



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**TATIANE SANTANA SALES**

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DA RESPOSTA  
IMUNOLÓGICA EM CAPRINOS CO-INFECTADOS COM  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus  
contortus*.**

SALVADOR – BAHIA

2016

**TATIANE SANTANA SALES**

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DA RESPOSTA  
IMUNOLÓGICA EM CAPRINOS CO-INFECTADOS COM  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus  
contortus*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer  
Nascimento  
Co-orientadora: Prof. Dra. Vera Lúcia Costa  
Vale

SALVADOR – BAHIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Departamento de Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde  
Sistema de Bibliotecas da UFBA

S163 Sales, Tatiane Santana

Avaliação de Aspectos da Resposta Imunológica em Caprinos Co-  
infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus*  
*contortus*. / Tatiane Santana Sales. -- Salvador, 2016.

113 f. : il

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento.

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Vera Lúcia Costa Vale. Tese (Doutorado -  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia) -- Universidade Federal da  
Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2016.

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2. *Haemonchus contortus*.  
3. Co-infecção. 4. Resposta Imune. 5. Caprinos. I. Meyer Nascimento,  
Prof. Dr. Roberto José. II. Costa Vale, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Vera Lúcia. III. Título

CDU: 616.428-002:636.39

**TATIANE SANTANA SALES**

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAPRINOS  
CO-INFECTADOS COM *Corynebacterium pseudotuberculosis* E *Haemonchus  
contortus*.**

**Tese para obtenção do Título de Doutora em Imunologia.**

**Salvador, 13 de junho de 2016.**

---

Profa. Dra. Leane Souza Queiroz Gondim

---

Profa. Dra. Sílvia Lima Costa

---

Profa. Dra. Soraya Castro Trindade

---

Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

---

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento  
Instituto de Ciências da Saúde – UFBA  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Albis e Dinalva, por todo amor e apoio incondicionais.

Ao meu marido Raildo, por todo apoio, companheirismo, amor e estímulo para a realização desta conquista.

A minha irmã Taisa por todo carinho e apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Meyer pelo incentivo, apoio, confiança e liberdade para realização desse trabalho.

A minha co-orientadora profa. Vera Vale pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos meus amigos Thaís Brito, Marcos Costa, Heidiane Alves, Andréia Pacheco, Aloísio Bittencourt, Alessandro Bittencourt e Danielle Dantas, por apoiarem na execução dos experimentos, bem como, pelo ótimo convívio e união.

A Francisca Soares (Dona Chica) todo apoio e ajuda na realização do experimento.

As professoras Soraya Trindade e Heloísa Silva por sempre me ajudarem na resolução de problemas e dúvidas.

Ao Prof. Tiago Peixoto, pela ajuda prestada para que concretização de parte dos experimentos.

A toda equipe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências e Saúde, pelo convívio, apoio e momentos alegres compartilhados.

Ao apoio financeiro da Fapex e Fapesb.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

*“Aos outros eu dou o direito de ser como  
são, a mim, dou o dever de ser cada dia  
melhor...”*

*- Chico Xavier*

SALES, T.S. **Avaliação de aspectos da resposta imunológica em caprinos co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus***. Salvador, Bahia, 113f. Il. 2016. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

## RESUMO

Na caprino-ovincultura do nordeste brasileiro observa-se alta prevalência da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* que resulta na Linfadenite Caseosa, gerando prejuízos econômicos significativos. O nematódeo gastrointestinal *Haemonchus contortus* também infecta os pequenos ruminantes, resultando em prejuízos econômicos e produtivos. Dessa forma, é importante a compreensão da interferência da infecção pelo *H. contortus* na possível modulação imune contra *C. pseudotuberculosis* em caprinos. Uma vez que a infecção por *C. pseudotuberculosis* desenvolve uma resposta Th1 predominante e que o *H. contortus*, induz uma expressiva estimulação Th2. O presente estudo avaliou a indução de resposta imune humoral e celular contra o *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos co-infectados pelo nematódeo *Haemonchus contortus*. Assim, nos diferentes grupos experimentais, caprinos foram inoculados ou não com  $10^7$  UFC de uma linhagem de alta virulência (C57) de *C. pseudotuberculosis*, por via subcutânea, e com aproximadamente 10.000 larvas infectante L3 de *H. contortus* por via oral. Foram acompanhados por um período de oito meses até serem necropsiados. Utilizou-se o teste ELISA e *western blotting* para o acompanhamento da cinética da resposta e da reatividade específica por anticorpos da classe IgG e a dosagem de IFN- $\gamma$  para avaliação da reatividade *in vitro*, em culturas de sangue periférico estimuladas com antígenos destes dois patógenos. A técnica parasitológica de OPG e a morfométrica das células inflamatórias na mucosa abomasal foram realizadas para avaliação *in loco* da infecção pelo nematódeo. Os resultados evidenciaram expressivos níveis de anticorpos e uma reduzida produção da citocina IFN- $\gamma$  contra o *C. pseudotuberculosis* nos animais co-infectados, que manifestaram lesões nos linfonodos internos e em algumas vísceras e alta carga parasitária. Ainda nos animais co-infectados observou-se níveis menos expressivos de IgG anti-*H. contortus*. Quanto ao reconhecimento antigênico através do *western blotting*, identificou-se oito proteínas de *C. pseudotuberculosis* e cinco proteínas do helminto. A ocorrência da resposta imune inata foi observada através da análise morfométrica da mucosa abomasal, onde foram identificados os linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e macrófagos em todos os grupos; e uma população de mastócitos expressiva nos grupos infectados com este verme. Com os resultados obtidos conclui-se que as respostas imunes inata e adaptativa contra o *H. contortus* implicam numa significativa estimulação de mecanismos Th2. Os resultados também sugerem que tal estimulação module negativamente a resposta Th1 contra o *C. pseudotuberculosis*, entretanto, torna-se necessário novos estudos para a melhor compreensão desta modulação.

Palavras chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemonchus contortus*, co-infecção, resposta imune, caprinos.

SALES, T.S. **Evaluation of aspects of the immune response in co-infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and goats *Haemonchus contortus*.** Salvador, Bahia, 113f. Il. 2016. Thesis (Doctor in Immunology) – Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, 2016.

## ABSTRACT

In goat and sheep breeding in northeastern Brazil, observed a high prevalence of infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* resulting in caseous lymphadenitis, causing significant economic losses. Gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* also infect small ruminants, resulting in economic and production losses. Thus, it is important to understand the interference of infection with *H. contortus* in possible immune modulation against *C. pseudotuberculosis* in goats. Once infection with *C. pseudotuberculosis* develops a predominantly Th1 response and *H. contortus*, induces a significant stimulation of Th2. This study evaluated the induction of humoral and cellular immune response against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in co-infected goats by *Haemonchus contortus*. Thus, the different experimental groups, goats were inoculated with or without  $10^7$  CFU of a highly virulent strain (C57) of *C. pseudotuberculosis*, subcutaneously, and approximately 10.000 infective larvae L3 *H. contortus* orally. They were followed by a period of eight months before being necropsied. We used ELISA and *Western blotting* for monitoring the response kinetics and specific reactivity of antibodies of the IgG and IFN- $\gamma$  dosage for evaluation of in vitro reactivity in peripheral blood cultures stimulated with antigens of these two pathogens. The parasitological technique OPG and morphometric of inflammatory cells in the abomasal mucosa were performed to on-site evaluation of nematode infection. The results showed significant levels of antibodies and a reduced production of IFN- $\gamma$  cytokine against *C. pseudotuberculosis* in co-infected animals, which showed lesions in lymph nodes and internal in some viscera and high parasite load. Also in co-infected animals there was less significant levels of IgG anti-*H. contortus*. As for the antigen recognition by *western blotting*, it identified eight proteins of *C. pseudotuberculosis* and five proteins helminth. The occurrence of the innate immune response was observed using the morphometric analysis of the abomasal mucosa were identified where lymphocytes, eosinophils, plasma cells and macrophages in all groups; and a population of mast cells in significant with this worm groups infected. With the results obtained it is concluded that the innate and adaptive immune responses against *H. contortus* imply a significant stimulation of Th2 mechanisms. The results also suggest that such stimulation negatively modulates the Th1 response against *C. pseudotuberculosis*, however, it is necessary to further studies to better understand this negative regulation.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemonchus contortus*, co-infection, immune response, goats.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**APC**- Células apresentadoras de antígeno

**BSA**- Albumina sérica bovina

**Células NK**- Células *Natural Killer*

**CLA**- Linfadenite Caseosa

**DPI** – Dias pós-infecção

**ELISA** - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked-Immunosorbent Assay*)

**H&E**- Hematoxilina e Eosina

**IFN- $\gamma$**  - Interferon gama

**IL- 2** - Interleucina 2

**IL- 4**- Interleucina 4

**IL- 5** - Interleucina 5

**IL- 6** - Interleucina 6

**IL- 10** - Interleucina 10

**kDa** - kilo Dalton (1000 daltons)

**NO** - Óxido nítrico

**OPG**- Contagem de ovos por grama de fezes

**PBS-T** - Tampão fosfato com salina e Tween 20 (detergente)

**PCR**- Reação em cadeia da polimerase

**PLD**- Fosfolipase D

**PM**- Peso molecular

**PWM** - *Pokweed*

**SRD** - sem raça definida

**TPP**- Separação de Proteínas em Três Fases

**T CD4** - Linfócito ou célula T CD4<sup>+</sup>

**T CD8** - Linfócito ou célula T CD8<sup>+</sup>

**TH1** - Linfócito de perfil helper de tipo 1

**TH2** – Linfócito de perfil helper de tipo 2

**TNF-  $\alpha$**  - “Tumor Necrosis Factor alpha” = Fator de Necrose Tumoral alfa

## LISTA DE FIGURAS

Manuscrito 1	Página
<b>Figura 1-</b> Cinética da produção de IgG total específica anti- <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em caprinos ao longo de 210 dias de observação. Grupo GI: controle negativo; grupo GII (Cp+); grupo GIII (Hc+); grupo GIV (Cp <sub>T0</sub> +Hc <sub>T0</sub> ) e grupo GV (Cp <sub>T0</sub> +Hc <sub>T90</sub> ). ELISA Indireto sensibilizado com antígenos secretados em BHI. Asteriscos indicam significância (p<0,05).	46
<b>Figura 2-</b> Cinética da produção de IgG total específica anti- <i>Haemonchus contortus</i> em caprinos ao longo de 210 dias de observação. Grupo GI: controle negativo; grupo GII (Cp+); grupo GIII (Hc+); grupo GIV (Cp <sub>T0</sub> +Hc <sub>T0</sub> ) e grupo GV (Cp <sub>T0</sub> +Hc <sub>T90</sub> ). ELISA Indireto sensibilizado com lisado de <i>H. contortus</i> . Asteriscos indicam significância (p<0,05).	47
<b>Figura 3-</b> Cinética da produção <i>in vitro</i> de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) por células do sangue periférico após estímulo com 40 $\mu$ g de antígenos secretado/excretado de <i>C. pseudotuberculosis</i> pela técnica de TPP ao longo de 210 dias de observação. Grupo GI: controle negativo; grupo GII (Cp+); grupo GIII (Hc+); grupo GIV (Cp <sub>T0</sub> +Hc <sub>T0</sub> ) e grupo GV (Cp <sub>T0</sub> +Hc <sub>T90</sub> ). Asteriscos indicam significância (p<0,05).	48
<b>Figura 4-</b> Cinética da produção <i>in vitro</i> de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) por células do sangue periférico após estímulo com 50ug dos antígenos somáticos do <i>H. contortus</i> ao longo de 210 dias de observação. Grupo GI: controle negativo; grupo GII (Cp+); grupo GIII (Hc+); grupo GIV (Cp <sub>T0</sub> +Hc <sub>T0</sub> ) e grupo GV (Cp <sub>T0</sub> +Hc <sub>T90</sub> ). Asteriscos indicam significância (p<0,05).	49
<b>Figura 5-</b> Correlação da cinética da produção de IgG total específica anti- <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (Ctp) e anti- <i>Haemonchus contortus</i> (Hct) ao longo de 210 dias de observação, nos grupos G2 (n=6) controle positivo de <i>C. pseudotuberculosis</i> e G5 (n=6) de co-infecção com <i>C. pseudotuberculosis</i> (T <sub>0</sub> ) e <i>H. contortus</i> (T <sub>90</sub> ). Com significância estatística em todos os pontos de coleta (p<0,05).	50
<b>Figura 6-</b> Correlação da cinética da produção <i>in vitro</i> de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) para <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (Ctp) e <i>Haemonchus contortus</i> (Hct) ao longo de 210 dias de observação, nos grupos G2 (n=6) controle positivo de <i>C. pseudotuberculosis</i> e grupo G4 (n=6) de co-infecção com <i>C. pseudotuberculosis</i> (T <sub>0</sub> ) e <i>H. contortus</i> (T <sub>0</sub> ). Com significância estatística em todos os pontos de coleta (p<0,05).	50

- Figura 7-** Correlação da cinética da produção *in vitro* de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e de IgG total específica anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* (Ctp) ao longo de 210 dias do grupo G5 (n=6) de co-infecção com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>90</sub>). Com significância estatística em todos os pontos de coleta (p<0,05). 51
- Figura 8-** Representação esquemática dos resultados do *western blotting* para o reconhecimento antigênico de proteínas secretadas/excretadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no *pool* de soros dos animais dos grupos experimentais, ao longo dos 210 dias. 52
- Figura 9-** Representação esquemática dos resultados do *western blotting* para o reconhecimento antigênico de proteínas somáticas de *Haemonchus contortus* no *pool* de soros dos animais dos grupos experimentais, ao longo dos 210 dias. 53
- Figura 10-** Correlação da cinética da produção de IgG total específica anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* (Ctp) e os valores do OPG ao longo de 210 dias de observação no grupo G4 (n=6) de co-infecção com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>0</sub>). Com significância estatística em todos os pontos de coleta (p<0,05). 55
- Figura 11-** Correlação da cinética da produção de IgG total específica anti-*Haemonchus contortus* (Hct) e os valores do OPG ao longo de 210 dias de observação, nos grupos G4 (n=6) de co-infecção com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>0</sub>) e G5 (n=6) com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>90</sub>). Com significância estatística em todos os pontos de coleta (p<0,05). 56

## LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1	Página
<b>Tabela 1-</b> Sumário de reconhecimento antigênico de proteínas secretadas/excretadas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> nos grupos de caprinos experimentalmente infectados.	52
<b>Tabela 2-</b> Sumário de reconhecimento antigênico de proteínas somáticas de <i>Haemonchus contortus</i> nos grupos de caprinos experimentalmente infectados.	54
<b>Tabela 3-</b> Média e desvio padrão dos valores de OPG nos animais dos grupos experimentais ao longo de 210 dias de infecção pelo nematódeo <i>Haemonchus contortus</i>	54
<b>Tabela 4-</b> Registros de lesões externas e internas características de Linfadenite Caseosa com isolamento e identificação microbiológica positiva para <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	56

## LISTA DE FIGURAS

Manuscrito 2	Página
<b>Figura 1-</b> Contagem da população de eosinófilos na mucosa abomasal dos caprinos abatidos no ponto 210 dias do experimento. Grupo G1 (n=4): Controle negativo; Grupo G2 (n=6): Infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> ; Grupo G3 (n=6): Infectados com <i>H. contortus</i> ; Grupo G4 (n=6): Co-infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>H. contortus</i> (T <sub>0</sub> ) e Grupo G5 (n=6): Co-infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> (T <sub>0</sub> ) e <i>H. contortus</i> (T <sub>90</sub> ). Há significância estatística (p<0,05).	83
<b>Figura 2-</b> Contagem da população de mastócitos na mucosa abomasal dos caprinos abatidos no ponto 210 dias do experimento. Grupo G1 (n=4): Controle negativo; Grupo G 2 (n=6): Infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> ; Grupo G 3 (n=6): Infectados com <i>H. contortus</i> ; Grupo G 4 (n=6): Co-infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>H. contortus</i> (T <sub>0</sub> ) e Grupo G 5 (n=6): Co-infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> (T <sub>0</sub> ) e <i>H. contortus</i> (T <sub>90</sub> ). Há significância estatística (p<0,05).	84
<b>Figura 3-</b> Contagem da população de plasmócitos na mucosa abomasal dos caprinos abatidos no ponto 210 dias do experimento. Grupo G 3 (n=6): Infectados com <i>H. contortus</i> e Grupo G 4 (n=6): Co-infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>H. contortus</i> (T <sub>0</sub> ). Há significância estatística (p<0,05).	85
<b>Figura 4-</b> Contagem da população de neutrófilos na mucosa abomasal dos caprinos abatidos no ponto 210 dias do experimento. Grupo G1 (n=4): Controle negativo; Grupo G 2 (n=6): Infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> ; Grupo G 3 (n=6): Infectados com <i>H. contortus</i> ; Grupo G 4 (n=6): Co-infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>H. contortus</i> (T <sub>0</sub> ) e Grupo G 5 (n=6): Co-infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> (T <sub>0</sub> ) e <i>H. contortus</i> (T <sub>90</sub> ). Há significância estatística (p<0,05).	86

## LISTA DE TABELAS

Manuscrito 2	Página
<b>Tabela 1-</b> Média e desvio padrão dos valores de OPG nos animais dos grupos experimentais ao longo de 210 dias de infecção pelo nematódeo <i>Haemonchus contortus</i> .	81
<b>Tabela 2-</b> Identificação e contagem dos parasitas adultos na mucosa abomasal dos caprinos nos grupos experimentais.	82
<b>Tabela 3-</b> Média e desvio padrão da morfometria de células inflamatórias na mucosa abomasal dos caprinos após o desafio com o nematódeo <i>Haemonchus contortus</i>	82

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	20
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
2.1. Prevalência e Importância Econômica da Linfadenite Caseosa e da Hemoncose.....	22
2.2. Aspectos Etiológicos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e do <i>Haemonchus contortus</i> .....	23
2.3. Mecanismos de Transmissão do <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>H. contortus</i> .....	25
2.4. Patogenia da Infecção por <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>H. contortus</i> .....	26
2.5. Resposta Imune Contra <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>H. contortus</i> .....	27
2.6. Diagnóstico Laboratorial da Infecção por <i>C. pseudotuberculosis</i> e o <i>H. contortus</i> .....	29
2.7. Resposta Imune Moduladora da Infecção por <i>C. pseudotuberculosis</i> e Co-infecção com <i>H. contortus</i> .....	31
<b>3. HIPOTESE</b> .....	32
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>5. MANUSCRITO 1 – Avaliação da Resposta Imune Caprina a Co-Infecção Experimental com <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e <i>Haemonchus contortus</i></b> .....	34
<b>5.1. INTRODUÇÃO</b> .....	35
<b>5.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
5.2.1 Comitê de Ética.....	36
5.2.2 Animais.....	36
5.2.2.1 Grupos Experimentais.....	37
5.2.3. Linhagem Bacteriana do <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e seus Antígenos .....	38
5.2.4. O Nematódeo <i>Haemonchus contortus</i> e seus Antígenos.....	39
5.2.4.1. Obtenção das Larvas Infectantes (L3) do <i>Haemonchus contortus</i> .....	39
5.2.4.2. Obtenção dos Antígenos do Nematódeo <i>Haemonchus contortus</i> .....	39
5.2.5. Inoculação do <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e <i>Haemonchus contortus</i> nos Caprinos.....	40



5.2.6. Acompanhamento Imunológico .....	40
5.2.6.1. Determinação dos Níveis de Produção de IgG Específica para <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	40
5.2.6.2 Determinação dos Níveis de Produção de IgG Específica para <i>Haemonchus contortus</i> .....	41
5.2.6.3 Avaliação da Produção de Interferon-gama para <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	41
5.2.6.4 Avaliação da Produção de Interferon-gama para o <i>Haemonchus contortus</i> .....	42
5.2.7 Reconhecimento Antigênico da Bactéria e do Nematódeo.....	42
5.2.7.1 Reconhecimento Antigênico do <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> pelo western blotting.....	42
5.2.7.2 Reconhecimento Antigênico do <i>Haemonchus contortus</i> pelo Western blotting.....	43
5.2.8 Exames Parasitológicos dos Caprinos.....	43
5.2.8.1 Técnica de Contagem de Ovos por Grama de Fezes (OPG).....	44
5.2.9 Identificação da Bactéria nas Lesões dos Linfonodos Internos e Externos dos Animais.....	44
5.2.10 Análise Estatística.....	44
<b>5.3 RESULTADOS</b> .....	45
5.3.1 ELISA Indireto para a Produção de IgG anti- <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	45
5.3.2 ELISA indireto para a Produção de IgG anti- <i>Haemonchus contortus</i> .....	46
5.3.3 Produção <i>in vitro</i> de Interferon-gama em Cultura de Sangue Total Estimulada por Antígenos Secretado/excretado de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	47
5.3.4 Produção <i>in vitro</i> de Interferon-gama em Cultura de Sangue Total Estimulada por Antígenos Somáticos do <i>Haemonchus contortus</i> .....	48
5.3.5 Correlação da Produção de IgG anti- <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e <i>Haemonchus contortus</i> e a Produção <i>in vitro</i> de IFN- $\gamma$ em Cultura de Sangue Total Estimulada por Antígenos Secretados/excretados de <i>C. pseudotuberculosis</i> e Antígeno Somático de <i>H. contortus</i> .....	49

5.3.6 Reconhecimento antigênico de proteínas secretadas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> através do western blotting.....	51
5.3.7 Reconhecimento Antigênico de Proteínas Somáticas de <i>Haemonchus contortus</i> através de Western blotting.....	53
5.3.8 Técnica de Contagem de Ovos por Grama de Fezes (OPG).....	54
5.3.9 Correlação da Produção de IgG Total Específica contra Antígenos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e <i>Haemonchus contortus</i> e o Teste de OPG.....	55
5.3.10 Identificação da Bactéria nas Lesões Presentes nos Linfonodos e Órgãos dos Caprinos dos Grupos Experimentais.....	56
<b>5.4 DISCUSSÃO</b> .....	57
5.4.1 Modelo da Infecção Experimental do <i>C. pseudotuberculosis</i> e Co-infecção com o <i>Haemonchus contortus</i> .....	57
5.4.2 Correlação entre os Parâmetros de Avaliação da Infecção Experimental pelo <i>C. pseudotuberculosis</i> e Co-infecção com o <i>Haemonchus contortus</i> .....	61
<b>5.5. CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>5.6. REFERENCIAS</b> .....	66
<b>6. MANUSCRITO 2 - Hemoncose em Caprinos: Efeitos da Co-infecção Experimental por <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> na Resposta do Hospedeiro</b> .....	74
<b>6.1 INTRODUÇÃO</b> .....	75
<b>6.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	76
6.2.1 Comitê de Ética.....	76
6.2.2 Animais.....	76
6.2.2.1 Grupos Experimentais.....	77
6.2.3. Linhagem Selvagem do <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	78
6.2.4 O Nematódeo <i>Haemonchus contortus</i> e seus Antígenos.....	78
6.2.4.1 Obtenção das Larvas Infectantes (L3) do <i>Haemonchus contortus</i> .....	78
6.2.5 Protocolo de Inoculação do <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>H. contortus</i> .....	79
6.2.6 Exames Parasitológicos dos Caprinos .....	79
6.2.6.1 Técnica de Contagem de Ovos por Grama de Fezes (OPG) .....	79
6.2.7 Necropsia dos Caprinos .....	79
6.2.8 Identificação e Contagem dos Parasitos no Abomaso .....	80
6.2.9 Histopatológico dos Cortes do Tecido Abomasal .....	80
6.2.10 Morfometria Celular da Mucosa Abomasal .....	80

6.2.11 Análise Estatística.....	80
<b>6.3 RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
6.3.1 Técnica de Contagem de Ovos por Grama de Fezes (OPG).....	81
6.3.2 Contagem dos Parasitos <i>Haemonchus contortus</i> na Mucosa Abomasal dos Caprinos.....	81
6.3.3 Análises Morfométricas da Mucosa Abomasal dos Caprinos.....	82
<b>6.4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>6.5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>6.6. REFERENCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>7. PERSPECTIVA FUTURA.....</b>	<b>96</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>
<b>9. APÊNDICE – Participação em Publicações durante o Doutorado.....</b>	<b>113</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A caprinocultura é considerada uma importante atividade econômica no país, com destaque para a região Nordeste, detentora de 90,6% do rebanho nacional, concentrando nas zonas árida e semi-árida. É uma importante fonte de renda para pequenos produtores dessa região, que obtêm através da venda da carne, leite e pele a garantia para sua sobrevivência (ANCO, 2010).

O rebanho mundial de caprinos em 2014 era de 1.006.785.725 bilhões de cabeças, e o rebanho de ovinos alcançou a marca de 1,2 bilhões. De acordo com o *ranking* mundial o Brasil possui o 22º maior rebanho caprino e, a 18º posição referente ao rebanho ovino. Os países que lideram o *ranking* são China, Índia, Austrália, Irã e Nigéria (FAO, 2015).

No Brasil, entre os estados detentores dos maiores rebanhos de ovinos, estão Bahia, Ceará, Piauí e Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul. E na caprinocultura os estados de maior representatividade são a Bahia, com 33,34%; Pernambuco, com 19,72% e Piauí, com 16,73% (IBGE, 2011). O rebanho nordestino de caprinos é de 8,3 milhões de cabeças, representando 90,6% do rebanho nacional, concentrando nas zonas árida e semi-árida (ANCO, 2010).

Na região Nordeste a Linfadenite Caseosa apresenta elevada frequência, e estima-se que grande parte dos rebanhos possuam animais infectados, e que 30% destes apresentem a prevalência clínica da doença (COSTA FILHO et. al., 1974). Um estudo conduzido por Meyer (2004), no semi-árido baiano, obteve uma prevalência média de 46,66% da enfermidade, resultando em perdas significativas na produtividade dos caprinos e ovinos. Além dessa enfermidade, a alta patogenicidade dos nematódeos, em particular a do *Haemonchus contortus*, nos pequenos ruminantes, também reflete significativamente no desempenho geral do rebanho.

Sendo assim, é fundamental que se conheça os mecanismos imunológicos dos agentes, a fim de que se possa compreender a interferência do parasita na patogênese da bactéria em caprinos pelo parasito. Sabe-se que a resposta imunológica dos animais frente à infecção por um agente se divide, em uma resposta predominantemente do tipo Th1 na infecção pelo *C. pseudotuberculosis* nos ruminantes, enquanto a infecção pelo nematódeo promove um desvio para a

subpopulação Th2 (SACCO et al., 2002). Um estudo realizado por Bentwich *et al.*, (1999), observou que a elevada ocorrência de indivíduos com tuberculose na África, enfermidade causada pela infecção com *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria filogeneticamente semelhante ao *C. pseudotuberculosis*, deve-se a alta frequência de co-infecção por helmintos nestes indivíduos, resultando em um desvio da resposta imune para o perfil Th2. E dessa maneira sugerindo que esta infecção pode ser um importante fator, para a manifestação mais precoce do quadro clínico da tuberculose.

Sendo assim, é de suma importância à compreensão da interferência do helminto *H. contortus* na modulação imune protetora contra *C. pseudotuberculosis* em caprinos. Uma vez, que ambos os agentes apresentam uma elevada prevalência nas criações de pequenos ruminantes na região Nordeste.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Prevalência e importância econômica da Linfadenite Caseosa e da Hemoncose

Em criações de ovinos e caprinos, as infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* determinam a Linfadenite Caseosa (LC), reconhecida como uma doença infecto-contagiosa de caráter crônica e de importância mundial. Encontra-se entre as principais doenças infecciosas em países com tradição na criação de ovinos e caprinos, incluindo Nova Zelândia, Espanha, França, Austrália, Suíça e Holanda (BINNS et al., 2002; BELCHIOR et al., 2006; BAIRD e FONTAINE, 2007).

A ocorrência da enfermidade nos EUA, Noruega, Espanha e Canadá encontra-se, respectivamente, ao redor de 70%, 61%, 25% e 62% dos animais (CUBERO et al., 2002; BAIRD, 2006; BELCHIOR et al., 2006; FONTAINE et al., 2006). Em criações de caprinos da Coreia foram identificado 57,3% dos animais soropositivos, enquanto que na Nigéria, a infecção pela bactéria nas cabras representou 0,3% das mastites clínicas (YERUHAM et al., 1996; JUNG et al., 2015).

No Brasil a LC tem uma elevada frequência nas criações caprinas e ovinas do Nordeste. Estima-se que grande parte dos animais dos rebanhos encontra-se infectados, e que a prevalência clínica abranja até 30% destes (COSTA FILHO, 1974). Na Bahia, na região do semi-árido, um dos registros de prevalência realizado obteve um percentual médio de 46,66% (MEYER et al, 2004).

Na indústria de caprinos e ovinos a ocorrência da Linfadenite Caseosa resulta em um prejuízo econômico considerável em decorrência de perdas produtivas. Tais como: a redução na produção de carne e leite, retardo no desenvolvimento dos animais, descarte precoce, deficiências nos índices reprodutivos, condenação de carcaças, depreciação do couro e da lã e morte ocasional de animais (LYOUD, et al., 1990; RIBEIRO, et al., 2001; ARSENAULT et al., 2003; VALE, et al., 2003).

Além da ocorrência da Linfadenite Caseosa nas criações de pequenos ruminantes, observa-se também a alta prevalência dos nematódeos gastrointestinais, em particular o *Haemonchus contortus*, que reflete negativamente no desempenho geral dos rebanhos.

Este parasita é reconhecido como um dos principais entraves na produção de pequenos ruminantes, levando a perdas econômicas significativas. E pode ser encontrado em todo o mundo, embora as infecções sejam mais frequentes e intensas em áreas com climas quentes e úmidos (ALLONBY e URQUHART, 1975).

A elevada ocorrência do *H. contortus*, em criações de caprinos e ovinos no mundo, é observada em países como Paquistão (QAMAR, et al. 2009), África Ocidental (ASANJI, 1988), México (GARDUÑO et al., 2011), Argentina (SUAREZ et al., 2013), Kenya (GATONGI et al., 1998) e nos Estados Unidos da América (HOWELL, et al., 2008).

No Brasil a alta prevalência do parasita nas criações de pequenos ruminantes é observada nos estados do Ceará (81,9%), Bahia (46,66%), Pernambuco (50%), Santa Catarina (61,3%), Rio Grande do Norte (16,9%) e Maranhão (35,41%) (RIET-CORRÊA et al., 2004; ALENCAR et al. 2010; SILVA et al., 2003; BELLATO et al., 2004; MEYER et al, 2004; AHID et al., 2008; BRITO et al., 2009).

No nordeste brasileiro, a região semi-árida é onde se observa a maior frequência do *H. contortus*, devido à grande concentração destes pequenos ruminantes e a falta de orientação técnica adequada aos criadores de caprinos e ovinos, quanto à sanidade de seu rebanho. Resultando em altas taxas de mortalidade, além do comprometimento no desempenho produtivo, que são decorrentes do atraso no crescimento, da queda na produção leiteira e da baixa fertilidade do rebanho (MACRAE, 1993).

## **2.2. Aspectos etiológicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e do *Haemonchus contortus***

O gênero *Corynebacterium* pertence à família *Actinomycetae*, assim como os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. O agente microbiano *Corynebacterium pseudotuberculosis* é um cocobacilo, Gram-positivo, curto e irregular (0,5 a 0,6 µm por 1 a 3 µm), pleomórfico, intracelular facultativo, imóvel, não esporulado, sem cápsula, anaeróbio facultativo, fermenta carboidratos sem produção de gás, podendo apresentar aspecto cocóide, e se mostrar isolado ou formando grupamentos irregulares ou em paliçada (TAKAHASHI et al., 1997; PATON et al., 2003; DORELLA et al., 2006; VALDIVIA et al., 2013). A temperatura ideal de

crescimento é 37°C por 48 horas em uma atmosfera de 5% de gás carbônico (MCKEAN et al., 2007a).

Em relação ao aspecto nutricional a bactéria é altamente exigente, de crescimento lento em meios enriquecidos como ágar sangue, ágar BHI e caldo BHI. Nestes meios, produzem colônias pequenas de coloração amarelo-esbranquiçadas, opacas, em período de 48 horas, rodeadas por halo de beta-hemólise (MOURA COSTA, 2002). Através das provas bioquímicas, *C. pseudotuberculosis* apresenta catalase e urease positivas, oxidase negativa, redução de nitrato a nitrito e fermentam carboidratos, sem produção de gás como maltose, manose, glicose e galactose (QUINN et al., 1994).

*Haemonchus contortus* é um nematóide que pertence ao Filo Nematelminthes, Classe Nematoda, Ordem Strongylida, Superfamília Trichostrongyloidea, Família Trichostrongylidae, Gênero *Haemonchus* (VIEIRA et al., 1989). Este gênero apresentam treze espécies, a exemplo de *H. placei*, *H. similis*, *H. longistipes*, *H. mitchelli*, *H. lagwrencei*, sendo *Haemonchus contortus* mais comum em criações de caprinos e ovinos em várias partes do mundo. Este parasita ocorre nas áreas de verão chuvoso, particularmente em região tropicais e subtropicais, a exemplo do Brasil (BATH e VAN WYK, 2001; LOPES et al., 2013).

Macroscopicamente, os parasitas adultos podem ser identificados devido a sua localização específica na região fúndica do abomaso e seu tamanho, pode variar nos machos de 10 a 20 mm e nas fêmeas de 18 a 30 mm (UENO; GONÇALVES, 1994; CLIMENI et al., 2008). Morfologicamente, ambos os sexos, possuem lanceta bucal e há presença de papilas cervicais na região anterior do nematóide. Os machos apresentam bolsa copulatória com um lobo dorsal assimétrico e espículos em ganchos. As fêmeas possuem ovários brancos que se enrolam em espiral ao redor do intestino repleto de sangue (LICHTENFELS, et al., 1994). No ambiente os ovos das fêmeas são liberados junto com as fezes dos animais nas pastagens, onde ocorre o desenvolvimento das larvas infectantes (L3) durante aproximadamente sete dias, contaminando as pastagens (FORTES, 2004).



### 2.3. Mecanismos de transmissão do *C. pseudotuberculosis* e *H. contortus*

Corrêa e Corrêa (1992) e Pepin *et al.*, 1997, descreveram que a transmissão do *Corynebacterium pseudotuberculosis* pode ocorrer, mediante o contato de um animal sadio com animais doentes com granulomas superficiais abscedados, bem como de elementos do ambiente contaminados, incluindo comedouros, bebedouros, equipamentos, instalações, solo, vegetação ou das fezes de animais infectados. Pode ainda ocorrer através de aerossóis de animais com infecções pulmonares e aleitamento por fêmeas infectadas. O microrganismo pode alojar-se na superfície dos objetos e infectar os animais, quando em contato com a pele com lesões.

A infecção por *C. pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos é responsável por causar a Linfadenite Caseosa, mas o microrganismo pode acometer esporadicamente outras espécies, como bovinos, equinos, búfalos, ruminantes silvestres, primatas, suínos, camelos e cervos (BROWN *et al.*, 1987; AL-RAWASHDEH e AL-QUDOH, 2000; HAWARI, 2008; GUEDES *et al.*, 2015). A infecção humana pode ocorrer ocasionalmente, e é caracterizada como uma zoonose ocupacional de profissionais ligados à criação de caprinos e ovinos (PEEL *et al.*, 1997; BASTOS, *et al.*, 2012).

Em relação, a via de transmissão do nematóide *Haemonchus contortus*, este apresenta um ciclo evolutivo direto, composto por duas fases: uma de desenvolvimento no hospedeiro, denominado fase parasitária e outra no ambiente, denominado de vida livre. Esta última inicia-se com a liberação pelas fêmeas dos ovos, que se encontram na fase de mórula, através das fezes dos animais infectados nas pastagens, em condições ideais, onde a temperatura varia entre 18 a 26°C e a umidade entre 80 a 100%. Após as sucessivas divisões celulares, ocorre à formação das larvas e eclosão, com subseqüentes mudas, que são os desenvolvimentos das larvas de primeiro (L1) e de segundo (L2) estádios, até as larvas infectantes (L3). Este processo dura de cinco a quatorze dias, infectando então seus hospedeiros de forma passiva por via oral (URQUHART *et al.*, 1998; ONYAH e ARSLAN, 2005). O ciclo parasitário inicia-se através da ingestão das larvas infectantes (L3) junto com a pastagem pelo hospedeiro, evoluindo no tubo digestivo para larva L4 hematófaga (pré-adulto). Os adultos encontram-se presentes na mucosa da região fúndica do abomaso de caprinos e ovinos, movendo-se

livremente na superfície da mucosa. O período pré-patente é de aproximadamente 21 dias (RAHMAN e COLLINS, 1990; CLIMENI et al., 2008).

#### **2.4. Patogenia da infecção por *C. pseudotuberculosis* e *H. contortus***

A patogenia de *C. pseudotuberculosis* ainda não se apresenta completamente esclarecida, porém já foram descritos dois fatores de virulência com papel essencial na imunopatogenia da doença (BROWN e OLANDER, 1987). O primeiro corresponde aos lipídios integrados à parede celular da bactéria, conhecido como ácido corinemicólico, que possibilita ao microrganismo resistir à digestão celular, por meio de enzimas celulares, e assim persistir como parasita intracelular facultativo (HARD, 1972). O segundo é uma exotoxina hemolítica denominada Fosfolipase D (PLD), que age hidrolisando a esfingomiéline presente nas membranas celulares do endotélio vascular, aumentando a permeabilidade e favorecendo a disseminação dessa bactéria do local onde ocorreu a infecção, para o sistema linfático (McNAMARA et al., 1994; BAIRD e FONTAINE, 2007; MCKEAN et al. 2007b).

A bactéria, ao penetrar no organismo do hospedeiro, é carregada pelas vias linfáticas aferentes aos linfonodos superficiais e drenantes, onde os granulomas característicos são produzidos. A enfermidade manifesta-se tanto nos linfonodos superficiais (submandibulares, parotídeos, retrofaríngeos, pré-escapulares, poplíteos e retro-mamários), quanto nos internos (mediastinais e mesentéricos), e também nos órgãos, como pulmões, fígado, e rins. As formas de manifestação são encontradas em caprinos e ovinos, sendo a forma superficial mais comumente encontrada em cabras, e a forma visceral mais freqüente em ovelhas (PATON, 1997; PAULE et al, 2004; BAIRD e FONTAINE, 2007, GUIMARÃES et al., 2011).

O nematóide *H. contortus* apresenta a sua patogenia relacionada à hematofagia, que corresponde a ingestão diária de cerca de 0,05mL de sangue realizada pelos estágios pré-adulto e adulto do parasito na mucosa abomasal dos animais. Este quadro pode ser agravado pelas condições climáticas e pelo alto poder de contaminação das pastagens resultante da grande quantidade de ovos, de 5.000 a 10.000 ovos por dia, eliminados pelas fêmeas. As fêmeas parasitadas dos pequenos ruminantes, quando entram no período de parto e lactação, podem apresentar um aumento da carga parasitária, e com isso a elevação da ovipostura

pelos parasitas, oriundos do desenvolvimento das larvas em hipobiose (CARVALHO et al., 2001).

Animais infectados por esse nematóide podem apresentar diferentes cursos clínicos, que vão desde os casos agudos frequentemente fatais nos animais jovens ou aqueles animais que não foram expostos previamente ao parasito, e sendo caracterizados pela perda de peso, desidratação, fraqueza, inapetência, emagrecimento, diarreia e anemia e pêlos arrepiados e sem brilho. Em quadros hiperagudos, a anemia apresenta-se mais intensa, quando pode-se notar a mucosa ocular e gengival dos animais extremamente pálida, podendo resultar na morte do animal. Na fase crônica, esses sinais intensificam-se, podendo ser observado edemas na região submandibular e ventral, em virtude da hipoproteinemia. A fisiopatologia desta infecção inclui distúrbios do aparelho digestivo, tais como perda de apetite, da motilidade intestinal e alterações de fluxo, aumento do pH gástrico e do metabolismo de proteínas (FOX, 1997; HOSTE, 2001; RAHMAN e COLLINS, 1990; CAVALCANTE, 2009).

## **2.5. Resposta imune contra *C. pseudotuberculosis* e *H. contortus***

A resposta imune inata na infecção pelo *C. pseudotuberculosis* ainda é muito pouco compreendida, porém já se tem conhecimento sobre a participação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-10, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , além da presença de células que atuam na fase inicial da infecção como os neutrófilos, células NK e macrófagos (PÉPIN et al., 1997; STEFAŃSKA et al., 2010; DE SOUZA, et al., 2014).

A resposta imunológica adaptativa do hospedeiro frente à infecção por *C. pseudotuberculosis* é atribuída a mecanismos humorais e celulares (LAN et. al., 1998; SIMMONS et al., 1998; BASTOS et al., 2012). No entanto, segundo Alves e Olander (1999) e Pepin *et al.*, (1997) a resposta imune celular, principalmente do tipo Th1, é a mais predominante na proteção contra a bactéria. Embora a infecção pelo microrganismo possa induzir uma expressiva resposta humoral, esta não é capaz de eliminar a infecção (FONTAINE, et al., 2006).

A infecção dos macrófagos, pelas bactérias intracelulares pode ativar as células TCD4<sup>+</sup> a estimular, mais especificamente, a subpopulação do tipo Th1, que secreta principalmente as citocinas INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que ativam os macrófagos e levam ao aumento da produção de óxido nítrico (NO) e à destruição da bactéria

(MACHADO et al., 2004; HOPE et al., 2004). O papel das células TCD8<sup>+</sup> no mecanismo de defesa contra este tipo de infecção é através da citotoxicidade destruindo os macrófagos infectados (EI-ENBAAWY, et al., 2005). Por sua vez, a resposta humoral é induzida pela subpopulação Th2, a partir da produção das interleucinas 4, 5 e 6. Apesar de sua intensa expressão, esta resposta imune isoladamente é incapaz de debelar a infecção (PÉPIN et al., 1997; VALE et al., 2003).

Em relação, a resposta imune inata contra o parasita *H. contortus*, as células leucocitárias que atuam induzindo um processo inflamatório agudo na mucosa do abomaso em caprinos e ovinos são os eosinófilos, mastócitos, monócitos e leucócitos globulares (LEDER e WELLER, 2000; SCHALLING, et al., 1997; SHAKYA, et al., 2009). Durante a infecção pelo parasita, ocorre a infiltração por mastócitos e eosinófilos na mucosa do abomaso dos pequenos ruminantes (GAMBLE e ZAJAC, 1992). Os mastócitos sintetizam e liberam a histamina, que atua na permeabilidade vascular e vasodilatação (MADRUGA et al., 2001).

A resposta imune adquirida contra o nematóide promove preferencialmente, a ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e sua participação na polarização da resposta imune do tipo Th2, que é o evento chave para o desenvolvimento de imunidade protetora contra os parasitas (URBAN, et al., 1992; GILL, et al., 2000). As células Th2, induzem a produção das citocinas IL4, IL5 e IL13, que, em conjunto, estimulam a produção de anticorpos das classes IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e especialmente IgE (GRENCIS, 2001; GAUSE et al., 2003; MILLER, 1996). Os linfócitos Th2 também induzem o aumento de eosinófilos na mucosa do abomaso dos animais resistentes a este parasita, estas células são atraídas para os sítios de invasão dos helmintos por moléculas quimiotáticas liberadas pelos mastócitos, e possuem receptores de baixa afinidade para fração Fc da IgE. Essa ligação desencadeia a degranulação do eosinófilo, havendo liberação de produtos tóxicos para o helminto (AMARANTE et al., 2004; MADRUGA et al., 2001; MUÑOZ-GUZMÁN et al., 2006).

Dentre os mecanismos efetores da imunidade humoral contra a hemonose, as imunoglobulinas IgA e IgG1 são as mais importantes, pois são responsáveis diretamente pela inibição no desenvolvimento das larvas, e participam indiretamente da sua expulsão, reduzindo assim o número de parasitas no abomaso. Além disso, inibem o metabolismo, o crescimento, a capacidade reprodutiva e a mobilidade do parasita, podendo também reduzir o número de ovos eliminados nas fezes dos animais infectados (GILL et al., 1993; GILL et al., 1994; SCHALLIG, 2000).

## 2.6. Diagnóstico laboratorial da infecção por *C. pseudotuberculosis* e o *H. contortus*

Para a realização do diagnóstico da Linfadenite Caseosa, deve-se levar em consideração a identificação dos sinais clínicos, a realização da avaliação bacteriológica para a detecção do agente no material caseoso dos granulomas e as técnicas sorológicas, sendo estas últimas de significativa importância. Uma vez que podem identificar os animais que apresentam o quadro subclínico da doença, podendo representar uma fonte de infecção para os animais sadios (CHIRINO-ZÁRRAGA, et al., 2006; KABA et al., 2001).

Diversos testes vêm sendo utilizados para o diagnóstico da LC, tais como: teste de inibição de hemólise sinérgica (BROWN, et al., 1987), fixação de complemento (SHIGIDI, 1979b), imunodifusão (BURREL, 1980), microaglutinação (MENZIES e MUCKLE, 1989), hemaglutinação indireta (SHIGIDI, 1979a), PCR (MOHAN, et al. 2008; ÇETINKAYA, et al., 2002; PACHECO et al., 2007) e RT-PCR (CARVALHO et al., 2014). Uma variedade de ensaios sorológicos são utilizados para detectar anticorpos contra o *C. pseudotuberculosis* no soro de caprinos e ovinos (KABA, 2001; CARMINATI et al., 2003; REBOUÇAS et al., 2013). Nos ensaios de ELISAs diversas preparações de antígenos têm sido testadas, incluindo a exotoxina fosfolipase D (DERCKSEN et al., 2000), antígenos da parede celular (CHIRINO-ZÁRRAGA, et al., 2009; BINNS et al., 2007), sobrenadante de cultura bacteriana (SEYFFERT et al., 2010, REBOUÇAS et al., 2013) e bem como exotoxinas recombinante (MENZIES, et al., 1994; MENZIES, et al., 2004).

Alguns estudos descrevem a identificação da resposta imune mediada por célula contra *C. pseudotuberculosis* em pequenos ruminantes, utilizando o teste de ELISA que quantifica a dosagem de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de culturas de sangue total dos caprinos estimulada pelo antígeno (PRESCOTT, et al., 2002; MENZIES, et al., 2004; REBOUÇAS, et al., 2011).

Vários autores descrevem uma expressiva resposta imune humoral contra uma grande quantidade de proteínas antigênicas do *C. pseudotuberculosis*, identificadas através da técnica de “western blotting”. Os antígenos estruturais do *C. pseudotuberculosis* identificados com maior frequência por anticorpos, presentes no soro de caprinos apresentam pesos moleculares (PM) de 20, 31, 36, 40, 46, 55, 63, 68, 80 e 120 kDa. Outros estudos identificaram os antígenos somáticos ou

secretados, com pesos moleculares entre 22 e 120 kDa e 5 e 200 kDa, e em menor proporção, os com 68, 64, 43 e 22 kDa (PAULE, 2003a ; PAULE, 2003b; VALE et al., 2003). Segundo Vale (2005) as proteínas secretadas pela bactéria, tanto no sobrenadante da cultura, quanto na fração somática possuem peso molecular 31, 40, 63 e 68 kDa.

No diagnóstico do parasita *H. contortus* em pequenos ruminantes pode ser realizado a observação dos sinais clínicos, correlacionando com o método FAMACHA, que é um teste qualitativo que correlaciona à coloração da conjuntiva ocular do animal, com a carga parasitária, através do grau de anemia deste (EJLERTSEN, et al., 2006; MOLENTO *et al.*, 2013). Outros diagnósticos realizados são os exames coprológicos, como a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e realização da coprocultura, para identificação das larvas infectantes L3 (CLIMENI et al., 2008; QAMAR & MAQBOOL, 2012). De acordo com Ueno e Golçanves (1998), a quantidade de ovos eliminada pelo parasito nas fezes de pequenos ruminantes, pode ser utilizada para determinar a carga parasitária e classificar a infecção pelo *H. contortus* em leve (abaixo de 500 ovos), moderada (entre 500 a 1500 ovos), aguda (1500 a 3000 ovos) e fatal (acima de 3000) por grama de fezes (MOLENTO *et al.*, 2004).

Há também a realização de testes sorológicos, a exemplo do ELISA indireto, que está sendo utilizado, por permitir a detecção do quadro subclínico e da infecção precoce pelo parasito (QAMAR & MAQBOOL, 2012). Nos testes de ELISAs vários preparados de antígenos têm sido avaliados, como o extrato do parasita adulto, o antígeno de superfície (RATHORE, et al., 2006) e proteína recombinante (XIAOJUN, et al., 2007).

Na técnica de *western blotting* a identificação de algumas proteínas antigênicas do *H. contortus* induz uma resposta imune humoral. O soro dos animais infectados pelo nematódeo apresentam anticorpos contra os antígenos estruturais, que apresentam pesos moleculares (PM) de 120,2; 91,2 e 85,1 kDa (KAUR, et al., 2002). Alguns estudos identificaram antígenos excretados/secretados pelo parasito de peso molecular 66 kDa e 24 kDa (RATHORE, et al., 2006; XIAOJUN, et al., 2007). Segundo Bowles *et al.*, (1995) antígenos da larva infectante L3 possuem peso molecular de 44; 48; 70 e 83 kDa.

## 2.7. Resposta imune moduladora da infecção por *C. pseudotuberculosis* e co-infecção com *H. contortus*

A associação entre infecção dos pequenos ruminantes pelo *C. pseudotuberculosis* e pelo *H. contortus* tem sido demonstrada em regiões onde ambos os agentes são endêmicos. Como é observado no Nordeste brasileiro, onde a Linfadenite Caseosa é altamente freqüente nos rebanhos de caprinos e ovinos, resultando perdas produtivas significativas (COSTA FILHO et al., 1974). Além dessa enfermidade bacteriana, observa-se também nos rebanhos desta região uma elevada ocorrência do *Haemonchus contortus*, que reflete significativamente no desempenho produtivo dos rebanhos. E esta ocorrência frequente da Linfadenite Caseosa e da Hemoncose nas criações, deve-se à grande concentração de animais e a falta de orientação adequada aos criadores de caprinos e ovinos, quanto à sanidade de seus rebanhos (MACRAE, 1993).

Levando-se em consideração que infecção pelo *C. pseudotuberculosis* induz uma resposta imune celular do tipo Th1, predominante na proteção contra a bactéria (PEPIN et al., 1997). E a resposta imune adquirida contra o *Haemonchus contortus* promove preferencialmente, a polarização da resposta imune para o tipo Th2 (GILL, et al., 2000). Logo, a influência da co-infecção nos animais pelo helminto, sugere uma imunomodulação da resposta imune a partir do desvio no equilíbrio Th1/Th2 (BENTWICH et al., 1999). E este pode ser um importante fator para a manifestação mais precoce do quadro clínico, característico da infecção por bactérias intracelulares, além de contribuir para a propagação da enfermidade (BUNDY et al., 2000).

### 3. HIPÓTESE

Considerando que a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* nos caprinos é contida por uma resposta Th1 predominante, e que a infecção por helmintos do gênero *Haemonchus* no Nordeste brasileiro ocorre com alta prevalência nestes animais, espera-se que a infecção por este parasita, induzindo uma intensa resposta Th2, interfira na modulação da resposta imune protetora destes pequenos ruminantes contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

### 4. OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

Avaliar a indução de resposta imune humoral e celular contra o *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos co-infetados pelo nematóide *Haemonchus contortus*.

#### Objetivos específicos

- Avaliar, através da produção específica *in vitro* de IFN- $\gamma$ , a partir culturas de sangue total caprino, a resposta celular em animais infectados com *C. pseudotuberculosis* ou co-infectados com este microrganismo e o nematódeo *Haemonchus contortus*;
- Avaliar, através de ELISA indireto e *western blotting*, a cinética da resposta humoral e o padrão de reconhecimento antigênico por anticorpos IgG, em animais infectados com *C. pseudotuberculosis* ou co-infectados com este microrganismo e o nematódeo *Haemonchus contortus*;
- Acompanhar periodicamente a evolução do quadro clínico dos caprinos infectados pela linhagem selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e pelo nematódeo *Haemonchus contortus*;



- Realizar o acompanhamento da infecção pelo nematóide *Haemonchus contortus* nos caprinos através da técnica de ovos por grama de fezes (OPG);
- Comparar as populações celulares presentes na mucosa abomasal dos caprinos nos diferentes grupos experimentais.

## 5. MANUSCRITO 1.

### **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CAPRINA A CO-INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Corynebacterium pseudotuberculosis* E *Haemonchus contortus***

#### **RESUMO**

Este estudo avaliou a possível imunomodulação induzida por mecanismos Th2, desencadeados pela infecção com *H. contortus*, sobre a resposta imune do tipo Th1, específica para *C. pseudotuberculosis*, na infecção caprina concomitante por estes dois agentes. Foram utilizados neste experimento 28 caprinos em sistema de confinamento, separados em cinco grupos. O grupo controle negativo (GI), contendo quatro animais; o segundo controle positivo para *C. pseudotuberculosis* (GII); o terceiro grupo o controle positivo para *H. contortus* (GIII), enquanto que o quarto e quinto grupo (GIV e GV) foram inoculados com a bactéria e o nematódeo em diferentes períodos, cada um destes grupos contendo seis animais. Amostras de sangue e fezes foram colhidas durante o período de oito meses, e os animais foram necropsiados aos 210 dias. A resposta por anticorpos da classe IgG específicos contra a bactéria e o helminto, foi identificada pelos testes de ELISA e *western blotting*. Para a avaliação da resposta celular foi realizada a dosagem dos níveis de IFN- $\gamma$ . A técnica parasitológica de OPG foi realizada para acompanhar a evolução da infecção pelo nematódeo. Os resultados evidenciaram que os animais dos grupos de co-infecção (GIV e GV) apresentaram altos títulos de anticorpos IgG anti-*C. pseudotuberculosis* e reduzidos níveis de INF $\gamma$ , e estes resultados correlacionaram-se positivamente com a presença de lesões. Os níveis de IgG anti-*H. contortus* nestes animais mantiveram-se reduzidos, no período que correspondeu a elevada carga parasitária. No pool das amostras de soros dos animais destes grupos o reconhecimento antigênico identificou oito proteínas de *C. pseudotuberculosis* e cinco proteínas oriundas do parasita. Foi realizada a correlação entre a produção de IgG anti-*C. pseudotuberculosis* e anti-*H. contortus* nos caprinos, o resultado demonstrou uma expressiva resposta humoral contra bactéria nos animais do quinto grupo. Nos grupos de co-infecção existe correlação entre a carga parasitária elevada e os níveis reduzidos de IgG anti-*H. contortus*. Concluiu-se que a co-infecção dos animais pela bactéria e parasita apresentou mecanismos imunológicos, que

sugeriram uma melhor compressão da imunomodulação exercida pela interferência do helminto na patogenia da bactéria nos caprinos.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemonchus contortus*, co-infecção, resposta imune Th1-Th2, imunomodulação.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O Nordeste é a região brasileira onde se observa a maior frequência tanto da linfadenite caseosa, que é uma enfermidade de caráter crônico, causada por uma bactéria intracelular facultativa denominada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*; quanto de nematódeos gastrintestinais, principalmente *Haemonchus contortus* um helminto hematófago da mucosa abomasal de ruminantes. Sendo que a elevada ocorrência destes agentes deve-se à grande concentração de rebanhos caprinos e ovinos, além da falta de orientação adequada aos seus criadores, quanto à sanidade destas criações (MACRAE, 1993; MEYER, 2003; MELO, 2005).

Trabalhos realizados por PROST *et al.* (1979) e SACCO *et al.* (2002) demonstram que as infecções pelo *Mycobacterium spp.* caracterizadas pelas fortes respostas Th1 específicas, sofrem a influência da co-infecção por helmintos, a partir da hipótese do desvio no equilíbrio Th1/Th2. De forma que deve-se levar em consideração a influência da co-infecção nos rebanhos, uma vez que estudos anteriores sugerem que indivíduos co-infectados pelo helminto podem desenvolver uma manifestação mais rápida do quadro clínico causado pela bactéria (lesões granulomatosas nos linfonodos superficiais, internos e vísceras), em razão da imunomodulação da resposta imune (BENTWICH *et al.*, 1999; RODRIGUES, 2015).

A resposta imunológica dos animais frente à infecção por um agente se relaciona, a produção de citocinas da subpopulação Th1 que incluem IL-2, IFN- $\gamma$  e o fator de necrose tumoral (TNF- $\beta$ ), indutoras da imunidade celular; quanto pelas citocinas produzidas pelo perfil Th2, como a IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 mediadoras de uma resposta imune e inflamatória (RIFFKIN *et al.*, 1996). Apesar de ambas as subpopulações de células possam ser induzidas durante a infecção, uma população em geral domina uma dada resposta. Os agentes bacterianos intracelulares, como

*C. pseudotuberculosis*, normalmente estimulam uma resposta do tipo Th1 e os helmintos, como *Haemonchus contortus*, uma resposta do tipo Th2 (BELLABY et al., 1996; ELSE e FINKELMAN, 1998).

A resposta imunológica adaptativa do hospedeiro frente à infecção por *C. pseudotuberculosis* é atribuída a mecanismos humorais e celulares (LAN et. al., 1998; SIMMONS et al., 1998). No entanto, segundo Alves e Olander (1999) e Pepin et al., (1997) a resposta imune celular, principalmente do tipo Th1, é, sem dúvida, essencial para conter a infecção no interior de macrófagos (FRAGA, 2012, SOUZA, 2014). Já a infecção pelo nematóide promove preferencialmente, ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e sua participação na polarização da resposta imune do tipo Th2, que é o evento chave para o desenvolvimento de imunidade protetora contra os parasitas (URBAN, et al., 1992; GILL, et al., 2000).

Considerando as altas prevalências e da co-existência entre o *Haemonchus contortus* e a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* nos rebanhos ovinos e caprinos em várias regiões do mundo, e especialmente as criações do semi-árido nordestino (MACIEL, 2006). Este trabalho tem como objetivo avaliar a resposta imune humoral e celular dos caprinos após a inoculação com o *Corynebacterium pseudotuberculosis* e co-infecção com *Haemonchus contortus* nos grupos experimentais, de forma a compreender a interferência do nematódeo *H. contortus* na possível imunomodulação contra *C. pseudotuberculosis* em caprinos.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 Comitê de Ética**

Este trabalho foi aprovado pelo CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA), sob protocolo nº052/2014.

### **5.2.2 Animais**

Os caprinos utilizados nos experimentos foram animais sem raça definida (SRD), com idade entre três a seis meses, ambos os sexos, com sorologia negativa para *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram obtidos da Estação Experimental de Caraiba da EBDA, do município de Jaguaraci no estado da Bahia.

A carga parasitária dos animais foi mensurada a partir das fezes colhidas e avaliadas através da técnica Gordon e Whitlock (1939). Antes do início do experimento todos os caprinos foram vermifugados com antiparasitário Albendazole (Valbazen<sup>1</sup>, Pfizer, New York, NY), na dose 2 mg/kg de peso vivo por via oral. Foram realizados três aplicações do anti-helmíntico respeitando um intervalo de 15 dias entre cada aplicação, de acordo com o espectro de ação. Um novo exame parasitológico das fezes foi realizado para confirmar se a carga parasitária encontrava-se zerada; garantindo que os caprinos encontravam-se livres de *Haemonchus contortus*.

Os animais foram mantidos em um sistema intensivo de criação, na unidade experimental do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, em Salinas da Margarida, Bahia, (12°52'16"S e 38°45'52"O), com alimentação balanceada a base de ração industrial, volumoso a base de feno e água *ad libitum*. Os animais foram examinados clinicamente antes e após a inoculação, e acompanhados mensalmente ao longo dos 210 dias do experimento, para a inspeção visual da mucosa ocular e oral e palpação dos linfonodos superficiais.

#### 5.2.2.1 Grupos experimentais

Os caprinos foram distribuídos em cinco grupos. O primeiro grupo (GI) ( $n = 4$ ) com animais livres de *C. pseudotuberculosis* (Cp) e do *H. contortus* (Hc); o segundo grupo (GII) ( $n=6$ ) correspondeu ao controle positivo de infecção por *C. pseudotuberculosis*, sendo infectado experimentalmente com 1mL de solução salina contendo uma dose de  $4,4 \times 10^7$  UFC (1mL) da linhagem selvagem C57 de *C. pseudotuberculosis*, na região pré-escapular direita por via subcutânea no dia zero; o terceiro grupo (GIII) ( $n = 6$ ) animais infectados pelo *H. contortus*, por via oral utilizando as larvas infectantes (L3) na dosagem de 10 mL/VO (1.000 larvas L3/ mL) no dia zero; o quarto grupo (GIV) de co-infecção (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T0</sub>), com seis animais infectados com *C. pseudotuberculosis* e *H. contortus* no dia zero e o quinto grupo (GV) de co-infecção (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T90</sub>), com seis animais previamente infectados com *C. pseudotuberculosis* no dia zero, e com *H. contortus* nos 90 dias pós-infecção.

O acompanhamento da resposta imune ocorreu nos dias 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210, com coletas mensais de sangue para: cultura de sangue total com estímulo de proteínas secretadas do *Corynebacterium pseudotuberculosis* pela

técnica de TPP (Separação de Proteínas em Três Fases) e a fração solúvel do lisado de *Haemonchus contortus*, para a dosagem *in vitro* de IFN- $\gamma$ , e para avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG específicos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* e o *Haemonchus contortus* por ELISA indireto e por *western blotting*. E para a realização dos exames coprológicos foram realizadas coleta de fezes, diretamente da ampola retal dos animais. Após o período de observação de oito meses, os animais foram abatidos no matadouro frigorífico Baby bode em Feira de Santana-BA, através do método humanitário de atordoamento por eletronarcose e seus órgãos (pulmões, fígado e baço) e linfonodos foram separados e inspecionados. Os tecidos que apresentaram lesões foram acondicionados assepticamente em coletores estéreis para posterior identificação bacteriana.

### 5.2.3. Linhagem bacteriana do *Corynebacterium pseudotuberculosis* e seus antígenos

Para a infecção dos caprinos utilizou-se a linhagem selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (C57) (MOURA-COSTA et al., 2008). A cepa isolada de um caprino naturalmente infectado e com sorologia para Linfadenite Caseosa e identificada por biologia molecular. Esta cepa é mantida na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (ICS-UFBA). A linhagem bacteriana foi semeada em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) e em seguida cultivada a 37°C, por 48 horas. Para a inoculação nos animais ajustou-se a quantidade de UFC, após centrifugação e lavagem da cultura.

No teste imunoenzimático ELISA indireto, descrito por Carminatti *et al.*, (2003), realizou-se o cultivo da linhagem selvagem VD57 de *C. pseudotuberculosis* no meio BHI. Para a estimulação das culturas de sangue e o *western blotting* utilizou-se as proteínas secretadas da cepa VD57 pela técnica de TPP, com concentração protéica de 7,76 mg/mL. Esta quantidade de proteína foi determinada pelo método modificado de Lowry *et al.*, (1951).

## 5.2.4 O nematódeo *Haemonchus contortus* e seus antígenos

### 5.2.4.1 Obtenção das larvas infectantes (L3) do *Haemonchus contortus*

Para a obtenção das larvas infectantes (L<sub>3</sub>) do *Haemonchus contortus* utilizadas na infecção experimental. Foram coletados parasitos adultos do abomaso de caprinos e ovinos abatidos no frigorífico Baby bode, em Feira de Santana-BA. Estes parasitos foram acondicionados em recipientes com solução fisiológica (0,09%), e encaminhados para Laboratório de Parasitologia do ICS-UFBA.

No laboratório os parasitos foram colocados em um recipiente com solução fisiológica (0,09%) aquecida (em torno de 45°C), para que as fêmeas realizassem a ovoposição (BORGES, 2007). Para a realização da técnica de coprocultura utilizou-se como matéria orgânica quatro gramas de fezes autoclavadas de ovinos misturadas à maravalha, na proporção de mais ou menos duas partes de maravalha para uma de fezes, e adicionou a solução contendo os ovos do nematódeo obtidos após a ovoposição, além do macerado dos parasitos. Em seguida, cada uma das misturas foi colocada em copos de vidro. As culturas foram mantidas na estufa à temperatura 37°C, por um período de sete dias, tempo necessário para a evolução das larvas infectantes (L3) do parasito, de acordo ao descrito por Ueno (1995).

### 5.2.4.2 Obtenção dos antígenos do nematódeo *Haemonchus contortus*

Para a realização das técnicas sorológicas de Elisa indireto, dosagem do INF- $\gamma$  e *western blotting*, foram produzidos antígenos de *H. contortus*, a partir dos parasitos adultos coletados do conteúdo abomástico de pequenos ruminantes abatidos em frigorífico. Os parasitos foram acondicionados em um recipiente com PBS pH 7,2, lavados 2 vezes sucessivamente para remoção de impurezas com 7,5mL do mesmo tampão. Em seguida foram lisados por meio de aparelho de ultrassom com frequência de 60 Hertz (seis ciclos de 30 segundos com pausa de 30 segundos entre os ciclos, em banho de gelo), e centrifugado a 6.000 rpm por 30 minutos à 8°C. Após a centrifugação, o conteúdo protéico da fração solúvel do lisado de *H. contortus* foi dosado pelo método de Lowry *et al.*, (1951), e obtendo a concentração de 6,4 mg/mL. O extrato obtido foi estocado a -20 °C até o momento do uso.

### 5.2.5 Inoculação do *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus* nos caprinos

A inoculação do *C. pseudotuberculosis* foi realizada através da via subcutânea, na região pré-escapular direita, numa dose de 1 mL ( $4,4 \times 10^7$  UFC). E a infecção do *H. contortus*, foi realizada pela via oral utilizando as larvas infectantes (L3), na dosagem de 10 mL/VO (1.000 larvas L3/ mL) em cada animal (MACKINNON et al., 2010).

### 5.2.6 Acompanhamento imunológico

#### 5.2.6.1 Determinação dos níveis de produção de IgG específica para *Corynebacterium pseudotuberculosis*

As placas de poliestireno de fundo chato (marca Costar, EUA) foram sensibilizadas com sobrenadante da cultura de 48h de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI, diluído a 1:100 em tampão carbonato bicarbonato a 0,05M, pH 9.6 e incubação por 12h a 4°C. Após duas lavagens com salina tampão fosfato contendo 0,05% Tween-20 (PBS-T), as placas foram bloqueadas com 200 µl/poço de PBS-T20 contendo 5% de leite desnatado, durante duas horas e incubadas a 37°C. Em seguida foram incubadas com 50µl/poço dos soros testes e controles diluídos 1:100 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado durante uma hora a 37°C. Após cinco lavagens em PBS-T, adicionou-se às placas 50µl/poço de imunoglobulina de coelho anti-IgG de caprino conjugada a peroxidase (Sigma), diluída 1:10.000 em PBS-T. As placas foram incubadas durante 45 minutos a 37°C e, em seguida, foram novamente lavadas cinco vezes em PBS-T e incubadas com 50µl/ do cromógeno tetrametilbenzidina (TMB), por 15 minutos, à temperatura ambiente, em ausência de luz. A reação foi interrompida com a adição de 25 µl/poço de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura da densidade óptica foi realizada em fotocolorímetro automático para ELISA (Microplate Reader BIO-RAD Model 550), usando-se filtro de 450 a 655nm de comprimento de luz. O ponto de corte utilizado foi de 0,250 D.O (CARMINATI et al., 2003).



#### 5.2.6.2 Determinação dos níveis de produção de IgG específica para *Haemonchus contortus*

As placas foram sensibilizadas com a fração solúvel do lisado de *H. contortus* na concentração de 0,25µg por poço, diluído em solução tamponada carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubação por 12h a 4°C. Transcorrido este tempo, duas lavagens com salina tampão fosfato contendo 0,05% Tween-20 (PBS-T) foram realizadas, e as placas foram bloqueadas com 200 µl/poço de PBS-T20 contendo 5% de leite desnatado, durante duas horas e incubadas a 37°C. Em seguida foram incubadas com 50µl/poço dos soros testes e controles diluídos 1:200 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado durante uma hora a 37°C. Após cinco lavagens em PBS-T20, para a revelação da ligação entre os anticorpos e os antígenos fixados na placa, foi adicionado às placas 50µl/ poço de imunoglobulina de coelho anti-IgG de caprino conjugada a peroxidase (Sigma), na diluição de 1:20.000 para IgG e PBS/T20. As placas foram incubadas durante 45 minutos a 37°C e, em seguida, foram novamente lavadas cinco vezes em PBS-T e incubadas com 50µl/poço da solução reveladora composta pelo cromógeno tetrametilbenzidina (TMB). As placas foram incubadas no escuro por 15 minutos, à temperatura ambiente, e a reação foi interrompida com a adição de 25 µl/poço de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A densidade óptica (D.O.) foi mensurada utilizando um fotolorímetro automático para ELISA (Microplate Reader BIO-RAD Model 550), usando-se filtro de 450 a 655nm de comprimento de luz, utilizando a metodologia descrita por Nunes em 2012, com modificações.

#### 5.2.6.3 Avaliação da produção de interferon-gama para *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A quantificação de IFN- $\gamma$  em culturas de sangue foi feita segundo REBOUÇAS *et al.*, (2011), a partir do sobrenadante de cultura de sangue total. As amostras de sangue colhidas (5mL em tubos heparinizados) em cada tempo amostral foram dispostas em placas de cultivo celular de 24 poços sendo para cada animal utilizados três poços com 1mL. O primeiro poço foi o controle negativo, sem adição de estímulo; o segundo poço o controle positivo, sendo adicionado 5µg de mitógeno *pokeweed* (PWM); e o terceiro poço foi adicionado 40µg das proteínas

secretadas da linhagem VD57 pela técnica de TPP. Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis no fluxo laminar. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi coletado após centrifugação das amostras durante 5 minutos a 8000rpm e então submetidos à avaliação da produção de INF- $\gamma$ , através do teste de ELISA Sandwich, utilizando o Kit Ovine INF- $\gamma$  (Mabtech, Suécia).

#### 5.2.6.4 Avaliação da produção de Interferon-gama para o *Haemonchus contortus*

Esse ensaio foi realizado através da incubação do sangue heparinizado de cada animal coletado em cada tempo do experimento, disposto em placas de cultivo celular (Costar) de 24 poços, sendo que para cada animal foram utilizados três poços com 1mL. Após o plaqueamento, no primeiro poço foi colocado o controle negativo, sem adição de estímulo; no segundo poço o controle positivo, sendo adicionado 5 $\mu$ g de mitógeno *pokeweed* (PWM); e no terceiro poço foi adicionado 50 $\mu$ g da fração solúvel do lisado de *H. contortus*. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi coletado após centrifugação das amostras durante 5 minutos a 8000rpm e então submetidos à avaliação da produção de INF- $\gamma$ , através de teste comercial imunoenzimático específico (Kit Ovine INF- $\gamma$ , Mabtech). A técnica foi padronizada no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do ICS-UFBA, utilizando a metodologia descrita por REBOUÇAS e colaboradores em 2011, com modificações.

#### 5.2.7 Reconhecimento antigênico da bactéria e do nematódeo

##### 5.2.7.1 Reconhecimento antigênico do *Corynebacterium pseudotuberculosis* pelo western blotting

As proteínas secretadas do *C. pseudotuberculosis* pela técnica de TPP foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida. O sistema utilizado foi o descontínuo, composto de um gel de empilhamento constituído por 4% de acrilamida - bisacrilamida (29,2% / 0,8%), 10% SDS, 0,05% de persulfato de amônia, 0,05% de temed e contendo tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. Esse gel de empilhamento foi colocado

sobre um gel de corrida, constituído por 12% de acrilamida - bisacrilamida (29,2% / 0,8%), 1,5M tris-HCl pH 8.8, 10%SDS, 0,05% persulfato de amônia, 0,05% de temed, contendo ainda tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; e cada poço deste gel foi saturado com 50 µg do antígeno.

A eletroforese foi realizada em tampão de migração contendo tris 0,124 M, glicina 0,96 M, 0,5% de SDS, pH 8.3 durante 2 horas, numa corrente de 30mA. As proteínas separadas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (Millipore), em tampão de transferência contendo tris 0,25 M, glicina 0,193 M e 20% de metanol. Após a transferência, a membrana foi corada com uma solução aquosa de vermelho Ponceau S, descorada em água destilada e cortada em tiras de aproximadamente 3mm. As tiras foram bloqueadas com BSA a 5% em salina fosfato contendo 0,1% de tween 20 (PBS-T 20), por 12 horas a 4° C. Um pool de soros dos caprinos dos grupos experimentais foram diluídos a 1:50 em PBS-T 20 contendo 1 % de leite desnatado, e incubados durante 1 hora a 37°C, com anticorpo de coelho anti-IgG de caprino conjugado com peroxidase, diluído 1:100 em PBS-T20. A revelação das bandas foi realizada com 4-cloro-1-naftol e peróxido de hidrogênio em PBS (PAULE, et al., 2003; MOURA-COSTA et al., 2008).

#### 5.2.7.2 Reconhecimento antigênico do *Haemonchus contortus* pelo western blotting

Para a realização do Western blotting foram utilizadas as proteínas presentes na fração solúvel do lisado de *H. contortus*. A técnica foi padronizada no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do ICS-UFBA, utilizando a metodologia descrita por PAULE e colaboradores (2003), com modificações.

#### 5.2.8 Exames parasitológicos dos caprinos

As análises coprológicas das amostras de fezes foram realizadas mensalmente, com o intuito de acompanhar a infecção experimental pelo nematóide *Haemonchus contortus* nos caprinos.

#### 5.2.8.1 Técnica de contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

Para a realização da técnica, utilizou-se cerca de 2 gramas de fezes dos caprinos diluídas em solução hipersaturada de sal (58mL), onde verificou-se a densidade necessária para a flutuação dos ovos. Aguardando dois minutos para os ovos flutuarem na câmara de McMaster, e poder assim dá início a contagem dos ovos do parasito contidos nas áreas delimitadas da câmara, com auxílio do microscópio óptico (objetiva de 10) (GORDON e WHITLOCK, 1939; WHITLOCK, 1948).

#### 5.2.9 Identificação da bactéria nas lesões dos linfonodos internos e externos dos animais

As amostras com a presença de material caseoso sugestivo de infecção por *C. pseudotuberculosis* foram analisadas no Laboratório de Microbiologia do ICS-UFBA. Estas foram semeadas em meio ágar BHI, e a bactéria foi identificada a partir da coloração de Gram, morfologia das colônias e provas bioquímicas: produção da catalase, urease, fermentação de carboidratos (glicose, lactose, sacarose e maltose). Foi realizada hemólise sinérgica das amostras coletadas e feita a comparação com o padrão hemolítico da linhagem virulenta C57 usada no experimento (DERCKSEN et al., 2000).

#### 5.2.10 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 17.0 para Windows. Na distribuição normal dos dados utilizou-se o teste ANOVA com pós-hoc de Tukey.

Nos resultados de correlação entre os grupos experimentais há diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) apresentando correlações lineares, entre as variáveis estabelecidas pelo Coeficiente de correlação de Spearman.

## 5.3 RESULTADOS

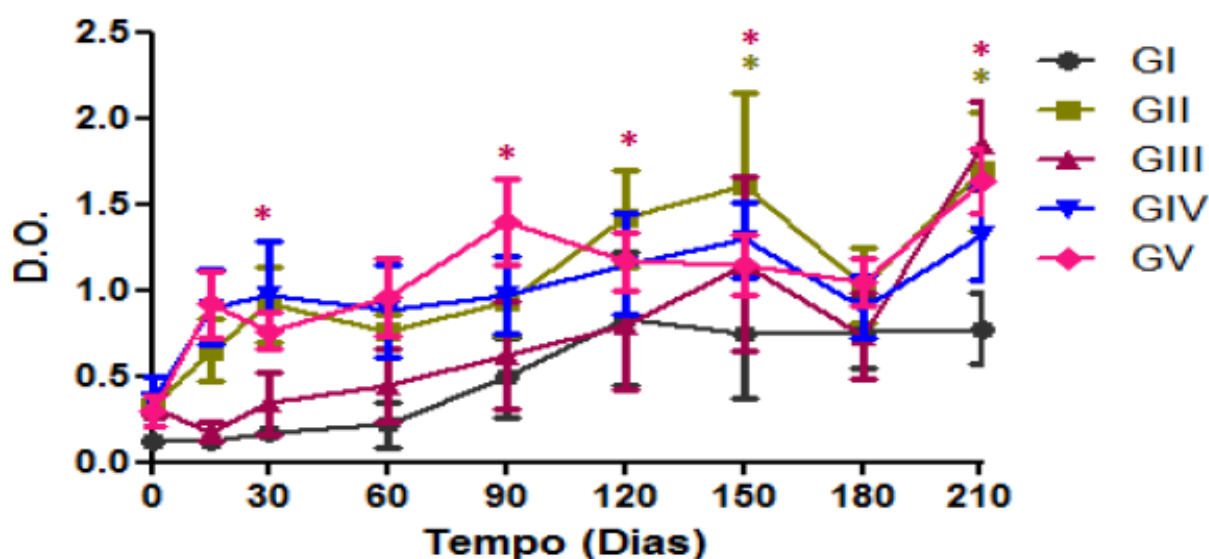
### 5.3.1 ELISA indireto para a produção de IgG anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis*

Os resultados a seguir (figura 1), avaliam a média da cinética da produção de IgG nos grupos ao longo do experimento. Demonstrando, que aos 15 dias pós-inoculação, o grupo II (Cp+), o grupo IV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e o grupo V (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) apresentaram um aumento da expressão da imunoglobulina G, e que ao longo de quase todo o experimento, estes títulos de anticorpos IgG encontravam-se acima do ponto de corte.

A partir dos 90 dias, no momento da infecção pelo *H. contortus* nos animais, o grupo V apresentou uma redução discreta nos títulos anticorpos IgG até 180 dias.

Contudo, o título de anticorpos dos grupos de co-infecção (GIV e GV) apresentaram a partir dos 120 dias níveis inferiores, quando comparado ao grupo controle positivo (GII) para a bactéria.

Na avaliação da produção de anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis* dos grupos experimentais entre tempos (figura 1). Foi observado que após a inoculação o grupo II (Cp+) e o grupo V (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>90</sub>) apresentaram um aumento da expressão da imunoglobulina G. Essa produção foi estatisticamente significativa no grupo II no tempo zero com relação aos tempos 150 e 210 ( $p < 0,05$ ). Já no grupo V de co-infecção houve diferença estatisticamente significativa no tempo zero com relação aos 90 ( $p < 0,01$ ), 120 ( $p < 0,05$ ), 150 ( $p < 0,05$ ) e 210 dias ( $p < 0,01$ ); e em relação ao período de 30 dias, quando comparado ao tempo 210 ( $p < 0,05$ ) dias de infecção.



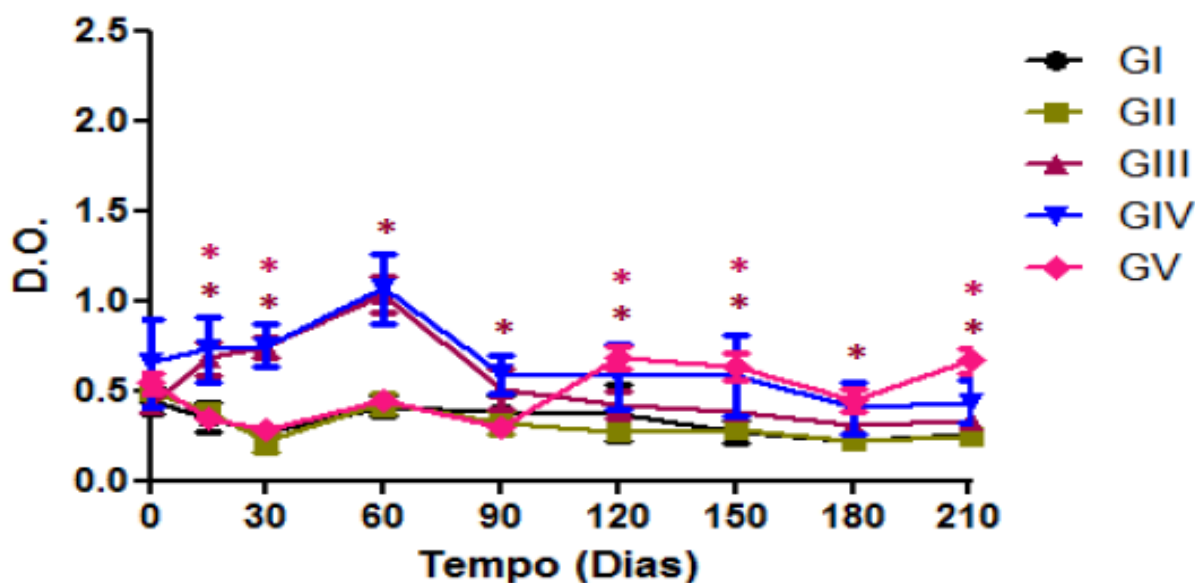
**Figura 1**– Cinética da produção de IgG total específica anti- *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos ao longo de 210 dias de observação. Grupo GI: controle negativo; grupo GII (Cp+); grupo GIII (Hc+); grupo GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e grupo GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>). ELISA Indireto sensibilizado com antígenos secretados em BHI. Asteriscos indicam significância ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.2 ELISA indireto para a produção de IgG anti- *Haemonchus contortus*

A cinética da produção de IgG anti- *H. contortus* dos grupos experimentais pós-desafio ao longo dos 210 dias estão apresentados na figura 2, onde foi observado que os grupos III (Hc+) e grupo IV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) apresentaram um elevação nos níveis de anticorpos até o ponto 60 PDI, com posterior decréscimo dos níveis. Nos períodos subsequentes estes grupos apresentavam níveis com pouca variação. Já o grupo V (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) apresentou aumento pouco expressivo do nível de IgG após os 90 DPI.

Na análise da produção de IgG anti-*H. contortus* dos grupos experimentais entre os tempos (figura 2), nota-se que o grupo III (Hc+) apresentou aumento dos títulos de anticorpos, com diferença estatisticamente significativa no tempo zero em relação aos 60 DPI ( $p < 0,01$ ), e no tempo 15 DPI quando comparado ao dia 60 ( $p < 0,05$ ), e ao decréscimo no nível nos dias 180 e 210 ( $p < 0,05$ ); no ponto 30 DPI quando relacionado aos tempos 150, 180 e 210 ( $p < 0,01$ ), observou-se uma redução dos títulos, que também foi visualizada no tempo 60 quando comparado aos dias 90, 120, 150 e 210 ( $p < 0,01$ ).

No grupo V (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) houve diferença estatisticamente significativa, no período de 15 dias quando comparado aos pontos 120, 150 e 210 ( $p < 0,01$ ).

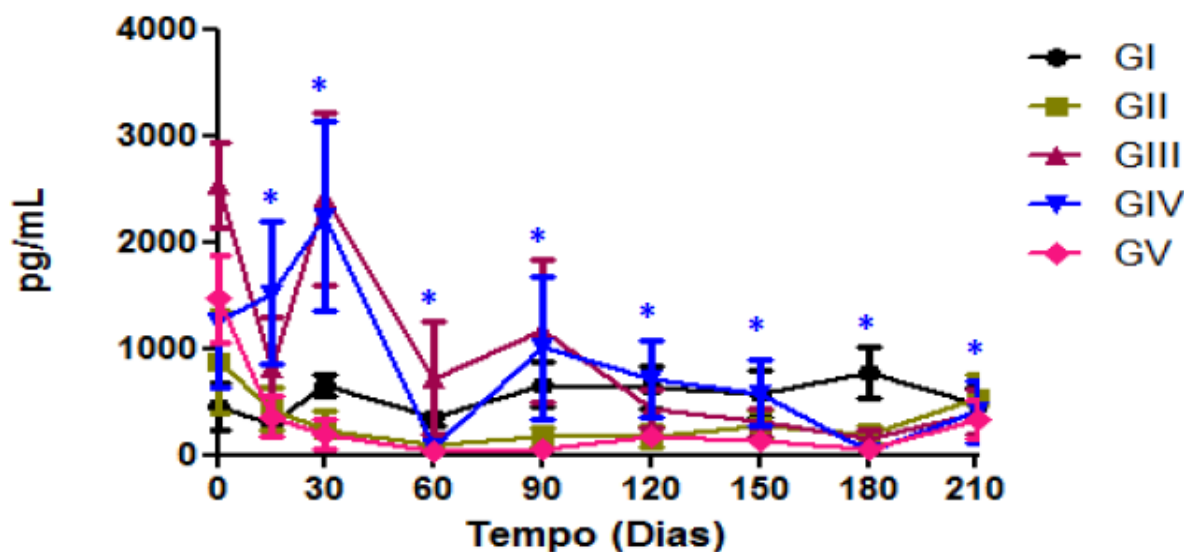


**Figura 2-** Cinética da produção de IgG total específica anti-*Haemonchus contortus* em caprinos ao longo de 210 dias de observação. Grupo GI: controle negativo; grupo GII (Cp+); grupo GIII (Hc+); grupo GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e grupo GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>). ELISA Indireto sensibilizado com lisado de *H. contortus*. Asteriscos indicam significância ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.3 Produção *in vitro* de Interferon-gama em cultura de sangue total estimulada por antígenos secretado/excretado de *C. pseudotuberculosis*.

Os resultados descritos na figura 3 representam as dosagens de IFN- $\gamma$  produzido *in vitro* por cultura de sangue total dos caprinos ao longo dos nove pontos de coleta, após o estímulo com antígenos secretado/excretado da cepa patogênica de *C. pseudotuberculosis*, onde foi observado que a produção desta citocina no grupo IV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) apresentou um aumento no tempo 30 DPI, e nos tempos seguintes ocorreu um decréscimo no nível. Já o grupo V (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) os níveis mantiveram-se baixos durante todos os períodos pós-infecção. O grupo II (Cp+) demonstra níveis constantes da produção do IFN- $\gamma$  em relação aos tempos analisados.

Os valores de IFN- $\gamma$  mensurados na análise dos grupos experimentais entre os tempos, demonstraram uma diferença estatisticamente significativa no grupo IV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) de co-infecção, com aumento dos níveis do menor nível da citocina do tempo 30 em relação aos pontos pós-inoculação 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias ( $p < 0,01$ ).



**Figura 3** – Cinética da produção *in vitro* de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) por células do sangue periférico após estímulo com 40 $\mu$ g de antígenos secretado/excretado de *C. pseudotuberculosis* pela técnica de TPP ao longo de 210 dias de observação. Grupo GI: controle negativo; grupo GII (Cp+); grupo GIII (Hc+); grupo GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e grupo GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>). Asteriscos indicam significância (p<0,05).

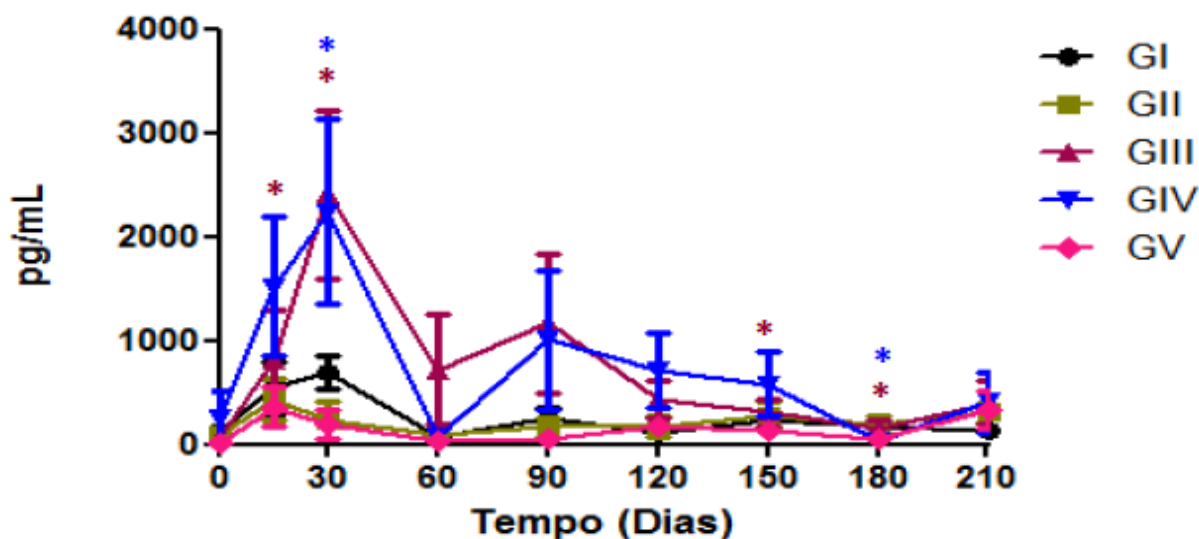
#### 5.3.4 Produção *in vitro* de Interferon-gama em cultura de sangue total estimulada por antígenos somáticos do *Haemonchus contortus*.

As dosagens de IFN- $\gamma$  produzidas na cultura de sangue total dos caprinos ao longo dos 210 dias do experimento, a partir do estímulo dos antígenos somáticos do *Haemonchus contortus* representado na figura 4, demonstram que o grupo III (Hc+) apresentou maior produção desta citocina nos períodos de 15 a 30 dias pós-infecção, enquanto nos tempos seguintes observa-se um decréscimo na produção. O grupo IV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) apresentou a produção expressiva do IFN- $\gamma$ , nos tempos 15 e 30DPI, e demonstrou variação na produção da citonina nos tempos subsequentes. Já o grupo V (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) apresentou níveis baixos desta citocina em todos os períodos do experimento.

Na avaliação da produção do IFN- $\gamma$  pelos grupos experimentais entre os tempos, observa-se que o grupo III (Hc+) apresentou diferença estatisticamente significativa no tempo zero em relação aos 30DPI (p<0,05) com aumento nos níveis da citocina; no tempo 15 DPI quando comparado ao dia 180 (p<0,05); e no ponto 30 dias pós-inoculação quando relacionado aos tempos 150 e 180 (p<0,05), onde observa-se a diminuição dos níveis do IFN- $\gamma$ . No grupo IV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) de co-infecção houve diferença estatisticamente significativa com aumento do IFN- $\gamma$  no



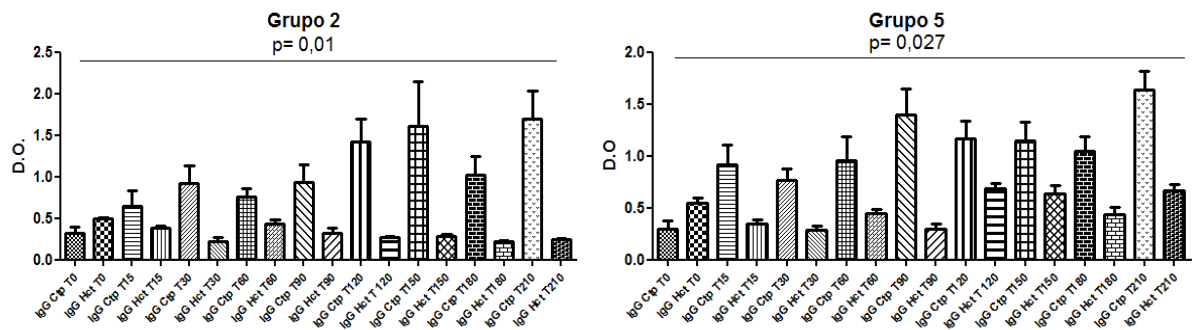
tempo zero com relação ao dia 30 ( $p < 0,05$ ); e em relação ao período de 30 DPI, quando comparado ao tempo 180 ( $p < 0,05$ ), constatou-se baixos níveis da citocina.



**Figura 4** – Cinética da produção *in vitro* de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) por células do sangue periférico após estímulo com 50ug dos antígenos somáticos do *H. contortus* ao longo de 210 dias de observação. Grupo GI: controle negativo; grupo GII (Cp+); grupo GIII (Hc+); grupo GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e grupo GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>). Asteriscos indicam significância ( $p < 0,05$ ).

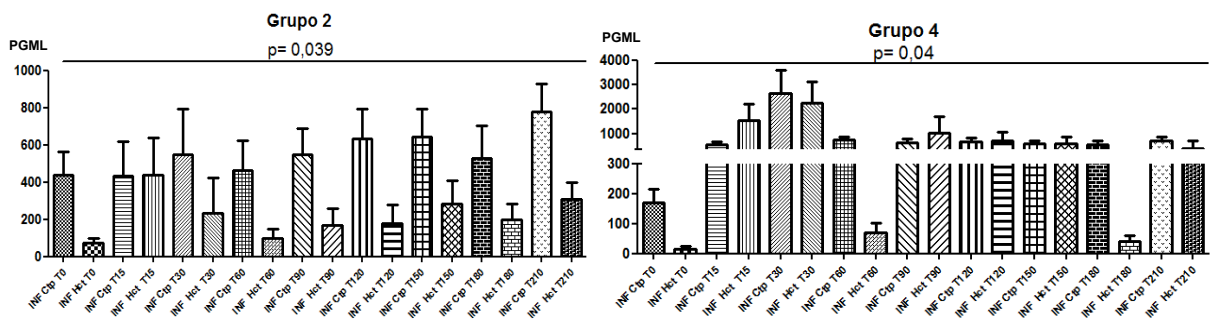
#### 5.3.5 Correlação da produção de IgG anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus* e a produção *in vitro* de IFN- $\gamma$ em cultura de sangue total estimulada por antígenos secretados/excretados de *C. pseudotuberculosis* e antígeno somático de *H. contortus*

A correlação entre produção de IgG anti-*C. pseudotuberculosis* e anti-*H. contortus* nos nove pontos de coleta (Figura 5), dos grupos controle positivo de *C. pseudotuberculosis* (GII) e o de co-infecção GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>), apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). O grupo II apresentou variação nos níveis de IgG anti-*C. pseudotuberculosis* ao longo dos tempos, com maior expressão nos 150 e 210DPI. E em relação aos anticorpos IgG anti-*H. contortus*, estes se mantiveram em níveis baixos e constantes. O grupo V apresentou uma redução discreta dos níveis de IgG anti-*C. pseudotuberculosis* após os 90 dias até o ponto 180 DPI. E uma elevação discreta nos níveis de IgG anti-*H. contortus* a partir dos 120DPI.



**Figura 5** – Correlação da cinética da produção de IgG total específica anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* (Ctp) e anti-*Haemonchus contortus* (Hct) ao longo de 210 dias de observação, nos grupos G2 (n=6) controle positivo de *C. pseudotuberculosis* e G5 (n=6) de co-infecção com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>90</sub>). Com significância estatística em todos os pontos de coleta ( $p < 0,05$ ).

A figura 6 representa a correlação entre produção de IFN- $\gamma$  para *C. pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus* em todos os pontos, do grupo GII (Cp +) e do GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) de co-infecção, os quais apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). No grupo II os níveis de IFN- $\gamma$  para *C. pseudotuberculosis* mantiveram-se elevados a partir dos 30 DPI, em relação aos níveis da citocina produzida pelo nematódeo. Enquanto, que o grupo GIV nos períodos 30 e 60 DPI os níveis de IFN- $\gamma$  para *C. pseudotuberculosis* foram mais expressivo, que os de IFN- $\gamma$  para o *H. contortus*. E nos períodos seguintes se mantiveram constantes.

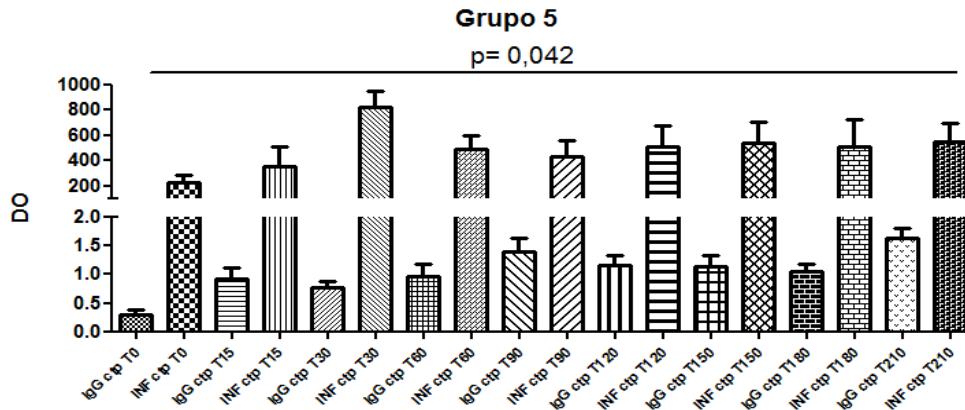


**Figura 6** – Correlação da cinética da produção *in vitro* de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) para *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Ctp) e *Haemonchus contortus* (Hct) ao longo de 210 dias de observação, nos grupos G2 (n=6) controle positivo de *C. pseudotuberculosis* e grupo G4 (n=6) de co-infecção com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>0</sub>). Com significância estatística em todos os pontos de coleta ( $p < 0,05$ ).

A correlação dos níveis de IFN- $\gamma$  e produção da IgG anti- *H. contortus* nos grupos experimentais em todos os períodos de coleta, não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Na correlação entre produção de IFN- $\gamma$  e os níveis de IgG anti-*C. pseudotuberculosis* dos animais do grupo GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) em todos os tempos de

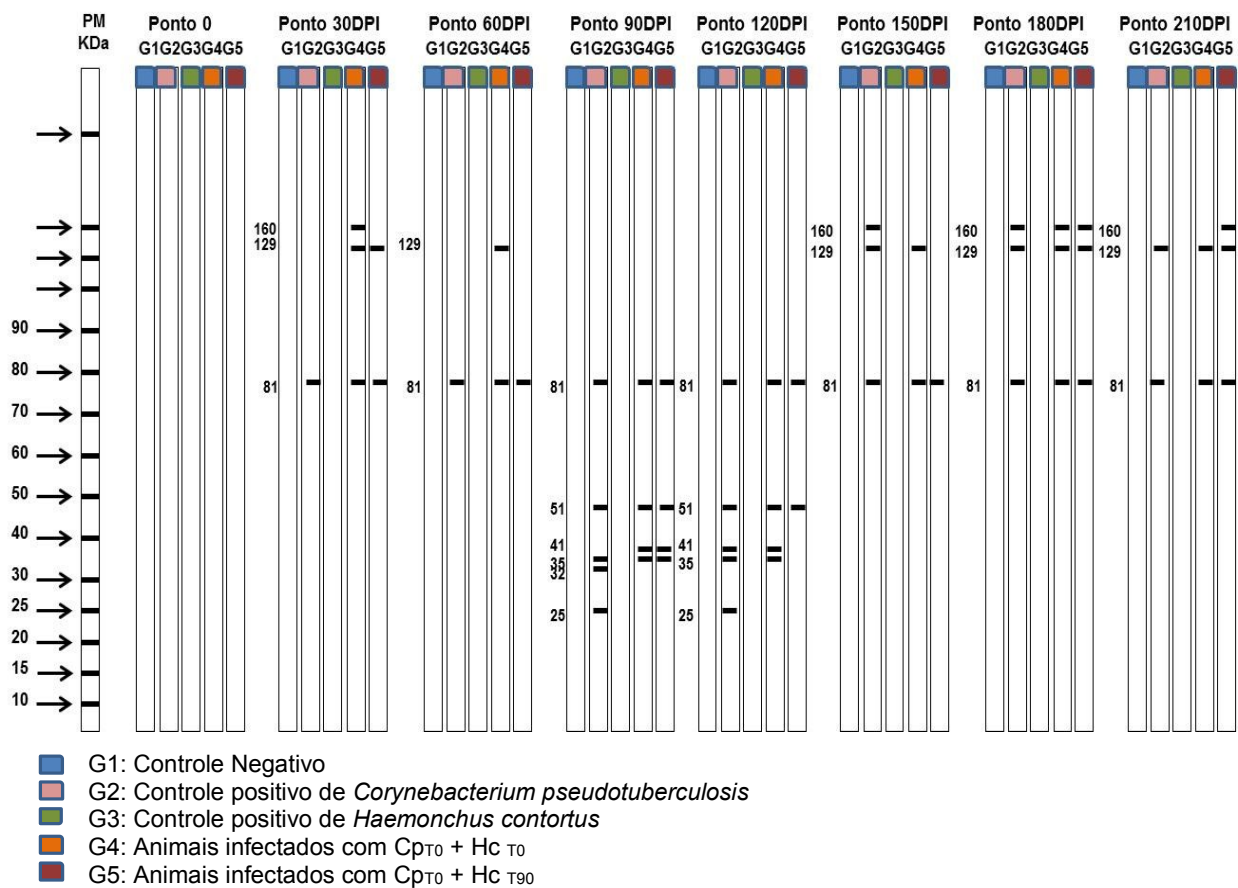
coleta, demonstrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), com elevados e constantes níveis de  $\text{IFN-}\gamma$  no decorrer dos períodos (Figura 7), em relação aos títulos de anticorpos IgG.



**Figura 7-** Correlação da cinética da produção *in vitro* de interferon-gama ( $\text{IFN-}\gamma$ ) e de IgG total específica anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* (Ctp) ao longo de 210 dias do grupo G5 ( $n=6$ ) de co-infecção com *C. pseudotuberculosis* ( $T_0$ ) e *H. contortus* ( $T_{90}$ ). Com significância estatística em todos os pontos de coleta ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.6 Reconhecimento antigênico de proteínas secretadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através do western blotting

Os achados quanto ao reconhecimento de frações antigênicas a partir de pool dos soros dos cinco grupos experimentais, ao longo de 210 dias (Figura 8). Nenhum dos grupos apresentou reconhecimento antigênico no dia zero do experimento; contudo, os animais dos grupos GII ( $\text{Cp}+$ ), GIV ( $\text{Cp}_{T0}+\text{Hc}_{T0}$ ) e GV ( $\text{Cp}_{T0}+\text{Hc}_{T90}$ ) apresentaram reconhecimento antigênico a partir dos 30 DPI. Apesar das bandas terem sido fracamente reveladas, foi possível observar-se o reconhecimento de oito bandas com peso molecular estimado de 25, 32, 35, 41, 51, 81, 129 e 160 kDa. Estas bandas apresentaram taxas de reconhecimento variando de 33,3 a 100%, ao longo do experimento (Tabela 1).



**Figura 8** – Representação esquemática dos resultados do *western blotting* para o reconhecimento antigênico de proteínas secretadas/excretadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no *pool* de soros dos animais dos grupos experimentais, ao longo dos 210 dias.

**Tabela1-** Sumário de reconhecimento antigênico de proteínas secretadas/excretadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* nos grupos de caprinos experimentalmente infectados.

Antígeno (KDa)	Grupos experimentais					Percentual nos grupos infectados (%)
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	
160	-	X	-	X	X	100
129	-	X	-	X	X	100
81	-	X	-	X	X	100
51	-	X	-	X	X	100
41	-	X	-	X	X	100
35	-	X	-	X	X	100
32	-	X	-	-	-	33,3
25	-	X	-	-	-	33,3

G1: Controle Negativo

G2: Controle positivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

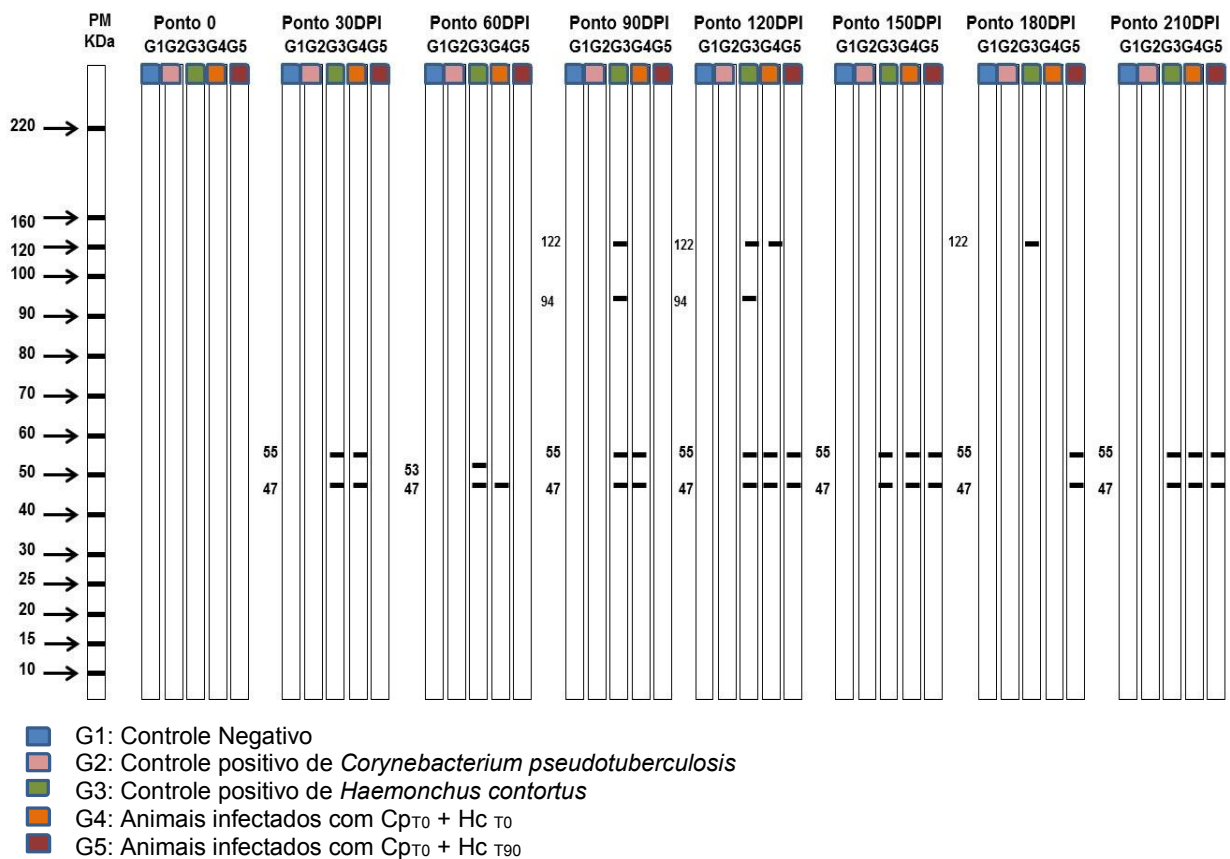
G3: Controle positivo de *Haemonchus contortus*

G4: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T0</sub>

G5: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T90</sub>

### 5.3.7 Reconhecimento antigênico de proteínas somáticas de *Haemonchus contortus* através de Western blotting

A figura 9 representa a análise pelo Western blotting, para a resposta imune IgG contra o *H. contortus*. Foi reconhecidas cinco proteínas com peso molecular de aproximadamente 47, 53, 55, 94 e 122kDa, no pool de soros dos caprinos sugerindo a capacidade imunogênica. No dia zero do experimento, nenhum dos grupos apresentou reconhecimento antigênico; entretanto, os animais dos grupos GIII (Hc+), GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) apresentaram reconhecimento antigênico a partir dos 30 DPI, embora as bandas tenham sido reveladas fracamente. As proteínas antigênicas, ao longo do experimento apresentaram taxas de reconhecimento variando de 33,3 a 100% (Tabela 2).



**Figura 9** – Representação esquemática dos resultados do *western blotting* para o reconhecimento antigênico de proteínas somáticas de *Haemonchus contortus* no pool de soros dos animais dos grupos experimentais, ao longo dos 210 dias.

**Tabela 2-** Sumário de reconhecimento antigênico de proteínas somáticas de *Haemonchus contortus* nos grupos de caprinos experimentalmente infectados.

Antígeno (KDa)	Grupos experimentais					Percentual nos grupos infectados (%)
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	
122	-	-	X	X	-	66,7
94	-	-	X	-	-	33,3
55	-	-	X	X	X	100
53	-	-	X	-	-	33,3
47	-	-	X	X	X	100

G1: Controle Negativo

G2: Controle positivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

G3: Controle positivo de *Haemonchus contortus*

G4: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T0</sub>

G5: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T90</sub>

### 5.3.8 Técnica de contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

Os resultados a seguir (tabela 3), representam a média e o desvio padrão da contagem de ovos liberados nas fezes dos animais dos grupos experimentais no decorrer dos 210 dias (Tabela 3). Levando-se em conta que a partir dos 30 DPI nos grupos III (Hc+) e GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>); e 120 dias no grupo GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) identificamos carga parasitária.

Observamos que os níveis de anticorpos IgG contra o nematódeo nos grupos de co-infecção (GIV e GV) mantiveram-se reduzidos e constantes, a partir dos 120 DPI (figura 2), e este período também correspondeu a maior expressão dos níveis de OPG nos animais destes grupos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Média e desvio padrão dos valores de OPG nos animais dos grupos experimentais ao longo de 210 dias de infecção pelo nematódeo *Haemonchus contortus*

Grupos	Ponto 0	15 DPI	30 DPI	60 DPI	90 DPI	120 DPI	150 DPI	180 DPI	210 DPI
GI	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
GII	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
GIII	0±0	0±0	617±723	817±1078	1167±1130	1333±1430	967±779	783±343	717±422
GIV	0±0	0±0	517±5081	517±1158	267±294	1217±1108	1850±3739	817±580	1800±1322
GV	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	9017±22923	10383±2776	1867±6222	1817±6149

GI: Controle Negativo

GII: Controle positivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

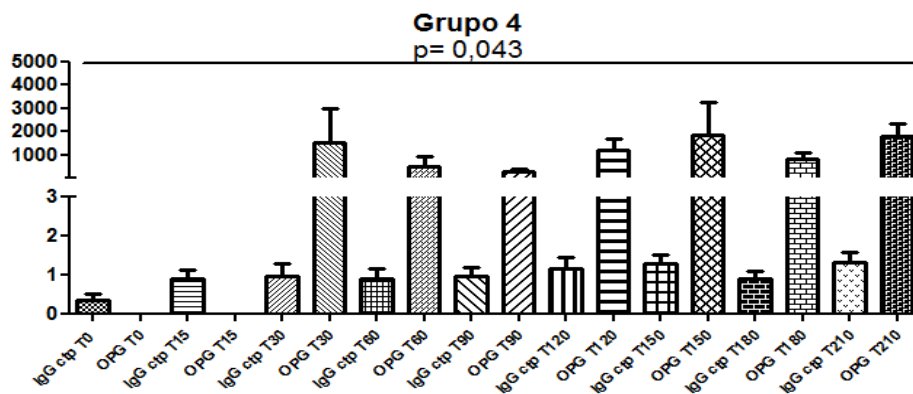
GIII: Controle positivo de *Haemonchus contortus*

GIV: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T0</sub>

GV: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T90</sub>

### 5.3.9 Correlação da produção de IgG total específica contra antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus* e o teste de OPG

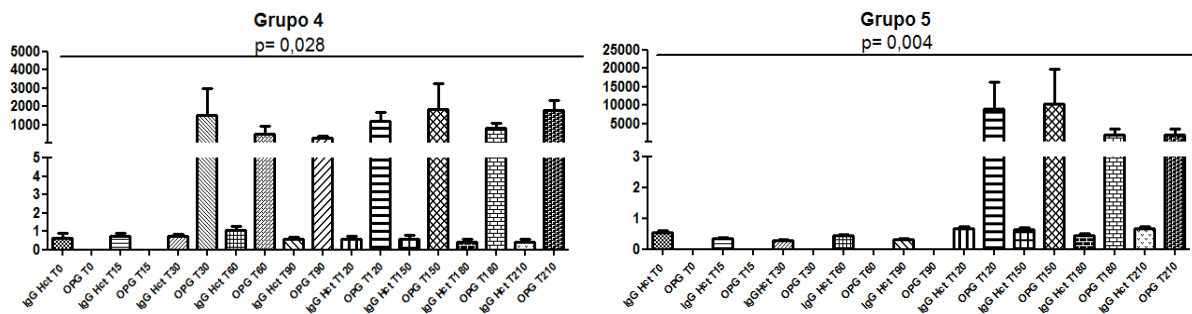
A correlação entre os valores de ovos liberados pelas fezes (OPG) e a produção da IgG anti- *C. pseudotuberculosis* em todos os pontos de coleta, esta representada na figura 10. O grupo de co-infecção GIV ( $Cp_{T0}+Hc_{T0}$ ), apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ). Neste grupo a partir dos 30 DPI a carga parasitária apresentou um aumento expressivo e constante até os 210 dias, e em contrapartida os níveis de IgG anti- *C. pseudotuberculosis* mantiveram-se baixos durante todo os períodos.



**Figura 10** – Correlação da cinética da produção de IgG total específica anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* (Ctp) e os valores do OPG ao longo de 210 dias de observação no grupo G4 (n=6) de co-infecção com *C. pseudotuberculosis* ( $T_0$ ) e *H. contortus* ( $T_0$ ). Com significância estatística em todos os pontos de coleta ( $p<0,05$ ).

A figura 11 representa a correlação entre os valores da análise parasitológica (OPG) e a produção de IgG anti-*Haemonchus contortus* em todos os pontos, com diferença estatisticamente significativa, nos grupos de co-infecção GIV ( $Cp_{T0}+Hc_{T0}$ ) ( $p<0,05$ ) e GV ( $Cp_{T0}+Hc_{T90}$ ) ( $p<0,01$ ). O grupo GIV apresentou a partir dos 30 DPI uma carga parasitária expressiva e regular até os 210 dias, entretanto os níveis de IgG anti-*H. contortus* mantiveram-se reduzidos e constantes durante todo o experimento. Os mesmos resultados foram observados no grupo GV ( $Cp_{T0}+Hc_{T90}$ ), após a infecção com o helminto no ponto 90 dias.





**Figura 11** – Correlação da cinética da produção de IgG total específica anti-*Haemonchus contortus* (Hct) e os valores do OPG ao longo de 210 dias de observação, nos grupos G4 (n=6) de co-infecção com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>0</sub>) e G5 (n=6) com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>90</sub>). Com significância estatística em todos os pontos de coleta (p<0,05).

### 5.3.10 Identificação da bactéria nas lesões presentes nos linfonodos e órgãos dos caprinos dos grupos experimentais.

As lesões granulomatosas, que caracterizam a Linfadenite Caseosa nos grupos de caprinos experimentalmente infectados estão descritas na tabela 4. As lesões nos linfonodos superficiais e nos órgãos foram observadas nos grupos GII (Cp+), GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>), na seguinte distribuição. No grupo GII foram observadas as lesões nos linfonodos superficiais (pré-escapular 16,7%; precural 16,7%) e nos órgãos (fígado 16,7%; rins 16,7%) dos caprinos na mesma frequência; os grupos de co-infecção GIV (pré-escapular 33,4%; fígado 16,7%; baço 16,7%) e GV (retrofaringeano 16,7%; pré-escapular 33,4%; precural 33,4%) apresentaram uma maior frequência de lesões nos linfonodos superficiais.

**Tabela 4:** Registros de lesões externas e internas características de Linfadenite Caseosa com isolamento e identificação microbiológica positiva para *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Grupos	Nº animais	Fígado (%)	Rins (%)	Baço (%)	Linf. retrofaringeano (%)	Linf. pré-escapular (%)	Linf. precural (%)
G1	4	-	-	-	-	-	-
G2	6	1(16,7%)	1 (16,7%)	-	-	1(16,7%)	1(16,7%)
G3	6	-	-	-	-	-	-
G4	6	1(16,7%)	-	1(16,7%)	-	2/6 (33,4%)	-
G5	6	-	-	-	1/6 (16,7%)	2/6 (33,4%)	2/6(33,4%)

G1: Controle Negativo

G2: Controle positivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

G3: Controle positivo de *Haemonchus contortus*

G4: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T0</sub>

G5: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T90</sub>

Quando foi comparada a produção de IgG com a presença das lesões granulomatosas nos animais pode-se observar que os caprinos dos grupos GII, GIV e GV tiveram uma produção de IgG elevada em todos os pontos após a inoculação (Figura1). Já com relação aos resultados da produção de IFN- $\gamma$  em função da



ausência ou ocorrência de lesão, observamos que os grupos IV e V de co-infecção, apresentaram um aumento do nível do IFN- $\gamma$  somente no tempo 30 dias pós-desafio. Entretanto no grupo II (Cp+) não houve produção de IFN- $\gamma$  expressiva, em quase todos os períodos de coletas (Figura 3).

## 5.4 DISCUSSÃO

### 5.4.1 Modelo da infecção experimental do *C. pseudotuberculosis* e co-infecção com o *Haemonchus contortus*

Neste estudo, o aumento na produção de anticorpos IgG anti-*C. pseudotuberculosis* nos grupos de co-infecção pelo nematódeo, esta relacionado a presença de granulomas nos linfonodos superficiais (retrofaríngeo, pré-escapular e pré-crural), e após o abate nos órgãos (fígado, rins e baço) (Tabela 4), sugerindo uma resposta humoral pouco eficiente na inibição do quadro clínico da enfermidade (figura 1). Logo, confirmando a teoria que uma expressiva resposta humoral contra o *C. pseudotuberculosis*, não é capaz de eliminar a infecção (FONTAINE, et al., 2006).

Nosso resultado discorda do estudo realizado por Paule *et al.* (2003), que observou elevados títulos de IgG após a infecção, porém sem apresentar sinais clínicos característicos nos linfonodos superficiais, mas somente nos órgãos e linfonodos internos. Entretanto, vale ressaltar que tanto a linhagem bacteriana quanto a dosagem da infecção foram diferentes.

O resultado relatado neste trabalho assemelha-se aos encontrados por Chirino-Zárraga *et al.* (2006) e Jung *et al.* (2015), quanto a utilização de uma cepa de alta patogenicidade do *C. pseudotuberculosis* na infecção de caprinos, frente à resposta imune humoral, produção de granulomas nos linfonodos superficiais parotídeo, mandibular, cervical, pré-escapular e subilíaco e a caracterização bacteriológica.

Os elevados níveis de anticorpos IgG anti-*C. pseudotuberculosis* visualizados em todos os grupos a partir dos 90 DPI, sugere a ocorrência da transmissão da bactéria por via aérea, através de aerossóis respiratórios que constituem uma importante rota de disseminação do microrganismo, uma vez que os

grupos experimentais foram mantidos em um sistema intensivo de criação (O'REILLY et al., 2010).

Na figura 2 deste estudo foi observado uma produção de anticorpos IgG anti-*H. contortus* em níveis constantes entre os grupos de co-infecção, em grande parte dos períodos, e estes resultados discordam aos encontrados por outros autores, que observaram variações na resposta imune humoral (SHAW et al.,1997; GOMÉZ-MUNHÓZ et al.,1998; MORAES, 2007).

O resultado observado neste trabalho, demonstra que a partir de determinado período os níveis de IgG contra o nematódeo nos grupos de co-infecção mantiveram-se reduzidos e constantes, e este período correspondeu a maior expressão dos níveis de OPG nos animais destes grupos (Tabela 3). Nosso resultado discorda do estudo de Nunes em 2012, no qual foi realizado o acompanhamento sorológico de caprinos naturalmente infetados pelo *H. contortus* e constatou-se níveis de IgG total diminuídos e constantes, provavelmente devido o controle do parasitismo exercido pela resposta imune dos animais. Embora se saiba que a resposta imune do hospedeiro pode limitar o estabelecimento da carga parasitária, pouco se conhece sobre a resposta imune contra helmintos em caprinos, pois escassos estudos são feitos neste modelo. E como no experimento foram utilizados caprinos SRD com diferentes padrões fenotípicos, nos grupos de co-infecção podem ter existido animais naturalmente susceptíveis ao nematódeo gastrointestinal, que não desenvolveram uma resposta imune eficiente capaz de controlar a carga parasitária e com isso a ovoposição, resultado semelhante foi encontrado por Shakya *et al.*(2009), em um experimento realizado com raças de ovinos susceptível e resistente a infecção pelo helminto.

Neste trabalho não foram visualizados sinais clínicos sugestivos da hemoncose (edema submandibular, anemia intensa nas mucosas ocular e gengival, diarreia e perda de peso), como observado por Bambou *et al.*, (2009), em caprinos infectados experimentalmente com as larvas infectantes L3 do *H. contortus*.

Nosso estudo se assemelha ao realizado por Meyer *et al.* (2005) e Paule *et al.* (2003), os quais descreveram uma resposta imune celular com desvio para a subpopulação Th1, a partir do elevado nível da citocina IFN- $\gamma$  em caprinos infectados experimentalmente pelo *C. pseudotuberculosis*, utilizando como estímulo *in vitro* dos antígenos secretados pela bactéria.

No estudo realizado por Rebouças *et al.* (2011), os caprinos e ovinos com sinais clínicos crônicos da Linfadenite Caseosa (CLA) apresentaram níveis elevados de IFN- $\gamma$ . Contudo, neste experimento o grupo IV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) de co-infecção, apresentou alto índice da citocina no tempo 30 DPI, e após este período ocorreu um decréscimo seguido de discreta flutuação do nível nos outros tempos. O grupo V (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>), mesmo após a infecção com o parasita no tempo 90, manteve os níveis da citocina constantes. E esta regularidade nos níveis do IFN- $\gamma$  associado à presença de granulomas nos linfonodos superficiais e nos órgãos destes animais na necropsia, pode sugerir uma imunomodulação da resposta imune celular (Figura 3). Uma vez que a redução ou inibição da resposta imune Th1 contra este microrganismo, permite a evolução desfavorável da LC nos animais.

As variações nos níveis de IFN- $\gamma$  contra a bactéria, observadas no grupo de co-infecção GIV pode ter influência de fatores como, o status de saúde do animal, o grau de disseminação bacteriana no organismo, bem como a heterogeneidade genética (PRESCOT *et al.*, 2002; SUNIL *et al.*, 2008). Uma vez que há evidências de variabilidade genética, para a resistência e suscetibilidade ao helminto entre raças e até entre indivíduos da mesma raça (GRENCIS, 2001; AMARANTE *et al.*, 2004; BAMBOU *et al.*, 2009).

Os resultados encontrados na figura 4 sugerem que a resposta imune celular expressiva dos grupos controle positivo GIII (Hc+) e de co-infecção GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>), nos primeiros períodos 30 DPI pode estar relacionada a existência de animais geneticamente susceptíveis a infecção pelo *H. contortus*. Resultados semelhantes foram descrito por Zaros *et al.*, (2010), que relataram uma polarização da resposta imune mediada por citocinas da subpopulação Th2 em bovinos resistentes (devido a um aumento de IL-4) , quanto por citocinas do perfil Th1 em bovinos suscetíveis (devido a um IFN- gama aumentado) infectados com *Haemonchus placei*. E também corrobora com outro estudo realizado por Gill *et al.*,( 2000), onde observaram que ovinos de raça susceptível à infecção apresentaram níveis elevados de IFN- $\gamma$ , quando comparados aos animais resistentes.

Ao ser realizado o reconhecimento antigênico foi identificado oito proteínas de *C. pseudotuberculosis* com pesos moleculares estimados de 25, 32, 35, 41, 51, 81,129 e160 kDa, reconhecidas pelos anticorpos IgG produzidos pelos animais testados (Figura 8). Nos trabalhos realizados anteriormente pelo nosso grupo de

pesquisa, com amostras de caprinos, foram identificadas bandas com peso molecular próximo, como no trabalho realizado por Paule *et al.* (2003) onde foram identificadas bandas de 33, 44, 55, 63 e 67 kDa nos animais infectados experimentalmente, e Moura-Costa *et al.* (2008) identificaram os antígenos de 28, 31, 43, 53, 64 e 67 kDa em seu experimento.

Neste estudo as proteínas 35, 41, 51, 81,129 e 160 kDa foram detectadas, e reagiram com 100% dos pools de soros testados sugerindo, a denominação de antígenos imunodominantes (Tabela 1). No trabalho descrito por Hoelzle *et al.* (2013), os antígenos do *C. pseudotuberculosis* com peso molecular de 150, 74, 48 e 30 kDa são imunodominantes, tanto em caprinos quanto em ovinos infectados. A proteína de 30 kDa que corresponde a exotoxina fosfolipase D (PLD), foi reconhecida em 100% dos grupos de caprinos.

A figura 9 ilustra os achados quanto ao reconhecimento de frações antigênicas a partir do pool de soros dos caprinos dos grupos experimentais. Quanto a resposta imune IgG contra o *H. contortus* foram reconhecidas cinco proteínas com peso molecular de aproximadamente 47, 53, 55, 94 e 122kDa, oriundas do parasita adulto lisado. Em um estudo realizado por Muñoz-Guzmán *et al* (2006), utilizando o lisado da larva infectante L3 do *H. contortus* foram identificadas onze bandas (416, 298, 182, 114, 95, 78, 57, 45, 39, 29 e 19 kD) em ovinos parasitados.

Neste estudo as proteínas antigênicas de aproximadamente 47 e 55 kDa reagiram em 100% dos pool de soros testados sugerindo, que provavelmente são epítomos imunodominantes do *H. contortus*, sendo que nestes grupos também foram identificadas cargas parasitárias elevadas (Tabela 3). Os dados deste estudo se assemelham aos encontrados por Santos em 2012, onde as bandas com peso molecular de aproximadamente 45 e 50 kDa foram reconhecidas pelos anticorpos de ovinos infectados naturalmente, e com alta carga parasitária. Em um trabalho realizado por Kaur *et al.*, (2002), foram identificados três antígenos imunodominantes (120,2; 91,2 e 85,1 kDa) de *H. contortus*, que possuem peso molecular próximo as bandas encontradas neste trabalho 122 e 94 kDa.

Sabendo-se que a resposta imune humoral, com desvio para a subpopulação Th2, atua efetivamente para o controle da carga parasitária na infecção por helmintos em ovinos e caprinos. O acompanhamento da infecção pelo helminto através análise fecal (tabela 3), onde foi observado valores elevados do OPG nos grupos de co-infecção GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) a partir dos 30 dias pós-

infecção. Sugere-se assim, que dentre os caprinos SRD utilizados podem existir animais susceptíveis ao *H. contortus*, nos grupos de co-infecção, que não desenvolveram uma resposta imune humoral eficiente no controle da infecção (BAMBOU et al., 2009). E uma vez, que o desvio da resposta Th2 para Th1, acaba por comprometer a habilidade do hospedeiro em expulsar os parasitos do organismo, este fato acaba por favorecer a continuidade da ovoposição pela fêmea do nematódeo (ZAROS e VIEIRA, 2008; DERVISHI et al., 2011).

Os registros de lesões externas e internas características de Linfadenite Caseosa estão dispostos na Tabela 4. Uma notável ausência de sinais clínicos característicos da infecção ao longo do experimento foi observada e pode ser resultante de uma resposta aguda precoce frente à infecção pelo *C. pseudotuberculosis* em caprinos, antes do surgimento das lesões da LC (JEBER et al., 2016). No momento do abate dos animais, verificou-se a ocorrência de uma maior frequência de abscessos internos nos grupos de co-infecção GIV (pré-escapular 33,4%; fígado 16,7%; baço 16,7%) e GV (retrofaringeano 16,7%; pré-escapular 33,4%; precural 33,4%), os quais foram isolados e identificados microbiologicamente o *C. pseudotuberculosis*. A ocorrência de granulomas nos linfonodos superficiais e internos, além do comprometimento de órgãos como fígado e pulmões na infecção experimental com cepa virulenta do *C. pseudotuberculosis* em caprinos, já foi descritos em estudos feito por Moura-Costa et al. (2008) e Johnson et al. (1993).

#### 5.4.2 Correlação entre os parâmetros de avaliação da infecção experimental pelo *C. pseudotuberculosis* e co-infecção com o *Haemonchus contortus*

Em relação à correlação entre produção de IgG anti-*C. pseudotuberculosis* e anti-*H. contortus* em caprinos, neste trabalho foi identificada uma expressiva resposta imune humoral contra bactéria nos animais do grupo V (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>), até o ponto 90 dias, em comparação a produção de IgG anti-*H. contortus*, que começa a apresentar um discreto aumento a partir do 120 dias (Figura 5). Este resultado corrobora com o relato de Fontaine et al. (2006) e Vale et al. (2003), que descreveram uma expressiva resposta humoral frente a infecção pela bactéria, mas incapaz de debelar a infecção. De acordo com Moura-Costa et al. (2008) ao correlacionarem os resultados de resposta humoral com os achados *post mortem*

de lesões caseosas, os altos títulos de anticorpos IgG anti-*C. pseudotuberculosis* não estiveram associados à indução de proteção.

A resposta imune celular, principalmente do tipo Th1, é a mais predominante na proteção contra a infecção por *C. pseudotuberculosis* (LAN et. al., 1998; SIMMONS et al., 1998). Este fato é confirmado na correlação entre produção de IFN- $\gamma$  para *C. pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus* no GII (Cp+), que apresentou elevados níveis da citocina para o *C. pseudotuberculosis*, em relação aos níveis da citocina produzida pelo nematódeo. Já no grupo GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>), apresentou níveis expressivo do IFN- $\gamma$  para *C. pseudotuberculosis* somente nos períodos 30 e 60 DPI, em relação aos níveis da citocina produzida pelo estímulo do nematódeo. E nos períodos subsequentes os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos contra ambos os agentes se mantiveram constantes, sugerindo a ocorrência de uma imunoregulação (Figura 6).

De acordo com Grecis (2001), a susceptibilidade à infecção crônica pelo nematódeo gastrointestinal, é mediada através de uma resposta Th1, caracterizada pela produção da citocina IFN- $\gamma$ , que pode comprometer a capacidade do hospedeiro em expulsar o nematódeo da mucosa abomasal dos animais.

Neste trabalho a correlação entre produção de IFN- $\gamma$  e os níveis de IgG anti-*C. pseudotuberculosis* dos animais no decorrer do experimento, apresentou no grupo GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) níveis altos e constantes da citocina, em relação aos títulos de anticorpos IgG (Figura 7).

A figura 10 representa a correlação entre os valores de ovos liberados pelas fezes (OPG) e a produção de produção da IgG anti- *C. pseudotuberculosis* em todos os pontos. No GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) a partir dos 30 DPI a carga parasitária apresentou um aumento expressivo e mantendo-se constante até os 210 dias, em contrapartida os níveis de IgG anti-*C. pseudotuberculosis* mantiveram níveis baixos durante todo o experimento. Sugerindo que quando a co-infecção dos animais ocorre no mesmo período a resposta imune celular Th1 predomina, resultando em uma inibição da resposta humoral contra a bactéria, enquanto à carga parasitária se torna expressiva na infecção pelo helminto.

Na correlação entre os valores da análise parasitológica (OPG) e a produção de IgG anti-*H. contortus*, em todos os pontos (figura 11). O grupo GIV apresentou a partir dos 30 DPI uma carga parasitária expressiva e regular até os 210 dias,

entretanto os níveis de IgG anti-*H. contortus* mantiveram reduzidos e constantes durante todo o experimento. O mesmo resultado foi observado no grupo GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>), após a infecção com o helminto no ponto 90 dias. Sugerindo que uma resposta imune humoral contra o parasita pouco eficiente, em razão da existência de animais susceptíveis geneticamente a infecção. Nosso resultado assemelha-se ao estudo realizado Moraes em 2007, o qual foi observado que níveis variáveis de anticorpos IgG anti-*H. contortus*, não tinha relação com os valores do OPG nos animais infectados. Tal fato também foi observado por Bambou *et al.*,(2008), em um estudo realizado com caprinos infectados experimentalmente com as larvas infectantes L3 do *H. contortus*, e que não apresentaram sinais clínicos sugestivos do quadro de hemoncose. Contudo, os animais susceptíveis geneticamente apresentaram uma contagem OPG extremamente elevada em comparação com os animais resistentes, embora os níveis de IgG não tenham sido diferentes entre os animais. Estes estudos corroboram com o resultado encontrado por Shakya *et al.*(2009), ao realizar uma infecção experimental pelo *H. contortus* em raças de ovinos geneticamente susceptível e resistente, onde o número de ovos por grama de fezes (OPG), apresentava-se mais elevado nos animais susceptíveis, que possuíam uma resposta imune humoral reduzida.

Nosso trabalho vai de encontro ao estudo realizado por Nunes em 2012, no qual foi realizado o acompanhamento sorológico de caprinos naturalmente infectados pelo *H. contortus*, e constatou-se que os elevados valores de IgG e o reduzido número do OPG correspondeu a uma eficiente resposta imune humoral no controle da infecção pelo nematódeo.

Segundo Grecis (2001), a susceptibilidade genética à infecção pelo helminto, apresenta um desvio para a resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela produção da citocina IFN- $\gamma$ , que pode comprometer a capacidade do hospedeiro em expulsar o nematódeo da mucosa abomasal dos animais.

Nossos resultados sugerem que animais infectados com o *C. pseudotuberculosis* e co-infectados com o *H. contortus* podem manifestar o quadro clínico característico da Linfadenite Caseosa. Em um trabalho realizado por Bentwich *et al.*, (1999), na região do Cabo na África do Sul, foi observado uma elevada ocorrência de indivíduos acometidos pela tuberculose, enfermidade causada pela infecção com *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria filogeneticamente semelhante ao *C. pseudotuberculosis*. Esta manifestação

acentuada da doença deve-se a elevada ocorrência de co-infecção dos indivíduos por helmintos, que desviam a resposta imune para o perfil Th2 sugerindo que, esta infecção pode ser um importante fator para a manifestação mais rápida do quadro clínico da tuberculose.

## 5.5. CONCLUSÕES

Frente ao protocolo experimental desenvolvido e aos resultados obtidos, conclui-se que:

- Respostas heterogêneas foram constadas pós a inoculação da cepa virulenta C57 do *C. pseudotuberculosis* e das larvas infectantes do nematódeo *Haemonchus contortus*, pois a interação entre patógenos e hospedeiro promoveu a ativação tanto a resposta humoral como celular com variação nos valores de IgG e IFN- $\gamma$ ;
- Os dados descrevem que na ocorrência da co-infecção os caprinos acometidos pelo *C. pseudotuberculosis*, apresentaram uma reduzida resposta imune celular e uma expressiva resposta humoral contra a bactéria. E este fato pode estar relacionado à evolução desfavorável da Linfadenite Caseosa nos animais;
- Os caprinos que foram co-infectados no mesmo período manifestaram uma resposta imune celular expressiva e uma reduzida resposta humoral contra o *H. contortus* nos primeiros 30 dias pós-infecção, sendo que a partir deste período os níveis de OPG apresentam-se elevados. Este fato propõe a influência da herdabilidade genética dos animais na infecção pelo nematódeo;
- No reconhecimento antigênico da linhagem selvagem do *C. pseudotuberculosis* nos grupos de co-infecção foram identificadas oito proteínas. Sendo que as com pesos moleculares estimados de 35, 41, 51, 81, 129 e 160 kDa podem ser consideradas imunodominantes reagindo nos soros dos animais destes grupos;
- Os antígenos do *H. contortus* identificados com peso molecular estimado de 47, 53, 55, 94 e 122kDa, reconhecidas por anticorpos IgG, podem ser consideradas imunodominantes reagindo nos soros dos animais co-infetados;



- Embora os dados presentes neste trabalho sejam preliminares, estes podem indicar a interferência na resposta vacinal contra *C. pseudotuberculosis* nos animais infectados pelo helminto. Logo, mais estudos devem ser realizados para elucidar esta questão.

## 5.6. REFERÊNCIAS

ALVES, F.S.F., OLANDER, H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Veterinária Notícias**, v.5, p.69–75, 1999.

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

BAMBOU, J.C.; DE LA CHEVROTIÈRE, C.; VARO, H.; ARQUET, R.; KOOYMAN, F.N.; MANDONNET, N. Serum antibody responses in Creole kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.158, n.4, p.311–318, 2008.

BAMBOU, J.C.; GONZÁLEZ-GARCÍA, E.; CHEVROTIÈRE, C.; ARQUET, R.; VACHIÉRYC, N.; MANDONNET, N. Peripheral immune response in resistant and susceptible Creole kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v.82, p.34–39, 2009.

BELLABY, T.; ROBINSON, K.; WAKELIN, D. Induction of differential Thelper- cell responses in mice infected with variants of the parasitic nematode *Trichuris muris*. **Infect. Immun.** v.64, n.3, p.791–795, 1996.

BENTWICH, Z.; KALINKOVICH, A.; WEISMAN, Z.; BORKOW, G.; BEYERS, N.; BEYERS, A. D. Can eradication of helminthic infections change the face of AIDS and tuberculosis? **Trends Immunology Today**, v.2, n.11, p. 485-487, 1999.

BORGES, F.A. **Ação reversora *in vitro* e *in vivo* do Verapamil sobre a resistência de *Haemonchus contortus* à ivermectina**. Tese de Doutorado, Medicina Veterinária (Patologia Animal) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp - Jaboticabal.2007.

CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA COSTA, L.F.; PAULE, B.J.A.; VALE, V.L.; REGIS, L.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAEER, R.; MEYER, R.

Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **R. Ci. méd. biol.**, v. 2, n.1, p. 88-93, 2003.

CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; SCARAMELLI, A.; REY-VALEIRÓN, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. **Small Ruminant Research**, v.65, p.170–175, 2006.

DERCKSEN DP, BRINKHOF JMA, DEKKER-NOOREN T, MAANEN K, BODE CF. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Vet Microbiol.** v.75 p.167-175, 2000.

DERVISHI, E.; URIARTE, J.; VALDERRÁBANO, J.; CALVO, J.H. Structural and functional characterisation of the ovine interferon gamma ( *IFNG*) gene: Its role in nematodes resistance in Rasa Aragonesa ewes. **Veterinary Immunology and Immunopathology** , v.141, p.100-108, 2011.

ELSE, K.J.; FINKELMAN, F.D. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. **Int. J. Parasitol.** v.28, n.8, p.1145–1158, 1998.

FRAGA, R. Avaliação de aspectos da relação parasito-hospedeiro durante a infecção com linhagem selvagem e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Brasil**, 2012.

FONTAINE, M.C.; BAIRD, G.; CONNOR, K.M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v.24, p. 5986-5996, 2006.

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

GOMEZ-MUÑOS, M.T.; CUQUERELLA, M.; FUENTE, C.; GÓMEZ-IGLESIAS, L.A.; ALUNDA, J.M. Infection-induced protection against *Haemonchus contortus* in Merino and Manchego sheep - relationship to serum antibody response. **Journal of Veterinary Medicine - Series B**, v.45, p.449-459, 1998.

GORDON, H.M.C.L.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J. Com. Sci. and Indst. Organizatio**, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

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

HOELZLE, L.E.; SCHERRER, T.; MUNTWYLER, J.; WITTENBRINK, M.M.; PHILIPP, W.; HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.359-365, 2013.

JEBER, Z.K.H.; MOHDJIN, Z.; JESSE, F.F.; SAHAREE, A.A.; SABRI, J.; YUSOFF, R.; WAHID, H. Influence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection on level of acute phase proteins in goats. **BMC Veterinary Research**, n.12, v.48, p.1-5, 2016.

JOHNSON, E.H.; SANTA ROSA, J.; KASS, P.H. Immunizing effects of live *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats. **Small Ruminant Research**, v.12, p. 349-356, 1993.

JUNG, BY; LEE, SH; KIM, HY; BYUN, JW; SHIN, DH; KIM, D; KWAK, D. Serology and clinical relevance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). **Trop. Anim. Health. Prod.**, v. 47, p.657-661, 2015.

KAUR, K.; KAPUR, J.; PARMAR, A.; SOOD, M.L. Identification of Immunodominant Antigens of Adult *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). **Journal of Veterinary Medical**, v. 49, p. 260-262, 2002.

LAN, D.T.B.; TANIGUCHI, S.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; NAKANE, A. Role of endogenous tumour necrosis factor alpha: a gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. **Microbiol. Immunol.** v.42, p.863–870, 1998.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p.265–275, 1951.

MACIEL, F. Manejo sanitário de caprinos e ovinos, **Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte**, Brasil, p. 19-22, 2006.

MACRAE, J.C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proc. Nutr. Soc.**, v.52, p.12-130, 1993.

MACKINNON, K. M.; ZAJAC, A. M.; KOOYMAN, F. N. J.; NOTTER, D. R. Differences in immune parameters are associated with resistance to *Haemonchus contortus* in Caribbean hair sheep. **Parasite Immunology**, v.32, p.484-493, 2010.

MELO, A. Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no Estado do Ceará, Brasil. **Tese de Doutorado, Universidade Federal da Ceará**, 2005.

MEYER, R. *Corynebacterium tuberculosis* e seu hospedeiro: aspectos da imunidade, do imunodiagnóstico e da prevalência. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Brasil**, 2003.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.107, p.249-254, 2005.

MORAES, F.R. **Padronização de ensaio imunoenzimático para detecção de imunoglobulinas G e E ovinas anti-Haemonchus contortus, seu uso na seleção de animais resistentes à verminose gastrintestinal e na compreensão dos fenômenos imunológicos que decorrem da interação entre hospedeiro e parasito.** 2007. 154f. Tese (Doutorado em processos biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MOURA-COSTA, L.F., BAHIA, R.C., CARMINATI, R., VALE, V.L.C., PAULE, B.J.A., PORTELA, R.W., FREIRE, S.M., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., BARRETO, L.M.S., MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde' goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 131-141, 2008.

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

NUNES, G. D. L. **Investigação das atividades biológicas do extrato aquoso de *Poincianella pyramidalis* no controle da hemoncose caprina.** 2012. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 2012.

O'REILLY, K.M., MEDLEY, G.F., GREEN, L.E. The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: A mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscesses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, p. 115–126, 2010.

PAULE, B.J.A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L.F.; CARMINATI, R.; BAHIA, C.R.; VALE, V.L.C.; MOURA-COSTA, L.F. ; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; GOES, A.M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-g production, IgG avidity and antigen

recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.96, 129-139, 2003.

PÉPIN, M.; SEOW, H. F.; CORNER, L.; ROTHEL, J. S.; HODGSON, A.L. M.; WOOD, P.R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Vet. Res.**, v. 28, p. 149-163, 1997.

PRESCOTT, J.F., MENZIES, P.I., HWANG, Y.T. An interferon-gama assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Veterinary Microbiology**, v.88, p.287–297, 2002.

PROST, A.; NEBOUT, M.; ROUGEMONT, A. Lepromatous leprosy and onchocerciasis. **Br. Med. J.**, v.1, p.589–590, 1979.

REBOUÇAS, M. F.; PORTELA, R.W.; LIMA, D.D.; LOUREIRO, D. BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L.F.; VALE, V.L.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **J. Vet. Diagn. Invest.** v. 23, p.213-220, 2011.

RIFFKIN, M.; SEOW, H.F.; JACKSON, D.; BROWN, L.; WOOD, P. Defence against the immune barrage: helminth survival strategies. **Immunol. Cell Biol.** v.74, n.6, p.564–574,1996.

RODRIGUES, G.C. **Avaliação da resposta imune em ovinos co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus***. 2015. 44p. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde pela Rede de Tecnologia do Nordeste). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, 2015.

SACCO, R.E.; HAGEN, M.; SANDOR, M.; WEINSTOCK, J.V.; LYNCH, R.G. Established TH1 granulomatous responses induced by active Mycobacterium avium

infection switch to TH2 following challenge with *Schistosoma mansoni*. *Clin. Immunol.* 104, 274–281, 2002.

SANTOS, S.C.O. **Proteases de *Haemonchus Contortus*: Hemoglobínólise e Resposta Imune em Caprinos Naturalmente Infectados**. 2012. 51p. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2012.

SHAW, R.J.; McNEILL, M.M.; GATEHOUSE, T.K.; DOUCH, P.G.C.; Quantification of total sheep IgE concentration using anti-ovine IgE monoclonal antibodies in a enzyme immunoassay. **Veterinary immunology and Immunopathology**, v.5, p.253-265, 1997.

SHAKYA, K.P.; MILLER, J.E.; HOROHOV, D.W. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.57-66, 2009.

SIMMONS C. P.; DUNSTAN S. I. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infect. Immun.**, v.66, n.2, p.474-479, 1998.

SOUZA, A. Avaliação *in vitro* de aspectos da resposta imune à *Corynebacterium pseudotuberculosis* atenuada e selvagem. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Brasil**, 2014.

SUNIL, V. P.I.; MENZIES, P.E.; SHEWEN, J.; PRESCOTT. F. Performance of a whole blood interferon-gamma assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Microbiology**, v.128, n.3-4, p.288-297, 2008.

UENO, H. Cultivo quantitativo de larvas de nematódeos gastrintestinais de ruminantes com tentativa para pré-diagnóstico. Ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, p.138, 1995.



URBAN, JFJr, MADDEN KB, SVETIC A, CHEEVER A, TROTTA PP, GAUSE WC, KATONA IM, FINKELMAN FD. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. **Immunological Reviews**, v. 127, p. 205-220, 1992

VALE, V; FREIRE, S; RIBEIRO, M ;REGIS, L.; Vale, V.; PAULE, B.; R. CARMINATI; R. BAHIA; MOURA-COSTA L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, v.2, n.2, p.192-200, 2003.

WHITLOCK H.V. Some modifications of the McMaster eggs counting technique and apparatus. **J. Counc. Sci. Ind. Res.**, v.21, p.177-180, 1948.

ZAROS, L.G.; VIEIRA, L.S. Citocinas na resposta a endoparasitoses gastrointestinais em ruminantes. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2008.

ZAROS, L.G.; BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.; ROCHA, R.A.; KOOYMAN, F.N.; DE VRIES, E.; COUTINHO, L.L. Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. **Vet. Parasitol.** v.171, n.1–2, p.68–73, 2010.

## 6. MANUSCRITO 2.

### HEMONCOSE EM CAPRINOS: EFEITOS DA CO-INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Haemonchus contortus* E *Corynebacterium pseudotuberculosis* NA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO

#### Resumo

Este estudo objetivou avaliar nos caprinos infectados com o *Corynebacterium pseudotuberculosis* e co-infectados pelo *Haemonchus contortus*, a influência desta condição na infecção no abomaso pelo nematódeo, através de indicadores da resposta imune local na mucosa abomasal dos caprinos. Foram utilizados neste experimento 28 caprinos num sistema de confinamento, separados em cinco grupos. O primeiro grupo (GI) foi determinado como controle negativo contendo quatro animais; o segundo grupo (GII) e o grupo terceiro (GIII) como controle positivo para *C. pseudotuberculosis* e *H. contortus*, respectivamente, enquanto que o quarto e quinto grupo (GIV e GV) foram inoculados com a bactéria e o nematódeo em diferentes períodos, cada um destes grupos contendo seis animais. Amostras de fezes foram colhidas durante um período de oito meses, e os animais foram necropsiados aos 210 dias. A técnica parasitológica de OPG, a contagem de parasitas na mucosa abomasal e a morfométrica das células inflamatórias presentes nesta mucosa foram realizadas para avaliação da infecção do nematódeo. Os resultados demonstraram elevados valores do OPG nos grupos de co-infecção GIV e GV, após os 30 dias de inoculação do helminto. E a constatação de uma infecção experimental efetiva foi confirmada a partir da identificação e contagem dos parasitas no abomaso dos caprinos, após a necropsia. Na análise morfométrica observou-se que os linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e macrófagos estavam presentes na mucosa abomasal dos animais em todos os grupos, enquanto somente os grupos GIII, GIV e GV apresentaram mastócitos. No GII foi identificada uma representativa população de neutrófilos. Quanto à quantificação e comparação das células inflamatórias entre os grupos experimentais observamos que a população de linfócitos, não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Vale salientar que os grupos GIII e GV apresentaram um elevado número de eosinófilos em relação ao grupo GIV, no qual a co-infecção ocorreu simultaneamente ( $p < 0,5$ );

uma população elevada de mastócitos foi identificada no GV, em comparação aos grupos GI, GII e GIII ( $p < 0,05$ ). Contudo, em relação ao grupo GIV, este apresentou reduzido número de mastócitos ( $p < 0,01$ ). E com relação à população de neutrófilos, somente o grupo GII apresentou uma contagem representativa desta população celular, em relação aos outros grupos ( $p < 0,05$ ). Concluiu-se que a resposta imune inata mediada por células inflamatórias na mucosa abomasal dos caprinos durante a co-infecção, tem papel importante na inibição da hemoncose nos caprinos.

Palavras-chave: *Haemonchus contortus*, hemoncose, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, co-infecção, caprinos.

## 6.1 INTRODUÇÃO

A hemoncose é uma enfermidade parasitária de elevada ocorrência nos rebanhos de ovinos e caprinos, é causada pelo nematódeo *Haemonchus contortus*, medindo nos machos de 10 a 20 mm e nas fêmeas de 18 a 30 mm (CLIMENI et al., 2008). Este parasita é hematófago, perfuram os vasos sanguíneos da parede do abomaso consumindo entre 0,05 a 0,08mL de sangue/dia. As fêmeas de pequenos ruminantes parasitadas no período de parto e lactação podem apresentar uma elevação da ovipostura pelos parasitas, oriundos de larvas em hipobiose, resultando em um aumento da carga parasitária (CARVALHO et al., 2001).

Quando o parasita infecta o animal, em quantidade suficiente, pode causar baixa conversão alimentar, subdesenvolvimento, menor produção de leite, perda de peso, diarreia, anemia, edema submandibular e até levar ao óbito (PUGH, 2004). No entanto, levantamentos realizados revelam que mais de 80% da carga parasitária de caprinos é composta por *Haemonchus contortus* (GIRÃO et al., 1992; AROSEMENA et al., 1999). No estado da Bahia, Almeida et al. (1997) encontraram uma frequência de 92% do gênero *Haemonchus* em cultivos de fezes de caprinos, naturalmente infectados.

A faixa etária mais sensível a hemoncose são os animais jovens, que adquirem resistência durante os primeiros 12 meses de vida, após repetidas exposições à infecção (COLDITZ et al., 1996). O parasita ocorre nas regiões tropicais e subtropicais, a exemplo do Brasil (LOPES et al., 2013). No ambiente os ovos das fêmeas são liberados junto com as fezes dos animais nas pastagens, onde

ocorre o desenvolvimento das larvas infectantes (L3), durante aproximadamente sete dias, contaminando as pastagens (FORTES, 2004).

A redução no número de nematódeos na mucosa abomasal durante a infecção baseia-se principalmente na ação da resposta imune Th2 (LACROUX et al., 2006; SHAKYA et al., 2009). O tipo de resposta imune que induz a produção de várias citocinas (MEEUSEN et al., 2005); contribui na diferenciação de células B que leva à expressão de uma forte resposta por anticorpos, tais como IgE, IgG1, IgG4 e IgA (BAMBOU et al., 2008; DE LA CHEVROTIERE et al., 2012); que leva a degranulação de mastócitos e citotoxicidade por eosinófilos, especialmente na mucosa abomasal, o nicho do parasitismo pelo nematódeo, resultando no ataque e erradicação do helminto (TEREFE et al., 2009; MEEUSEN et al., 2005).

Estudos mostram que animais geneticamente resistentes montam uma resposta imune mediada por células específicas (mastócitos, eosinófilos e leucócitos globulares) na mucosa abomasal mais eficiente contra o parasita, do que os animais susceptíveis, os quais podem apresentar um aumento inicial e redução contínua dos eosinófilos na mucosa abomasal frente à infecção sugerindo uma resposta do tipo Th2 inicial, e um desvio para a resposta Th1 (GILL, 1994; MUÑOZ-GUZMÁN et al., 2006; SHAKYA et al., 2009; CHEN et al., 2012).

Portanto, considerando as informações apresentadas, este trabalho tem como objetivo avaliar os indicadores da resposta imune local na mucosa abomasal dos caprinos, frente à infecção pelo nematódeo *Haemonchus contortus* e a influência destes na ocorrência da hemoncose.

## **6.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1 Comitê de Ética**

Este trabalho foi aprovado pelo CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA), sob protocolo nº052/2014.

### **6.2.2 Animais**

Os caprinos utilizados nos experimentos foram animais sem raça definida (SRD), com idade entre três a seis meses, ambos os sexos, com sorologia negativa para *C. pseudotuberculosis*.

A carga parasitária dos animais foi mensurada a partir das fezes colhidas e avaliadas através da técnica Gordon e Whitlock (1939). Antes do início do experimento todos os caprinos foram vermifugados com antiparasitário Albendazole (Valbazen<sup>1</sup>, Pfizer, New York, NY), na dose 2 mg/kg de peso vivo por via oral. Foram realizados três aplicações dos anti-helmínticos respeitando um intervalo de 15 dias entre cada aplicação, de acordo com o espectro de ação. Um novo exame parasitológico das fezes foi realizado para confirmar se a carga parasitária encontrava-se zerada; garantindo que os caprinos encontravam-se livres de *Haemonchus contortus*.

Os animais foram mantidos em um sistema intensivo de criação, na unidade experimental do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, em Salinas da Margarida, Bahia, (12°52'16"S e 38°45'52"O). Com alimentação balanceada a base de ração industrial, volumoso a base de feno e água *ad libitum*. Os animais foram examinados clinicamente antes e após a inoculação, e acompanhados mensalmente ao longo dos 210 dias do experimento, para a inspeção visual da mucosa ocular e oral.

#### 6.2.2.1 Grupos experimentais

Os caprinos foram distribuídos em cinco grupos. O primeiro grupo (GI) ( $n = 4$ ) com animais livres de *C. pseudotuberculosis* (Cp) e do *H. contortus* (Hc); o segundo grupo (GII) ( $n=6$ ) correspondeu ao controle positivo de infecção por *C. pseudotuberculosis*, sendo infectado experimentalmente com a linhagem selvagem C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via intradérmica no dia zero; o terceiro grupo (GIII) ( $n = 6$ ) animais infectados pelo *H. contortus*, por via oral utilizando as larvas infectantes (L3) no dia zero; o quarto grupo (GIV) de co-infecção (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T0</sub>), com seis animais infectados com *C. pseudotuberculosis* e *H. contortus* no dia zero e o quinto grupo (GV) de co-infecção (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T90</sub>), com seis animais previamente infectados com *C. pseudotuberculosis* no dia zero, e com *H. contortus* nos 90 dias pós-infecção.

O acompanhamento dos exames coprológicos (OPG) ocorreu nos dias 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210, com coletas mensais de fezes, diretamente da ampola retal dos animais. Após o período de observação de oito meses, os animais foram abatidos no matadouro frigorífico Baby bode em Feira de Santana-BA, através

do método humanitário de atordoamento por eletronarcose. E no abatedouro no processo de evisceração o abomaso foi coletado e devidamente acondicionado, para a realização da quantificação dos parasitos presentes na mucosa abomasal e realização da análise histopatológica deste tecido.

### 6.2.3. Linhagem selvagem do *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Para a infecção dos caprinos utilizou-se a linhagem selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (C57), cepa isolada de um caprino naturalmente infectado e com sorologia para Linfadenite Caseosa e identificada por biologia molecular. Esta cepa é mantida na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (ICS-UFBA). A linhagem bacteriana foi semeada em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) e em seguida cultivada a 37°C, por 48 horas. Para a inoculação nos animais ajustou-se a quantidade de UFC, após centrifugação e lavagem da cultura (MOURA-COSTA et al., 2008).

### 6.2.4 O nematódeo *Haemonchus contortus* e seus antígenos

#### 6.2.4.1 Obtenção das larvas infectantes (L<sub>3</sub>) do *Haemonchus contortus*

Para a obtenção das larvas infectantes (L<sub>3</sub>) do *Haemonchus contortus* utilizadas na infecção experimental. Foram coletados parasitos adultos do abomaso de caprinos e ovinos abatidos no frigorífico Baby bode, em Feira de Santana-BA. Estes parasitos foram acondicionados em recipientes com solução fisiológica (0,09%), e encaminhados para Laboratório de Parasitologia do ICS-UFBA.

No laboratório os parasitos foram colocados em um recipiente com solução fisiológica (0,09%) aquecida (em torno de 45°C), para que as fêmeas realizassem a ovoposição (BORGES, 2007). Para a realização da técnica de coprocultura utilizou-se como matéria orgânica quatro gramas de fezes autoclavadas de ovinos misturadas à maravalha, na proporção de mais ou menos duas partes de maravalha para uma de fezes, e adicionou a solução contendo os ovos do nematódeo obtidos após a ovoposição, além do macerado dos parasitos. Em seguida, cada uma das misturas foi colocada em copos de vidro. As culturas foram mantidas na estufa à

temperatura 37°C, por um período de sete dias, tempo necessário para a evolução das larvas infectantes (L3) do parasito, de acordo ao descrito por Ueno (1995).

#### 6.2.5 Protocolo de inoculação do *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus*

A inoculação do *C. pseudotuberculosis* foi realizada através da via subcutânea, na região pré-escapular direita, numa dose de 1 mL ( $4,4 \times 10^7$  UFC). E a infecção do *H. contortus*, foi realizada pela via oral utilizando as larvas infectantes (L3), na dosagem de 10 mL/VO (1.000 larvas L3/ mL) em cada animal (MACKINNON et al., 2010).

#### 6.2.6 Exames parasitológicos dos caprinos

As análises coprológicas das amostras de fezes foram realizadas mensalmente, com o intuito de acompanhar a infecção experimental pelo nematóide *Haemonchus contortus* nos caprinos.

##### 6.2.6.1 Técnica de contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

Para a realização da técnica, utilizou-se cerca de 2 gramas de fezes dos caprinos diluídas em solução hipersaturada de sal (58mL), onde verificou-se a densidade necessária para a flutuação dos ovos. Aguardando dois minutos para os ovos flutuarem-na câmara de McMaster, e poder assim dá início a contagem dos ovos do parasito contidos nas áreas delimitadas da câmara, com auxílio do microscópio óptico (objetiva de 10) (GORDON e WHITLOCK, 1939; WHITLOCK, 1948).

#### 6.2.7 Necropsia dos caprinos

No final dos sete meses após o desafio, os animais foram encaminhados para o abatedouro frigorífico Baby Bode, no município de Feira de Santana, Bahia, onde foram abatidos através do método humanitário de atordoamento por eletronarcore. Foi coletado o abomaso dos animais e acondicionado em frascos com solução de

formol a 10%, para posterior identificação e quantificação dos parasitos presentes na mucosa abomasal e realização da análise histopatológica deste tecido.

#### 6.2.8 Identificação e contagem dos parasitos no abomaso

Após o abate dos caprinos, o abomaso de cada animal foi removido das carcaças e colocado em um recipiente de plástico estéril com 2000 mL de solução de formaldeído a 10%, e encaminhado para Laboratório de Parasitologia do ICS-UFBA. O abomaso foi aberto longitudinalmente e os parasitos na fase adulta foram retirados e quantificados utilizando a técnica descrita por Le Jambre (1995).

#### 6.2.9 Histopatológico dos cortes do tecido abomasal

Para a realização da análise morfométrica, foi realizado um corte da mucosa abomasal de cada animal dos grupos experimentais, fixados em formol a 10%, e em seguida corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) (Sigma). Para posterior identificação das células inflamatórias, como os eosinófilos e leucócitos globulares (BALIC et al., 2000a).

#### 6.2.10 Morfometria celular da mucosa abomasal

As análises foram realizadas a fim de determinar o número de linfócitos, eosinófilos, mastócitos e leucócitos na lâmina própria da mucosa do abomaso, o número de células numa área de 0,28 mm x 0,28 mm. Foram quantificados 10 campos diferentes, para cada animal dos grupos experimentais com observação 400x magnitude (MACKINNON et al., 2010).

#### 6.2.11 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 17.0 para Windows. Na distribuição normal dos resultados das análises morfométricas utilizou-se o teste ANOVA com pós-hoc de Tukey.



## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Técnica de contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

Os resultados demonstram a média e o desvio padrão da contagem de ovos liberados nas fezes dos animais dos grupos experimentais no decorrer dos 210 dias (tabela 1). Os grupos apresentaram carga parasitária, a partir dos 30 dias pós-infecção nos grupos GIII e GIV e mantiveram-se em todos os pontos. O GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) apresentou carga parasitária, 30 dias após a infecção com o nematódeo. O grupo III (Hc+) nos 60 dias, e os grupos de co-infecção GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) nos 120 dias apresentaram valores elevados do OPG.

**Tabela 1:** Média e desvio padrão dos valores de OPG nos animais dos grupos experimentais ao longo de 210 dias de infecção pelo nematódeo *Haemonchus contortus*.

Grupos	Ponto 0	15 DPI	30 DPI	60 DPI	90 DPI	120 DPI	150 DPI	180 DPI	210 DPI
GI	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
GII	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
GIII	0±0	0±0	617±723	817±1078	1167±1130	1333±1430	967±779	783±343	717±422
GIV	0±0	0±0	517±5081	517±1158	267±294	1217±1108	1850±3739	817±580	1800±1322
GV	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	9017±22923	10383±2776	1867±6222	1817±6149

GI: Controle Negativo

GII: Controle positivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

GIII: Controle positivo de *Haemonchus contortus*

GIV: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T0</sub>

GV: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T90</sub>

### 6.3.2 Contagem dos parasitos *Haemonchus contortus* na mucosa abomasal dos caprinos

A tabela 2 descreve a identificação e contagem dos parasitas no abomaso dos animais, após a realização da necropsia no final do experimento aos 210 dias. Foi observado no grupo controle positivo para *H. contortus* (GIII) e nos grupos co-infectados GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) um elevado número de parasitos adultos na mucosa abomasal dos caprinos, confirmando assim a eficácia da infecção experimental realizada.

**Tabela 2:** Identificação e contagem dos parasitas adultos na mucosa abomasal dos caprinos nos grupos experimentais

Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV		Grupo V	
Animais	Parasitas	Animais	Parasitas	Animais	Parasitas	Animais	Parasitas	Animais	Parasitas
229	0	250	0	224	40	241	4	230	17
215	0	254	0	213	14	256	1	238	4
214	0	225	0	222	1	251	42	249	1
217	0	245	0	235	35	243	17	252	900
-	-	226	0	227	41	244	12	236	31
-	-	216	0	205	42	212	17	228	8
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>Total</b>	<b>173</b>	<b>Total</b>	<b>93</b>	<b>Total</b>	<b>961</b>

GI: Controle Negativo

GII: Controle positivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

GIII: Controle positivo de *Haemonchus contortus*

GIV: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T0</sub>

GV: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T90</sub>

Necropsia dos animais aos 210 dias

### 6.3.3 Análises morfométricas da mucosa abomasal dos caprinos

Os resultados da tabela 3 ilustram a média e o desvio padrão obtidos na análise morfométrica das células inflamatórias presentes na mucosa abomasal dos caprinos no final do experimento, aos 210 dias. Foi observado que todos os grupos apresentavam linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e macrófagos. E que somente os grupos III (Hc+), GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) apresentaram mastócitos. E somente no GII (Cp+) foram identificados neutrófilos.

**Tabela 3** – Média e desvio padrão da morfometria de células inflamatórias na mucosa abomasal dos caprinos após o desafio com o nematódeo *Haemonchus contortus*

Grupos	Linfócitos	Eosinófilos	Mastócitos	Plasmócitos	Macrófagos	Neutrófilos
GI	1.076 ± 726	48 ± 80	0 ± 0	46 ± 31	19 ± 4,3	-
GII	730 ± 292,5	14,5 ± 19,7	0 ± 0	14 ± 5,9	30 ± 18	112 ± 104
GIII	1.121 ± 741,8	276 ± 84,6	112 ± 95,7	61 ± 47,3	36 ± 17	-
GIV	835 ± 713,5	90 ± 66	83 ± 83	13 ± 8,1	26 ± 14,3	-
GV	568 ± 187,7	269 ± 164,8	302 ± 167,5	33 ± 24,6	39 ± 46,1	-

GI: Controle Negativo

GII: Controle positivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

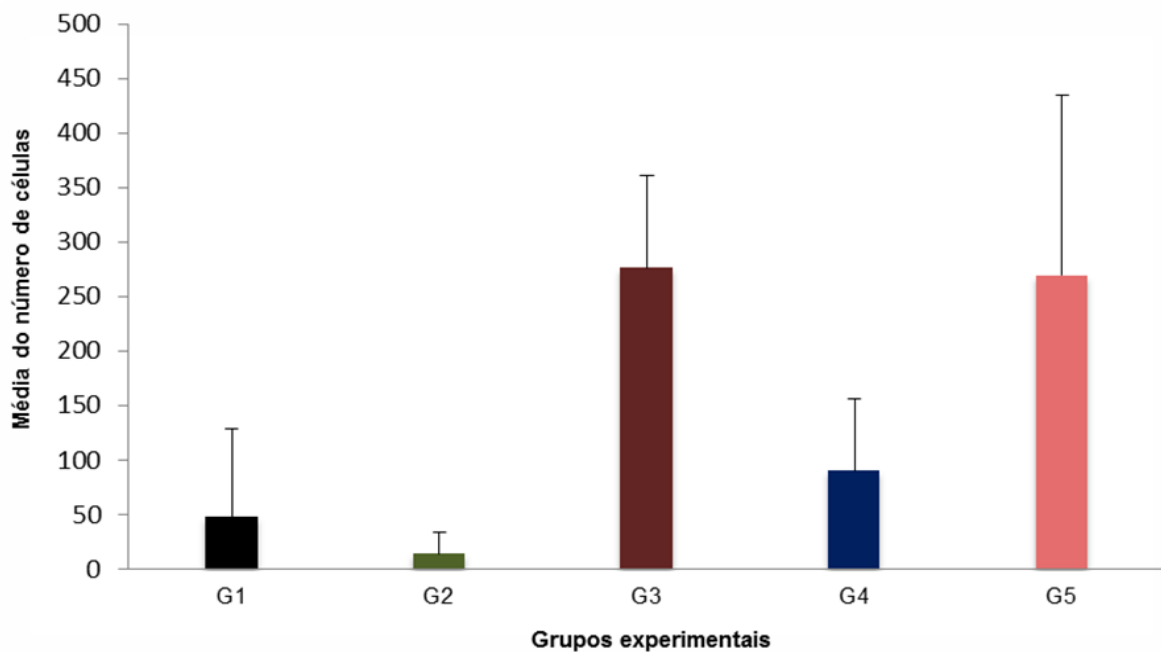
GIII: Controle positivo de *Haemonchus contortus*

GIV: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T0</sub>

GV: Animais infectados com Cp<sub>T0</sub> + Hc<sub>T90</sub>

Necropsia dos animais aos 210 dias

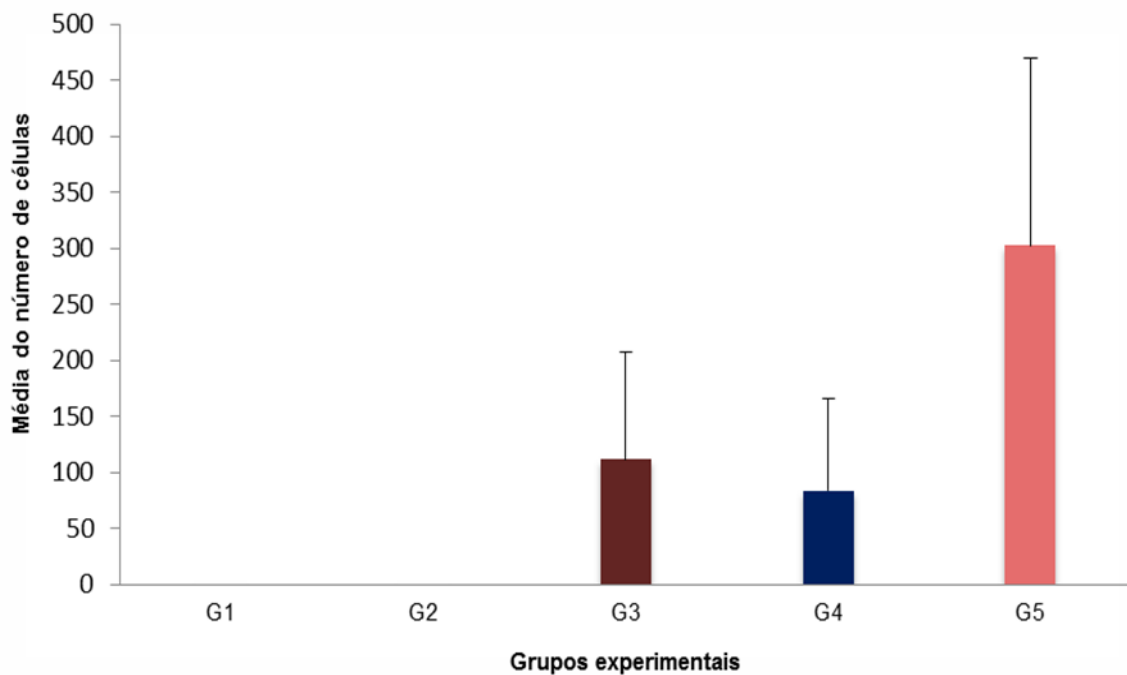
Na figura 1 foi observado que a população de eosinófilos presentes na mucosa abomasal dos caprinos. O GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) apresentou um elevado número de eosinófilos em relação aos grupos GII (Cp+) e GIV (Cp<sub>T0</sub>+ Hc<sub>T0</sub>). Já o grupo III (Hc+) apresentou um aumento no número de eosinófilos na mucosa abomasal, em relação ao grupo GIV e GV. Todos os grupos apresentarão diferença estatística significativa (p<0,05)



**Figura 1** – Contagem da população de eosinófilos na mucosa abomasal dos caprinos abatidos no ponto 210 dias do experimento. Grupo G1 (n=4): Controle negativo; Grupo G2 (n=6): Infectados com *C. pseudotuberculosis*; Grupo G3 (n=6): Infectados com *H. contortus*; Grupo G4 (n=6): Co-infectados com *C. pseudotuberculosis* e *H. contortus* (T<sub>0</sub>) e Grupo G5 (n=6): Co-infectados com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>90</sub>). Há significância estatística ( $p < 0,05$ ).

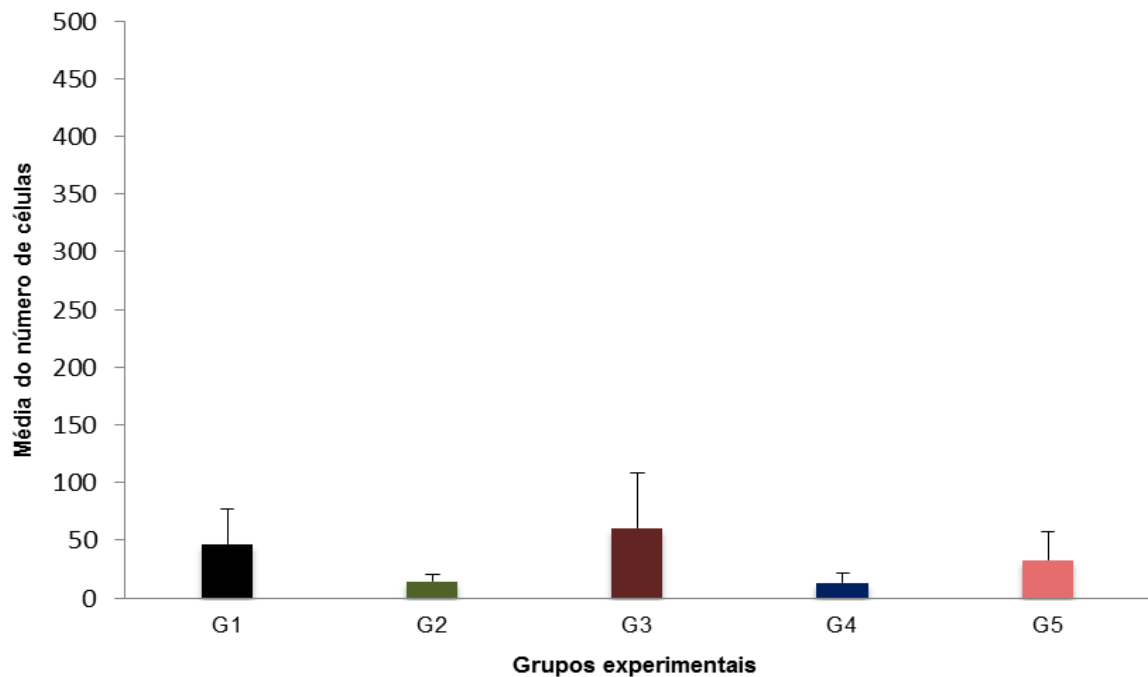
A população de mastócitos na mucosa abomasal dos animais (figura 2) apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais, onde o grupo V de co-infecção (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) apresentou um elevado número de mastócitos em relação aos grupos GIII (Hc+) e GIV(Cp<sub>T0</sub>+ Hc<sub>T0</sub>).

Quanto à quantificação de linfócitos, observou-se um número expressivo da população celular em todos os grupos, embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 2** – Contagem da população de mastócitos na mucosa abomasal dos caprinos abatidos no ponto 210 dias do experimento. Grupo G1 (n=4): Controle negativo; Grupo G 2 (n=6): Infectados com *C. pseudotuberculosis*; Grupo G 3 (n=6): Infectados com *H. contortus*; Grupo G 4 (n=6): Co-infectados com *C. pseudotuberculosis* e *H. contortus* (T<sub>0</sub>) e Grupo G 5 (n=6): Co-infectados com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>90</sub>). Há significância estatística ( $p < 0,05$ ).

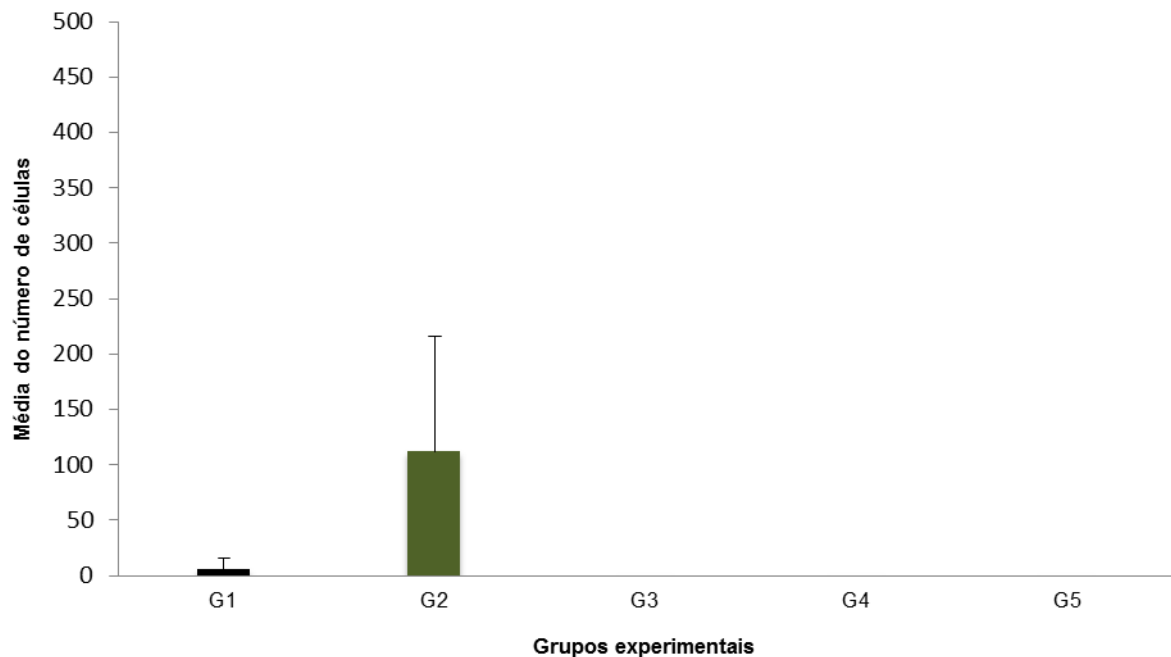
A figura 3 representa a contagem da população de plasmócitos na mucosa dos animais, onde observa-se a presença desta população celular em todos os grupos experimentais. Com maior expressão no grupo GIII (Hc+) em relação ao GIV (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>). E ao avaliar a população celular entre os grupos de co-infecção, constatou-se que o GV apresenta um maior número plasmócitos, quando comparado ao GIV. Havendo diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3** – Contagem da população de plasmócitos na mucosa abomasal dos caprinos abatidos no ponto 210 dias do experimento. Grupo G 3 (n=6): Infectados com *H. contortus* e Grupo G 4 (n=6): Co-infectados com *C. pseudotuberculosis* e *H. contortus* (T<sub>0</sub>). Há significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Quanto à identificação e quantificação de macrófagos, esta população celular foi observada em todos os grupos, com maior expressão nos animais do GV (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T90</sub>) em relação aos do GIV (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T0</sub>), embora não tenha diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Na identificação e contagem da população de neutrófilos na mucosa dos caprinos (figura 4), foi observado o aumento do número destas células nos animais inoculados somente com a bactéria (GII), em relação aos grupos GI (controle negativo), GIII (Hc+), G IV (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T0</sub>) e G V (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T90</sub>); com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4** – Contagem da população de neutrófilos na mucosa abomusal dos caprinos abatidos no ponto 210 dias do experimento. Grupo G1 (n=4): Controle negativo; Grupo G 2 (n=6): Infectados com *C. pseudotuberculosis*; Grupo G 3 (n=6): Infectados com *H. contortus*; Grupo G 4 (n=6): Co-infectados com *C. pseudotuberculosis* e *H. contortus* (T<sub>0</sub>) e Grupo G 5 (n=6): Co-infectados com *C. pseudotuberculosis* (T<sub>0</sub>) e *H. contortus* (T<sub>90</sub>). Há significância estatística ( $p < 0,05$ ).

## 6.4 DISCUSSÃO

Uma das alternativas de controle hemoncose é a seleção de animais resistentes à infecção pelo helminto. Existem várias maneiras de se avaliar a resistência ao nematódeo gastrintestinal, os dois mais utilizados são a contagem de ovos nas fezes (OPG) e a quantidade de parasitas na fase adulta presentes na mucosa abomusal, dos animais avaliados (GILL 1994; HOODA et al., 1999).

Os resultados demonstraram um aumento nos valores do OPG dos grupos GIII (Hc+), GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) após os 30 dias de inoculação do helminto, e estes valores mantiveram-se elevados em todos os tempos (tabela 1). Estudos realizados por Qamar e Maqbool (2012) e Bambou *et al.*, (2008), descreveram que caprinos infectados experimentalmente com as larvas infectantes L3 do *H. contortus*, apresentaram uma contagem OPG extremamente elevada nos animais geneticamente susceptíveis, quando comparados aos resistentes.

Após a realização da necropsia, para a identificação e contagem dos parasitas na mucosa abomasal dos caprinos neste experimento (tabela 2). Foi observado que o grupo GIII (Hc+) e os grupos co-infectados GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) apresentaram um elevado número de parasitos adultos na mucosa abomasal dos animais, confirmando assim a eficácia da infecção experimental realizada. Resultados semelhantes foram encontrados por Muñoz-Guzmán *et al.*, (2006); Shakya *et al.*,(2011) e Ortolani *et al.*,(2013), em ovinos infectados experimentalmente pelo *H. contortus*, os quais apresentaram uma alta contagem do número total de nematódeos recuperados no abomaso dos animais.

Neste experimento não foram observados sinais clínicos da hemoncose. E este fato pode ser justificado pela ocorrência de uma expressiva resposta imune inata contra o *H. contortus*, onde as células leucocitárias (eosinófilos, mastócitos, monócitos e leucócitos globulares) atuam induzindo um processo inflamatório agudo na mucosa do abomaso em caprinos e ovinos (LEDER e WELLER, 2000; BALIC et al, 2000; PÉREZ et al., 2008; SHAKYA, et al., 2009). Ao realizarmos a análise morfométrica das células inflamatórias presentes na mucosa abomasal dos caprinos no final do experimento, aos 210 dias (tabela 3), foi observado que todos os grupos apresentavam linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e macrófagos. E que somente os grupos GIII (Hc+), GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) apresentavam mastócitos.

Estes resultados corroboram com os estudos realizados por Ortolani *et al.*, (2013) e Gill *et al.*, (2000), em ovinos infectados experimentalmente com as larvas L3 do parasito, os quais apresentam após a eutanásia uma contagem elevada de mastócitos, eosinófilos e leucócitos globulares na mucosa do abomaso. No estudo realizado por Kemp *et al.*, (2009) foi observada uma rápida resposta de rejeição ou exclusão imune pelos mastócitos e leucócitos globulares, dos parasitas presentes na mucosa abomasal em ovinos hipersensibilizados, a partir da infecção repetida com as larvas infectantes L3 do *Haemonchus contortus*.

Quanto a presença da população de macrófagos na mucosa a maior expressão destas células foram observadas nos animais do GV (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T90</sub>), que foram desafiados pelo parasita mais tardiamente, em relação aos do GIV (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T0</sub>). E este resultado deve-se ao fato, que nos estágios iniciais da inoculação do helminto os macrófagos são ativados, exercendo uma importante linha de defesa contra o parasita, através da fagocitose e bem como de sua remoção (STITES *et al.*, 2000).

Quanto à quantificação de linfócitos, este trabalho demonstrou um número expressivo da população celular em todos os grupos experimentais. Este fato pode ser justificado, a partir da ativação dos linfócitos Th2 para a indução da resposta imune humoral (BALIC *et al.*, 2000b).

Vale salientar que neste experimento (figura1), o grupo GIV apresentou um reduzido número de eosinófilos na mucosa abomasal, quando comparado aos grupos GIII (Hc+) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>), sugerindo uma provável imunomodulação para a resposta do tipo TH1, quando a co-infecção ocorre simultaneamente. Enquanto que os grupos controle negativo (GI) e GII (Cp+) apresentam uma contagem muito baixa de eosinófilos.

Na condição genética de resistência ou suscetibilidade à infecção pelo nematódeo em caprinos e ovinos, também esta relacionada à imunidade mediada pelas células leucocitárias, na mucosa abomasal dos animais (MANDONNET *et al.*, 2001; AMARANTE *et al.*, 2004; SHAKYA *et al.*, 2009). Um estudo realizado com raças de ovinos resistente e sensível à infecção pelo *H. contortus*, demonstrou um elevado número de eosinófilos ( $p < 0.05$ ) na mucosa abomasal nos animais resistentes, condizendo ao desenvolvimento e manutenção de uma resposta imune do tipo Th2. Enquanto, que na mucosa de ovinos susceptíveis o aumento inicial e redução contínua dos eosinófilos sugerem uma resposta do tipo Th2 inicial, e um desvio para a resposta do tipo Th1 (MUÑOZ-GUZMÁN *et al.*, 2006).

Sabe-se que a população de mastócitos na mucosa abomasal de pequenos ruminantes, infectados pelo helminto, é fundamental na expulsão destes parasitas do organismo dos animais (GILL *et al.*, 1994; KEMP *et al.*, 2009). Os resultados da figura 2 demonstraram um elevado número de mastócitos no grupo V (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>) de co-infecção, em comparação aos grupos GI, GII e GIII, sugerindo uma resposta imune do tipo Th2. Entretanto, em relação ao grupo GIV este apresentou um baixo número de mastócitos na mucosa, sugerindo assim que a ocorrência de infecções simultâneas nos animais pode levar a uma imunomodulação na resposta contra o helminto.

Em um estudo realizado por Zaros *et al.*, (2010) com um grupo de bovinos da raça Nelore, que apresentaram resistente para *Haemonchus placei* observou-se uma elevada contagem de mastócitos na mucosa do abomaso destes animais, em relação ao grupo susceptível. O mesmo foi observado por Shakya *et al.*, (2011), em um experimento realizado em ovinos resistentes a infecção pelo *H. contortus*.



Ao realizarmos a contagem da população de neutrófilos na mucosa abomasal dos caprinos experimentalmente infectados (figura 4), foi observado que somente os animais do grupo GII (Cp+) apresentavam uma elevada contagem desta população celular, em relação a todos os outros grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). A ausência da identificação destas células nos grupos G III (Hc+), GIV (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub> x Hc<sub>T90</sub>) (tabela 3)., contradiz a proposta do estudo realizado por Galina (2011), que considera os neutrófilos como importantes efetores parasiticidas, na resposta eficaz contra helmintos.

## 6.5 CONCLUSÕES

Frente ao protocolo experimental desenvolvido e aos resultados obtidos, conclui-se que:

- A eficácia da co-infecção experimental com as larvas infectantes L3 do *H. contortus* nos caprinos foi confirmada pela identificação e contagem dos parasitas adultos na mucosa abomasal dos animais dos GIV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T0</sub>) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>);
- Nos caprinos infectados experimentalmente com o *C. pseudotuberculosis* e o *H. contortus* os sintomas característicos da hemoncose não foram identificados provavelmente pela indução de uma intensa resposta imune local contra o helminto, caracterizada pelas populações de células inflamatórias na mucosa do abomasal dos animais;
- A população linfocitária presente no abomaso demonstrou não apresentar diferença estatística entre os grupos experimentais;
- Os dados demonstram que os caprinos do grupo GIV, de co-infecção simultânea, apresentaram um número reduzido de eosinófilos e mastócitos na mucosa abomasal quando comparação aos grupos GIII (Hc+) e GV (Cp<sub>T0</sub>+Hc<sub>T90</sub>), provavelmente devido a condição de suscetibilidade genética destes animais a infecção pelo helminto, mediante a uma reduzida resposta imune celular local.

## 6.6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.A.O.; AYRES, M.C.C.; SANTOS, S.C.S. Frequência de helmintos gastrintestinais em caprinos leiteiros criados no estado da Bahia: Influência do sistema de criação e dos fatores etário e racial. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.2, p.53, 1997.

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

AROSEMENA, N.A.E.; BEVILAQUA, C.M.L.; MELO, A.C.F.L.; GIRÃO, M.D. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semiarid area in Brazil. **Revue de Medicine Veterinaire**, v.150, p.873-876, 1999.

BALIC, A.; BOWLES, V.M.; MEEUSEN, E.N.T. Cellular profiles in the mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.75, p.109-120, 2000a.

BALIC, A.; BOWLES, V.M.; MEENSEN, E.N.T. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. **Adv. Parasitology**, v.45, p.181-241, 2000b.

BAMBOU, J. C.; DE LA CHEVROTIÈRE, C.; VARO, H.; ARQUET, R.; KOOYMAN, F. N.; MANDONNET, N. Serum antibody responses in Creole kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, v.158, n.4, p.311-318, 2008.

BORGES, F. A. **Ação reversora *in vitro* e *in vivo* do Verapamil sobre a resistência de *Haemonchus contortus* à ivermectina**. Tese de Doutorado, Medicina Veterinária (Patologia Animal) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp - Jaboticabal.2007.

CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA COSTA, L.F.; PAULE, B.J.A.; VALE, V.L.; REGIS, L.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAEER, R.; MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **R. Ci. méd. biol.**, v. 2, n. 1, p. 88-93, 2003.

CARVALHO, E.B., OLIVEIRA, M.A.G., DOMINHGUES, P.F. Base para criação de ovinos no estado de São Paulo. São Manuel: **Associação Paulista de Criadores de Ovinos** (ASPACO), 2.ed., p.81, 2001.

CHEN, F.; LIU, Z.; WU, W.; ROZO, C.; BOWDRIDGE, S.; MILLMAN, A.; VAN ROOIJEN, N.; URBAN JR., J.F.; WYNN, T. A.; GAUSE, W.C. An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. **Nat. Med.** v.18, n.2, p.260-266, 2012.

CLIMENI, B. S. O. ; MONTEIRO, M. V.; CICOTI, C. A.; NEVES, M. F. **Hemoncose ovina**. Editora FAEF. São Paulo, ano11, n. 11, 2008.

DE LA CHEVROTIERE, C.; BAMBOU, J.C.; ARQUET, R.; JACQUIET, P.; MANDONNET, N. Genetic analysis of the potential role of IgA and IgE responses against *Haemonchus contortus* in parasite resistance of Creole goats. **Vet Parasitol.** v.186, n.3-4, p.337–343, 2012.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Ícone, p. 239, 2004.

GALINA, T. **Efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* em ovinos infectados por nematódeos gastrintestinais**. Ph.D. Thesis. Federal University of Pelotas, 2011.

GILL, H.S. Cell-mediated immunity in merino lambs with resistance to *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v.24, n.5, p.749-156, 1994.

GILL, H.S., HUSBAND, A.J., WATSON, D.L., GRAY, G.D. Antibody containing cells in the abomasal mucosa of sheep with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. **Res. Vet. Sci.** v.56, p.41-47, 1994.

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

GIRÃO, E.S.; MEDEIROS, L.P.; GIRÃO, R.N. Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrintestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí. **Ciência Rural**, v.22, n.2, p.197-202, 1992.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council of Scientific and Industrial Research**, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

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

HOODA, V.; YADAV, C. L.; CHAUDHRI, S. S.; RAJPUROHIT, B. S. Variation in resistance to haemonchosis: selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus*. **J. Helminthol.** v.73, p.137-142, 1999.

KEMP, J.M.; ROBINSON, N.A.; MEEUSEN, E.N.T.; PIEDRAFITA, D.M. The relationship between the rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues in immune sheep. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.1589-1594, 2009.

LACROUX, C.; NGUYEN, T.H.; ANDREOLETTI, O.; PREVOT, F.; GRISEZ, C.; BERGEAUD, J.P.; GRUNER, L.; BRUNEL, J.C.; FRANCOIS, D.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. **Vet Res.** v.37, n.4, p.607-622, 2006.

LEDER K, WELLER PF. Eosinophilia and helminthic infections. **Baillière's Clinical Haematology**, v.13, n.2, p.301-317, 2000.

LE JAMBRE, L.F. Relationship of blood loss to worm burdens, biomass and egg production in *Haemonchus* infected sheep. **Int. J. Parasitol.**, v.25, p.269-273, 1995.

LOPES, J.; SANCHES, J. M.; BRAGA, R.M.; MELO, D. R. Avaliação de diferentes princípios ativos no controle de helmintos gastrintestinais em rebanho ovino na região do Taiano - Roraima. **AgroEducare**, v.1, n.1, p.85-103, 2013.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol.Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.

MACKINNON, K. M.; ZAJAC, A. M.; KOOYMAN, F. N. J.; NOTTER, D. R. Differences in immune parameters are associated with resistance to *Haemonchus contortus* in Caribbean hair sheep. **Parasite Immunology**, v.32, p.484-493, 2010.

MANDONNET, N., AUMONT, G., FLEURY, J., ARQUET, R., VARO, H., GRUNER, L., BOUIX, J., KHANG, J.V.T. Assessment of genetic variability of resistance to gastrointestinal nematode parasites in Creole goats in the humid tropics. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1706-1712, 2001.

MEEUSEN, E.N.; BALIC, A.; BOWLES, V. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.108, n.1-2, p.121-125, 2005.

MOURA-COSTA, L.F.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; VALE, V.L.C.; PAULE, B.J.A.; PORTELA, R.W.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; BARRETO, L.M.S.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde' goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.126, p.131-141, 2008.

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

ORTOLANI, E.L.; LEAL, M.L.R.; MINERVINO, A.H.H.; AIRES, A.R.; COOP, R.L.; JACKSON, F.; SUTTLE, N.F. Effects of parasitism on cellular immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.196, p.230-234, 2013.

PAULE, B.J.A., MEYER, R., MOURA-COSTA, L.F., BAHIA, R.C., CARMINATI, R., REGIS, L.F., VALE, V.L.C., FREIRE, S.M., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Protein Expression and Purification**, v. 34, p. 311-316, 2004.

PÉREZ, J.; ZAFRA, R.; BUFFONI, L.; HERNÁNDEZ, S.; CÁMARA, S.; MARTÍNEZ-MORENO, A. Cellular phenotypes in the abomasal mucosa and abomasal lymph nodes of goats infected with *Haemonchus contortus*. **J. Comp. Pathol.**, v.138, p.102–107, 2008.

PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 513p. 2004.

QAMAR, M. F.; MAQBOOL, A. Biochemical Studies and Serodiagnosis of Haemonchosis in Sheep and Goats. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v.22, n.1, p.32-38, 2012.

REBOUÇAS, M.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B.; MOURA-COSTA, L.; HANNA, S.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, n.11, p.1296-302, 2013.

SHAKYA, K.P.; MILLER, J.E.; HOROHOV, D.W. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. **Veterinary Parasitology**, v.163, n.1-2, p.57-66, 2009.

SHAKYA, K.P.; MILLER, J.E.; LOMAX, L.G.; BURNETT, D.D. Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.239-247, 2011.

TEREFE, G.; LACROUX, C.; PREVOT, F.; GRISEZ, C.; BERGEAUD, J.P.; BLEUART, C.; DORCHIES, P.; FOUCRAS, G.; JACQUIET, P. Eosinophils in *Haemonchus contortus*-infected resistant and susceptible breeds of sheep: abomasal tissue recruitment and in vitro functional state. **Vet Parasitol.** v.165, n.1-2, p.161-164, 2009.

UENO H. Cultivo quantitativo de larvas de nematódeos gastrintestinais de ruminantes com tentativa para pré-diagnóstico. Tokyo, Japan, p.138, 1995.

WHITLOCK, H. V. Some modifications of the McMaster eggs counting technique and apparatus. **J. Counc. Sci. Ind. Res.** v.21, p.177-180, 1948.

ZAROS, L.G.; BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.; ROCHA, R.A.; KOOYMAN, F.N.; DE VRIES, E.; COUTINHO, L.L. Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. **Vet. Parasitol.** v.171, n.1-2, p.68-73. 2010.

## 7. PERSPECTIVA FUTURA

- Um estudo está sendo realizado a partir da identificação de citocinas que induzem uma resposta Th1 e Th2 em ovinos infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e co-infectados com *Haemonchus contortus*, utilizando a técnica de micro-RNA.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D.; MAIA, M. B.; MEDEIROS, V.; COSTA, M.; SOARES, H. S. Parasitos Gastrintestinais em Caprinos e Ovinos da Região Oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, 212-218, 2008.

ALENCAR S.P.; MOTA R.A.; COELHO M.C.O.C.; NASCIMENTO S.A.; ABREU S.R.O.; CASTRO R.S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, n 11, v.1, p.131-140, 2010.

ALLONBY, E.W.; URQUHART, G.M. The epidemiology and pathogenic significance of haemonchosis in a Merino flock in East Africa. **Vet. Parasitol.** v.1, p.129–143,1975.

AL-RAWASHDEH, O.F.; AL-QUDOH, K.M. Effect of Shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan. **J. Vet. Med.**, 47: 287-293, 2000.

ALVES, F.S.F., OLANDER, H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Veterinária Notícias**, v.5, p.69–75, 1999.

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

ANCO - Agência de notícias de caprinos e ovinos. Bahia organiza Câmara Setorial da Carne. 2010. Disponível em:<<http://www.anco.cnpc.embrapa.br/index.php>>. Acesso em: 09/02/2016.

ARSENAULT, J.O.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D. O.; GALARNEAU, J.-R.; BOISCLAIR, J., SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada, **Preventive Veterinary Medicine**, v.59 , p.67-81, 2003.

ASANJI, M. F. Haemonchosis in sheep and goats in Sierra Leone. **Journal of Helminthology** , v.62, n. 03, p 243-249, 1988.

BAIRD, G.J. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. **Vet. Rec.** v.159, p.500, 2006.

BAIRD G. J.; FONTAINE M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J. Comp. Pathol**, v.137, p.179-210, 2007.

BASTOS, B.L.; PORTELA, R.W.D.; DORELLA, F. A.; RIBEIRO, D.; SEYFFERT, N.; CASTRO, T.L.P.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, p.1-15, 2012.

BATH, G. F.; VAN WYK, J. A. Using the Famacha system on commercial sheep farms in south Africa. In: INTERNATIONAL SHEEP VETERINARY CONGRESS, 1., 1992, Cidade do Cabo. **Anais...** Cidade do Cabo: University of Pretoria, v.1, p.3, 2001.

BELCHIOR, S.E.; GALLARDO, A.; ABALOS, A.; JODOR, N.; JENSEN, O. Actualizacion sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. **Rer. Vet. Argent.** v. 23, p.258-78, 2006.

BELLATO, C. I. R. V.; DE SOUZA, A. P.; AVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; DALAGNOLL, C. A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v. 34, n.6, p. 1889-1895, 2004.

BENTWICH, Z.; KALINKOVICH, A.; WEISMAN, Z.; BORKOW, G.; BEYERS, N.; BEYERS, A. D. Can eradication of helminthic infections change the face of AIDS and tuberculosis? **Trends Immunology Today**, v.2, n.11, p. 485-487, 1999.

BINNS, S.H.; BAILEY, M. GREEN, L.E. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. **Vet. Rec.** v.150, p.263-268, 2002.

BINNS, S.H.; GREEN, L.E.; BAILEY, M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. **Vet. Microbiol.** v. 20, p.169-179; 2007.

BRITO, D. R. B.; SANTOS, A. C. G.; TEIXEIRA, W. C.; NOGUEIRA, R. D. M. S.; GUERRA, C. Parasitos Gastrintestinais em Caprinos e Ovinos da Microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no Estado do Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.3, p.967-974, 2009.

BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; ALVES, S.F. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in northeastern Brazil. **Vet. Bull., J.** 51: 46-49, 1987.

BROWN C. C.; OLANDER H. J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. **Vet. Bulletin.** v.57, n.1, p. 1-5, 1987.

BUNDY, D.; SHER, A.; MICHAEL, E. Good Worms or Bad Worms: Do Worm Infections Affect the Epidemiological Patterns of Other Diseases? **Parasitology Today**, v.16, n.7, 2000.

BURREL, D.H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. **Res.Vet. Sci.**, v.28, p.234-237, 1980.

CARVALHO, E.B., OLIVEIRA, M.A.G., DOMINHGUES, P.F. Base para criação de ovinos no estado de São Paulo. São Manuel: **Associação Paulista de Criadores de Ovinos** (ASPACO), 2.ed., p.81, 2001.

CARVALHO, D.M.; DE SÁ, P.H.; CASTRO, T.L.; CARVALHO, R.D.; PINTO, A.; GIL, D.J.; BAGANO, P.; BASTOS, B.; COSTA, L.F.; MEYER, R.; SILVA, A.; AZEVEDO, V.; RAMOS, R.T.; PACHECO, L.G. Reference genes for RT-qPCR studies in *Corynebacterium pseudotuberculosis* identified through analysis of RNA-seq data. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.106, n.4, p.605-614, 2014.

CARMINATI R.; BAHIA R.; MOURA-COSTA, L.F.; PAULE, B.J.A.; VALE,V.L.; REGIS,L.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO I.; SCHAER,R.; MEYER,R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, v.2, n.1, p. 88-93, 2003.

CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE BAERE, T.; VANEECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, v.88, p.75-83, 2002.

CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; SCARAMELLI, A.; REY-VALEIRÓN, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. **Small Ruminant Research**, v. 65, n.1, p.170-175, 2006.

CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; REY-VALERION, C.; SCARAMELLI, A.; CARRERO, L. Diagnosis of caseous lymphadenitis by ELISA in naturally infected goats from Venezuela. **Small. Rumin. Res.**, v.87, p.92–95, 2009.

CLIMENI, B. S. O. ; MONTEIRO, M. V.; CICOTI, C. A.; NEVES, M. F. **Hemoncose ovina**. Editora FAEF. São Paulo, ano11, n. 11, 2008.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Linfadenite caseosa. In: CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: MEDSI, p. 147-149, 1992.

COSTA FILHO, G.A. Particularidades da Linfadenite Caseosa dos caprinos em Pernambuco e no Nordeste. **Anais** da ESV – Univ. Feder. Rural de Pernambuco, v.1, p.9-23, 1974.

CUBERO, P.M.J.; REAL, V.F.; GONZÁLEZ, C.M.; LEÓNVISCAÍNO, L. Epidemiologia de la pseudotuberculosis. **Rev. Ovis.** 2002. Disponível em: <<http://exopol.com/cirulares/205.html>> Acesso em: 09/10/2010.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M.; DEKKER-NOOREN, T.; VAN MAANEN, K.; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v.75, n.2, p.167-175, 2000.

DE SOUZA, A.P.; VALE, V.L.C.; SILVA, M.C.; ARAÚJO, O.I.B.; TRINDADE, S.C.; MOURA-COSTA, L.F.; RODRIGUES, G.C.; SALES, T.S.; SANTOS, H.A.; CARVALHO-FILHO, P.C.; OLIVEIRA-NETO, M.G.; SCHAEER, R.E.; MEYER, R. MAPK involvement in cytokine production in response to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **BMC microbiology**, v.14, n.1, p. 230, 2014.

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Vet. Res.**, v. 37, p. 201–218, 2006.

EJLERTSEN, M.; GITHIGIA, S.M.; OTIENO, R.O.; THAMSBORG, S.M. Accuracy of an anaemia scoring chart applied on goats in sub-humid Kenya and its potential for control of *Haemonchus contortus* infections. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.291–301, 2006.

EI-ENBAAWY, M.I.; SAAD, M.M.; SELIM, S.A. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Egypt J. Immunol.** v.12, p.13-19, 2005.

FAO - Food and agriculture organization of the United States. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org/site/>>. Acesso em: 30/11/2015.

FONTAINE, M.C.; BAIRD, G.; CONNOR, K.M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v.24, p. 5986-5996, 2006.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Ícone, p. 239, 2004.

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

GAUSE, W.C.; URBAN Jr., J.F., STADECKER, M.J. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. **Trends Immunol.** , v.13, p.617-628, 2003.

GAMBLE, H.R.; ZAJAC, A.M. Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. **Veterinary Parasitology**, v.41, n.3-4, p.211-225,1992.

GARDUÑO, R. G.; PÉREZ, C. C.; HERNÁNDEZ, G. T.; GIVES, P.M.; GARCÍA, J. A. Prevalence of gastrointestinal parasites in slaughtered sheep at a slaughterhouse in Tabasco, Mexico **Vet. Méx.**, v.42, n.2, p. 125-135, 2011.

GATONGI, P.M. ; PRICHARD, R.K.; RANJAN, S.; GATHUMA, J.M.; MUNYUA, W.K.; CHERUIYOT, H.; SCOTT, M.E. Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya. **Veterinary Parasitology**, v.77, p.49-61, 1998.

GILL, H. S.; GRAY, G. D.; WATSON, D. L.; HUSBAND, A. J. Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. **Parasite Immunology**, v.15, p.61-67, 1993.

GILL, H.S., GRAY, G.D., HUSBAND, A.J., WATSON, D.L. Antibody- containing cells in the abomasal mucosa of sheep with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v.56, p.41-47, 1994.

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

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

GUEDES, M.T.; SOUZA, B.C.; SOUSA, T.J.; LOUREIRO, D.; MOURA-COSTA, L. F.; AZEVEDO, V. ; MEYER , R.; PORTELA, R.W. Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. **Pesq. Vet. Bras.** v.35, n.8, p.701-708, 2015.

GUIMARÃES, A.S., CARMO, F.B., PAULETTI, R.B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D., LAGE, A.P., HEINEMANN, M.B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A.M.G. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis and control. **The IIOAB Journal**, v. 2, 33-43, 2011.

HARD G.C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. **J Med Microbiol** v.5 p. 483-491, 1972.

HOPE, J.C., THOM, M.L., McCORMICK, P.A., HOWARD, C.J. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. **Vet. Immun. Immunopath.**, v.100, p.187-195, 2004.

HOSTE, H. Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. **Int. J. Parasitol.** v.31, p.231–244, 2001.

HOWELL, S.B.; BURKE, J.M.; MILLER, J.E.; TERRILL, T. H.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M.J. ; WILLIAMSON, L. H. ; ZAJAC, A. M.; KAPLAN, R.M. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 233, n.12, p.1913-1919, 2008.

HAWARI, A. D. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection (Caseous Lymphadenitis) in Camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. **American J. Animal and Vet. Sci.**, v.3, n.2, p.68-72, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Efetivo dos rebanhos de médio porte, segundo as grandes regiões e as unidades da Federação – 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 28/12/2015.

JUNG, B.Y.; LEE, S.H.; KIM, H.-Y.; BYUN, J.W.; SHIN, D.H.; KIM, D.; KWAK, D. Serology and clinical relevance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in native Korean goats (*Capra Hircus Coreanae*). **Trop. Anim. Health. Prod.** v.47, p.657-661, 2015.

KABA J., KUTSCHKE L., GERLACH G.F. Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats. **Vet. Microbiol.** v.78, p.155-163, 2001.

KAUR K, KAPUR J, PARMAR A, SOOD ML. Identification of Immunodominant Antigens of Adult *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). **Journal of Veterinary Medical**, v. 49, p. 260-262, 2002.

LAN, D.T.B.; TANIGUCHI, S.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; NAKANE, A. Role of endogenous tumour necrosis factor alpha: a gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. **Microbiol. Immunol.** v.42, p.863–870,1998.

LEDER K, WELLER PF. Eosinophilia and helminthic infections. **Baillière's Clinical Haematology**, v.13, n.2, p.301-317, 2000.



LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A.; HOBERG, E. P. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. **Journal Parasitology**, v. 80, p.107-119. 1994.

LOPES, J.; SANCHES, J. M.; BRAGA, R.M.; MELO, D. R. Avaliação de diferentes princípios ativos no controle de helmintos gastrintestinais em rebanho ovino na região do Taiano - Roraima. **AgroEducare**, v.1, n.1, p.85-103, 2013.

LYOYD, S.; LINDSAY, H.J.;SLATER, J.D.; JACKSON, P.G.G. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection (caseous lymphadenitis) in goats. **Goat Vet. Soc.** v.11, p.55-65, 1990.

MACHADO P. R. L.; ARAÚJO M. I. A. S.; CARVALHO L.; CARVALHO E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol.** v.79, n.6, 2004

MACRAE, J.C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proc. Nutr. Soc.** v.52, p.12-130. 1993.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES,C.O. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária, EMBRAPA, 2001.

MCNAMARA, P.J.; BRADLEY, G. A.; SONGER, J.G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decrease virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiol.**, v.12, p.921-930, 1994.

MCKEAN, S. C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R, J. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: The major virulence factor, phospholipases D, is downregulated. **Res Microbiol.** v.158, p.279-286, 2007a.

MCKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by

multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. **Microbiology** v.153, p.2203–2221, 2007b.

MENZIES, P. I.; MUCKLE, C. A. The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.53, n.3, p.313,1989.

MENZIES, P.I.; MUCKLE, C.A.; HWANG, Y.T.; SONGER, G.J. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Small. Rumin. Res.**, v.13, p.193–198, 1994.

MENZIES, P.I.; HWANG, Y, PRESCOTT, J.F. Comparison of an interferon- $\gamma$  to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. **Vet. Microbiol.**, v.100, p.129-137, 2004.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSA, L. SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. In vitro IFN- $\gamma$  production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Vet. Immunol. Immunopathology**. v.107, n.3-4, p.249-254, 2004.

MILLER, H.R.P. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes: Natural immunity, can it be harnessed? **International Journal for Parasitology**, v.26, n.8/9, p.801-811, 1996

MOHAN, P.; VATHSALA, M.; JAYAPRAKASAN, V. Comparative characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in Kerala, India and reference strain. **Small Ruminant Research**, v.74; n.1–3, p. 226–230, 2008.

MOLENTO, M.B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus*

*contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1139-1145, 2004.

MOLENTO, M.B.; VERÍSSIMO, C.J.; AMARANTE, A.T.; VAN WYK, J.A.; CHAGAS, A.C.S.; ARAÚJO, J.V.; BORGES, F.A. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.80, n.2, p.253-263, abr./jun., 2013.

MOURA-COSTA L.F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, v.1, n.1, p.105-115, 2002.

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

ONYIAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, v.30, p.203-211, 2005.

PACHECO, L.G.C.; PENA, R.R.; CASTRO, T.L.P.; DORELLA, F.A.; BAHIA, R.C., et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p.480-486, 2007.

PATON, M. W. The Epidemiology of caseous lymphadenitis in Australia and observations on other production systems. **Unit. Stat. Animal Health Association, USA**, p.18-24, 1997.

PATON, M. W.; WALKER, S. B.; ROSE, I. R.; WATT, G. F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Aust. Vet. J.**, v.81, p.91-95, 2003.

PAULE B.J.A. AZEVEDO, V. MOURA-COSTA, L., BAHIA, R., CARMINATI, R., REGIS, L., VALE, V., FREIRE, S., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 96, p. 129-139, 2003a.

PAULE, B.J.A. AZEVEDO, V. MOURA-COSTA, L., BAHIA, R., CARMINATI, R., REGIS, L., VALE, V., FREIRE, S., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., MEYER, R. Comparative Study of Different Antigenic Proteic Extracts from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Small Ruminant Research**, 2003b.

PAULE, B.J.A., MEYER, R., MOURA-COSTA, L.F., BAHIA, R.C., CARMINATI, R., REGIS, L.F., VALE, V.L.C., FREIRE, S.M., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Protein Expression and Purification**, v. 34, p. 311-316, 2004.

PEEL, M. M.; PALMER, G.G; STACPOOLE, A.M; KERR, T.G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of tem cases from Australia and review. **Clin. Infect. Dis.**, v.24, n.2, p.185- 191, 1997

PÉPIN, M.; SEOW, H. F.; CORNER, L.; ROTHEL, J. S.; HODGSON, A.L. M.; WOOD, P.R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Vet. Res.**, v. 28, p. 149-163, 1997.

PRESCOTT, J.F.; MENZIES, P.I.; HWANG, Y.T. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Vet. Microbiol.** v.88, p.287-297, 2002.

QAMAR, M.F.; MAQBOOL, A.; KHAN, M.S.; AHMAD, N.; MUNEER, M.A. Epidemiology of Haemonchosis in sheep and Goats under different managerial conditions. **Veterinary World**, v.2, n.11, p.413-417, 2009.

QAMAR, M.F.; MAQBOOL, A.S. Biochemical studies and serodiagnosis of haemonchosis in sheep and goat. **The journal of animal & Plant Sciences**, v.22, n 1, p-32-38, 2012.

QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY B, CARTER GR. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. **Clinical Veterinary Microbiology**, 1994.

RAHMAN, W.A.; COLLINS, G.H. The establishment and development of *Haemonchus contortus* in goats. **Vet. Parasitol.**, v.35, n.3, p.189-193, 1990.

RATHORE, D. K.; SUCHITRA, S.; SAINI, M.; SINGH, B.P.; JOSHI, P. Identification of a 66 kDa *Haemonchus contortus* excretory/secretory antigen that inhibits host monocytes. **Vet. Parasitol.**, v.138, p. 291–300, 2006.

REBOUÇAS, M.F.; PORTELA, R.W.; LIMA, D.D.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B.L.; MOURA-COSTA, L.F.; VALE, V.L.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **J. Vet. Diag. Invest.** v.23, n.2, p.213-220, 2011.

REBOUÇAS, M. F.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L.F. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, n.11, p.1296-1302, 2013.

RIBEIRO, M.G; DIAS JUNIOR, J.G; PAES, A.C; BARBOSA, P.G; NARDI JUNIOR, G.; LISTONI, F.J.P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arq. Inst. Biol.** v.68, p.23-28, 2001.

RIET-CORRÊA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2ª ed. São Paulo: Varela; 2004.

SACCO, R.E.; HAGEN, M.; SANDOR, M.; WEINSTOCK, J.V.; LYNCH, R.G. Established TH1 granulomatous responses induced by active *Mycobacterium avium* infection switch to TH2 following challenge with *Schistosoma mansoni*. **Clin. Immunol.** 104, 274–281, 2002.

SCHALLING, HDFH, VAN LEEUWEN MAW, CORNELISSEN AWCA. Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. **Parasite Immunology**, v. 19, p. 447-453, 1997.

SCHALLIG, H.D.F.H. Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v.120, p. 563-572, 2000.

SILVA, W. W.; BEVILAQUA, C. M.; RODRIGUES, M. D. A. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no semi-árido paraibano-Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.2, p.71-75, 2003.

SHAKYA, K.P; MILLER, J.E; HOROHOV, D.W. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. **Vet. Parasitol.** v.163, n.1-2, p.57-66, 2009

SHIGIDI, M.T. An indirect haemagglutination test for the sero-diagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. **Res V et Sci**, v. 24, p.57-60, 1979a.

SHIGIDI, M.T. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. **Br. Vet.**, v.135, p.172-177,1979b.

SIMMONS, C.P., DUNSTAN, S.J., TACHEDJIAN, M., KRYWULT, J., HODGSON, A.L.M., STRUGNELL, R.A. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v. 66, n.2, p. 474-479, 1998.

STEFAŃSKA I, GIERYŃSKA M, RZEWUSKA M, BINEK M. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. **Pol J Vet Sci** 13: 143-149, 2010.

STITES, D.P.A.; PARSLON. T. **Imunologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SUAREZ, V.H; FONDRAZ, M; VIÑABAL, A.E; MARTÍNEZ, G.M; SALATIN, A.O. Epidemiología de los nematodos gastrointestinales en caprinos lecheros en los valles templados del NOA, Argentina. **RIA. Rev. investig. agropecu.**, v. 39, n. 2, p. 191-197, 2013.

TAKAHASHI, T.; MORI, Y.; KOBAYASHI, H.; OCHI, M.; KIKUCHI, N.; HIRAMUNE, T. Phylogenetic positions and assignment of swine and ovine *Corynebacterium* isolates based on the 16S rDNA sequence. **Microbiol. Immunol.**, n. 41, v. 9, p. 649-655, 1997.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 3. ed. Tóquio: **Japan International Cooperation Agency**, p. 84, 1994.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4. ed **Japan International Cooperation Agency**, p.144, 1998.

UNANIAN, M.M., FELICIANO-Silva, A.E.D., PANT, K.P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v.17, p.57–62, 1985.

URBAN, JFJr, MADDEN KB, SVETIC A, CHEEVER A, TROTTA PP, GAUSE WC, KATONA IM, FINKELMAN FD. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. **Immunological Reviews**, v. 127, p. 205-220, 1992

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

VALDIVIA, J.; REAL, F.; ACOSTA, F.; ACOSTA, B.; DÉNIZ, S.; RAMOS-VIVAS, J.; ELAAMRI, F.; PADILLHA, D. Interaction of *Corynebacterium pseudotuberculosis* with ovine cells in vitro. **Vet Pathol.** v.50, n.2, p.318-323, 2013.

VALE, V; FREIRE, S; RIBEIRO, M ;REGIS, L.; Vale, V.; PAULE, B.; R. CARMINATI; R. BAHIA; MOURA-COSTA L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, v.2, n.2, p.192-200, 2003.

VALE, V. L. C. Avaliação de aspectos da resposta imune de camundongos contra *C. pseudotuberculosis*. **Tese de doutorado**. Programa de pós-graduação em imunologia – UFBA, 2005.

VIEIRA, LS; BERNE, M.E.A.; CAVALCANTE, A.C.R.; MENEZES, R.C.A.A. Redução do número de ovos por grama de fezes (OPG) em caprinos medicados com anti-helmínticos. Sobral : **EMBRAPA**, 18p. Boletim de Pesquisa,11, 1989.

XIAOJUN, L.; DU, A.; CAI, W.; HOU, Y.; PANG, L.; GAO, X. Evaluation of a recombinant excretory secretory *Haemonchus contortus* protein for use in a diagnostic enzyme linked immunosorbent assay. **Experimental Parasitol.**, v.115, p.242–246, 2007.

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N.Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and feasibility of transmission by houseflies. **Vet. Q.**, v.18, p.87-89,1996.



## 9. APÊNDICE – Participação em publicações durante o doutorado

**A-** DE SOUZA, A.P.; VALE, V.L.C.; SILVA, M.C. ; ARAÚJO, I.B.O.; TRINDADE, S.C.; MOURA-COSTA, L.F.; RODRIGUES, G.C.; SALES,T.S. ; DOS SANTOS, H.A.; CARVALHO FILHO, P.C.; OLIVEIRA NETO, M.G.; SCHAER, R.E.; MEYER, R. MAPK involvement in cytokine production in response to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **BMC Microbiology**, v.14, p.230, 2014.