



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

THAÍS BRITO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES DA RESPOSTA IMUNE OVINA NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Haemonchus contortus*, SOB
TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE *Poincianella
pyramidalis***

Salvador

2013

THAÍS BRITO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES DA RESPOSTA IMUNE OVINA NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Haemonchus contortus*, SOB
TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE *Poincianella
pyramidalis***

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de
Ciências da Saúde, Universidade Federal da
Bahia – ICS/UFBA

Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer
Co-orientador (a): Prof.^a Dr.^a Vera Vale

Salvador

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

O48 Oliveira, Thaís Brito de
Avaliação de indicadores da resposta imune ovina na infecção experimental com *Haemonchus contortus*, sob tratamento com extrato aquoso de *Poincianella pyramidalis*/Thaís Brito de Oliveira. – Salvador, 2014.
56 f.
Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer
Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Vera Costa Vale
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde, 2014.
1. Biotecnologia. 2. Ovinos. 3. Imunologia. I. Meyer, Roberto. II. Vale, Vera Costa. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.
CDU 60

THAIS BRITO DE OLIVEIRA

Avaliação de indicadores da resposta imune ovina na infecção com *Haemonchus contortus*, sob tratamento com extrato aquoso de *Poincianella pyramidalis*

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 28 de novembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Vera Lúcia Costa Vale – Co-orientadora 
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade do Estado da Bahia.

Heloísa Cristina da Silva 
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Soraya Castro Trindade 
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Estadual de Feira de Santana.

Ao verdadeiro espírito do amor e da coragem.

Aos amigos e a família.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e as forças divinas por toda luz emanada nos momentos mais difíceis que sempre me fizeram levantar e lutar.

A minha família maravilhosa que sempre esteve junto em todas as minhas batalhas me apoiando ou me direcionando, não me deixando desistir. Vocês são os meus maiores orgulhos e espelhos para continuar crescendo. Amo muito a todos: Vera, Ataíde, Carleoni, Vitória Caroline, Messias, Mazinha, Lais, Jardel. Além de todos os avós, tios e primos que estiveram ao meu lado. A Deyvison Moura pelo apoio, amizade e amor a mim dedicado no momento especial.

Aos meus amigos de sempre como Rafaela Carvalhais, Cintia Corsini e aos novos: Tatiane Sales, Anderson Moscoso, Lis Marques, Polyana Carozo, Marcel Lemos, Poliana Moura, Paulo Lucas, Marcos Silva, Marivaldo Neri, Heidiane Alves, Andrea Pacheco, Antônio Carlos. Além das duas mães que me acolheram Lourdes Félix e Francisca Soares.

A todas as pessoas que me acolheram e me apoiaram quando iniciei, obrigado família Lacerda e cia.

Ao seu Ari que cuidou dos animais com dedicação e zelo. Aos alunos Aloisio e Alessandro Bitencourt pelo auxilio.

Ao meu orientador Roberto Meyer pela orientação, amizade e confiança. Ao apoio, dedicação também da minha co-orientadora Dr^a Vera Vale. A todos os amigos do Laboratório de Imunologia que me auxiliaram representadas por: Seu Mário, Seu Zé, Seu Pedro, Zilda, Rafaela Brinco, Lú.

Ao Laboratório de Parasitologia da UFBA pelo apoio, em especial aos professores Thiago Bahiense e Heloisa Silva. Ao Laboratório de Farmácia e também ao de Química da UFBA pela enorme colaboração, aos professores Dr.^aFernanda Washington e Dr^o Jucenir David.

Ao Frigorifico Baby Bode pela colaboração representado pelo veterinário Davi Vilas Boas.

Ao Programa de Mestrado em Biotecnologia e ao professor Dr.^o Milton Roque.

A Fundação de Apoio à Pesquisa CAPES pelo financiamento.

E a todos aqueles que não foram citados aqui, mas que foram de fundamental importância no meu trabalho e na minha vida, Deus os iluminem!!.

OLIVEIRA, T. B. Avaliação de indicadores da resposta imune ovina na infecção experimental com *Haemonchus contortus*, sob tratamento com extrato aquoso de *Poincianella pyramidalis*. 56 f. il. 2013. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

RESUMO

Haemonchus contortus é um nematoide gastrointestinal de ruminantes, principalmente de ovinos e caprinos, de grande importância mundial que causa diversas perdas econômicas. Este helminto tem apresentado resistência anti-helmíntica, o que vem dificultando o tratamento dos pequenos ruminantes pelos seus criadores. Por isso novas alternativas estão sendo testadas a fim de combater o parasita, a exemplo do extrato aquoso da planta *Poincianella pyramidalis*. Foram utilizados onze animais, divididos em três grupos: GI (sem infecção); Grupo II (infectados) e GIII (infectados e tratados). Para a infecção experimental utilizou-se aproximadamente 20.000 larvas L₃. Durante 90 dias amostras de fezes foram colhidas para análise parasitológica, e de sangue para análise da resposta imunológica através da dosagem do anticorpo sérico IgG e da citocina Interferon gama. A administração do extrato da planta ocorreu no GIII no tempo 45 dias. Obteve-se no tempo 60 dias em relação aos resultados parasitológicos uma redução carga parasitária de 79% no Grupo III e uma eficácia do extrato de 85%; em relação à resposta imune ocorreu uma baixa produção de interferon gama. A produção de anticorpos séricos IgG foi levemente estimulado após a administração do extrato. Os resultados indicam que esta planta possui um moderado efeito relacionado aos ovos encontrados nas fezes, assim como um leve potencial imunomodulador. Faz-se necessário, novos estudos para verificar novos parâmetros imunológicos relacionados à infecção e a administração deste extrato em estudo.

Palavra-chave: Ovinos, *Haemonchus contortus*, *Poincianella pyramidalis*, IgG.

OLIVEIRA, T. B. Evaluation of indicators of immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*, under treatment with aqueous extract of *Poincianella pyramidalis*. 56 f. il. 2013. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Haemonchus contortus is a gastrointestinal nematodes of ruminants, mainly sheep and goats, of great global importance that causes severe economic losses. This helminth has shown anthelmintic resistance, which is hampering the treatment of small ruminants by its creators. So new alternatives are being tested to combat the parasite, such as the plant *Poincianella pyramidalis* aqueous extract. Eleven animals were used, divided into three groups: GI (without infection), Group II (infected) and GIII (infected and treated). For experimental infection, we used about 20,000 L3 larvae. 90 days stool samples were collected for parasitological examination, and blood samples for analysis of the immune response through the measurement of serum IgG antibody and cytokine gamma interferon. The administration of the extract of the plant occurred in GIII time in 45 days. It was obtained in 60 days time in the parasitological reduced parasitic load of 79% in Group III and efficacy of the extract of 85%, compared to the immune response was a low production of interferon gamma. The production of serum IgG was slightly stimulated after administration of the extract. The results indicate that this plant has a moderate effect related to eggs found in the faeces, as a light immunomodulatory potential. Further studies are necessary, to verify new immunological parameters related to infection and administration of this extract under study.

Keywords: Sheep, *Haemonchus contortus*, *Poincianella pyramidalis*, IgG.

Lista de Ilustrações

Figura 1A	Unidade Experimental do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Salinas das Margaridas- BA.	28
Figura 1B	Baia de piso ripado suspenso onde estavam confinados os animais.	28
Figura 2	Ovinos do Grupo II infectados com <i>H. contortus</i> apresentando sinais clínicos de hemoncose, como emagrecimento	38
Figura 3	Cinética do título de anticorpos da classe IgG específicos contra <i>H. contortus</i> dos Grupos I, II e III, apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655nm, distribuídas ao longo do período experimental.	40
Figura 4	Título de anticorpos da classe IgG específicos contra <i>H. contortus</i> do Grupo I não infectado experimentalmente com larvas L ₃ , apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655nm, ao longo do período experimental.	41
Figura 5	Título de anticorpos da classe IgG específicos contra <i>H. contortus</i> do Grupo II, apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655nm, ao longo do período experimental.	42
Figura 6	Título de anticorpos da classe IgG específicos contra <i>H. contortus</i> do Grupo III tratado com extrato de <i>P. pyramidalis</i> , apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655 nm, ao longo do período experimental.	42

Lista de Tabelas

Tabela 1	Valores da média do número de ovos de <i>H. contortus</i> com base na contagem de ovos por grama de fezes dos ovinos (OPG) ao longo do período experimental de 90 dias dos animais do Grupo I,II,III.	36
Tabela 2	Contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) ao longo do período experimental de 90 dias dos animais do Grupo II, apenas infectados com as larvas L ₃ de <i>H. contortus</i> sem tratamento do extrato aquoso de <i>P. pyramidalis</i> .	37
Tabela 3	Contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) ao longo do período experimental de 90 dias dos animais do Grupo III infectados experimentalmente com larvas L ₃ de <i>H. contortus</i> e tratados com extrato aquoso de <i>P. pyramidales</i> .	38
Tabela 4	Contagem de vermes adultos de <i>H. contortus</i> coletados no abomaso após a eutanásia dos animais dos Grupos I (não infectado experimentalmente), Grupo II (infectado com <i>H. contortus</i>) e Grupo III (infectado com <i>H. cotortus</i> e tratado com extrato aquoso de <i>P. pyramidales</i>).	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFENCIAL TEÓRICO	15
2.1	OVINOCULTURA NO BRASIL.....	15
2.2	NEMATÓDEO <i>Haemonchus contortus</i>	16
2.3	ANTI-HELMÍNTICOS.....	19
2.4	<i>Poincinella pyramidalis</i>	22
2.5	RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	23
3	OBJETIVO	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	ANTÍGENOS DE <i>Haemonchus contortus</i>	27
4.2	CULTURAS DE LARVAS L3 DE <i>Haemonchus contortus</i>	27
4.3	EXTRATO AQUOSO DE <i>Poincinella pyramidalis</i>	28
4.4	INFECCÃO.....	28
4.4.1	OVINOS	28
4.4.2	PROTOCOLO INFECCÃO EXPERIMENTAL	30
4.4.3	PROTOCOLO DE ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA <i>Poincinella pyramidalis</i>	30
4.5	COLHEITAS DE AMOSTRAS.....	30
4.5.1	COLHEITA DAS FEZES	31
4.5.1.1	CONTAGEM DE OVOS POR GRAMA DE FEZES (OPG)	31
4.5.1.2	COPROCULTURA.....	31
4.5.2	COLHEITAS DE SANGUE	32
4.5.3	EFICÁCIA DA INFECCÃO EXPERIMENTAL	32
4.6	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE.....	32
4.6.1	QUANTIFICAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS	32
4.6.2	CULTIVO CELULAR	33
4.6.3	DOSAGEM DE INTERFERON GAMA (INF-γ)	34
4.7	EFICÁCIA.....	35

4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
4.9	ASPECTOS ÉTICOS.....	36
5	RESULTADOS.....	37
5.1	INFECÇÃO POR <i>Haemonchus contortus</i>	37
5.2	QUANTIFICAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS.....	41
5.3	INTERFERON GAMA (INF- γ).....	44
6	DISCUSSÃO.....	45
7	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma das atividades mais antigas do mundo, tendo maior representatividade na Ásia, África e Oceania. No Brasil, este setor da economia corresponde a uma importante fonte de sustento familiar, principalmente na região nordeste, com destaque à produção de carne, leite e pele.

Infelizmente, a ocorrência de parasitoses gastrointestinais é um fator de grande impacto à ovinocultura, pelo atraso no crescimento do animal, na redução da produção e qualidade da carne e de lã. Dentre os principais parasitos destacam-se: *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia sp.*, *Ostertagia (Teladorsagia) spp.*, *Nematodirus sp.* e *Haemonchus contortus*.

O nematoide gastrointestinal de ruminantes de pequeno a grande porte (caprinos, ovinos e bovinos), *H. contortus*, é bastante prevalente em todo o mundo e altamente patogênico, capaz provocar doenças agudas com alto índice de mortalidade (KAMARAJ *et al.*, 2011). A patologia provocada por este agente é denominada hemoncose, que vem sendo tratada com medicamentos denominados anti-helmínticos.

Entretanto, o uso indiscriminado dos anti-parasitários tem levado ao desenvolvimento de cepas resistentes. A este processo denominamos resistência anti-helmíntica, o qual é influenciado diretamente por elementos como o ambiente, variações genéticas do hospedeiro e também do parasita, além da capacidade de seu sistema imune em responder a uma infecção (MOLENTO, *et al.*, 2013).

Alguns padrões da resposta imune estão diretamente relacionados à genética do hospedeiro tanto na susceptibilidade ou resistência parasitária relacionados com o parasitismo. Quando o organismo é infectado, a população de linfócitos TCD4+ é estimulada a produzir subpopulações de células que podem assumir o perfil Th1 ou Th2 a depender do tipo de antígeno e das citocinas envolvidas no processo de sinalização (MACHADO *et al.*, 2004). Entretanto, de acordo com os estudos de Milonovic *et al.* (2010) existe também o perfil Th17 envolvido na resposta imune.

Organismos multicelulares como helmintos são parasitas extracelulares capazes de induzir resposta de perfil Th2, com predomínio da citocina IL-4. É

importante salientar que além da IL-4 outras citocinas estão envolvidas na resposta Th2, a exemplo da IL-5, IL-10 e IL-13 que atuam como mediadores da resposta imune e inflamatória para produção de anticorpos das classes IgG, IgA e principalmente IgE, bem como na ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, componentes fundamentais na defesa contra helmintos (ABBAS, LICHTMAN & POBER , 2005; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2011).

Para evitar a resistência dos parasitos aos anti-helmínticos comerciais, faz-se necessário tanto um trabalho de capacitação dos produtores no que se refere ao uso adequado destes produtos, quanto de pesquisas bioprospectivas para obtenção de biomoléculas. Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com base no etnoconhecimento e na biodiversidade em busca de princípios ativos capazes de estimular o sistema imune auxiliando no controle e combate de parasitas.

Neste contexto, muitas plantas do semiárido nordestino vêm sendo utilizadas com objetivo de reduzir as cargas parasitárias de *H. contortus* em seus hospedeiros. Diante disso, o presente trabalho avaliou a ação anti-helmíntica e imunomoduladora do extrato bruto de *Poincianella pyramidalis* na resposta imune dos ovinos infectados com *H. contortus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OVINOCULTURA NO BRASIL

O Brasil atualmente é o décimo sétimo maior produtor de caprinos e ovinos no mundo com um rebanho de aproximadamente 18 milhões de cabeças (FAO, 2012). A região Nordeste é a principal produtora, concentrando nas zonas árida e semiárida cerca de 10 milhões de cabeças. O estado da Bahia é responsável pela criação de quase três milhões de animais destinados predominantemente ao corte, ocupando a segunda posição no *ranking* nacional atrás apenas do Rio Grande do Sul com quatro milhões de cabeças (IBGE, 2011; ANCO, 2010), o que corresponde a cerca de 20% da produção nacional (MARTINEZ *et al.*, 2010). Esta cultura representa uma importante fonte de renda para pequenos produtores, que obtêm através da venda da carne, leite e pele, a garantia para sua sobrevivência. A ovinocultura é caracterizada pelo sistema de produção extensiva e às vezes ultra-extensiva (RIBEIRO *et al.*, 1988; PEREIRA *et al.*, 2008).

Entretanto, deve-se salientar que a depender do objetivo do criador e da disponibilidade financeira pode-se ter outros sistemas de criação de ovinos a exemplo do sistema intensivo e semi-intensivo. Diferente do modo extensivo que é caracterizado pela simplicidade, menos custo e utilização de raças com menor exigência nutricional, o sistema intensivo usa vários recursos tecnológicos para assegurar uma boa produtividade das raças dos animais e assim boas condições sanitárias e da qualidade do produto (lã, carne, pele, matrizes entre outros) a se comercializar. Já o modo semi-intensivo usa medidas extensivas associadas a algumas tecnologias para garantir também a condição sanitária (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A ovinocultura é prejudicada pela presença de endoparasitas, assim como fatores nutricionais, climáticos, genéticos e da resistência aos antiparasitários. Dentre os parasitas mais comuns de ruminantes existem os nematoides, *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia sp.*, *Ostertagia (Teladorsagia) spp.* *Nematodirus*

sp. e *Haemonchus contortus*, este último possui uma grande importância justificada pela alta ocorrência e patogenicidade (RAMOS, *et al.*, 2004; GADZA, 2006; MACEDO, 2007; MOLENTO *et al.*, 2013).

2.2 NEMATÓDEO *Haemonchus contortus*

Nematódeos são parasitas que apresentam simetria bilateral, três folhetos germinativos, com corpo alongado, cilíndrico e afilado; revestido por uma cutícula que sofre quatro mudas até chegar à fase do verme adulto. São dioicos com tubo digestivo completo. Em relação ao modo de vida, podem ser livres e/ou parasitários, no caso deste último podem ser hospedeiros de plantas e animais (RUPPERT, FOX & BARNES, 2005).

O nematódeo *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) foi descrito por Colb (1898), o qual pertence ao Reino Animalia, Filo Nematelminthes, Classe Nematoda (*Secernentea*), Ordem Strongylida, Subordem Strongylina, Superfamília Strongyloidea, Família Trichostrongylidae, Gênero *Haemonchus* e espécie *Haemonchus contortus* (Colb, 1898).

No gênero *Haemonchus* estão inseridas treze espécies a exemplo de *H. placei* (Place, 1893), *H. similis* (Travassos, 1914), *H. longistipes* (Railliet y Henry, 1909), *H. mitchelli* (LeRoux, 1929), *H. lagwrencei* (Sandground, 1933), sendo *H. contortus* a mais comum em ruminantes, dando destaque a ovinos e caprinos de várias partes do mundo, em climas tropicais e subtropicais, a exemplo do Brasil (MILLER & HOROV, 2012; LOPES *et al.*, 2013).

Acredita-se que o gênero *Haemonchus* teve sua origem na África parasitando antílopes e, a partir dos processos de colonização e migração, este helminto difundiu-se para outros ruminantes de grande e pequeno porte como o gado, ovelhas e caprinos em diversas regiões do mundo (ANGULO-CUBILLÁN *et al.*, 2007). Assim, atualmente *H. contortus* apresenta uma ampla distribuição mundial, principalmente em regiões de clima mais quente e úmido, características que favorecem o seu desenvolvimento (RADOSTITS *et al.*, 2000; ANGULO-CUBILLÁN *et al.*, 2007).

O Nordeste é a região brasileira onde se observa a maior frequência de nematódeos gastrintestinais em pequenos ruminantes, principalmente *Haemonchus contortus*, devido à criação em grandes concentrações e a carência de orientação adequada aos seus criadores, quanto à sanidade de seus rebanhos. As infecções causadas por estes nematódeos resultam em perdas econômicas evidenciadas através da alta taxa de mortalidade e comprometimento do desempenho produtivo, que são decorrentes do atraso no crescimento, da queda na produção leiteira, da redução do potencial reprodutivo e dos gastos com tratamentos (ALLONBY e URQUHART, 1975; CHARLES *et al.*, 1989; MACRAE, 1993; MOLENTO *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2007, LOPES *et al.*, 2013).

H. contortus apresenta como característica marcante a presença de bolsa copulatória, cápsula bucal pequena contendo uma lanceta e um conjunto de papilas cervicais, dimorfismo sexual evidente (fêmeas são maiores do que os machos e apresentam os ovários brancos envolta do intestino) e alto potencial biótico com eliminação de 5.000 a 10.000 ovos por dia a depender da carga parasitária e da quantidade de larvas infectantes ingeridas (UENO, 1995; UQUART *et al.*, 1998; ANGULO-CUBBILÁN *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2011).

O helminto possui um ciclo evolutivo direto, com duas fases: uma parasitária e outra ambiental, denominada fase de vida livre. Esta última se inicia com a liberação dos ovos que se encontram na fase de mórula, através das fezes dos animais infectados nas pastagens. Após as sucessivas divisões celulares, as larvas são formadas em seguida à sua eclosão ocorrem os estágios de mudas: L₁, L₂ até chegar a L₃ (larva infectante) em um processo que dura de cinco a sete dias. A fase parasitária inicia-se no hospedeiro através da ingestão de larvas infectantes junto com a pastagem e então, no tubo digestivo a larva L₃ se transforma em L₄ hematófaga (pré-adulto). Na fase adulta ocorre sua diferenciação em macho ou fêmea, e a fixação na região do abomaso, um dos quatro estômagos dos ruminantes (RAHMAN e COLLINS, 1990).

A enfermidade causada pela infecção por *H. contortus* é denominada hemoncose, e pode apresentar como quadros clínicos, surtos crônicos em animais velhos com baixa carga parasitária, agudos, frequentemente fatais, nos animais jovens ou em animais que não foram expostos ao parasito. Devido ao

hábito hematófago dos estágios pré-adulto e adulto na mucosa do abomaso, surgem alguns sinais como anemia, palidez na mucosa, edema submandibular (devido à hipoproteïnemia), perda de apetite e da motilidade intestinal, aumento do pH gástrico, fraqueza, emagrecimento, morbidade (ROWE *et al.*, 1988; RAHMAN e COLLINS, 1990; HOSTE, 2001; ANGULO-CUBILLÁN, 2007 e 2010; MILLER & HOROHOV, 2012).

A gravidade da doença depende de alguns fatores, tais como: intensidade da infecção no que se refere ao número de helmintos, virulência do parasita, idade, estado nutricional e imunológico, período peripuerperal e variação genética das raças de ovinos, além das condições ambientais como temperatura, pluviosidade e umidade (AMARANTE, 2004; ANGULO-CUBILLÁN, 2007). De acordo com Ueno & Golçanves (1998), a depender da quantidade de ovos eliminada nas fezes pelo estágio adulto, pode-se classificar as doenças em leve (abaixo de 500 ovos), moderada (entre 500 a 1500 ovos), aguda (1500 a 3000 ovos) e fatal (acima de 3000).

Para o diagnóstico clínico da hemoncose tem-se utilizado principalmente o método auxiliar FAMACHA e contagem de ovos por grama de fezes (OPG) apesar de testes sorológicos, a exemplo do ELISA, estarem sendo inseridos na identificação da doença. O primeiro trata-se de um método hospedeiro - específico que correlaciona a coloração da conjuntiva ocular do animal com o valor do seu hematócrito para verificar a incidência do parasita e assim, o grau de anemia do animal. Um fator a se considerar é que o FAMACHA pode gerar o estabelecimento da refugia, a seleção e resistência parasitária, uma vez que apenas são tratados os animais que apresentam sinais clínicos mais evidentes o que leva uma pequena parcela da população dos helmintos serem excluídas, constituindo a refugia (MOLENTO *et al.*, 2013).

O exame de fezes que tem como a unidade o OPG, por sua vez, permite determinar a carga parasitária a partir da quantidade de ovos encontrada nas fezes e desta forma relacionar com os possíveis danos provocados pelo helminto, sendo indicado realizar antes e após o tratamento como método confirmatório (MOLENTO *et al.*, 2004; QAMAR & MAQBOOL, 2012).

O diagnóstico, porém, pode ser mascarado devido a um importante mecanismo de defesa do parasito conhecido como hipobiose. A hipobiose

acontece quando as condições ambientais ou do hospedeiro são desfavoráveis, podendo ocorrer um retardo temporário da transformação da larva L₄ em adultos o que garante aos parasitos uma maior sobrevivência, principalmente em animais susceptíveis. Entretanto, de acordo com Gantoni *et al.* (1998) este mecanismo pode ser uma condição necessária à sobrevivência de *H. contortus* tanto em ambientes secos quanto nos úmidos, sendo neste último uma coexistência com formas adultas (URQUHART *et al.*, 1998; GANTONI *et al.*, 1998; MELO, 2005).

A contaminação ambiental, seja por animais sem diagnóstico de hemoncose e a hipobiose, é um fator a se considerar, já que os estágios larvares presentes no pasto possuem reserva energética e um baixo metabolismo, condição que favorece a sobrevivência do parasita no ambiente por um período longo o que pode levar a uma infecção ou reinfecção durante a alimentação. De acordo com Pereira *et al.* (2008), o *H. contortus* apresenta maior incidência no período seco do que no chuvoso, tratando-se de uma inversão em relação a presença de larvas infectantes no pasto e o verme adulto no animal, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento em animais com infecções subclínicas.

Entretanto, uma vez identificada a infecção, medidas de combate e controle ao nematoide são aplicadas principalmente em relação à administração de anti-helmínticos, associada às medidas preventivas, as quais são pouco conhecidas, a exemplo do manejo rotacional do pasto, controle biológico através de fungos nematoides, o qual ainda esta em fase experimental; além dos fitoterápicos que podem servir como alternativa dos métodos químicos (LOPES *et al.*, 2013) .

2.3 ANTI-HELMÍNTICOS

A hemoncose é uma doença considerada como um problema sanitário por causar altas taxas de mortalidade, perda da produção que geram grandes danos econômicos, entre outros. A principal forma de combate a hemoncose é através do uso de anti-helmínticos (MACEDO *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2008).

Os anti-helmínticos são fármacos que agem localmente para expulsar os parasitos do trato gastrointestinal ou eliminá-los de forma sistêmica dos órgãos e tecidos. Estes fármacos podem ser de largo ou curto espectro, sendo os primeiros os que apresentam maior utilização. Isso porque podem ser aplicados no tratamento de infecções causadas por diferentes patógenos e são administrados na tentativa de controlar a doença por um período mais longo. Por esta razão esse medicamento vem sendo utilizado de forma indiscriminada e assim sua eficácia tem-se reduzido (PEREIRA *et al.*, 2008; GOODMAN & GILMAN, 2010).

Os principais compostos químicos utilizados para o tratamento parasitário são: os bendamizóis (Albendazole, Febendazole e Oxfendazole), os imidazotiazoles (Cloridrato de Levamisole), as salicilanilidas (Closantel Sódico) e as avermectinas (Ivermectina) (BUZZULLINI, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2010). Entre estes, os bendamizóis e as avermectinas são considerados de largo espectro e de uso convencional (RODRIGUES *et al.*, 2007). Alguns destes medicamentos vão atuar como ovicida, larvicida, a exemplo do bendamizóis, e outros no estágio adulto do nematoide como o Levamisole, por causar paralisia e morte ao afetarem os canais de cloro independentes do GABA (LOPES *et al.*, 2013)

O modo de ação deste fármaco está associado a alterações bioquímicas no verme, a exemplo da inibição dos microtúbulos, especificamente a ligação da β -tubulina (GOODMAN & GILMAN, 2010; LOPES *et al.*, 2013), apesar do mecanismo ainda ser pouco conhecido (LIMA *et al.*, 2010). Porém, nos ruminantes a eficiência do medicamento pode ser alterada devido a uma série de diluições sofridas pelo fármaco ao longo da sua passagem pelos diferentes estômagos do animal, associadas à presença de uma fauna microbiológica que podem interferir no metabolismo do mesmo (GOODMAN & GILMAN, 2010; BUTTLE *et al.*, 2011).

Entretanto, os nematódeos, a exemplo do *H. contortus*, vem se tornando resistentes a estes compostos mesmo quando combinados a outros princípios ativos. Uma explicação esta no fato que este helminto possui uma afinidade com os compostos do fármaco, gerando resistência anti-helmíntica (MOLENTO, *et al.*, 2013).

A resistência anti-helmíntica é um mecanismo onde a droga não consegue apresentar a mesma eficácia terapêutica (95%) após um determinado período, quando utilizada sob as mesmas condições (BUZZULLINI, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2007). De acordo com Silvestre *et al.* (2002), a resistência pode ser também descrita como uma situação onde a dosagem normal da droga não consegue promover a redução de ovos excretados nas fezes pelos vermes, em condições normais. Então, o mecanismo pode ocorrer devido à falha ou ao uso indiscriminado dos fármacos para combater os parasitas de uma forma geral (PEREIRA *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2013)

Os parasitas resistentes são resultados de trocas gênicas entre os que sobreviveram a exposição à droga, pois os mesmos passam seus alelos aos descendentes, criando assim uma população diferente até mesmo na patogenicidade, que na sua maioria são mais letais (MELO & BEVILAQUA, 2005).

Alternativas para reduzir a ação do *H. contortus* e de outros nematódeos estão sendo desenvolvidas, como por exemplo, a criação de vacinas utilizando genótipos de linhagens de parasitas resistentes (CHIEJINA *et al.*, 2002; LEJAMBRE, WINDON & SMITH, 2008); uso de fungos nematófagos, suplementação alimentar, consumo de forragens bioativas (plantas que possuem metabólitos secundários que podem atuar como anti-helmínticos) (MORENO *et al.*, 2012) e manejo do pasto para reduzir a contaminação ambiental (MILLER & HOROHOV, 2012).

No entanto, novas moléculas que possuam o potencial minimizador de parasitas são necessárias, desde as formuladas em laboratório como as naturais com propriedades e efeitos específicos. Por isto, muitas pesquisas desenvolvidas em todo o mundo se baseiam em estudos etnobotânicos, e as mesmas utilizam extratos de plantas que são compostos por várias partes vegetais (casca, raiz, folhas e etc.). Além de ser uma alternativa para o uso dos produtos químicos, é uma forma de baratear os altos custos, diminuir a poluição ambiental e reduzir o aparecimento de cepas mais resistentes (BUZZULLINI *et al.*, 2007; KAMARAJ *et al.*, 2011).

2.4 *Poincinella pyramidalis*

No Brasil, estudos etnobotânicos vêm sendo realizados com algumas espécies do semiárido nordestino, em especial no estado da Bahia (ALBURQUEQUE & OLIVEIRA, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2010), na tentativa de obter substâncias com propriedades biocidas capazes de combater diversos patógenos e conseqüentemente as doenças por eles causadas, sendo de fácil utilização e baixo custo, a exemplo da *Poincinella pyramidalis* que vem sendo investigada no uso contra a hemoncose.

A *Poincinella pyramidalis*, (Tul.) L.P. Queiroz, antes denominada *Caesalpinia pyramidalis*, é uma árvore de porte médio que pode alcançar até 12 metros, endêmica do semiárido nordestino, sendo mais representativa na Caatinga. Pertencente a família *Fabaceae*, produz flores amarelas em racemo e fruto em forma de vagem achatada com cinco a sete sementes. No período chuvoso as folhas exalam um cheiro desagradável, por isso conhecida popularmente como “catingueira” ou “pau-de-rato”, e ao chegar à estação seca as mesmas secam e caem transformando-se em uma forragem nutritiva usada na medicina popular e na alimentação dos animais.

Esta árvore possui um grande potencial econômico em relação ao aproveitamento madeireiro e ao uso medicinal (SEPLANTEC, 1979; COELHO *et al.*, 2010; SILVA, 2012). As folhas, principalmente, flores e casca da *P. pyramidalis* são utilizadas na medicina popular no combate a infecções catarrais, febres, doenças estomacais, diarréias e disenterias por terem propriedades antiinflamatória, cicatrizante e antimicrobiana (MONTEIRO *et al.*, 2005; DANTAS *et al.*, 2008).

Em estudos anteriores com esta planta obteve-se o isolamento de uma variedade de moléculas a exemplo de biflavonoides, flavonoides, triterpenos e fenilpropanoides (MENDES *et al.*, 2000; BAHIA *et al.*, 2005). Verificou-se em amostras da planta coletadas de diversas regiões do nordeste brasileiro, uma variedade de biflavonoides, sugerindo que a influência das condições climáticas, do solo e da idade da planta é bastante relevante sobre a biossíntese destas substâncias (BAHIA *et al.*, 2007).

Na avaliação do extrato clorofórmico das folhas de *Poincinella pyramidalis* foi constatada a presença de um novo biflavonoide denominado caesalflavona, a podocarpusflavona A, agathisflavona, apigenina, kaempferol, sitosterol e lupeol. No extrato clorofórmico do caule foram obtidos 4,4'-diidroxí-2'-metoxi-chalcona, (-)-siringaresinol e galato de metila, não se observando biflavonoides nesta parte. As estruturas destas substâncias foram estabelecidas com base em dados espectrométricos utilizando-se técnicas de espectrometria de massa e de ressonância nuclear magnética. (BAHIA *et al*, 2007).

Borges-dos-Santos *et al.* (2007) e Nunes (2012) avaliaram a atividade do extrato aquoso desta planta modulando a resposta imune em caprinos naturalmente infectados com *Haemonchus contortus*, através da avaliação do seu efeito *in vitro* sobre populações celulares, bem como a ação *in vivo* sobre a resposta por anticorpos IgG e IgA. Os efeitos hematológicos, histológicos e parasitológicos produzidos pela administração dos extratos a estes animais também foram avaliados. Sendo assim, foi possível observar o efeito deste extrato na expressiva redução de ovos por grama de fezes (OPG) e o aumento na produção de imunoglobulinas específicas (IgG e IgA) contra o helminto.

2.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Helmintos são parasitas extracelulares capazes de induzir resposta imune inata e humoral em seus hospedeiros. Sua presença estimula a ativação de linfócitos T CD4⁺ e a produção de subpopulações de células T efectoras de perfil Th1 ou Th2, dependendo, porém, do tipo de antígeno e das citocinas envolvidas no processo de sinalização.

Os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produzem citocinas, tais como a IL-4, IL-5 e IL-13 capazes de induzir a produção de IgE, que por sua vez ativa basófilos circulantes ou mastócitos teciduais e eosinófilos, induzindo a liberação de histamina e outros mediadores da reação de hipersensibilidade (MACHADO, 2004; ABBAS, LICHTMAN & POBER, 2005; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2011),

resultando no aumento da secreção de mediadores da inflamação, secreção de muco e aumento da contratilidade da musculatura intestinal, facilitando a expulsão dos vermes adultos (FINKELMAN, 1997).

Estudos investigando os mecanismos da defesa imunológica contra nematódeos indicam que há um predomínio das células TCD4⁺ de perfil Th2, com síntese de IL-4. Além desta, outras citocinas estão envolvidas na resposta Th2, a exemplo da IL-5, IL-10 e IL-13, que atuam como mediadores da resposta imune e da inflamação para produção de anticorpos das classes IgG, IgA e principalmente IgE, bem como na ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, componentes fundamentais na defesa contra helmintos. Os anticorpos podem inibir o metabolismo, o crescimento, a capacidade reprodutiva e a mobilidade do parasita (GILL *et al.*, 2000; ÂNGULO-CUBBILLÁN *et al.*, 2005; ABBAS, LICHTMAN & POBER, 2005; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2011).

Devido à complexidade dos antígenos helmínticos, o sistema imune cria vários mecanismos para tentar reconhecê-los e combatê-los. Os linfócitos TCD4⁺, por exemplo, desempenham importante papel na mediação da resistência contra *H. contortus* através da produção e secreção de IL-4. Além disso, o aumento da resposta linfocitária aos antígenos parasitários tem sido verificado em animais com resistência genética as parasitoses via polarização Th2 (ZAROS & VIEIRA, 2008).

Alguns padrões da resposta imune estão diretamente relacionados à genética do hospedeiro, tanto na susceptibilidade ou resistência parasitária (AMARANTE, 2004; ZHACARIAS, 2004), quanto no grau de infecção, seja este de acordo com a espécie de parasito, com o número de larvas infectantes ingeridas ou com a idade, sexo e raça/espécie de hospedeiro.

A variação genética é um importante fator a ser considerado na hemoncose, assim como em outras doenças. Em relação a essa variação pode-se ter animais resistentes, resilientes e susceptíveis. Resistentes são aqueles que conseguem eliminar ou matar os vermes pela ação do seu sistema de defesa; os resilientes são considerados aqueles que podem continuar com o agente sem demonstrar muitas vezes a sintomatologia, já os susceptíveis são aqueles que os parasitas persistem no organismo do animal.

Animais geneticamente resistentes à infecção pelo *H. contortus*, apresentam uma forte resposta imune do tipo Th2, sugerindo que os linfócitos TCD4⁺ com este perfil são parte integrante da resistência natural à infecção pelo parasito, podendo atuar sinergicamente com os anticorpos, assim contribuindo para expressão da imunidade adquirida no hospedeiro (GILL *et al.*, 2000; PENÃ *et al.*, 2006). O papel dos eosinófilos tem sido frequentemente associado também à resistência ao *H. contortus* (MILLER, 1996; MUÑOZ-GUZMÁN *et al.*, 2006), juntamente com a imunidade humoral, caracterizada pela formação de anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE, sendo essa última a mais importante (WATSON, 1986; MILLER, 1996).

O desenvolvimento da resistência contra os nematódeos tem sido associada com a resposta imune mediada por linfócitos Th2, com aumento do número de mastócitos na mucosa, eosinofilia e linfócitos globulares, além da presença de substâncias inibidoras no muco e o aumento de sua produção (AMARANTE; SHAKYA, MILLER & HOROV, 2009).

Os parasitas podem também induzir um desvio da resposta Th2 para Th1 com a produção de altos níveis de interferon gama (INF- γ), citocina que pode, como a IL-12, comprometer a capacidade do hospedeiro em expulsar os nematoides tornando-os mais susceptíveis (ZAROS & VIEIRA, 2008; DERVISHI *et al.*, 2011). Já a elevada produção de IL-13 esta associada a expulsão dos parasitas pelos animais resistentes por atuar conjuntamente com IL-4, produzindo um aumento na permeabilidade intestinal, na contração da musculatura lisa e também na quantidade e qualidade de muco.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar aspectos da resposta imune humoral e celular em ovinos infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus*, tratados com extrato aquoso de *Poincianella pyramidalis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a infecção experimental de ovinos com *H. contortus*.
- Avaliar a produção de anticorpos séricos ao longo de 90 dias de infecção.
- Avaliar ao longo de 90 dias a produção *in vitro* de interferon gama a partir de cultura de células do sangue periférico de ovinos.

4 METODOLOGIA

4.1 ANTÍGENOS DE *Haemonchus contortus*.

Utilizou-se o método modificado de Borges-dos-Santos e Cols (2010). Foram coletados, no abatedouro, vermes adultos machos e fêmeas do abomaso de ovinos e transferidos para um recipiente com soro fisiológico. Em seguida, foram lavados sucessivas vezes com tampão salina fosfato (TSF) pH 7,4, para retirada das impurezas e acondicionados em tubos cônicos de 15mL contendo cento e cinquenta parasitos de ambos sexos também em TSF com pH 7,4. Os parasitos de todos os tubos cônicos foram lisados por meio de cinco ciclos de 30 segundos com intervalos entre cada ciclo de 30s com frequência de 60 hertz por meio do aparelho Ultrasonic Processor. Em cada lise, o tubo cônico foi mantido em uma "cama de gelo".

Quando todos os parasitos de todos os tubos foram lisados, ocorreu a centrifugação à 8°C por 30 minutos a 1200G para separação do *pellet* e sobrenadante. O sobrenadante foi armazenado em tubos tipo *ependorff* estéreis e mantido no freezer a -20°C. Foi realizada a técnica de Lowry e Cols. (1951) para obtenção da dosagem de proteína de cada amostra, sendo encontrada a concentração de 5,34mg/mL.

4.2 CULTURAS DE LARVAS L3 DE *Haemonchus contortus*

Para a cultura de larvas infectantes L3 de *Haemonchus contortus* foram coletados nos abatedouros, vermes adultos (principalmente fêmeas) do abomaso de ovinos. Estes foram transportados em solução fisiológica (0,09%) até o Laboratório de Parasitologia (ICS-UFBA). Em seguida, as fêmeas deste parasito foram separadas dos machos, e colocadas em um recipiente onde foi adicionada

solução fisiológica 0,09% aquecida (morna) em torno de mais ou menos 60°C, para que as mesmas fizessem a ovopostura (Borges, 2007). Além disso, as fêmeas foram dissecadas com auxílio de um bisturi para uma maior obtenção de ovos.

Após esta etapa, foi realizada a técnica da coprocultura (Roberts & O'Sullivan, 1950) utilizando as fezes autoclavadas de ovinos como substrato (sem a presença de estruturas infectantes de qualquer parasito), solução fisiológica (a mesma da ovoposição) e fêmeas dissecadas, criando assim uma situação favorável para obtenção das larvas infectantes L₃ (Borges, 2007).

Para cada coprocultura, foram utilizada 4g de fezes estéreis. Foram adicionados também uma porção de maravalha, as fêmeas dissecadas e a solução fisiológica da ovoposição para umidificar o meio, controlando o excesso hídrico. Depois, a mistura foi transferida para um copo de vidro, permanecendo por 10 dias em temperatura ambiental (Ueno & Golçanves, 1995).

4.3 EXTRATO AQUOSO DE *Poincinella pyramidalis*

O extrato aquoso de *P. pyramidalis* foi produzido no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, seguindo-se o protocolo de Bahia e colaboradores (2005). Foram utilizados 200g de folhas coletadas do município de Jaguarari (10° 15' 36" S, 40° 11' 45" W), situado a 400 km da cidade de Salvador, Bahia. O material foi seco em estufa ventilada, macerado em moinho do tipo Willey, submetido à extração através de infusão em água por 24 horas, liofilizado e acondicionado em placas de petri. Ao final do processo obteve-se 48g de extrato.

4.4 INFECÇÃO

4.4.1 Ovinos

Foram utilizados 11 ovinos sem raça definida, de ambos os sexos (sendo quatro machos e onze fêmeas), com idade entre cinco e dez meses. Os ovinos foram mantidos em regime de confinamento em baias de piso ripado suspenso (Figura 1B) na Unidade Experimental (Figura 1A) de Salinas da Margarida da Universidade Federal da Bahia (12°52'16"S e 38°45'52"O), com alimentação balanceada à base de ração industrial, farelo de trigo, sal mineral, sorgo e feno e água *ad libitum*. Suplementação com vitamina B12 foi administrada no período anterior a infecção experimental, para fortalecer os animais.



Figura 1. A- Unidade Experimental do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Salinas das Margaridas- BA. B- Baia de piso ripado suspenso onde estavam confinados os animais.

Para mensuração da carga parasitária dos animais e identificação dos parasitos, fezes foram colhidas e avaliadas através da técnica Gordon & Whitlock (1939) e coprocultura. Em seguida todos os ovinos foram vermifugados com doramectina tendo sua carga parasitária mensurada novamente em três dias consecutivos (Borges, 2007). Vinte dias após a primeira vermifugação foram administrados albendazole e levamisole, respectivamente, respeitando um intervalo de 15 dias para aplicação de cada um. Um novo exame parasitológico das fezes foi realizado para confirmar a redução da carga parasitária igual à zero. Todos os antiparasitários aplicados nos animais seguiram as normas dos fabricantes obedecendo à relação dose versus peso vivo.

O total de onze ovinos foi dividido em três grupos contendo:

- I. Grupo I (Controle Negativo): três animais não infectados com o *Haemonchus contortus*.
- II. Grupo II (Controle Positivo): quatro animais infectados por via oral com as larvas infectantes L₃ do *H. contortus* sem tratamento com extrato aquoso de *P. pyramidalis*.
- III. Grupo III (Infectado e tratado): quatro animais infectados por via oral com as larvas infectantes L₃ do *H. contortus* e com tratamento do extrato aquoso da *P. pyramidalis*.

4.4.2 Protocolo da Infecção Experimental

A infecção dos ovinos com *H. contortus* nos Grupos II e III foi realizada inoculando pela via oral uma suspensão de água destilada contendo aproximadamente 20.000 larvas L₃ oriundas da coprocultura (GILL et al., 2000) com auxílio de seringas de 20ml. O volume a ser inoculado teve como base o número de larvas contidas em 1ml da suspensão, com isso foi inoculado um total de 220ml por animal.

4.4.3 Protocolo de Administração do Extrato Aquoso da *P. pyramidalis*

Com a certificação da alta carga parasitária, foi administrado em três dias consecutivos no tempo 45 dias. O extrato da planta *P. pyramidalis* (10mg/Kg PV) diluído em água destilada, por via oral com auxílio de uma seringa de 20mL, tendo como parâmetro a relação dose *versus* peso vivo (NUNES, 2012).

4.5 COLHEITAS DE AMOSTRAS

4.5.1 Colheita das Fezes

Amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos ovinos com auxílio de luvas estéreis nos tempos 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias e armazenadas em caixas isotérmicas com gelo químico para o envio e análise no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências em Saúde (ICS/UFBA).

4.5.1.1 Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

Para contagem de ovos de *H. contortus* utilizou-se a técnica de Gordon & Whitlock (1939) modificada por Whitlock (1948) cuja unidade é o OPG (ovos por grama de fezes). Para tanto, 2g de fezes diluídas em 58 ml de solução saturada de sal mantida em repouso por 30 minutos para flutuação dos ovos. Após este período amostras da mistura eram transferidas à Câmara de Macmaster para leitura em microscópio óptico, na objetiva de 10x e confirmado na objetiva de 40x.

4.5.1.2 Coprocultura

Para confirmação da espécie dos parasitos utilizou-se a técnica descrita por Roberts & O'Sullivan (1950). Foi feito um sistema com cerca de 4g de fezes de ovinos adicionadas a uma porção de maravalha, o qual foi mantido ao longo de dez dias em temperatura ambiente controlando-se a umidade, para evitar a contaminação fúngica da amostra, e assim obter as larvas do nematódeo (UENO & GOLÇALVES, 1995).

A confirmação foi a partir dos caracteres morfológicos dos nematódeos com os indicados na chave taxonômica de Thomas & Probert (1993) para esta espécie.

4.5.2 Colheitas de sangue

Amostras de sangue dos ovinos foram colhidas nos tempos 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias por punção da veia jugular utilizando tubos á vácuo (*Vacutainer*) com heparina, para realização da cultura celular, e tubo sem anticoagulante para obtenção do soro, o qual era centrifugado por dez minutos a 479 g para obtenção dos soros, que posteriormente eram acondicionados em tubos tipo *ependorfs* e armazenados no *freezer* a -20°C, até o momento da análise.

4.5.3 Eficácia da Infecção Experimental

Para confirmação da eficácia da infecção experimental os ovinos foram eutanasiados no 90º dia pós-infecção, de acordo com o protocolo do comitê de ética e bem estar animal da UFBA, com 5ml de acepromazina a 1% e 2,5ml de quetamina por via intravenosa, seguido de uma solução de eutanásia (250g de sulfato de magnésio diluído em 500ml de soro fisiológico e três ampolas de 30ml de cloreto de potássio a 19% para cada 50 Kg/peso vivo. O conteúdo do abomaso foi colhido utilizando peneira de nylon com malha fina e mantido em recipiente plástico estéril contendo formol a 10%. Os espécimes de *H. contortus* foram quantificados e classificados quanto ao sexo. Depois desta coleta, o abomaso foi colocado junto com o resto da carcaça para incineração como medida profilática, evitando contaminação ambiental.

4.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

4.6.1 Quantificação do Título de Anticorpos

O título de anticorpos séricos da classe IgG específicos contra *H. contortus* foi avaliado através do teste de ELISA Indireto (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando placas de poliestireno fundo chato de 96 poços de alta ligação (Costar). A placa foi sensibilizada com 0,125µg de antígeno diluído em 100µl de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6 por poço, e incubadas durante 12 horas (*overnight*) em câmara úmida a 4°C.

Após o período de incubação as placas foram lavadas duas vezes com Tampão Salina Fosfato contendo 0,05% de Tween 20® (TSF-T). Em seguida acrescentou-se 200ul de solução de bloqueio (TSF-T contendo 5% de leite Molico® desnatado) por poço e incubada em câmara úmida a 37°C durante 2 horas. As placas foram uma vez lavadas com TSF-T e em seguida foram adicionados 50ul de soro de ovino diluído 1:100 em TSF-T contendo leite Molico® desnatado a 1% e novamente incubadas em câmara úmida a 37°C durante 1 hora.

Ao final do período de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com TSF-T. Adicionou-se 50ul, em cada poço, de soro de coelho anti-IgG de ovelha conjugado com peroxidase (SouthernBiotech, Alabama, Estados Unidos) diluído na proporção 1:10.000 em TSF-T contendo 1% de leite Molico® desnatado e incubado em câmara úmida a 37°C em estufa durante 45 minutos.

As placas foram novamente lavadas por cinco vezes com TSF-T, seguido da adição de 50ul de solução reveladora TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) por poço, mantidas em temperatura ambiente abrigada de luz durante 15 minutos. Para interromper a revelação adicionou-se 25ul de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄) por poço. A leitura foi realizada na faixa de 450 a 655nm de comprimento de onda em leitor automático de microplacas (iMark Microplate Reader S/N 10978).

4.6.2 Cultivo Celular

O cultivo celular para a dosagem de interferon- γ (INF- γ) foi realizado utilizando como modelo o protocolo de Meyer e colaboradores (2005). Em uma placa de cultivo (Costar) de 24 poços foi colocado 1mL de sangue heparanizado de cada animal dos grupos, seguindo um modelo contendo controle negativo, controle positivo e o antígeno do parasita. Para o controle positivo foram utilizados 5 μ g do mitógeno *Pokeweed* (*Phytolacca americana* ou PWM); como controle negativo utilizou-se apenas o sangue heparanizado e para o antígeno foram usadas diferentes concentrações, entretanto, foi utilizada a concentração de 10 μ g.

As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa de CO₂ à 5%. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação das placas, armazenado em tubos tipo *ependorfs* estéreis, identificados e armazenados em freezer a -20°C.

4.6.3 Dosagem de Interferon gama (INF- γ)

A avaliação da produção de INF- γ foi realizada através da técnica ELISA *sandwich* utilizando o kit comercial (Kit Ovine INF- γ , Mabtech). Uma placa estéril de fundo chato de 96 poços (Costar) foi sensibilizada utilizando 2 μ g/mL do anticorpo de captura do kit comercial (Kit Ovine INF- γ , Mabtech) diluídos em TSF (pH 7,4). Aplicou-se 100 μ l em cada poço e incubou-se 12 horas, *overnight*, em câmara úmida a 4°C.

Em seguida as placas foram lavadas por duas vezes com TSF-T, bloqueadas com 200 μ l da solução de TSF a 0,05% de Tween 20 e 0,01% de Albumina Bovina Sérica (BSA) permanecendo por uma hora em câmara úmida a temperatura ambiente.

Foram adicionados 100 μ l por poço das amostras dos sobrenadantes obtidos da cultura, e dos padrões do kit, incubando a temperatura ambiente por duas horas. Para a curva padrão foi feita uma diluição seriada com 2 μ L (500pg/mL) do padrão em 2mL de TSF no tubo de ensaio, obtendo cinco diluições

diferentes: 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62,5pg/mL, 31,75pg/mL e 15,875pg/mL. Uma curva padrão foi feita para cada placa.

Seguido o período de incubação realizou-se cinco lavagens com TSF-T a 0,05%. Em seguida colocou-se 100µl do anticorpo de detecção, (0,1µg/mL) diluído em TSF-T a 0,01% de BSA, deixando por mais uma hora incubar a temperatura ambiente. Após o tempo, as placas foram lavadas cinco vezes com TSF-T 0,05%. Em seguida, colocou-se 100µL por poço de estreptavidina diluída na concentração de 1:1000 de TSF com Tween 20 0,05% e BSA 0,1%, ficando a temperatura ambiente por mais uma hora.

As placas foram lavadas cinco vezes com TSF-T 0,05% e em seguida foram adicionados 100µl por poço de solução reveladora TMB; as mesmas foram mantidas no escuro de 10 a 20 minutos. Adicionou-se 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) para interromper a reação. A leitura foi realizada em leitor automático de microplacas (iMark Microplate Reader S/N 10978), com filtro de 450 a 655nm de comprimento de onda. Os valores da densidade óptica foram tabulados e transformados em gráficos.

4.7 EFICÁCIA

Para avaliar a eficácia da planta foi aplicada a seguinte fórmula recomendada pela Portaria nº48 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (1997):

$$\text{O Teste de Eficácia (TE)} = (\text{GC} - \text{GT}) / \text{GC} \times 100$$

Onde GC representa a média do número de helmintos do Grupo Controle; GT, a média do número de helmintos do Grupo Tratado.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos nos testes experimentais foram tabulados e os gráficos construídos utilizando o programa Microsoft Excel 2007[®]. Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) seguidas pelo teste-*t* de Tukey ou Dunnet. Todos os dados foram expressos pela média dos grupos considerando o valor de $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativa utilizando o programa estatístico SPSS versão 14.0.

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi realização de acordo com os parâmetros éticos para experimentação em animais do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal da Bahia (UFBA), aprovado sob o registro 02312012.

5 RESULTADOS

5.1 INFECÇÃO POR *Haemonchus contortus*

Observou-se que a partir de sete dias após a infecção experimental com as larvas L3 de *H. contortus* nos animais dos Grupos II e III, já era possível encontrar ovos presentes nas fezes. Neste ponto de colheita, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os Grupos I, II e III. Houve diferença estatisticamente significativa entre os mesmos grupos em 15 e 60 dias pós-infecção ($p < 0,05$), neste tempos ocorreram aumento da carga parasitária entre os grupos infectados (GII e GIII) (Tabela 1).

Nos pontos de coleta 7, 15, 30, e 45 dias foi possível observar uma diferença na contagem do OPG do grupo infectado e tratado em relação ao grupo somente infectado. Entretanto, no tempo 90 dias, houve uma inversão deste fato, ocorrendo aumento da carga parasitária de *H. contortus*. Após tratamento com extrato de *P. pyramidalis* no ponto 45, houve redução de 79% da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais do Grupo III aos 60 dias de infecção conforme a tabela 1; já no Grupo II, o que não recebeu tratamento, o número de ovos elevou 12,5%.

Tabela 1. Valores da média do número de ovos de *H. contortus* com base na contagem de ovos por grama de fezes dos ovinos (OPG) ao longo do período experimental de 90 dias dos animais do Grupo I, II e III.

	Tempos de colheita (dias)						
	0	7	15*	30	45	60*	90
Grupo I*	0	0	0	0	0	0	0
Grupo II**	0	175	125	350	525	600	467
Grupo III***	0	1150	525	625	425	88	280

*Grupo I (controle) **Grupo II (Infectados) *** Grupo III (infectados e tratados).

* Diferença estatística $p \leq 0,05$.

No Grupo I, os ovinos não foram inoculados com as larvas do helminto e a carga parasitária manteve-se zerada.

No Grupo II, o animal 298 apresentou carga parasitária igual a 1000 ovos nos pontos 45 e 60 dias demonstrando uma infecção moderada (tabela 2). No ponto 90 dias, ocorreu uma redução na carga parasitária na maioria dos animais com exceção do animal 263. Esses ovinos apresentaram sinais característicos de hemonose, como emagrecimento aparente e quadro de diarreia (Figura 2) (MILLER & HOROHOV, 2012). Houve diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ quando comparados os tempos 0 e 60 dias.

Tabela 2. Contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) ao longo do período experimental de 90 dias dos animais do Grupo II, apenas infectados com as larvas L₃ de *H. contortus* sem tratamento do extrato aquoso de *P. pyramidalis*.

Animais	Tempos de colheita (dias)						
	0*	7	15	30	45	60*	90
263	0	0	0	200	300	300	534
267	0	0	100	500	500	300	284
269	0	700	100	300	300	800	467
298	0	0	300	400	1000	1000	584

* Diferença estatística $p \leq 0,05$

Um ovino do Grupo III (nº 256) apresentou valor de OPG referente a 3000 ovos, sete dias após a infecção. Esta carga parasitária é considerada bastante elevada caracterizando uma infecção aguda e divergente dos demais animais do grupo, nos quais os valores do OPG permaneceram abaixo de 1000 ovos. No tempo 15 dias este mesmo indivíduo apresentou uma redução significativa no número de ovos, mantendo uma infecção leve os longo do experimento (Tabela 3).

Após administração do extrato aquoso em três dias consecutivos no tempo 45 dias, a redução da carga parasitária dos animais 280 e 288 chegaram a 79% e 100%, respectivamente, e no restante se manteve constante (Tabela 3). No ponto 90 dias todos os valores dos OPGs voltaram a aumentar.

O Teste de Eficácia do extrato aquoso de *P. pyramidalis* em relação a sua ação anti-helmíntica foi realizado com base nos resultados obtidos a partir da

contagem dos vermes adultos, coletados no abomaso dos ovinos após sua eutanásia (Tabela 4). O valor da eficácia calculado foi igual a 85%, sugerindo que o extrato da *P. pyramidalis*, nas condições experimentais aplicadas neste estudo, possui efeito moderado.

As coproculturas realizadas em todos os tempos experimentais, permitiram confirmar que os ovos encontrados nas fezes dos ovinos nas análises parasitológicas eram de *H. contortus*.



Figura 2. Ovinos do Grupo II infectados com *H. contortus* apresentando sinais clínicos de hemocose, como emagrecimento.

Tabela 3. Contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) ao longo do período experimental de 90 dias dos animais do Grupo III infectados experimentalmente com larvas L₃ de *H. contortus* e tratados com extrato aquoso de *P. pyramidalis*.

Animais	Tempos de colheita (dias)						
	0	7	15	30	45	60	90
256	0	700	400	500	100	100	350
280	0	100	600	1200	700	150	170
288	0	700	300	800	800	0	100
291	0	800	800	0	100	100	500

Tabela 4. Contagem de vermes adultos de *H. contortus* coletados no abomaso após a eutanásia dos animais dos Grupos I (não infectado experimentalmente), Grupo II (infectado com *H. contortus*) e Grupo III (infectado com *H. cotortus* e tratado com extrato aquoso de *P. pyramidales*).

GRUPO		Número de vermes			
		Machos	Fêmeas	Indiferenciados	Total
Grupo I	254	0	0	0	0
	265	0	0	0	0
	268	0	0	0	0
				Média	0
Grupo II	263	31	34	2	67
	267	6	20	---	26
	269	24	72	5	101
	298	37	5	1	43
			Média	60	
Grupo III	256	1	31	0	32
	280	1	1	---	2
	288	0	0	0	0
	291	0	0	0	0
			Média	9	

5.2 QUANTIFICAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS

A quantificação dos títulos de anticorpos de classe IgG específicos contra *H. contortus* foi realizada nos tempos 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90.

Os níveis de anticorpos da classe IgG dos Grupos I, II e III podem ser observados ao longo do período experimental na Figura 3. Com base nas leituras da densidade óptica presente nesta figura, foi possível inferir que no tempo zero os Grupos I e II apresentaram a mesma titulação diferindo do Grupo III.

Houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos nos tempos de sete e trinta dias após infecção.

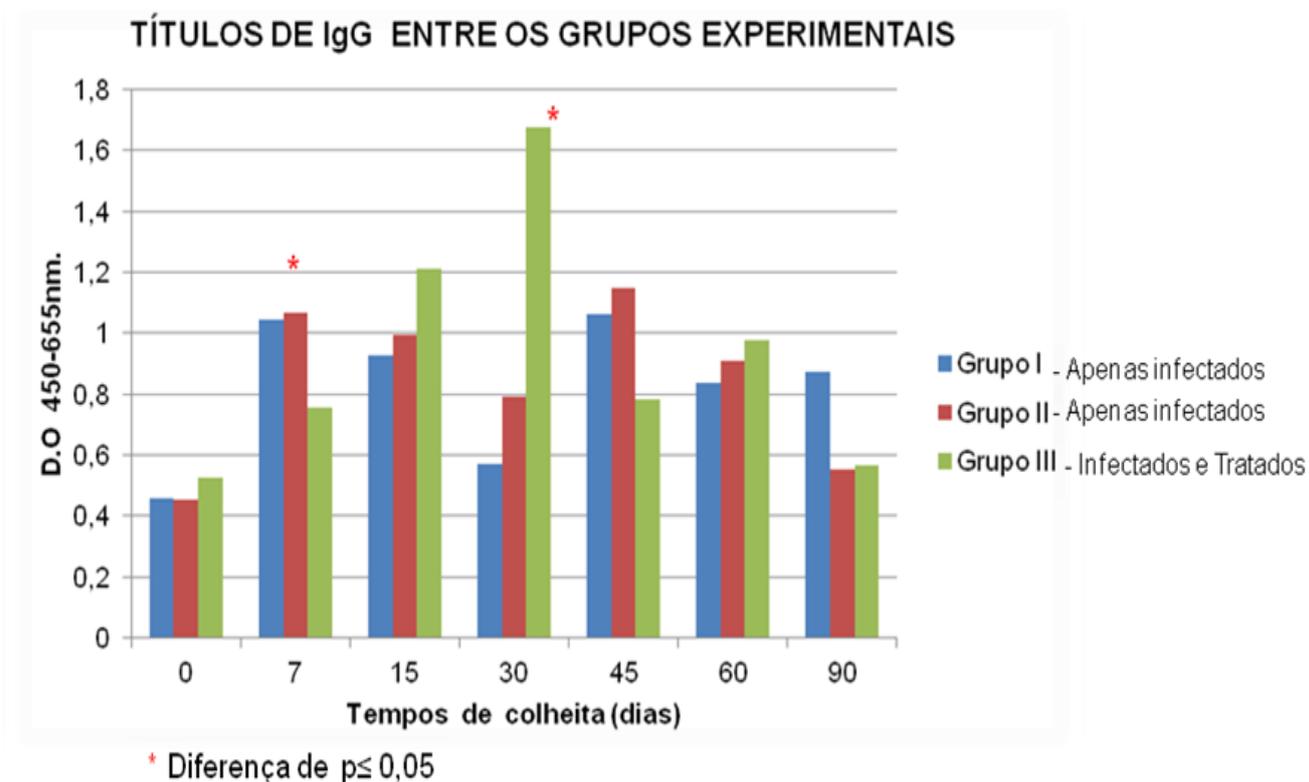


Figura 3. Cinética do título de anticorpos da classe IgG específicos contra *H. contortus* dos Grupos I, II e III, apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655nm, distribuídas ao longo do período experimental.

Ao analisar os títulos de IgG entre os animais do Grupo I (Figura 4) tem-se uma elevação que se inicia no ponto zero dias até o ponto sete dias mas que

em seguida começa declinar até o ponto 30 dias. Pela análise de variância (Tukey) nota-se diferença estatística ao cruzar os dados entre os tempos zero e sete dias e zero e 15 dias ambos com $p \leq 0,05$. A partir de 30 dias pós-infecção, o animal nº 268 aumentou o nível de anticorpo enquanto que o ovino nº 265 declinou até o ponto 90 dias.

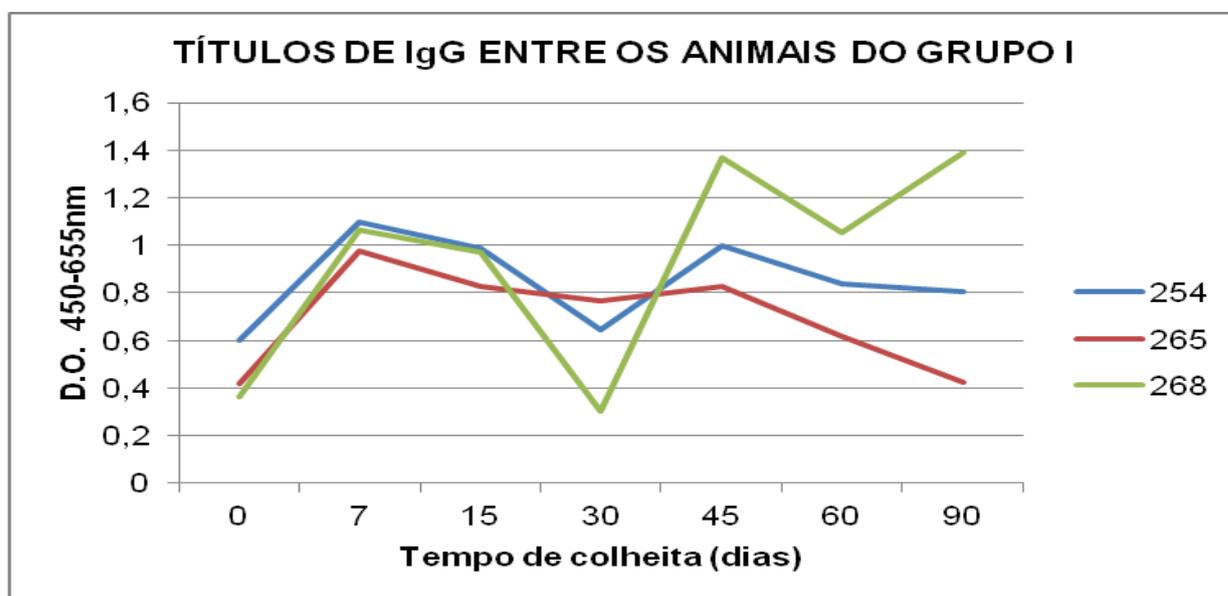


Figura 4 Título de anticorpos da classe IgG específicos contra *H. contortus* do Grupo I não infectado experimentalmente com larvas L₃, apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655nm, ao longo do período experimental.

De acordo com a Figura 5, os títulos de IgG dos animais do Grupo II, apenas infectados com *H. contortus*, apresentaram um aumento na produção de anticorpos a partir do tempo zero dias seguido de uma redução no tempo sete dias, com exceção apenas do ovino nº 298. Essa diminuição se prologa até o ponto 30 dias seguida de um leve aumento dos anticorpos no momento de 45 dias, decaindo novamente no ponto 60 e 90 dias, exceto o animal nº 267. Em relação a análise de variância (Tukey) houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) quando comparado os tempos zero e 45 dias.

Os animais do Grupo III, infectados com *Haemonchus contortus* e tratados com o extrato de *Poincinella pyramidalis*, apresentaram um aumento nos títulos dos anticorpos IgG com 30 dias decaindo em seguida até 45 dias (Figura 6). No período de 60 dias ocorre uma leve elevação na produção de IgG reduzindo ao

tempo 90 dias. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado todos os tempos com $p \leq 0,05$, sendo os pares que variaram pelo teste de Tukey: 0dias X 15dias ($p=0,002$); 0dias X 30dias ($p=0,000$), 7dias X 30dias ($p=0,000$); 15dias X 90dias ($p=0,002$); 30dias X 45dias ($p=0,000$) ; 30dias X 60dias ($p=0,001$); 30dias X 60dias ($p=0,000$).

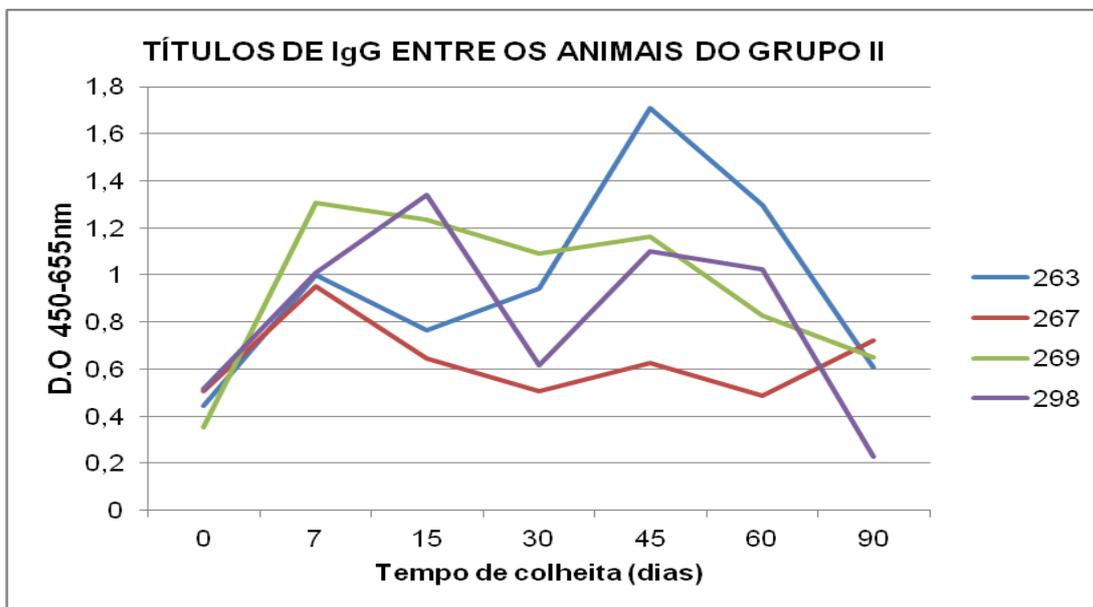


Figura 5. Título de anticorpos da classe IgG específicos contra *H. contortus* do Grupo II, apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655nm, ao longo do período experimental.

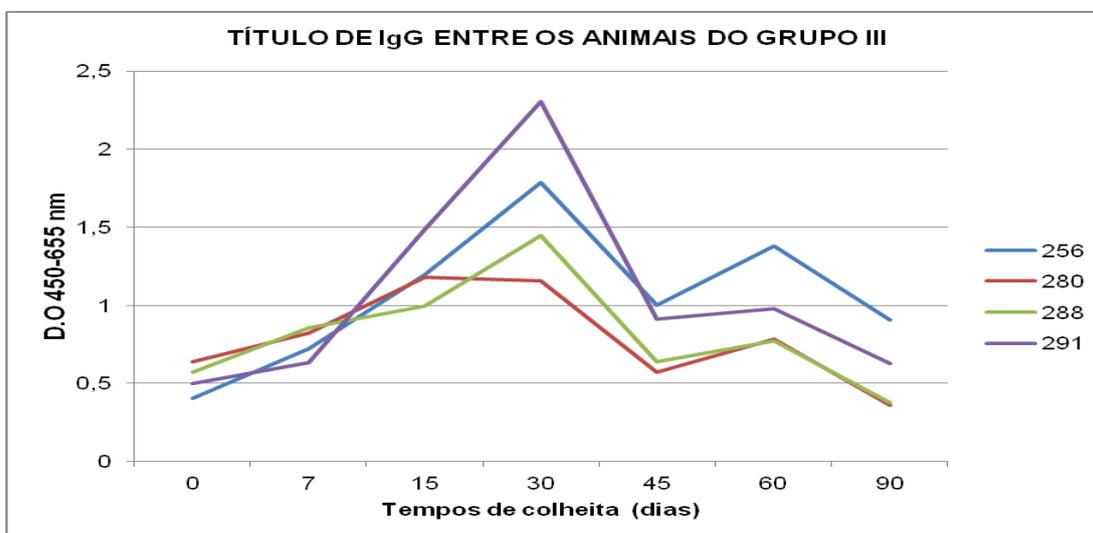


Figura 6. Título de anticorpos da classe IgG específicos contra *H. contortus* do Grupo III tratado com extrato de *P. pyramidalis*, apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655 nm, ao longo do período experimental.

5.3 INTERFERON GAMA (IFN- γ)

A partir dos sobrenadantes das culturas de células observou-se que houve baixa produção de IFN- γ em todos os Grupos nos tempos amostrados. Os níveis de IFN- γ das culturas estimuladas com antígeno de *H. contortus* foram semelhantes ao controle negativo da cultura.

6 DISCUSSÃO

Antes de iniciar o processo de infecção todos os animais foram vermifugados três vezes para a certificação de que sua carga parasitária estaria zerada; garantindo que todo e qualquer ovo ou larva encontrados nos ovinos durante e após a infecção experimental seria de *H. contortus*. Além disso, houve um cuidado especial na limpeza do capril, através de controle químico e físico (lança chamas) tendo em vista evitar a infecção dos animais por quaisquer parasitos, especialmente do grupo controle negativo (Grupo I), que não seriam inoculados com o nematódeo

O protocolo de infecção aplicado de acordo com a metodologia descrita por Gill *et al.* (2000) referente a quantidade de larvas e a de Borges (2007) relacionada ao cultivo da mesma obtiveram sucesso. A infecção experimental com *H. contortus* foi possível verificar após trinta dias de inoculação a partir dos resultados parasitológicos de OPG. A carga parasitária de acordo com a classificação de Ueno (1995) se caracteriza como uma infecção moderada. Como afirma Amarante (2005), Gill *et al.* (2000); Rocha *et al.* (2011) a carga parasitária é um fator importante para a confirmação da infecção.

Os animais do Grupo I, os quais não receberam experimentalmente as larvas de *H. contortus*, sob as condições experimentais se mantiveram sem a presença de ovos deste parasita. Mostrando que as condições de higienização e cuidado animal foram satisfatórios.

A aplicação do extrato aquoso de *P. priramidalis* foi considerada moderadamente eficaz segundo o Teste de Eficiência e nas condições aplicadas neste estudo com uma taxa de 85% de acordo com Associação Mundial de Medicina Veterinária (WOOD *et al.*, 1995) . Este resultado confronta os achados de Fabo *et al.*(2008) e Cala *et al.* (2012) , que não encontraram eficácia com a utilização do *Melia azedarach* em relação a carga parasitária assim como no estudos de Chagas (2008) com *Azadiractha indica*.

Após tratamento com o extrato da planta no tempo 45 dias, houve uma redução de 79% da carga parasitária dos animais do grupo tratado (GIII),

enquanto alguns animais deste grupo se mantiveram constante e outro reduziu 100% no tempo 60 dias. Esta taxa de redução foi semelhante ao encontrado no trabalho realizado com caprinos infectados naturalmente com *H. contortus* por Borges-dos-Santos (2007) e Nunes (2012).

De acordo com Nunes (2012), a dose de 10mg/Kg foi capaz de inibir 100% da eclosão de ovos enquanto as larvas infectantes se tornaram resistentes. Isto seria uma explicação para a manutenção das larvas imaturas sexualmente quanto os vermes adultos no grupo dos animais tratados. Pode-se observar na contagem dos vermes adultos

A redução da carga parasitária do grupo II, apenas infectados com *H. contortus*, no ponto 90 dias pode ser explicada primeiramente, pela existência de condições não favoráveis, que levam as larvas do nematódeo a entrarem no estado de hipobiose, reduzindo a eliminação de ovos no ambiente através das fezes. Segundo fator, esta relacionada a resistência dos animais frente a infecção associada com uma forte ação imunológica contra estes helmintos, estas hipóteses concordam com Amarante (2004) e Miller & Horohov (2012). Entretanto os animais do grupo II apresentaram sinais característicos de hemoncose, como emagrecimento aparente e quadro de diarreia (MILLER & HOROHOV, 2012).

A carga parasitária encontrada nos indivíduos do Grupo III, infectados com larvas L3 de *H. contortus* e tratados com extrato de *P. pyramidalis*, mostrou-se mais elevada quando comparada a do Grupo II (figura 2). Este fato pode sugerir uma condição de susceptibilidade a infecções parasitárias, resultante da variabilidade genética dos ovinos deste grupo (MELO & BEVILAQUA, 2005; MACKNON *et al.*, 2010). Além da susceptibilidade, alguns ovinos por serem sem raça definida apresentaram condições de resistentes quanto de resilientes relacionadas com a carga parasitária (MELO & BEVILAQUA, 2005; ÂNGULO-CUBILLÁN *et al.*, 2007; SHAKYA *et al.*, 2011; BAKER *et al.*, 2012).

Essa variação dos ovos encontrados nas fezes dos animais infectados e tratados provavelmente está relacionado a genética tanto do hospedeiro quanto do parasita (AMARANTE, 2004; BUZZULINI *et al.* 2007; CHEVROTIÈRE *et al.*, 2012), associada com elevado potencial biótico do parasita (PEREIRA *et al.*, 2008). Além desses fatores, deve ser considerada a capacidade de resiliência dos

ovinos que permite que os parasitas permaneçam no organismo (AMARANTE, 2004) e o estado hipobiótico que permite que não ocorra a maturação no estágio adulto, podendo ficar por longos períodos devido ao baixo metabolismo (URQUHART *et al.*, 1991). Como afirma Silva, Bevilaqua & Rodrigues (2003), o ambiente exerce grande influência sobre a composição e a regulação da população parasitária.

De acordo com a tabela 4, observou-se que alguns vermes estavam indiferenciados sexualmente, sugerindo a transformação dos estágios larvares para o estado de hipobiótico (URQUHART *et al.*, 1998). Este fato foi mais recorrente nos animais do grupo III. Um fator importante que deve-se destacar é a relação da contagem de ovos por grama de fezes e a quantidade de vermes adultos, uma vez que os animais que liberaram mais ovos apresentaram um número menor de vermes adultos. Isto se confirma o caso de animais do experimento do grupo II em relação ao grupo III apresentarem menores valores de ovos quando se tem uma população menor de parasitas adultos, havendo o evento da competição intraespecífica por espaço ou recursos (HOPPE, 2010).

A partir dos resultados imunológicos obtidos neste estudo, é visível a produção de anticorpos contra o parasita que desde os tempos zero e sete dias após a infecção, houve uma rápida resposta imune humoral com a produção de elevados títulos de IgG referente a todos os grupos. Este fato demonstra que os animais de raças e idades diferentes induzem respostas imunológicas diferentes em relação ao *H. contortus* (MILLER *et al.*, 2006).

O Grupo I apresentou títulos de IgG, causadas por infecções parasitárias anteriores. Os animais do Grupo II mostraram uma variação nos títulos de anticorpos frente ao desafio com o parasita em estudo. Este fato demonstra a questão da variabilidade genética associada a imunidade dos animais e a carga parasitária que respondem de forma diferente sob condições ambientais semelhantes, fato observado por Amarante (2004), Alba-Hurtado e Muñoz-Guzmán (2013).

Nos Grupos I e II a cinética de IgG foi semelhante até o tempo sete dias, com ligeira redução no tempo 15 dias, porém o segundo grupo apresentou títulos mais elevados devido a infecção experimental. Já o Grupo III exibiu uma

produção de IgG com aumento contínuo até 30 dias pós-infecção, quando atingiu o maior título, este fato pode ser associado ao ciclo do parasita. Entretanto a partir do tempo 45 dias houve uma considerável redução da carga parasitária e um leve aumento da mesma no tempo 60 dias. Mostrando uma leve ação imunomoduladora semelhante aos estudos de Farouk (2004), Borges-dos-Santos (2007) e Nunes (2012).

A baixa produção de interferon gama (figura 11) assim como ao encontrado nos estudos de Gill *et al.* (2000); Shakya, Miller e Horov (2009) demonstra que a infecção por *H. contortus* não ocorreu o desvio para a resposta de perfil Th1. Este fato confirma uma infecção helmíntica de perfil Th2.

Outros parâmetros imunológicos devem ser testados através da biologia molecular e por *Western blotting* a fim de se observar o perfil da infecção experimental por *H. contortus* e o efeito do extrato aquoso da *P. pyramidalis*.

7 CONCLUSÃO

Nas condições deste estudo a planta *P. pyramidalis* obteve uma ação efetiva na resposta imune frente à infecção experimental com *H. contortus* e uma eficácia considerável. Este fato sugere a necessidade de novas investigações utilizando diferentes concentrações do extrato, número de doses e outras partes aéreas da planta, reavaliando outros aspectos com possível potencial imunomodulador e parasiticida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. & POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. 5ª ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 580 p, 2005.

ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 545 p., 2011.

ALBA-HURTADO, F. & MUÑOZ-GUZMÁN, M. A. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. *BioMed Research International*, p.1-11, 2013.

ALBUQUERQUE, U.P.; Oliveira , R. F. Is the use-impact on native *caatinga* species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? *Journal of Ethnopharmacology*, v.113, p. 156–170, 2007.

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

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L.C.; ALBUQUERQUE, U. P. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* , v.127, p.674–684, 2010.

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 out. 2010.

ANGULO-CUBILLÁN, F.J.; GARCÍA-COIRADAS, L.; CUQUERELLA, M.; DE LA FUENTE, C.; ALUNDA, J.M. *Haemonchus contortu*-sheep relationship: a review. *Revista Científica*, v. XVII, n.6, p. 577-587, 2007.

ANGULO-CUBILLÁN, F.J.; GARCÍA-COIRADAS, L.; ALUNDA, J.M.; CUQUERELLA, M.; DE LA FUENTE, C. Biological characterization and pathogenicity of three *Haemonchus contortus* isolates in primary infections in lambs. *Veterinary Parasitology* v.171, p.99-105, 2010.

AMARANTE, A.F.T. Resistência Genética às infecções parasitárias.IN: *Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária,25. Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul*, 2; 2008.

AMARANTE, A.F.T. Resistência genética a helmintos gastrointestinais. IN:V *Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal*, 2004.

BAHIA, M, BATISTA, J, DAVID, J.M., DAVID, J.P. Biflavonoids and other phenolics from *Caelsapinia pyramidalis* (Fabaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.16, n.6b, 2005.

BAHIA, M, BATISTA, J, DAVID, J.M., DAVID, J.P. Estudo da variação do conteúdo de biflavonóides de *Caesalpinia pyramidalis* de diferentes regiões. IN: *Anais da 30ª. Reunião Anual da SBQ*, 2007.

BORGES DOS SANTOS, R., LIMA, F.W. Biological effect of leaf aqueous extract of *Caesalpinia pyramidalis* in goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, Article ID 510391, 6 p., 2012. doi:10.1155/2012/510391

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

BORGES, Fernando A. et al. Weak phenotypic reversion of ivermectin resistance in a field resistant isolate of *Haemonchus contortus* by verapamil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.9, p. 731-736, 2011

BUZZULINI. C.; SOBRINHO, A.G.S.; COSTA, A.J; SANTOS, T. R.;BORGES, F. A. & SOARES, V. E. Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação albendazole, levamisole e ivermectina à moxidectina em ovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.6, p.891-895, 2007.

CALA, A.C.; CHAGAS, A.C.S; OLIVEIRA, M.C.S.; MATOS, A.P.; BORGES, L.M.F.; SOUSA, L.A.D.; SOUZA, F.A.; OLIVEIRA, G.P. In vitro Anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* against sheep gastrointestinal nematodes. *Experimental Parasitology*, v.130, p. 98–102, 2012.

CHAGAS, A.C. S. Metodologias *in vitro* para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. In: Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, 25.; Seminário De Parasitologia Veterinária Dos Países Do Mercosul, 2., 2008, Curitiba. Programa e resumos. Curitiba: UFPR: Universidade Estadual de Londrina, 2008. 13 f. 1 CD-ROM. 2008.

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

CHEVROTIÈRE, 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. *Veterinary Parasitology*, v.186, n3-4, p. 337-343, 2012.

CHIEJINA, S.N.; FAKAE, B.B.; BEHNKE, J.M.; NNADI, P.A.; MUSONGONG, G.A.; WAKELIN, D. Expression of acquired immunity to a local isolate of *Haemonchus contortus* by the Nigerian West African Dwarf goat. *Veterinary Parasitology*, v.104, p. 229-242, 2002.

COELHO, I.A. M.; BOTELHO, A.V. F.; FONTES JUNIOR, L. C. ; SILVA, E. A.; SANTOS, W.B.; PASSOS, M.A.A. Avaliação da germinação de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* tul.) em diferentes substratos. IN: X Jornada De Ensino, Pesquisa E Extensão – JEPEX 2010 – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro, 2010.

COSTA, K.M.F.M; M.AHID, S. M.; VIEIRA, L. S.; VALE, A.NDRE M.; BENITO SOTO-BLANCO. EFEITOS do tratamento com closantel e ivermectina na carga parasitária, no perfil hematológico e bioquímico sérico e no grau Famacha de ovinos infectados com nematódeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.12, p.1075-1082, 2011

DANTAS, B. F.; CORREIA, J.S.; MARINHO, L.B.; ARAGÃO, C.A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.). *Revista Brasileira de Sementes*, v.30, n.1, p.221-227, 2008.

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.

FALBO, M. K.; SANDINI, I. E; ISHIY, H.M.; FÁVARO, J. L; SANTOS, C.E.; BASTOS, S.; RODIGHIERI, D.; GUZZO, D. Atividade anti-helmíntica do fruto da *Melia azedarach* em cordeiros naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 29, n. 4, p. 881-886, 2008.

FAO. Food and agriculture organization of the United States. FAOSTAT. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/>>. Acesso em: 30 jan. 2012

FINKELMAN, F.D. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annual Review of Immunology*, v. 15, p. 505-533, 1997.

GANTONI, P.M.; PRICHARD, R.K.; RANJAN, S.; GATHUMA, J.M.; MUNYUA, WK.; CHERUIYOT, H.; SCOTT, M.E. Hypobioses 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.

GAZDA, T. L. Distribuição de Larvas de Nematódeos Gastrintestinais de Ovinos em Pastagens Tropicais e Temperadas. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia Animal, Curitiba, 82 p., 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.

GORDON, H.M.C.L.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *International Journal of Industrial Organization*, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

HOSTE, H. Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. *International Journal for Parasitology*, v.31, p. 231-244, 2001.

HOPPE, E.G.L. Infecção experimental de *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814) (Cervidae: Odocoileinae) com *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) (Nematoda: Trichostrongyloidea). Tese de Doutorado Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal- 2010.

IBGE. Efetivo dos rebanhos de médio porte em 31.12, segundo as Grandes Regiões e as Unidades da Federação – 2011. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 28 dez. 2012.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A.A.; ELANGO,G.;BAGAVAN,A.; ZAHIR,A.A. Anthelmintic activity of botanical extracts against sheep gastrointestinal nematodes, *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*, v.109, p.37-45, 2011.

LEJAMBRE, L.F.; WINDON, R.G.; SMITH, W.D. Vaccination against *Haemonchus contortus*: performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Veterinary Parasitology*, v. 153, p. 302–312, 2008.

LIMA, W.C.; ATHAYDE, A.C.R.; AZEVEDO, E.O.; LIMA, D.A.S.D.; BORBUREMA, J.B.; SANTOS, E.M.; VILELA, V.L.R.; AZEVEDO, S.S. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30,n.12, p. 1003-1009, 2010.

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., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *The Journal of Biological Chemistry* v.193 p. 265-275, 1951.

MACEDO, F.R. Efeitos da Folha de Nim Indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) no Controle de Helmintos em Ovinos Infectados Naturalmente. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2007.

MACRAE, J.C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. *Proceedings of The Nutrition Society*, v.52, p.12-130, 1993.

MARTINEZ, P. M.; COSTA, J. N.; SOUZA, T.S.; COSTA NETO, A. O.; PINHEIRO, R.R. Sistemas de criação de ovinos e ocorrência de anticorpos contra o vírus da

Maedi-Visna na microrregião de Juazeiro, BA . *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.11, n.2, p. 342-353, 2010.

MELO, A. C.F. L. Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil. 2005 Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, 104 p. 2005.

MELO, A.C. F. L. ; BEVILAQUA, C. M.L. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 100, p. 141-146, 2005.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S.A. A produção in vitro de IFN-gama por células de sangue de cabra após estimulação com antígenos somática e *pseudotuberculosis* secretaram *Corynebacterium*. *Veterinária e Imunopatologia*, v.107, n. 3-4, p. 249-254, 2005.

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.

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

MILOVANOVIC, M.; DROZDENKO, G.; WEISE, C.; BABINA, M.; WORM, M. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *Journal of Investigative Dermatology*, v.130, p. 2621–2628, 2010.

MOLENTO, M. B. et al. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. *Ciência Rural*, 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. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.80, n.2, p.253-263, 2013.

MONTEIRO, J.M; LINS NETO, E. M. F.; AMORIM, E.L.C.; STRATTMANN, R.R.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. *Revista Árvore*, v.29, n.6, p.999-1005, 2005.

MORENO, F.C.; GORDON, I.J.;KNOX, M.R.; SUMMER, P.M.;SKERRAT, L.F.; BENVENUTTI, M.A.; SAUMELL, C.A. Anthelmintic efficacy of five tropical native Australian plants against *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus*

colubriformis in experimentally infected goats (*Capra hircus*). *Veterinary Parasitology*, v.187, n.1-2, p.237-43, 2012

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.

NUNES, G.D.L. Investigação das atividades biológicas do extrato aquoso de *Poincianella pyramidalis* no controle da hemoncose ovina. Tese de mestrado, Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária- UFBA- BA- 2012.

OLIVEIRA, R.V; ARAGÃO, I.M.A; MATOS, R.S.; SALLUM, W.B. Manual de criação de caprinos e ovinos / coordenação de Paulo Sandoval. Brasília : Codevasf, p.142, 2011.

OLIVEIRA, Luciana Dinato Rosa de. Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes in vitro e in vivo. 2013. xiii, 59 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013.<http://hdl.handle.net/10482/13868>. acesso 30/09/2013

PENÃ, M.T.; MILLER, J.E.; HOROHOV, D.W. Effect of CD4+ T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*, v.138, p.240-246, 2006.

PEREIRA, R.H.M.A.; AHID, S.M.M.; BEZERRA, A.C.D.S.; SOARES, H.S.S.; FONSECA, Z.A.A.S. Diagnóstico da resistência dos nematoides gastrointestinais a anti-helmínticos em rebanhos caprino e ovino do RN. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.1, p-16-19, 2008.

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.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; ARUNDEL, J.H.; HINCHCLIFF, K.W. *Clínica Veterinária um Tratado de doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos*. 9º ed., Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, p.653-655, 2000.

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

RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; AVILA, V.S.; COUTINHO, G.C.; DALAGNOL, C.A . Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural*, v.34, n.6, 2004.

RIBEIRO, O. C.; SILVA, J. A. H.; PEREIRA FILHO, M. Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.10, n.2, p.23-24, 1988.

ROBERTS F.H.S. & O´SULLIVAN J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 1,p.99-102, 1950.

RODRIGUES, A.B.; ATHAYDE, A.C.R.; RODRIGUES, O.G.;SILVA,W.W.; FARIA, E.B. Sensibilidade dos nematoides gastrointestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.27,n.4, p. 162-166, 2007.

ROWE, J.B.; NOLAN, J.V.; DE CHANEET, G.; TELENI, E. The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. *British Journal of Nutrition*, v.59, p.125-139, 1988.

SEPLANTEC, *Secretaria de Planejamento, Ciência e Tecnologia do Estado da Bahia*, In: Dados da Flora do Semi-árido Baiano, 1979. Disponível em: < <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 01 jan. 2012.

SHAKYA, K.P.; MILLER ,J.E.; HOROHOV, D.W. 2009.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.

SILVA, W.W.; BEVILAQUA, C.M.L.; RODRIGUES, M. L. 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.

SOUZA, M.M.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S. M.; COSTA, C.T.C; SILVA, A.R.A.; BRAZ-FILHO, R. Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.80, n.2, p. 271-277, 2008.

THOMAS, D.R.H & PROBERT, A.J. A key to the identification of arrested gastrointestinal nematode larvae of sheep in Britain. *Veterinary Parasitology*, v. 47, p. 77-80, 1993.

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.

URQUHART, G.M; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A.M; JENNINGS, F.W. *Parasitologia Veterinária*. IN:Helmintologia veterinária, 2 ed., p.3-8,1998

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*; v.2, n.2, p.49-56, 2008.

WATSON, T.G. Immunity to gastrointestinal nematode parasites in domestic stock with particular reference to sheep: A review. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, v.46, p.15-22, 1986.

WHITLOCK H.V. Some modifications of the McMaster eggs counting technique and apparatus. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v.21, p.177-180, 1948.

WOOD, I.B.; AMARAL, N.K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.L.; KASSAI, T.; MALONE, J.B.; PANKAVICH, J.A.; REINECKE, R.K.; SLOCOMBE, O. ; TAYLOR, S.M.; VERCRUYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, v. 58, p.181-213,1995.

ZACARIAS, F., GUIMARÃES, J.E.; ARAÚJO, R.R.; ALMEIDA, M.A.O.; AYRES, M.C.C.; BAVIA, M.E.; MENDONÇA-LIMA, F.W. Effect of homeopathic medicines on helminth parasitism and resistance of *Haemonchus contortus* infected sheep. *Homeopathy*, v.97, p.145-151, 2008.

ZAROS, L.G.; VIEIRA, L.S. *Citocinas na resposta a endoparasitoses gastrintestinais em ruminantes*. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos. 2008.
Disponível em:
<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/534098/1/doc80.pdf>>.
Acesso em: 05 fev. 2012.