructural observations on the interaction between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*. **Parasitology** 91:459-470

Gonçalves TC., Alencar MM et al. (2018) Resistance of sheep from different genetic groups to gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Small Ruminant Research** 166:7-11.

Gossner A, Wilkie H, Joshi A, Hopkins J (2013) Exploring the abomasal lymph node transcriptome for genes associated with resistance to the sheep nematode *Teladorsagia circumcincta*. **Veterinary Research** 44:68-80.

Greer AW, Stankiewicz M, Jay NP, McAnulty RW, Sykes AR (2005) The effect of concurrent corticosteroid-induced immuno-suppression and infection with the intestinal parasite *Trichostrongylus colubriformis* on feed intake and utilization in both immunologically naive and competent sheep. **Anim Sci** 80:89-99.

Gruner L, Aumont G, Getachew T, Brunel JC, Pery C, Cognie Y, Guerin Y (2003) Experimental infection of Black Belly and INRA 401 straight and crossbred sheep with trichostrongyle nematode parasites. **Vet Parasitol** 116:239-249

Gruner L, Cortet J, Sauve C, Limouzin C, Brunel JC (2002) Evolution of nematode community in grazing sheep selected for resistance and susceptibility to *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*: a 4-year experiment. **Vet Parasitol** 109:277-291.

Guo Z, González JF, Hernandez JN, McNeilly TN, Corripio-Miyar Y, Frew D, Morrison T, Yu P, Lic RW (2016) Possible mechanisms of host resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep breeds native to the Canary Islands. **Scientific Reports** 1:1-14.

Hamano N, Terada N, Maesako K, Hohki G, Ito T, Yamashita T, Konno A (1998) Effect of female hormones on the production of IL-4 and IL-13 from peripheral blood mononuclear cells. **Acta Otolaryngol Suppl** 537:27-31.

Harder A, Wunderlich F, Marinovski P (1992) Effects of testosterone on *Heterakis spumosa* infections in mice. **Parasitology** 105:335-342.

Hassan M, Good B, Hanrahan JP, Champion D, Sayers G, Mulcahy G, Sweeney T (2011b). The dynamic influence of the DRB1*1101 allele on the resistance of sheep to experimental *Teladorsagia circumcincta* infection. **Vet Res** 42:46-55.

Hassan M, Hanrahan JP, Good B, Mulcahy G, Sweeney T (2011a) A differential interplay between the expression of Th1/Th2/Treg related cytokine genes in *Teladorsagia circumcincta* infected DRB1*1101 carrier lambs. **Veterinary Research** 1:45-54.

Hayward AD, Nussey DH et al. (2014) Natural Selection on Individual Variation in Tolerance of Gastrointestinal Nematode Infection. **PLoS Biology** 12:e1001917.

Hein WR, Pernthaner A, Piedrafiita D, Meeusen ENT (2010) Immune mechanisms of resistance to gastrointestinal nematode infections in sheep. **Parasit Immunol** 32:541-548.

Helmby H, Grencis RK (2003) Essential role for TLR4 and MyD88 in the development of chronic intestinal nematode infection. **Eur J Immunol** 33:2974-2979.

Hermánek J, Goyal PK, Wakelin D (2007) Lymphocyte, antibody and cytokine responses during concurrent infections between helminths that selectively promote T-helper-1 or T-helper-2 activity. **Parasite Immunology** 16:111-117.

Hernández JN, Hernández A, Stear MJ, Conde-Felipe M, Rodríguez E, Piedrafita D, González JF (2016) Potential role for mucosal IgA in modulating *Haemonchus contortus* adult worm infection in sheep. **Veterinary Parasitology** 223:153-158.

Ho LH, Ohno T, Oboki K, Kajiwarra N, Suto H, Ikura M, Okayama Y, Akira S, Saito H, Galli SJ, Nakae S (2007) IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcεRI signals. **J Leukoc Biol** 82:1481-1490.

Hoffmann A, Baltimore D (2006) Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. **Immunol Rev** 210:171-186.

Howell SB, Burke JM, Miller JE, Terrill TH, Valencia E, Williams MJ, Williamson LH, Zajac AM, Kaplan RM (2008) Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 233:1913-1919.

Huber SA, Pfaeffle B (1994) Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackie virus group B type 3. **J Virol** 68:5126-5132.

Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grencis RK (2008) IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. **J Immunol** 180:2443-2449.

Hung LY, Lewkowich IP, Dawson LA, Downey J, Yang Y, Smith DE, Herbert DR (2013) IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworms. **Proc Natl Acad Sci USA** 110:282-287.

Huntley JF, Schallig HD, Kooyman FN, Mackellar A, Jackson F, Smith WD (1998) IgE responses in the serum and gastric lymph of sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*. **Parasite Immunology** 20:163-168.

Ibelli AMG, Nakata LC et al. (2011) mRNA profile of Nellore calves after primary infection with *Haemonchus placei*. **Veterinary Parasitology** 176:195-200.

Idika I, Chiejina S, Mhomga L, Nnadi P, Ngongeh L (2012) Correlates of resistance to gastrointestinal nematode infection in Nigerian West African dwarf sheep. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 5:529-532.

Ingham A, Reverter A, Windon R, Hunt P, Menzies M (2008) Gastrointestinal nematode challenge induces some conserved gene expression changes in the gut mucosa of genetically resistant sheep. **International Journal for Parasitology** 38:431-442.

Issakowicz J, Issakowicz ACKS, Bueno MS, Costa RLD, Katiki LM, Geraldo AT, Abdalla AL, McManus C, Louvadini H (2016) Parasitic infection, reproductive and productive performance from Santa Inês and Morada Nova ewes. **Small Ruminant Research** 136:96-103.

Jacobs HJ, Ashman K, Meeusen NT (1995) Humoral and cellular responses following local immunization with surface antigen of the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 48:323-332 .

Jacobs JR, Greiner SP, Bowdridge SA (2015) Serum interleukin-4 (IL4) production is associated with lower fecal egg count in parasite-resistant sheep. **Veterinary Parasitology** 211:102-105.

Jacobs JR, Sommers KN, Zajac AM, Notter DR, Bowdridge SA (2016) Early IL-4 gene expression in abomasum is associated with resistance to *Haemonchus contortus* in hair and wool sheep breeds. **Parasite Immunology** 38:333-339.

Jenkins SJ, Hewitson JP, Ferret-Bernard S, Mountford AP (2005) Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and independent pathways. **Int Immunol** 17:1409-1418.

Kamis AB, Ahmad RA e Badrul-Munir MZ (1992) Worm burden and leukocyte response in *Angiostrongylus malaysiensis* infected rats: the influence of testosterone. **Parasitol Res** 78:388-391.

Kanobana K, Ploeger HW, Vervelde L (2002) Immune expulsion of the trichostrongylid *Cooperia oncophora* is associated with increased eosinophilia and mucosal IgA. **Int J Parasitol** 32:1389-1398.

Karanu FN, McGuire TC, Davis WC, Besser TE, Jasmer DP (1997) CD4+ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. **Parasite Immunology** 19:435-445.

Keegan JD, Good B, Hanrahan JP, Lynch C, de Waal T, Keane OM (2018) Live weight as a basis for targeted selective treatment of lambs post-weaning. **Veterinary Parasitology** 258:8-13.

Kerepesi LA, Hess JA, Leon O, Nolan TJ, Schad GA, Abraham DA (2007) Toll-like receptor 4 (TLR4) is required for protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Microbes Infect** 9:28-34.

Kim MR, Manoukian R et al. (2002) Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. **Blood** 100:2330-2340,

Knight PA, Griffith SE et al. (2011) Novel gene expression responses in the ovine abomasal mucosa to infection with the gastric nematode *Teladorsagia circumcincta*. **Veterinary Research** 42:78-99.

Kondo Y, Yoshimoto T et al. (2008) Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. **International Immunology** 20:791-800.

Kooyman FN, Schallig HD, Van Leeuwen MA, MacKellar A, Huntley JF, Cornelissen AW, Vervelde L (2000) Protection in lambs vaccinated with *Haemonchus contortus* antigens is age related, and correlates with IgE rather than IgG1 antibody. **Parasite Immunol** 22:13-20.

Kotze AC, McClure SJ (2001) *Haemonchus contortus* utilises catalase in defence against exogenous hydrogen peroxide in vitro. **Int J Parasitol** 31:1563-1571

Koyasu S, Moro K. Th2-type innate immune responses mediated by natural helper cells. **Annals Of The New York Academy Of Sciences** 1283:43-49.

Kroeger KM, Sullivan BM, Locksley RM (2009) IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38 α -dependent pathway. **Journal of Leukocyte Biology** 86:769-778.

Kyriazakis I, Houdijk J (2006) Immunonutrition: nutritional control of parasites. **Small Rumin Res** 62:79-82.

Lacroux C, Nguyen THC et al. (2006) *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. **Vet Res** 37:607-622

Laurenson YC, Kahn LP, Bishop, SC, Kyriazakis I (2016) Which is the best phenotypic trait for use in a targeted selective treatment strategy for growing lambs in temperate climates? **Vet. Parasitol** 226:174-188.

Li RW, Hou Y, Li C, Gasbarre LC (2010) Localized complement activation in the development of protective immunity against *Ostertagia ostertagi* infections in cattle. **Veterinary Parasitology** 174: 247-256

Li RW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Gasbarre LC (2007) Local inflammation as a possible mechanism of resistance to gastrointestinal nematodes in Angus heifers. **Veterinary Parasitology** 145:100-107.

Lin YS, Zhou H, Forrest RHJ, Frampton CM, Burrows LER, Hickford JGH (2016) Association between variation in faecal egg count for a natural mixed field-challenge of nematode parasites and TLR4 variation. **Veterinary Parasitology** 218:5-9.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-CT method. **Methods** 25:402-408.

Lôbo RNB, Vieira LS, de Oliveira AA, Muniz EN, da Silva JM (2009) Genetic parameters for faecal egg count, packed-cell volume and body-weight in Santa Inês lambs. **Genet Mol Biol** 32:288-294

Louvandini H, Veloso CF, Paludo GR, Dell'Porto A, Gennari SM, McManus CM (2006) Influence of protein supplementation on the resistance and resilience on young hair sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes during rainy and dry seasons. **Veterinary Parasitology** 137:103-111.

Luttmann W, Matthiesen T, Matthys H, Virchow Junior JC (1999) Synergistic effects of interleukin-4 or interleukin-13 and tumor necrosis factor-alpha on eosinophil activation in vitro. **Am J Respir Cell Mol Biol** 20:474-480.

Macdonald A, Araujo MI, Pearce EJ (2002) Immunology of parasitic helminth infection. **Infection and Immunity** 70:427-433.

Mackinnon KM, Bowdridge SA, Kanevsky-Mullarky I, Zajac AM, Notter DR (2015) Gene expression profiles of hair and wool sheep reveal importance of Th2 immune mechanisms for increased resistance to *Haemonchus contortus*. **Journal of Animal Science** 93:2074-2082.

Mackinnon KM, Burton JL, Zajac AM, Notter DR (2009) Microarray analysis reveals difference in gene expression profiles of hair and wool sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Immunology And Immunopathology** 130:210-220.

Mackinnon KM, Zajac AM, Kooyman FNJ, Notter DR (2010) Differences in immune parameters are associated with resistance to *Haemonchus contortus* in Caribbean hair sheep. **Parasite Immunology** 32:484-493.

Macmicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review Of Immunology** 15:323-50.

Madden KB, Whitman L et al. (2002) Role of STAT6 and mast cells in IL-4- and IL-13-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. **J Immunol** 169:4417-4422.

Maizels RM (2005) Infections and allergy – helminths, hygiene and host immune regulation. **Current Opinion In Immunology** 17:656-661.

Martins AC, Bergamasco PLF, Felippelli G, Tebaldi JH, Duarte MMF, Testi AJP, Lopera IM, Hoppe EGL (2017) *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep: fecal egg count reduction tests and randomized controlled trials. **Semina: Ciências Agrárias** 38:231-238.

Mcmanus C, Hermuche P, Paiva SR, Moraes JCF, Melo CB, Mendes C (2013) Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. **Brazilian Journal Of Science And Technology** 1:2-15.

McRae KM, Good B et al. (2014) Response to *Teladorsagia circumcincta* infection in Scottish Blackface lambs with divergent phenotypes for nematode resistance. **Vet Parasitol** 206:200-207.

Meeusen EN, Balic A, Bowles V (2005) Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. **Vet Immunol Immunopathol** 108:121-125.

Menzies M, Reverter A, Andronicos N, Hunt P, Windon R, Ingham A (2010) Nematode challenge induces differential expression of oxidant, antioxidant and mucous genes down the longitudinal axis of the sheep gut. **Parasite Immunology** 32:36-46.

Miller HR, Jackson F, Newlands G, Appleyard WT (1983) Immune exclusion, a mechanism of protection against the ovine nematode *Haemonchus contortus*. **Res Vet Sci** 35:357-363.

Moro K, Yamada T (2010) Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺ Sca-1⁺ lymphoid cells. **Nature** 463:540-544.

Mugambi, JM, Bain RK, Wanyangu SW, Ihiga MA, Duncan JL, Murray M, Stear MJ (1997) Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. **Vet Parasitol** 69:265-273.

Muñoz-Guzmán MA, Cuéllar-Ordaz JA, Valdivia-Anda AG, Buendía-Jiménez JA, Alba-Hurtado F (2006) Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. **Canadian Journal Of Animal Science** 86:363-371.

Muñoz-Guzmán MA, Cuenca-Verde C, Valdivia-Anda G, Cuéllar-Ordaz JA, Alba-Hurtado F (2012) Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology** 185:175-180.

Nakamura Y, Syouji T, Onodera T, Kawashima K, Inumaru S, Yokomizo Y (2002) Effects of recombinant bovine interferon γ on *Strongyloides papillosus* infection in calves. **Journal of Helminthology** 76:59-64.

Neill DR, Wong SH et al. (2010) Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature** 464:1367-1370.

O'Connor LJ, Kahn LP, Walkden-Brown SW (2007) The effects of amount, timing and distribution of simulated rainfall on the development of *Haemonchus contortus* to the infective larval stage. **Veterinary Parasitology** 146:90-101.

O'Neill LA (2006) How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know Curr. **Opin Immunol** 18:3-9.

Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S (2013) Development and maintenance of regulatory T cells. **Immunity** 38:414-423.

Owyang AM, Zaph C et al. (2006) Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. **The Journal Of Experimental Medicine** 203:843-849.

Pan G, French D et al. (2001) Forced expression of murine IL-17E induces growth retardation, jaundice, a Th2- biased response, and multiorgan inflammation in mice. **J Immunol** 167:6559-6567.

Paul WE, Zhu J (2010) How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? **Nat Rev Immunol** 10:225-235.

Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA (2009) Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. **Blood** 113:1526-1534.

Pei C Zhao C et al. (2016) Critical Role for Interleukin-25 in Host Protective Th2 Memory Response against *Heligmosomoides polygyrus bakeri*. **Infection And Immunity** 84:3328-3337.

Pène J, Rousset F, Brière F, Chrétien I, Paliard X, Banchereau J, Spits H, De Vries JE (1998) IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma. **J Immunol** 141:1218-1224.

Pereira JFS, Mendes JB et al. (2016). FAMACHA© scores history of sheep characterized as resistant/resilient or susceptible to *H. contortus* in artificial infection challenge. **Veterinary Parasitology** 218:102-105.

Pernthaner A, Cole SA, Morrison L, Green R, Shaw RJ, Hein WR (2006) Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with the nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. **Vet Immunol Immunopathol** 114:135-148.

Pernthaner A, Cole SA, Morrison L, Hein WR (2005) Increased Expression of Interleukin-5 (IL-5), IL-13, and Tumor Necrosis Factor Alpha Genes in Intestinal Lymph Cells of Sheep Selected for Enhanced Resistance to Nematodes during Infection with *Trichostrongylus colubriformis*. **Infection And Immunity** 73:2175-2183.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research** 29:2003–2007.

Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eisley CJ, Erle DJ, Locksley RM (2010) Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. **Proc Natl Acad Sci USA** 107:11489-11494.

Prussin C, Metcalfe DD (2003) IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J Allergy Clin Immunol** 111:486–494.

Pulendran B (2004) Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. **Immunol Res** 29:187-196.

Rahman WA (1990) The establishment and development of *Haemonchus contortus* in goats. **Veterinary Parasitology** 35:189-193.

Rainbird MA, Macmillan D, Meeusen EN (1998) Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. **Parasite Immunology** 20:93-103.

Rajan TV, Porte P, Yates JA, Keefer L, Shultz LD (1996) Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. **Infection and Immunity** 64:3351-3353.

Reynecke DP, van Wyk JA, Gummow B, Dorny P, Boomker J (2011) Validation of the FAMACHA(c) eye colour chart using sensitivity/ specificity analysis on two South African sheep farms. **Vet Parasitol** 177:203-211

Roberts FHS, O'Sullivan JP (1950) Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research** 1:99-102.

Rocha RA, Amarante AFT, Bricarello PA (2005) Resistance of Santa Inês and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 14:17-20.

Schmitz J, Owyang A et al. (2005) IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity** 23:479-490.

Scott I, Umair S, Savoian MS, Simpson HV (2017) Abomasal dysfunction and cellular and mucin changes during infection of sheep with larval or adult *Teladorsagia circumcincta*. **PLoS ONE** 12:e0186752.

Seenz SA, Siracusa MC et al. (2010) IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T_H2 cytokine responses. **Nature** 464:1362-1366.

Selby LA, Corwin RM e Hayes Junior HM (1980) Risk factors associated with canine heartworm infection. **J Am Vet Med Assoc** 176:33-35.

Shakya KP, Miller JE, Horohov DW (2009) A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. **Veterinary Parasitology** 163:57-66.

Silva BF, Bassetto CC, Amarante AF (2012) Immune responses in sheep naturally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) and gastrointestinal nematodes. **Vet Parasitol** 190:120-126.

Stear MJ, Bishop SC et al. (1995) Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. **Parasite Immunol** 17:643-652.

Strain S, Bishop S, Henderson N, Kerr A, Mackellar Q, Mitchell S, Stear M (2002) The genetic control of IgA against *Teladorsagia circumcincta* and its association with parasite resistance in naturally infected sheep. **Parasitology** 124:545-552.

Suzukawa M, Koketsu R et al. (2008) Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. **Lab Invest** 88:1245-1253.

Terefe G, Lacroux C et al. (2007) Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. **Parasite Immunology** 29:415-424.

Terefe G, Lacroux C et al. (2009) Eosinophils in *Haemonchus contortus*-infected resistant and susceptible breeds of sheep: Abomasal tissue recruitment and in vitro functional state. **Veterinary Parasitology** 165:161-164.

Tizard IR (2009) Helper T Cells and Their Response to Antigen. In: Tizard IR (Ed.) **Veterinary Immunology**. Saunders: Elsevier, p. 137-149.

Toscano JHB, Lopes LG, Giraldeiro LA, Silva MH, Okino CH, Chagas ACS (2018) Identification of appropriate reference genes for local immune-related studies in Morada Nova sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Mol Biol Rep** 45:1253-1262.

Ueno H, Gonçalves PC (1998) **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 143 p.

Urb M, Sheppard DC (2012) The role of mast cells in the defence against pathogens. **PLoS Pathog** 8:e1002619.

Van der Kleij D, Latz E et al. (2002) A novel host–parasite lipid cross-talk Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. **J Biol Chem** 277:48122-48129.

Vanimisetti HB, Andrew SL, Zajac AM, Notter DR (2004) Inheritance of fecal egg count and packed cell volume and their relationship with production traits in sheep infected with *Haemonchus contortus*. **J Anim Sci** 82:1602-1611.

Venturiello SM, Giambartolomei GH, Costantino SN (1993) Immune killing of newborn *Trichinella* larvae by human leukocytes. **Parasite Immunology** 15:559-564.

Veríssimo CJ, Niciura SC et al. (2012) Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology** 187:209-216.

Voehringer D (2013) Protective and pathological roles of mast cells and basophils. **Nat Rev Immunol** 13:362-375.

Waller PJ (1999) International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology** 29:155-164.

Wang W, Yuan C, Wang S, Song X, Xu L, Yan R, Hasson IA, Li X (2014) Transcriptional and proteomic analysis reveal recombinant galectins of *Haemonchus contortus* down-regulated functions of goat PBMC and modulation of several signaling cascades *in vitro*. **Journal Of Proteomics** 98:123-137.

Wang Y, Campbell HD, Young IG (1993) Sex hormones and dexamethasone modulate interleukin-5 gene expression in T lymphocytes. **J Steroid Biochem Mol Biol** 44:203-210.

Winqvist I, Olofsson T, Olsson I, Persson AM, Hallberg T (1982) Altered density, metabolism and surface receptors of eosinophils in eosinophilia. **Immunology** 47:531-539.

Winterrowd CA, Pomroy WE, Sangster NC, Johnson SS, Geary TG (2003) Benzimidazole-resistant β -tubulin alleles in a population of parasitic nematodes (*Cooperia oncophora*) of cattle. **Veterinary Parasitology** 117:161-172.

Wood IB, Amaral NK et al. (1995) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.): Second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology** 58:181-213.

Woolaston RR (1992) Selection of Merino sheep for increased and decreased resistance to *Haemonchus contortus*: peri-parturient effects on faecal egg counts. **Int J Parasitol** 22:947-953.

Woolaston RR, Barger IA, Piper LR (1990) Response to helminth infection of sheep selected for resistance to *Haemonchus contortus*. **Int J Parasitol** 20:1015-1018.

Yasuda K, Muto T et al. (2012) Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences** 109:3451-3456.

Yu F, Bruce LA, Calder AG, Milne E, Coop RL, Jackson F, Horgan GW, MacRae JC (2000) Subclinical infection with the nematode *Trichostrongylus colubriformis* increases gastrointestinal tract leucine metabolism and deduces availability for other tissues. **J Anim Sci** 78:380-390,

Zajac AM, Herd RP, McClure KE (1988) Trichostrongylid parasite populations in pregnant or lactating and unmated Florida Native and Dorset/Rambouillet ewes. **Int J Parasitol** 18:981-985.

Zaragoza-Vera CV, Aguilar-Caballero AJ et al. (2019). Variation in phenotypic resistance to gastrointestinal nematodes in hair sheep in the humid tropics of Mexico. **Parasitology Research** 118:567-573.

Zaros LG, Bricarello PA, Amarante AF, Rocha RA, Kooyman FN, De Vries E, Coutinho LL (2010) Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. **Veterinary Parasitology** 171:68-73.

Zaros, LG, Neves, MRM, Benvenuti, CL, Navarro, AMC, Sider, LH, Coutinho, LL, Vieira, LS (2014) Response of resistant and susceptible Brazilian Somalis crossbreed sheep naturally infected by *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research** 113: 1155-1161.

Zhang R, Liu F, Hunt P, Li C, Zhang L, Ingham A, Li RW (2019) Transcriptome analysis unraveled potential mechanisms of resistance to *Haemonchus contortus* infection in Merino sheep populations bred for parasite resistance. **Veterinary Research** 50:7-19.

Zhao A, Urban Junior JF et al. (2010) Critical role of IL-25 in nematode infection-induced alterations in intestinal function. **The Journal of Immunology** 85:6921-6929.