

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

EFEITO DO IMUNOESTIMULANTE ASSOCIADO AO ANTI-
HELMÍNTICO NO TRATAMENTO DA VERMINOSE
EXPERIMENTAL EM OVINOS.

Priscila Martins Andrade Denapoli

São Paulo
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

EFEITO DO IMUNOESTIMULANTE ASSOCIADO AO ANTI-
HELMÍNTICO NO TRATAMENTO DA VERMINOSE
EXPERIMENTAL EM OVINOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Paulista - UNIP, para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof^a Dr^a Lucia Jamli Abel

São Paulo
2008

Priscila Martins Andrade Denapoli

Efeito do Imunoestimulante associado ao anti-helmíntico no tratamento da verminose experimental em ovinos.

Presidente da Banca: Profª Drª Lucia Jamli Abel

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Lucia Jamli Abel

Profª Drª Leoni Villano Bonamin

Prof Dr Mauricio Garcia

Suplente

Vânia Maria de Carvalho

Aprovada em: _____ / _____ / _____.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Fabio e Maria Aparecida, pela presença constante em minha vida, pelo amor, pelo carinho, dedicação e amizade. Pelo exemplo de homem, mulher e família que vocês foram em minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a Dr^a Lucia Jamli Abel, que com grande dedicação soube me ensinar e orientar a cada passo para a realização deste trabalho, no qual sem sua estimável ajuda não se realizaria. Obrigada por tudo!

Ao Professor Dr Richard Shaw do Research Center Ville, Nova Zelândia, que colaborou imensamente para a realização das dosagens de IgE neste trabalho. Muito Obrigada por compartilhar suas descobertas!

À Prof^a Dr^a Selene Coutinho por ter me ouvido e me ajudado, pelo apoio oferecido durante um período difícil em que passei durante esta etapa! Muito Obrigada!

À CAPES, pois a bolsa de estudos concedida, foi de grande valia para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Ieda Longo Maugéri, do Departamento de Imunologia da UNIFESP, pela concessão das facilidades de seu laboratório, pelo incentivo e ajuda na solução dos problemas pertinentes as técnicas empregadas neste estudo.

Às amigas Juliana e Carla, do Departamento de Imunologia da UNIFESP, que contribuíram para a realização deste trabalho. Pela amizade conquistada durante o período de convivência.

Aos colegas de projeto Caroline e Flávio, pelo valioso auxílio no desenvolvimento das técnicas de rotina e manipulação dos animais.

À amiga Shellen pela amizade, pelas risadas e pelo auxílio prestado durante a realização deste projeto.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UNIP, especialmente a Dr^a Ana, pela valiosa ajuda no manejo, alimentação, avaliação e higienização dos animais.

Aos professores do curso pós-graduação em Medicina veterinária, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional, compartilhando idéias e conhecimento.

Aos amigos Beatriz, João Carlos e Adriano, pela amizade e pelo carinho dividido durante as aulas.

Aos amigos Fernanda, Vander, Caré, Paula, Paulinha, Cris, Júnior e Mayara, pela amizade, pelo respeito, pelo incentivo constante e por cada momento de alegria compartilhado. Obrigada por terem compreendido as vezes que eu não pude sair com vocês, devido a dedicação a este trabalho, por terem

orado por mim durante este período, por terem compreendido meu mal humor na etapa final de dissertação. Em especial à amiga Paula que se propôs prontamente a ajudar na revisão da língua portuguesa deste trabalho.

À minha família, em especial meu irmão e meus avós, pela admiração e por terem acreditado e incentivado a passagem por mais esta etapa da minha vida. Tenho certeza de que ao lerem vocês compreenderão que era inviável colocar o nome de todos vocês!

Em especial, ao Naor, que me incentivou desde o primeiro momento em que decidi me inscrever no programa de mestrado. Por ter me ajudado da forma como pôde, por ter compreendido meus momentos de irritação, por ter me ouvido e me aconselhado. Pelo simples fato de ser o homem que é. Obrigada por estar comigo neste momento! Te amo.

*"Se você quer os acertos, esteja preparado para os erros."
Carl Yastrzemski*

RESUMO

O uso de anti-helmíntico para controlar verminose em ovinos e caprinos é uma realidade, de rápido crescimento, em criadouros do mundo todo. O desenvolvimento de estratégias alternativas e métodos imunológicos para controlar a parasitose tem se tornado relevante. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do imunestimulante associado ao anti-helmíntico no tratamento da verminose experimental através da análise de: IgE, proliferação de células T e contagem de ovos por grama de fezes OPG). 15 ovinos machos, adultos, com idade superior a doze meses foram divididos em 4 grupos: I – animais tratados com imunestimulante (LPS e *Propionibacterium acnes*) e anti-helmíntico; II - animais tratados com *Propionibacterium acnes* e anti-helmíntico; grupo III - animais tratados somente anti-helmíntico; IV - animais tratados com salina estéril 0.9% (controles). Todos os animais receberam 10.000 larvas infectantes (L3) por via oral no dia 0 e foram tratados com LPS e *P. acnes*, *P. acnes* e/ou anti-helmíntico quando o OPG atingiu o pico no 35° dia após a infecção.

As amostras de sangue e fezes foram coletadas semanalmente para a realização do OPG, dosagem de IgE total, teste de proliferação de células T e hemograma. Significante redução no OPG foi observada nos grupos I, II e III quando comparados ao grupo IV, mas com diferença estatística significativa no grupo III.

A análise estatística mostrou correlação negativa entre OPG e nível de IgE, números de eosinófilos e OPG, número de neutrófilos e OPG nos animais do grupo I tratados com imunestimulante (LPS e *Propionibacterium acnes*).

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) dos grupos I, II, III mostraram aumento da resposta proliferativa na presença de Concanavalina A, sendo a maior resposta observada nos dias 28 e 35 após a infecção.

Quanto aos parâmetros hematológicos observamos redução nos valores de eritrócitos no 35° após a infecção (pico de OPG) em todos os grupos, após o tratamento os valores permaneceram abaixo do limite de normalidade somente no grupo não tratado, com correlação negativa entre OPG e eritrócitos.

Nenhuma alteração significativa foi encontrada nos parâmetros: dosagem de hemoglobina, hematócrito e índices hematimétricos.

Todos os grupos mostraram um aumento na contagem de leucócitos após o 35º dia após a infecção, e encontramos correlação positiva entre OPG e linfócitos no grupo I.

Esses resultados sugerem que o uso de anti-helmíntico associado ao imunostimulante não foi efetivo no tratamento da verminose experimental em ovinos considerando o resultado de OPG.

No entanto, foi possível detectar alterações nos parâmetros imunológicos nos animais tratados com imunostimulante (LPS e *Propionibacterium acnes*) e anti-helmíntico que serão investigadas.

ABSTRACT

The failure of anthelmintics to control nematode parasites in sheep and goats is a reality, of rapidly increasing dimensions, on many farms in the world. Development of alternative strategies and immunological methods to control the parasites has become relevant. The purpose of this study was to determine the effectiveness of an immunostimulant in combination with anthelmintic on experimental helminthiasis through IgE analysis, T cell proliferation assay and fecal egg counts (FEC). Fifty sheeps, 12-month-old, male were grouped into 4 groups: I- animals treated with immunostimulant (LPS and *Propionibacterium acnes*) and anthelmintic; II- animals treated with *Propionibacterium acnes* and anthelmintic; III- animals treated with only anthelmintic; and IV- animals treated with a sterile saline solution 0.9%, as untreated controls. All the animals received 10,000 infective larvae (L3) orally on day 0 and were treated with LPS and *P acnes*, *P acnes* and/or anthelmintic when the fecal egg counts reached a peak at 35 days.

Fecal and blood samples were collected weekly for fecal egg counts (FEC), IgE antibodies detection, T cell proliferation assay and haematological examinations. Significant reduction in the fecal egg counts, were observed in groups I, II and III when compared with group IV, but with statistical difference in group III.

The statistical analyses showed negative correlation between IgE and FEC; numbers of eosinophils and FEC; number of neutrophils and FEC in animals from group I treated with immunostimulant (LPS and *Propionibacterium acnes*).

PBMC from group I, II, III displayed enhanced proliferation response to Concanavalina –A with maximal response observed on day 28th and 35th (fecal egg count peak).

The hematological parameters showed a decrease in the erythrocytes when the mean fecal egg count reached a peak at 35 days in all groups, but after the treatment the indexes remains decreased only in untreated group, with negative correlation between FEC and erythrocytes.

No significant differences were found in hemoglobin, hematocrit and hematimetric indices.

All groups showed an increase in the leucocytes counts leukocytes after 35th day, and we found an positive correlation between FEC and lymphocytes in animals from group I.

These results suggest that the use of immunostimulant in combination with anthelmintic was not effective on experimental helminthiasis in sheep considering the FEC.

However, it was possible to find alterations on the immunological parameters on the animals treated with immunostimulant (LPS and *Propionibacterium acnes*) and anthelmintic that will be investigated.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Tratamento com anti-helmíntico durante a infecção natural.

FIGURA 2 – Fotomicrografia da porção anterior do *Haemonchus contortus*.

FIGURA 3 – Valores médios de OPG dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 4 – Valores médios de IgE (U/mL) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 5 – Resposta proliferativa (IE) de CMSP frente a Con-A dos ovinos dos grupos I, II, III, e IV; realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 6 – Resposta proliferativa (IE) de CMSP frente ao extrato de larvas dos ovinos dos grupos I, II, III, e IV; realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 7 – Valores médios de eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$) nos animais dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 8 – Valores médios de hematócrito (%) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 9 – Valores médios de hemoglobina (g/dL) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 10 – Valores médios de HCM (pg) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 11 – Valores médios de CHCM (%) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 12 – Valores médios de VCM (fL) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 13 – Valores médios de leucócitos totais (cél/s/ μ L) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 14 – Valores médios de linfócitos (cél/s/ μ L) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 15 – Valores médios de neutrófilos (cél/s/ μ L) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 16 – Valores médios de eosinófilos (cél/s/ μ L) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 17 – Valores médios de monócitos (cél/s/ μ L) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

FIGURA 18 – Valores médios de proteínas plasmáticas (g/dL) dos grupos I, II, III e IV, realizados antes e após o início do tratamento (35° dia após a infecção).

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Desenho experimental. Divisão dos animais em grupos, incluindo: peso individual, média de peso por grupo e tratamento delineado para cada grupo.

TABELA 2 – Valores médios de OPG dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 3 – Valores médios de IgE (U/mL) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 4 – Matriz de correlação entre OPG e a variável IgE.

TABELA 5 – Valores médios do índice de proliferação de CMSP na presença de Con-A dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 6 – Valores médios do índice de proliferação de CMSP na presença de Extrato de Larvas dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 7 – Valores médios de eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 8 – Matriz de correlação entre OPG e a variável eritrócito.

TABELA 9 – Valores médios de Hematócrito (%) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 10 – Valores médios de Hemoglobina (g/dL) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 11 – Valores médios de HCM (pg) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 12 – Valores médios de CHCM (%) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 13 – Valores médios de VCM (fL) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 14 – Valores médios de Leucócitos Totais (cél/ μL) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 15 – Valores médios de linfócitos (cél/ μ L) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 16 – Matriz de correlação entre OPG e a variável linfócito.

TABELA 17 – Valores médios de neutrófilos (cél/ μ L) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 18 – Matriz de correlação entre OPG e a variável neutrófilo.

TABELA 19 – Valores médios de eosinófilos (cél/ μ L) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 20 – Matriz de correlação entre OPG e a variável eosinófilo.

TABELA 21 – Valores médios de monócitos (cél/ μ L) dos grupos I, II, III e IV.

TABELA 22 – Valores médios de proteínas plasmáticas (g/dL) dos grupos I, II, III e IV.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cAMP – adenosina monofosfato cíclico

cGMP – guanina monofosfato cíclico

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

CMSP – células mononucleares de sangue periférico.

Con-A – Concanavalina A

CpG – citosina fosfato guanosina, região metilada do DNA rica em C e G

Cpm – cintilação por minuto.

CSO – clara solidificada de ovo de galinha

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA – Imunoensaio enzimático.

FCA – Composto adjuvante de Freund

H. contortus – *Haemonchus contortus*

Hb – Hemoglobina.

HCM – Hemoglobina corpuscular Média.

He – Hemácias.

Hsp – heat shock protein ou proteína do choque térmico.

Ht – Hematócrito

IE – Índice de Estimulação.

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G do isotipo 1.

IgG2 – Imunoglobulina G do isotipo 2.

IgM – Imunoglobulina M

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-13 – Interleucina 13

IL-18 – Interleucina 18

INF- γ – Interferon gama

L1 – Larva de primeiro estágio

L3 – Larva de terceiro estágio (infectante)

L4 – Larva de quarto estágio

LPS – Lipopolissacarídeo

NK – Célula Natural Killer

OPG – Ovos por grama de fezes

OVA – ovoalbumina agregada

P. acnes – *Propionibacterium acnes*

P. granulosum – *Propionibacterium granulosum*

RNA_m – RNA mensageiro

Rpm – rotações por minuto

T. circumcincta - *Trichostrongylus circumcincta*

T. colubriformis – *Trichostrongylus colubriformis*

TLA – ácido lipotecóico

TLR – Toll like receptor ou receptor de Toll

TLR 4 – receptor de Toll 4

TLR 9 – receptor de Toll 9

TNF-β – Fator de necrose tumoral beta

VCM – Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Epígrafe.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xvi
1.Introdução.....	1
2.Objetivos.....	4
3.Revisão da Literatura.....	5
3.1 Verminose em ovinos.....	5
3.2 Resposta Imune aos Helmintos.....	6
3.3 Tratamento da Verminose.....	10
4.Métodos.....	16
4.1 Animais.....	16
4.2 Tratamento da Verminose Natural.....	16
4.3 Cultura de Larvas.....	17
4.4 Identificação e Contagem das Larvas.....	17
4.5 Infecção Experimental.....	17

4.6 Desenho Experimental.....	18
4.7 Tratamento.....	19
4.8 Imunoestimulantes.....	19
4.8.1 Extrato de <i>Propionibacterium acnes</i>	19
4.8.2 Composto misto de LPS e <i>P. acnes</i>	19
4.9 Vermifugação.....	20
4.10 Coleta de Materiais Biológicos.....	20
4.11 Contagem de Ovos por Grama de fezes.....	20
4.12 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico.....	21
4.13 Ensaio de Proliferação de células mononucleares.....	21
4.14 Extrato de Larvas.....	22
4.15 Hemograma.....	22
4.16 Quantificação Total de IgE no soro.....	24
4.17 Dosagem de Proteínas Plasmáticas.....	25
4.18 Análise Estatística.....	25
5. Resultados.....	26
5.1 Controle da Verminose Natural.....	26
5.2 Identificação das Larvas.....	26
5.3 Indução da verminose experimental e OPG.....	27
5.4 Quantificação Total de IgE no soro.....	29
5.5 Ensaio de Proliferação.....	31

5.6 Hemograma.....	34
5.6.1 Contagem global de Eritrócitos.....	34
5.6.2 Hematócrito.....	36
5.6.3 Dosagem de Hemoglobina.....	37
5.6.4 Índices Hematimétricos.....	38
5.6.5 Contagem de Leucócitos Totais.....	42
5.6.6 Linfócitos	43
5.6.7 Neutrófilos.....	45
5.6.8 Eosinófilos.....	46
5.6.9 Monócitos.....	48
5.7 Dosagem de Proteínas Plasmáticas.....	50
6. Discussão.....	52
7. Conclusão.....	63
8. Referências Bibliográficas.....	64
Anexos.....	85

1. INTRODUÇÃO

As verminoses representam um grave problema sanitário na ovinocultura no Brasil. Os prejuízos econômicos estão relacionados ao atraso de desenvolvimento corporal dos cordeiros, queda na produção e na qualidade da carne e da lã e morte de animais jovens nos casos mais graves (Ramos *et al.*, 2004).

A severidade e seqüelas associadas ao parasitismo estão ligadas à diversos fatores, incluindo a espécie do parasita, taxa de infestação, idade do hospedeiro, condições ambientais, estresse, fatores nutricionais práticas de manejo e diversidade genética (Balic *et al.*, 2000).

Dentre os helmintos parasitas de ovinos, o *Haemonchus contortus* é um dos mais patogênicos (Taylor *et al.*, 1990; Jasmer & Mc Guire, 1996; Yatsuda *et al.*, 2003), além de ser altamente prevalente no Brasil (Amarante, 2001).

De uma maneira geral, a resposta imune aos helmintos é caracterizada por uma resposta do tipo Th2 com a participação de linfócitos TCD4+, produtores de citocinas como as IL-4, IL-5 e IL-13. Esses mediadores promovem a ativação de eosinófilos e mastócitos que quando estimulados liberam grânulos tóxicos contra os helmintos e ativam linfócitos B na produção de IgE (Tizard, 2002).

A presença de citocinas do tipo Th2 no tecido abomasal é importante para a ativação de eosinófilos e na eliminação das larvas L3 de *H. contortus*, já que são células ativadas na presença de IL-5, anticorpo e complemento (Rainbird *et al.*, 1998; Balic *et al.*, 2005).

O controle das infecções provocadas por nematóides gastrintestinais consiste na administração de anti-helmínticos sintéticos. No entanto, o desenvolvimento da resistência tem limitado o uso de anti-helmínticos, estimulando a procura de drogas mais efetivas (Maciel *et al.*, 2006).

Desta forma as indústrias farmacêuticas continuam a investir significativamente na descoberta de novas drogas (Newton & Meeusen, 2003).

Os imunomoduladores são substâncias que atuam na produção de uma resposta imune mais intensa e efetiva contra agentes produtores de enfermidades clínicas e subclínicas, promovendo aumento na imunidade inespecífica em animais

neonatos jovens e susceptíveis a infecção além de aumentar a resposta imune nas mucosas do trato gastrointestinal, respiratório e genital (Quinn, 1990). Compostos a base de Lipopolissacarídeo (LPS) e *Propionibacterium granulosum* estimulam a resposta imune em animais e humanos (Ko *et al.*, 1981; Pang *et al.*, 1994), e em condições de imunossupressão são capazes de promover a ativação de linfócitos B (Gallego-Olivella *et al.*, 1998) e diminuir os efeitos adversos sobre a imunossupressão causada pela doença de Aujeszky e peste suína clássica (Makowska *et al.*, 1992).

A associação de drogas imunomoduladoras às anti-helmínticas, foi capaz de promover a redução na contagem de larvas em ovinos (Molento & Prichard 1999). Em outro trabalho, Bautista-Garcia *et al.* (1991), verificaram que ovinos tratados com adjuvante completo de Freund (FCA) antes, durante e depois da infecção com 10.000 larvas de *H. contortus*, apresentaram significativa redução no OPG quando comparado a animais que não receberam tratamento.

Um imunomodulador constituído de LPS de *E. coli* e células inativadas de *Propionibacterium granulosum*¹, tem demonstrado efeito *in vivo* sobre a resposta imune humoral, através de uma ativação específica de linfócitos B, produtores de IgA + e IgM+ em nódulos mesentéricos e de IgA na lâmina própria das vilosidades intestinais (Gonzales *et al.*, 1993).

A participação da resposta imune na verminose em ovinos pôde ser verificada em experimentos utilizando um modelo experimental onde ovinos tratados com ciclofosfamida submetidos à imunossupressão, apresentaram maiores contagens de ovos por grama de fezes e diminuição de valores de proteínas séricas, sugerindo que a condição imune no momento da infecção verminótica pode estar associada à severidade da doença (Garcia *et al.*, 2002; Chate, 2005).

¹ Inmodulen (Calier®)

Recente trabalho do nosso grupo mostrou que animais tratados com imunoestimulante composto a base de *P.acnes* e LPS de *E. coli*², apresentaram aumento da proliferação de linfócitos T e do número de eosinófilos, resultando em uma diminuição significativa no OPG em modelo experimental de verminose (Abel *et al.*, submitted).

Esses resultados sugerem que o tratamento com imunoestimulante foi capaz de provocar aumento na resposta imune celular, particularmente na produção de eosinófilos. Desta forma, a produção de IgE pode estar envolvida no mecanismo de proteção.

A modulação da resposta imune por bactérias e seus produtos pode ser uma alternativa promissora haja visto que o *Propionibacterium acnes* é um potente adjuvante (Perry & Lambert, 2006).

² INFERVAC (Calier®)

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do uso associado de anti-helmíntico a imunostimulante na verminose experimental em ovinos. Os resultados deste trabalho poderão propor uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da verminose em ovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia do tratamento do uso associado de anti-helmíntico a imunostimulante na verminose experimental através dos seguintes parâmetros:
- Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)
- Hemograma
- Dosagem de proteínas plasmáticas.
- Dosagem de IgE total
- Proliferação de Linfócitos T

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Verminose em ovinos

A maior parte dos animais criados a campo apresenta parasitismo por uma ou mais espécies de helmintos, sendo que os nematóides da ordem *Strongylidea* são os mais importantes (Amarante, 2005).

Os helmintos gastrintestinais mais importantes dos pequenos ruminantes são o *Haemonchus contortus*, a *Ostertagia* spp e o *Trichostrongylus* spp (Uhlinger, 1996; Molento & Prichard, 2001; Silva *et al.*, 2002).

O ciclo de vida destes parasitas é direto, os ovos são liberados com as fezes desenvolvendo-se rapidamente em larvas infectantes em um período de quatro a seis semanas, sendo que as larvas podem sobreviver na pastagem por meses. Após a eclosão dos ovos, ocorre o desenvolvimento das larvas de primeiro estágio (L1) em larvas infectantes (L3) em aproximadamente sete a quatorze dias. A sobrevivência e o desenvolvimento das larvas requerem condições ambientais apropriadas que também influenciam a migração das larvas dos bolos fecais para as pastagens.

Uma vez ingerida a larva infectante transforma-se na forma adulta e em um período de duas a quatro semanas os ovos aparecem nas fezes (Soulsby, 1987; Uhlinger, 1996).

O grau de infecção por nematóides gastrintestinais em ovinos pode depender de uma série de fatores que muitas vezes se inter-relacionam dentre eles as condições climáticas que podem determinar a taxa de infestação da pastagem, comportamento de pastejo dos animais, infecções prévias, estado fisiológico dos animais, rompimento do equilíbrio desencadeado pela ação do próprio homem através de medidas indevidas de manejo e utilização incorreta de medicamentos antiparasitários (Amarante, 2001).

A quantidade de parasitas presentes no hospedeiro é controlada por fatores genéticos e pela qualidade da resposta imune, levando a um “equilíbrio” entre hospedeiro e parasita. Outros fatores como a competição intra e inter-espécies

pelo espaço a ser ocupado no trato gastrointestinal e a quantidade de nutrientes, influenciam na carga parasitária destes animais (Tizard, 2002).

As infecções parasitárias do rebanho de ovinos geralmente são mistas e os efeitos patológicos causados pelos nematóides gastrintestinais são variados e dependem, dentre outros fatores, do tipo de migração e da localização final dos vermes (Araújo & Madruga, 2001). Espécies do gênero *Ostertagia* estão associadas à destruição morfológica e funcional das glândulas gástricas do abomaso.

A patologia principal provocada por *Haemonchus* é a hemorragia que surge na mucosa, nos locais onde o verme se fixa, que juntamente com o hábito de hematofagia deste parasita, leva a quadros de anemia, perda de peso em animais jovens e em alguns casos pode resultar na morte do animal (Bakker *et al.*, 2004).

Algumas espécies de helmintos dos gêneros *Cooperia* e *Trichostrongylus*, durante a penetração na superfície epitelial do intestino delgado, podem levar a ruptura da mucosa, resultando em perda de proteínas plasmáticas e atrofia das vilosidades, reduzindo a superfície de absorção de nutrientes e líquidos. Vermes do gênero *Oesophagostomum* migram profundamente na mucosa do intestino, provocando uma resposta inflamatória com formação de nódulos, podendo levar a quadros de colite ulcerativa, levando na fase final da doença ao desenvolvimento de anemia e hipoalbuminemia, devido à perda protéica e extravasamento de sangue através da mucosa lesada (Urqhart *et al.*, 1996).

3.2 Resposta Imune aos Helmintos

A resposta imune contra nematódeos intestinais tem sido extensivamente estudada em modelos humanos e roedores (Miller, 1984; Cox & Liew, 1992; Sher & Coffman, 1992; Miller, 1996).

Em ovinos a resposta imune contra os parasitas nematódeos gastrintestinais é mediada por linfócitos TCD4+ gerados nos linfonodos mesentéricos (Gill *et al.*, 1993). Sabe-se que a participação destas células é extremamente importante na resposta a infecções por nematóides gastrintestinais

uma vez que a depleção dessas células tornam os animais susceptíveis (Gill *et al.*, 1993).

De uma maneira geral, os linfócitos TCD4+ podem ser classificados em dois subtipos: subtipo 1 (Th1) e subtipo 2 (Th2), baseadas nas citocinas que eles secretam. As células Th1 produzem IL-1, IL-2, interferon γ (INF- γ) e fator de necrose tumoral- β (TNF- β) e as células Th2 são produtoras de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, IL-13 (Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann & Coffman, 1989).

As infecções por helmintos produzem uma resposta do tipo Th2, com a participação de linfócitos TCD4+ produtores de citocinas como as IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 promove a ativação de linfócitos B na produção da imunoglobulina E (IgE), e a IL-5 promove o desenvolvimento e a ativação de eosinófilos (Abbas *et al.*, 2005; Meeusen *et al.*, 2005).

Os eosinófilos apresentam receptores para IgE, e podem ser ativados por helmintos ligados a IgE. Uma vez ativados, os eosinófilos liberam grânulos dentre eles a proteína básica principal, que é tóxica para os helmintos (Tizard, 2002; Abbas *et al.*, 2005). A IL-5 tem importante papel na ativação de eosinófilos, assim como a eotaxina que é produzida localmente e é capaz de mobilizar os eosinófilos (Collins *et al.*, 1995; Rainbird *et al.*, 1998).

Os mastócitos são células que também apresentam receptores para IgE, e quando ativados liberam mediadores dentre eles a histamina, serotonina, triptase, calicreínas, proteases e proteoglicanos. Esses mediadores estimulam a contração da musculatura lisa e promovem o aumento da permeabilidade vascular, permitindo extravasamento de fluido no lúmen intestinal, favorecendo a expulsão dos helmintos (Tizard, 2002; Meeusen *et al.*, 2005; Balic *et al.*, 2006).

A IL-4 tem importante papel na ativação dos mastócitos intraepiteliais no tecido abomasal de ovinos, pois além de promoverem aumento de IgE total e específica, estimulam os eosinófilos (Huntley *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 2002; Balic *et al.*, 2006).

Em ovinos infectados por *Haemonchus contortus*., os animais resistentes apresentavam aumento nos níveis de IL-5, e diminuição nos níveis de INF γ em

relação aos animais susceptíveis, sugerindo a participação de citocinas do tipo Th2 nos mecanismos de proteção (Gill *et al.*, 2000).

Relatos da literatura demonstraram uma diminuição nos níveis de expressão de RNAm para IL-2 e aumento na taxa de transcrição de IL-4 e IL-10 em gados infectados com *Ostertagia ostertagi* (Canals *et al.* 1997). Outros estudos mostraram padrão semelhante, animais resistentes a *Trichostrongylus colubriformis.*, apresentaram aumento da expressão nos níveis de RNAm para IL-4 em relação aos animais suscetíveis (Pernthaner *et al.* 1997).

Em ovinos infectados por *T. colubriformis* e bovinos infectados com *Dictyocaulus viviparus*, a IgE está associada aos mecanismos de proteção (Shaw *et al.*, 1998; Stankiewicz *et al.*, 2000; Kooyman *et al.*, 2002).

Embora a resposta anti-helmíntica mediada por eosinófilos IgE-dependente constitua o mecanismo de resistência mais importante nas verminoses, anticorpos de outras classes também desempenham papel importante (Tizard, 2002; Abbas *et al.*, 2005). Os anticorpos parasitas-específicos neutralizam proteases utilizadas pelas larvas para penetrar nos tecidos; bloqueiam os poros oral e anal das larvas por meio de imunocomplexos, impedem a ecdise e a inibição do desenvolvimento larval por parte dos anticorpos direcionados contra os antígenos extra-cuticulares (Tizard, 2002; Abbas *et al.*, 2005).

Os anticorpos das classes IgA e IgG estão envolvidos na resistência a infecção pelo *Haemonchus*. Após a infecção primária ou secundária, é observado um aumento no nível destes anticorpos no soro (Schallig *et al.*, 1994; Schallig *et al.*, 1995; Gómez-Munoz *et al.*, 1998), além de terem participação na neutralização ou inativação de enzimas metabólicas vitais do *Haemonchus* (Gill *et al.*, 1993).

Estudos anteriores a estes, como os de Abu-Ghazaleh *et al.* (1989), já demonstravam a participação da IgA na eliminação do parasita, devido a sua habilidade de induzir a degranulação eosinofílica.

Sabe-se que a IgE total e específica tem participação importante na resposta imune do hospedeiro contra a infecção helmíntica (Hagan, 1993; Pritchard, 1995).

A participação da IgE nas infecções helmínticas em ovinos tem sido demonstrada (Shaw *et al.*, 1997; Kooyman *et al.* 1997). Aumento nos níveis de IgE foi evidenciado entre a 2^a e 4^a semana após a infecção experimental por *Haemonchus contortus* em ovinos, sendo observado uma correlação negativa entre carga parasitária (OPG) e os níveis de IgE no soro (Kooyman *et al.* 1997).

Achados semelhantes foram encontrados por Thatcher *et al.* (1989) e Baker & Gershwin (1993), em bovinos infectados com *Ostertagia ostertagi*.

O aumento de IgE específico para os antígenos larvais de L3 quanto para os antígenos de vermes adultos foi evidenciado em ovinos desafiados com *Trichostrongylus colubriformis*. (Shaw *et al.*, 1998).

A resposta imune local mediada por IgE parece ser importante na eliminação dos helmintos onde ovinos infectados com L3 de *T. circumcincta*, apresentaram níveis de IgE quatro vezes mais altos nos linfonodos gástricos do que no soro (Huntley *et al.* 1998).

Os mastócitos desempenham importante papel na eliminação dos nematódeos gastrintestinais em ovinos, com presença de hiperplasia de mucosa no local da infecção (Schalling, 2000). A presença de mastocitose nas helmintíases gastrintestinais, sugerem a presença de uma reação de hipersensibilidade do tipo I na eliminação dos vermes (Miller, 1984; Huntley *et al.* 1995).

Estudos têm demonstrado uma forte associação entre a ativação de eosinófilos e a eliminação de helmintos em animais resistentes (Butterworth & Thorne, 1993; Balic *et al.*, 2006).

Outros resultados de experimentos *in vivo* mostraram um aumento significativo de eosinófilos nos tecidos de animais virgens e de animais previamente desafiados durante infecção com *Haemonchus contortus* (Balic *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro* mostraram que eosinófilos obtidos de lavados mamários de ovinos, são capazes de matar larvas de *Haemonchus contortus* na presença de anticorpos específicos contra antígenos larvais e principalmente na presença de IL-5 (Rainbird *et al.*, 1998).

3.3 Tratamento da Verminose

A eliminação e redução do número de larvas infectantes é um dos principais objetivos do tratamento das verminoses (Padilha & Mendonza-de-Gives, 1996).

O controle da população de larvas nas pastagens, via de regra, tem sido feita através da administração de anti-helmínticos cuja finalidade do tratamento é limitar a eliminação de ovos e larvas nas fezes, reduzindo conseqüentemente o número de estágios infectantes no meio onde vivem os hospedeiros (Jackson, 2004).

Os anti-helmínticos foram descobertos na década de 1960 e apresentavam amplo espectro de atividade, maior eficácia e menor toxicidade. Em 1961, surgiu o primeiro benzimidazole, o tiabendazole, e, posteriormente, os imidazotiazóis em 1965, as pirimidinas em 1966, as salicilanilidas em 1969, até chegar a década de 1980, com a descoberta dos endectocidas, as lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) (Spinosa *et al.*, 2006).

As drogas antiparasitárias de amplo espectro vêm sendo utilizadas em diversas regiões do mundo para o controle das infecções por nematóides gastrintestinais em ruminantes, visando redução da contaminação das pastagens (Charles & Furlong, 1996; Brundson, 1980).

Os benzimidazóis e os endectocidas são as drogas mais freqüentemente utilizadas no combate às verminoses (Suarez, 2002). Dentre os benzimidazóis podemos citar o albendazol, oxfendazol e o parbendazol, cujo mecanismo de ação ocorre através de uma ligação à β -tubulina do nematódeo, evitando dimerização com a α -tubulina e a polimerização dos oligômeros da tubulina dentro dos microtúbulos, impedindo a mitose, montagem protéica e o metabolismo energético do parasita.

Os endectocidas também são conhecidos como lactonas macrocíclicas, como a moxidectina, abamectina e doramectina. Estas lactonas ligam-se seletivamente com alta afinidade aos canais de íon cloreto ao glutamato nos nervos e nas células musculares dos invertebrados. Nos nematódeos, a sinapse

entre os interneurônios inibidores e os neurônios motores excitadores é o local primário de ação, o resultado final é paralisia flácida dos parasitas acometidos, seguida de sua morte (Adams, 2003).

A utilização indiscriminada desses anti-helmínticos em épocas inadequadas, tem favorecido o aparecimento de cepas de parasitas resistentes (Charles & Furlong, 1996; Waller *et al.*, 1996 ; Sangster, 2001). Infelizmente, a resistência aos anti-helmínticos é preocupante em países como Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil, onde se encontram os maiores níveis de resistência anti-helmíntica do mundo (Márquez Lara, 2003). Até a utilização de drogas modernas da família das lactonas macrocíclicas como a moxidectina está sendo ineficiente no Brasil e em outros países como a Austrália (Love *et al.* 2003; Molento, 2004; Thomaz-Soccol *et al.*, 2004).

Diante deste quadro preocupante, nos últimos 10-15 anos, houve grande interesse das indústrias e centros de pesquisa a investirem no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o controle das verminoses em animais de produção.

Diversos grupos de pesquisa tentam desenvolver uma vacina contra *H. contortus*. As estratégias desenvolvidas até o momento baseiam-se em preparações antigênicas de dois tipos: antígenos naturais e antígenos escondidos (Schalling, 2000). Infelizmente algumas destas preparações não forneceram proteção a animais jovens (Schalling *et al.*, 1997), enquanto outras só geraram proteção em animais com cinco meses de vida (Jacobs *et al.*, 1999). Além disso a coleta dos antígenos é laboriosa e intensiva, e técnicas de tecnologia do DNA recombinante são requeridas para a produção, tornando o valor final do produto extremamente oneroso, não sendo portanto uma estratégia atrativa comercialmente.

A utilização de imunomoduladores parece ser uma alternativa atraente pela facilidade de produção e baixo custo.

A imunomodulação consiste na manipulação do sistema imune através do uso de substâncias biológicas ou químicas, para produzir uma resposta imune adequada. O imunomodulador pode ser utilizado tanto para aumentar como para reduzir a resposta imune.

De acordo com Quinn (1990) o uso de imunoestimulante em animais tem como objetivo a produção de uma resposta imune mais intensa e efetiva contra agentes produtores de enfermidades clínicas e subclínicas, promover aumento da imunidade inata e específica em animais jovens e suscetíveis a infecção, aumentar a resposta imune específica, celular e humoral, através da vacinação, e reduzir os efeitos da imunossupressão causado por agentes infecciosos. Além disto o imunoestimulante não deve ser tóxico, nem possuir atividade teratogênica, o composto do produto deve ser inativado e biodegradável no meio ambiente, deve ser ativo por via oral e manter sua estabilidade em águas e alimentos, deve ser compatível com outros fármacos incluindo antibióticos e antiparasitários.

O modo de ação da maioria dos imunoestimulantes não é completamente conhecido. No entanto, sabe-se que os principais alvos são linfócitos T e B, macrófagos e células NK (Mendonza, 2002), além de promoverem mudanças na expressão gênica, processamento de RNAm e no transporte intracelular de proteína (Quinn, 1990; Pell, 1995). Em outros estudos foi demonstrado que os imunoestimulantes podem agir no equilíbrio e produção de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e guanina monofosfato cíclica (cGMP) (Kehrl & Thot, 1990; Quinn, 1990). Outros trabalhos mostraram que os imunoestimulantes promovem aumento nos níveis de cAMP, inibindo a função dos linfócitos levando a um quadro de imunossupressão, por outro lado os imunoestimulantes podem agir promovendo altos níveis de cGMP, a qual é capaz de aumentar a atividade dos linfócitos maduros, gerando um estímulo do sistema imune (Mulkahty & Quinn, 1986; Quinn 1990).

Dentre as diversas substâncias utilizadas como imunomoduladores destacam-se o LPS e as bactérias do gênero *Propionibacterium*.

O LPS é um componente que se encontra em maior proporção na parede de bactérias gram negativas. O LPS no hospedeiro é capaz de induzir uma série de alterações e manifestações clínicas, como febre, vômito, anorexia, sonolência, letargia, diarreia, hipotensão, coagulação intravascular disseminada, degradação de proteína muscular, apoptose, indução de mediadores inflamatórios e choque tóxico (Adams *et al.*, 1990; Klir *et al.*, 1997; Norimatsu *et al.*, 1995; Webel *et al.*, 1997).

O LPS é capaz de se ligar aos macrófagos através do CD14, promovendo fosforilação e ativação das proteínas quinases, aumento dos mecanismos de tradução, levando a uma proliferação de macrófagos e secreção de citocinas pró-inflamatórias (Alving, 1993; Basta *et al.*, 2001). Além do papel mitogênico para macrófagos, pode atuar na ativação de linfócitos B, neutrófilos, promover a liberação de citocinas como a IL- α , IL- β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α ; aumento da resposta imune nas placas de Peyer e cGMP nos linfócitos (Charley, 1986; Jacobs, 1982; Marshall & Zielger, 1989; Mulcahy & Quinn, 1986; Norimatsu *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2000)

A *Propionibacterium acnes* é um bacilo Gram positivo que pertence à microflora normal da pele (Kligman *et al.*, 1976; Leyden *et al.*, 1998) e em modelos experimentais é capaz de ativar o sistema fagocitário mononuclear (Halpern *et al.*, 1963), induzir atividade tumoricida (Halpern *et al.*, 1966; Ananias *et al.*, 2001), atuar como adjuvante na produção de anticorpos (War & James, 1975) e promover aumento da resistência a infecções (Hill, 1987; Abath *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 1996)

Além disso, a *P. acnes* induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como INF γ , IL-1- α , IL-6 e TNF- α (Smith *et al.*, 1993), sendo também observada a produção IL-18 e IL-12 (Okamura *et al.*, 1995; Dao *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1997; Tsuji *et al.*, 1999).

A modulação da resposta imune por bactérias e seus produtos pode ser uma alternativa promissora, haja visto que o *Propionibacterium acnes* é um potente adjuvante (Perry & Lambert, 2006).

A *Propionibacterium acnes* vem utilizada na imunoterapia ativa inespecífica, na forma de suspensões comerciais (Imunoparvum[®], Parvulan[®]), indicadas para pacientes com patologias associadas à supressão da resposta imune.

Mais recentemente, Braga (1998, apud Braga *et al.*, 2003) demonstrou que camundongos tratados com *P. acnes* por via intraperitoneal ou subcutânea apresentavam aumento da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais.

O tratamento com *P. acnes* foi eficaz para algumas doenças parasitárias, pois diminuiu a parasitemia e aumentou a sobrevivência de animais desafiados com

Plasmodium berghei (Nussenzweig, 1967), *Trypanosoma cruzi* (Brener & Cardoso, 1976; Abath *et al.*, 1988), *Leishmania major* (Hill, 1987) e *Schistosoma mansoni* (Teixeira *et al.*, 1996),

Vários trabalhos têm relatado a propriedade da *P. acnes* de induzir atividade tumoricida, efeito demonstrado inicialmente em estudos experimentais *in vivo*, utilizando diversos tipos de células tumorais (Halpern *et al.*, 1966; Kennedy *et al.*, 1989), e posteriormente em estudos clínicos, em associação com quimioterapia e/ou radioterapia (Fisher *et al.*, 1990; Lypston *et al.*, 1991).

Assim, procurando esclarecer os mecanismos pelos quais essa bactéria promove a síntese de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN- γ , Matsui *et al.* (1997) observaram diminuição da população de células T CD4⁺ NK1.1⁺, produtoras de IL-4 (perfil Th2), e aumento da população T CD4⁻, produtoras de IFN- γ (perfil Th1), no fígado de camundongos tratados com *P. acnes*. Aumento da produção de IL-12 e IL-18 por células de Kupffer *in vitro* também foi observado (Matsui *et al.*, 1997), sugerindo que a *P. acnes* é capaz de modular a resposta imune celular de Th2 para Th1.

Devido a essa capacidade a *P. acnes* vem sendo utilizada em alguns trabalhos como uma ferramenta para o estudo da resposta imune celular, sendo considerada um típico antígeno indutor de resposta Th1 (Mac Donald *et al.*, 2001; Mac Donald *et al.*, 2002). Entretanto, foi demonstrado recentemente que, dependendo do esquema de tratamento com a bactéria a resposta celular a um antígeno tipicamente Th2 pode ser suprimida ou potencializada (Braga *et al.*, 2003). Nesse estudo foi utilizado um modelo murino de hipersensibilidade imediata, no qual camundongos sensibilizados com clara solidificada de ovo de galinha (CSO) no tecido subcutâneo e desafiados, 14 dias depois, com ovoalbumina agregada (OVA) na pata desenvolvem, no local do desafio, uma reação eosinofílica tipicamente Th2. O pré-tratamento dos animais com *P. acnes*, por via subcutânea suprimiu a resposta Th2 na pata dos animais, induzindo reação de hipersensibilidade tardia (Th1) quando a última injeção com a bactéria ocorreu uma semana antes do implante com CSO. Entretanto, quando a última injeção foi administrada no dia do implante houve potencialização da resposta Th2, com intenso infiltrado eosinofílico no local do desafio com OVA (Braga *et al.*, 2003).

Em experimentos *in vitro* células mononucleares de porcos estimuladas com LPS e *P. granulosum*¹ apresentaram aumento na transcrição de RNA para IL-1 e TNF α , expressão de CD25, e na proliferação de linfócitos na presença de Con-A (Alvarez *et al.*, 1998). Em estudos *in vivo* o tratamento de porcos com LPS e *P. granulosum*¹ estimulou a resposta imune humoral. Ortiz *et al.* (1994) estudou os efeitos LPS e *P. granulosum*¹ em porcas prenhas e vacinadas contra doença de Aujeszky, e observou um aumento significativo de IgA específica para o vírus no colostro 21 dias antes do parto. Em processos entéricos causados por *E. coli* e *Brachyspira hyodysenteriae*, observou que o uso do produto a base de LPS e *P. granulosum*¹ produziu redução no número de porcos com diarreia, e número de porcos que tiveram que ser tratados parentalmente (Ferro *et al.*, 1999^a; Ferro *et al.*, 1999^b).

Aves suprimidas com ciclofosfamida e tratadas com LPS detoxificado de *E. coli* e células inativadas de *P. acnes*, foram capazes de aumentar a resposta imune primária e humoral, além apresentarem aumento de peso (Sisquella, 2000). Experimento semelhante foi realizado em ratos imunossuprimidos e tratados com LPS e *P. granulosum*, o composto foi capaz de induzir proliferação de linfócitos B, produtores de IgA + e IgM+ em nódulos mesentéricos e de IgA na lâmina própria das vilosidades intestinais (Gonzales *et al.*, 1993).

¹ Inmodulen (Calier®)

4. MÉTODOS

4.1 Animais

15 ovinos de raça cruzada (Corriedale x Ile de France), machos, adultos, com idade superior a 12 meses com média de 26 kg de peso vivo cada, foram adquiridos de uma propriedade particular localizada em São Manuel e posteriormente alojados no Hospital Veterinário da Universidade Paulista, onde foram mantidos estabulados em baias, alimentados com feno de capim e ração comercial, e identificados de 1 a 15. Os animais foram submetidos a avaliação clínica periódica, realizada pela médica Veterinária do Hospital Veterinário da UNIP- Cantareira, Dr^a Ana Carla Parício.

4.2 Controle da Verminose Natural dos Animais

Inicialmente todos os animais foram tratados semanalmente com vermífugo para diminuição da carga parasitária. O tratamento constituiu de dois antiparasitários sem ação imunoestimulante, Albendazol³ e Moxidectina⁴ da seguinte forma: Albendazol na dose de 3,5 mL/animal até a 10^a semana, por via oral; Moxidectina da 11^a a 15^a semana na dose de 3,5 mL/animal, por via oral; e por fim Albendazol na dose de 3,5 mL/animal da 16^a a 37^a semana, por via oral. A eficácia do tratamento foi avaliada através da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), exames laboratoriais e exame clínico de cada animal.

³ Ricobendazole® Oral – Fort Dodge®

⁴ Cydectin® Oral – Ouro Fino®

4.3 Cultura de larvas

A coprocultura foi realizada para obtenção das larvas conforme a técnica de Roberts & O'Sullivan (1950). 20 a 30 g de fezes de ovinos com verminose obtidas de uma propriedade particular foram misturadas a vermiculita na proporção de aproximadamente 1 parte de vermiculita para 1 de fezes. O frasco foi tampado com atadura de gaze para assegurar a aerobiose do cultivo, e mantido à temperatura ambiente por 10 dias. Após esse período, o frasco foi destampado, preenchido com água a 37°C até a borda e invertido bruscamente, sendo o frasco apoiado em espátulas para ficar levemente inclinado. Depois de 4 horas, o conteúdo da placa de Petri foi coletado com pipeta e colocado num tubo de ensaio. Este conteúdo permaneceu na geladeira por três horas para decantação das larvas, após este período o sobrenadante foi retirado e seguiu-se a identificação de larvas no mesmo dia.

4.4 Identificação e contagem das larvas

As larvas L3 obtidas a partir da coprocultura dos ovinos infectados, foram identificadas de acordo com a chave taxonômica de Ueno & Gonçalves (1998).

Depois de coletar as larvas do cultivo, decantou-se o excesso de água e 25µL do sedimento foi colocado sobre uma lâmina adicionando-se uma gota de Lugol e observada ao microscópio óptico em objetiva de 100x.

Para a identificação das larvas L3 os seguintes parâmetros foram considerados: tamanho, presença ou não da bainha caudal, forma da região anterior e tipo de cauda, espaço entre a ponta da cauda da larva e a ponta da cauda da bainha, número e tipo de células intestinais e intensidade de coloração com o Lugol.

Foi realizada a contagem das larvas infectantes (L₃) viáveis presentes em toda a extensão da lâmina e calculando-se o número aproximado de larvas contidas em cada mL.

4.5 Infecção experimental

Após a identificação das larvas, cada animal recebeu por via oral 10.000 larvas L3, como descrito previamente por Adams & Fell (1997), na seguinte

proporção: 94% de *Haemonchus ssp*, 4% *Ostertagia ssp* e 2% de *Trichostrongylus ssp* e *S. papillosus*.

A data em que os animais receberam as larvas foi determinada como dia zero (0) dando início ao protocolo de indução da verminose e subsequente avaliação do tratamento.

4.6 Desenho Experimental

No 35° dia após a infecção experimental (pico do OPG) os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com o peso e carga parasitária e receberam o seguinte tratamento, como mostra a tabela 1:

Tabela 1: Os animais foram divididos em grupos e receberam 10.000 larvas por via oral. No 35° dia após a indução da verminose experimental, os animais foram tratados com anti-helmíntico + suspensão de LPS (*E. coli*) e *P. acnes* (grupo I); anti-helmíntico + *P. acnes* (grupo II); anti-helmíntico (Grupo III) e sem tratamento (Grupo IV) correspondendo ao grupo controle.

GRUPO	ANIMAIS	PESO	MEDIA DE PESO	TRATAMENTO
Grupo I	11	26.2	26.37	Moxidectina + suspensão de LPS (<i>E.coli</i>) e <i>P.acnes</i>
	5	28.3		
	1	28.1		
	6	22.9		
Grupo II	14	30	28.9	Moxidectina + <i>P. acnes</i>
	9	27.2		
	4	30.8		
	3	27.9		
Grupo III	12	26	25.2	Moxidectina
	13	28.3		
	8	18.4		
	15	28.1		
Grupo IV	2	32	27.7	Sem Tratamento (Controle)
	7	27.1		
	10	24.1		

4.7. Tratamento

O Tratamento foi iniciado no 35° dia após a infecção, conforme tabela 1 no pico de OPG. Os animais receberam dose de reforço no dia 63 e dia 71 após a indução da verminose. Esta dose foi administrada nos grupos I, II e III na mesma concentração aplicada no dia zero, tanto para os imunostimulantes quanto para o anti-helmíntico e os animais do grupo IV receberam salina.

4.8. Imunostimulantes

4.8.1 Extrato de *Propionibacterium acnes*

O extrato da bactéria *Propionibacterium acnes* (sedimento da bactéria sonicada) foi cedido gentilmente pela Prof^a Dr^a Ieda Maugeri, da Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP- Departamento de Imunologia.

Garrafas contendo 40 mL de meio de cultura para anaerobiose Hemobac foram acrescidas de 1 mL de suspensão estoque de *P. acnes*, e mantida no mesmo meio, à temperatura ambiente. As garrafas foram colocadas em estufa a 37°C por 3 dias, e, após esse período de crescimento, as bactérias foram centrifugadas por 30 minutos, a 2.000rpm, em centrífuga refrigerada e ressuspensas em solução fisiológica 0,9 % obtida comercialmente. Esse procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes. A suspensão foi então autoclavada e a dosagem protéica avaliada pelo método de Bradford (1976).

Somente os animais do Grupo II receberam a suspensão de *P. acnes* na concentração de 280 µg/mL, por via subcutânea.

4.8.2 Suspensão de LPS e *P. acnes*

A suspensão comercial de LPS e *P.acnes* (INFERVAC®) é fabricada pelo Laboratório Calier (Espanha). Este composto contém 0,250mg de células inativadas de *P. acnes* e 0,02mg de LPS de *E. coli* inativada. O composto foi administrado na dose de 1mL/10kg de peso vivo por via intramuscular, conforme orientação do fabricante.

4.9 Vermifugação

Os animais foram vermifugados com o anti-helmíntico a base de Moxidectina por via oral, na concentração de 3,5mL/ animal. A administração foi realizada nos animais em jejum de doze horas.

4.10 Coleta de Materiais Biológicos

Vinte mL de sangue foram coletados através de venopunção na jugular de cada ovino e distribuídos em 3 tubos: 1- com EDTA destinado a avaliação hematológica, 2- seco destinado a dosagem de proteínas e IgE no soro, 3- tubo heparinizado destinado a cultura e proliferação celular.

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de cada animal, colocados em copos plásticos limpos e descartáveis, e identificados de acordo com o número do animal.

As coletas foram realizadas semanalmente para avaliação do tratamento proposto até o 73° dia após a indução da verminose experimental.

4.11 Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

A contagem de ovos por grama de fezes foi realizada de acordo com a técnica modificada de Mc Master (Gordon & Whitlock, 1939). Duas gramas de fezes foram homogeneizadas e misturadas a 28 mL de solução salina supersaturada. A solução foi homogeneizada, filtrada em compressas de gaze e transferida para um recipiente limpo.

A leitura foi feita na câmara de MacMaster que permaneceu em repouso três minutos antes da leitura. A contagem de ovos de strongilídeos foi efetuada ao microscópio óptico (objetiva 100x), sendo multiplicado por 50 revelando o número de ovos por gramas de fezes (OPG).

4.12 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de ovinos

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas por separação em gradiente de concentração com Ficoll Hypaque, de acordo com o método descrito por Bignold & Ferrante, 1987.

O sangue foi misturado na proporção de 1:1 com Dulbecco/PBS (Cultilab) e homogeneizado com auxílio de pipeta Pasteur várias vezes e colocado vagarosamente sobre 3mL de Ficoll Hypaque (Amershan). O material foi centrifugado a 2500 rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada. Ao término da centrifugação o plasma foi retirado com pipeta Pasteur, sendo a nuvem, contendo as células mononucleares lavadas com solução Dulbecco/PBS e ressuspensas em meio RPMI completo (Cultilab) com 5% soro fetal bovino (Cultilab) e centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos. Os eritrócitos foram removidos incubando-se a suspensão celular enriquecida de linfócitos T com solução de lise (0,15M NH_4Cl ; 1,0mM KHCO_3 ; 0,1mM EDTA; pH 7,3) durante 3 minutos em banho Maria a 37°C sob agitação, em seguida foi acrescido Dulbecco/PBS e centrifugou-se a 1600 rpm durante 10 minutos. A contagem e a viabilidade celular foram feitas em hemocítômetro utilizando-se corante azul de Tripan.

4.13. Ensaio de proliferação de linfócitos T

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de ovinos foram preparadas com gradiente Ficoll-Hypaque e cultivadas em meio de cultura DME, acrescido de tampão HEPES 10 mM, 2mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio e 10% soro fetal bovino, pré-testado para crescimento de linfócitos T, contendo 10^5 células/poço na presença de mitógeno Concanavalina-A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e extrato de larva na concentração de 878 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sendo utilizado 10 μL extrato/well. Em seguida, a suspensão de células foi incubada em atmosfera de 5% CO_2 à 37°C, por 5 dias, em uma placa de cultura de 96 poços de fundo chato e em seguida pulsadas com 0,5 uCi de timidina triciada/poço (Amersham) seguida de coleta após 18 horas de incubação em coletor e a incorporação de timidina determinada

com contador Betaplate (Wallac). A média aritmética das triplicatas em cpm (cintilação por minuto), foi considerada para análise de resultados. Os resultados foram considerados positivos com índice de estimulação ($SI \geq 2$), calculado como cpm teste/ cpm controle.

4.14 Extrato de Larvas

4.14.1 Processo de Sonicação

As larvas obtidas a partir da coprocultura foram centrifugadas por 30 minutos a 6000 rpm em seguida o sobrenadante foi descartado. Logo após este procedimento, o pellet foi ressuspensão em 3mL de PBS e então congelado. Após descongelamento, foi realizada a sonicação por 1 hora, na frequência de 75mHz onde foi verificado se as larvas romperam no microscópio. A solução resultante foi filtrada e a quantidade de proteínas medida pelo método de Bradford (1976).

4.14.2 Método de dosagem protéica

A concentração protéica do extrato de larvas foi determinada pelo método de Bradford, descrito em 1976. A concentração protéica da amostra foi determinada a partir de uma curva padrão realizada em uma placa de fundo chato de 96 orifícios, a partir de uma solução padrão de 100 $\mu\text{g/mL}$ de BSA, sendo a leitura das absorvâncias determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm (A_{570}).

Foi utilizada a concentração de 878 $\mu\text{g/mL}$ de extratos de larvas na cultura para re-estímulo dos linfócitos T *in vitro*.

4.15. Hemograma

4.15.1 Contagem de eritrócitos por μL de sangue

A contagem de eritrócitos foi realizada com auxílio de uma pipeta de Thomas. O sangue foi aspirado até a marca de 0,5 e em seguida preenchido até a marca 101 com diluente de Hayem. Após esse procedimento a pipeta foi agitada

no sentido circular, misturando o sangue com o diluente. A contagem foi feita em câmara de Newbauer em aumento de 40x, sendo a contagem de eritrócitos realizada nos 5 quadrados do quadrante central. O resultado foi multiplicado por 1000 obtendo-se o número de eritrócitos por μL de sangue (Garcia-Navarro, 2005).

4.15.2 Dosagem de Hemoglobina

A dosagem de hemoglobina foi realizada através do kit da marca LABTEST® e a leitura realizada por método fotocolorimétrico (Garcia-Navarro, 2005).

4.15.3 Hematócrito

Tubos capilares foram preenchidos com até $\frac{3}{4}$ de sangue total homogeneizado, sendo selados posteriormente com massa apropriada e centrifugados durante 15 minutos com velocidade de 11.000 rpm. A leitura foi realizada com o auxílio da escala de leitura de micro-hematócrito e o resultado expresso em porcentagem (Schalm *et al.*, 1975).

4.15.4 Índices Corpusculares Absolutos dos Eritrócitos

Os índices corpusculares absolutos dos eritrócitos como concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), foram determinados através de cálculos (Bush, 2004; Garcia-Navarro, 2005) mostrados a seguir:

$$\text{CHCM (em g/dL)} = \frac{\text{Hb (em g/dL)} \times 10}{\text{Ht (em \%)}}$$

$$\text{VCM (em fL)} = \frac{\text{Ht (em \%)} \times 10}{\text{He (em } 10^6/\mu\text{L)}}$$

$$\text{HCM (em pg)} = \frac{\text{Hb (em g/dL)}}{\text{He (em } 10^{12}/\mu\text{L)}}$$

4.15.5 Contagem total de leucócitos

A contagem de leucócitos foi feita de acordo com a técnica de Hewitt (1984). Uma parte de sangue total foi colocada na pipeta de Thomas, em seguida foram adicionadas dezenove partes de líquido de Turk como diluidor, onde a mistura foi homogeneizada. A contagem dos leucócitos foi feita na câmara de Neubauer ao microscópio óptico com aumento de 100x, sendo os valores multiplicados por 50.

4.15.5.1 Esfregaço Sangüíneo – Contagem Diferencial de Leucócitos e Caracterização Morfológica dos Eritrócitos

O esfregaço sangüíneo foi feito com auxílio de lamínula extensora a partir de uma gota de sangue total homogeneizado, obtendo-se um esfregaço uniforme e adequado para a observação. A coloração da lâmina foi feita com corante Leishman (Garcia-Navarro, 2005; Kerr, 2003).

A contagem diferencial foi feita em microscópio óptico em aumento de 1000x (com óleo de imersão). Foram contados 100 leucócitos, sendo estes diferenciados em linfócitos, neutrófilos, bastonetes, metamielócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, de acordo com as características morfológicas de cada célula (Jain 1993; Kerr, 2003; Garcia-Navarro, 2005)

4.16. Quantificação de IgE total no soro

A análise de IgE foi determinada usando a técnica de Shaw *et al.* (1997) com algumas modificações. O anticorpo monoclonal anti-IgE purificado (YD3) foi colocado numa placa de ELISA para a captura de IgE nas amostras de soro. O anticorpo monoclonal biotinizado anti-IgE seguido pelo uso de streptavidina com peroxidase foi utilizado para detectar a IgE capturada. OPD e H₂O₂ foram utilizados como substrato enzimático. A leitura da placa foi realizada utilizando filtro de 492nm. O soro referência foi preparado com um pool de soros de ovinos com alta concentração de IgE. Este soro referência continha o valor de 100 unidades por mL e foi utilizado para preparar a curva do ensaio imunoenzimático. As

concentrações de IgE foram determinadas nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 48, 53, 67 e 73 após indução da verminose.

4.17 Dosagem de Proteínas Totais

Para a realização da dosagem das proteínas plasmáticas totais utilizou-se a técnica de refratometria com amostras pareadas. Após a centrifugação do capilar de hematócrito e a leitura do mesmo, quebrou-se o capilar de modo a obter uma gota de plasma sanguíneo, o qual foi colocado sobre o refratômetro, verificando-se o valor obtido. Antes da leitura das proteínas, o refratômetro foi calibrado com água destilada, para que não houvesse erro de leitura (Kerr, 2003; Rebar *et al.*, 2003).

4.18 Análise Estatística dos Resultados

Foi utilizado o método de Shapiro-Wilk, e os gráficos de qq-plot, para verificar se os dados apresentavam distribuição normal.

Para descrição dos dados calculou-se a média e o erro padrão da média, como estimadores da medida de tendência central da população e da incerteza em relação a esta estimativa, respectivamente.

Para verificar a eficácia da verminose, utilizou-se a ANOVA para medidas repetidas, considerando como fator o dia de mensuração (6 níveis).

A análise da eficiência dos diferentes tratamentos ao longo do tempo, utilizou-se uma ANOVA a dois fatores, num desenho 4 × 6, ou seja, 4 grupos em 6 momentos diferentes.

Todo o processamento estatístico foi realizado utilizando o programa R (versão 2.6.1, R Development Core Team, 2007). A significância estatística foi estabelecida em $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Tratamento da verminose Natural

No início do projeto, todos os animais apresentavam níveis elevados de OPG. Desta forma, iniciamos o tratamento alternado com os anti-helmínticos Albendazol e Moxidectina, evitando-se assim possível resistência aos mesmos. A vermifugação foi feita para diminuir o OPG dos animais e iniciar o experimento de indução da verminose experimental. Como podemos observar na figura 1, após um tratamento semanal e prolongado, esta condição foi alcançada somente após a 21ª semana de tratamento.

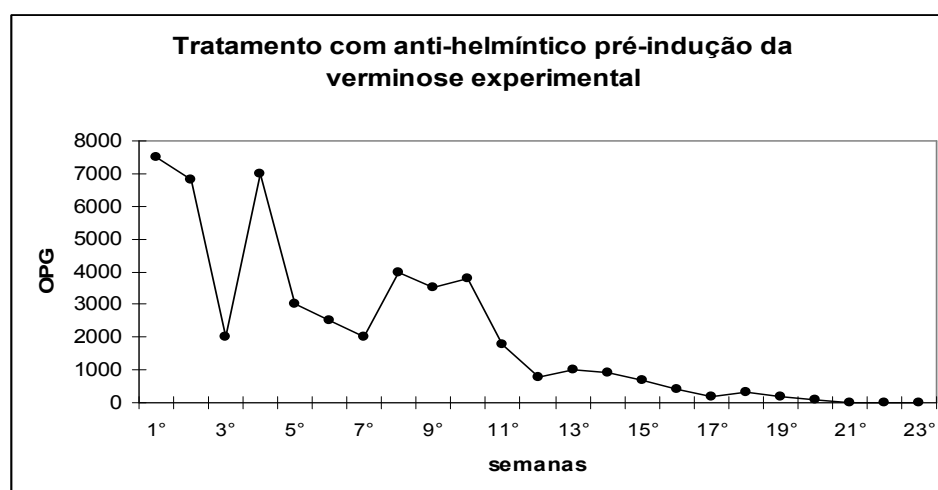


Figura 1: Tratamento da verminose natural de 15 ovinos com Albendazol (1ª a 11ª semana), Moxidectina (11ª a 15ª semana) e Albendazol (16ª a 37ª semana). Os valores representam a média dos OPG de 15 ovinos em cada semana.

5.2 Identificação das Larvas

As larvas em estágio L3 foram obtidas conforme descrito no item 4.3 em métodos. Foram identificados quatro gêneros de nematódeos nas fezes dos ovinos utilizados para a indução da verminose experimental. O gênero predominante foi *Haemonchus spp*, sendo 94% de *Haemonchus spp*, 2% de *Ostertagia spp*, 2% de outros (*Trichostrongylus spp* e *S. papillosus*).



Figura 2: Fotomicrografia da porção anterior do *Haemonchus spp*, em microscópio óptico, aumento de 1000x.

5.3 Indução da verminose experimental

A indução da verminose experimental foi feita 3 meses após o tratamento com os anti-helmínticos onde todos os animais apresentavam OPG igual a zero. Desta maneira, no dia 0 todos os animais receberam 10.000 larvas L3 por via oral, e a partir daí foram monitorados semanalmente. Como podemos observar na figura 3, a indução da verminose experimental foi realizada com sucesso, onde observamos um aumento significativo no OPG a partir do 21º dia em todos os grupos, com níveis bastante elevados no 35º dia, correspondendo ao pico do OPG (Fig.3, Tab.2).

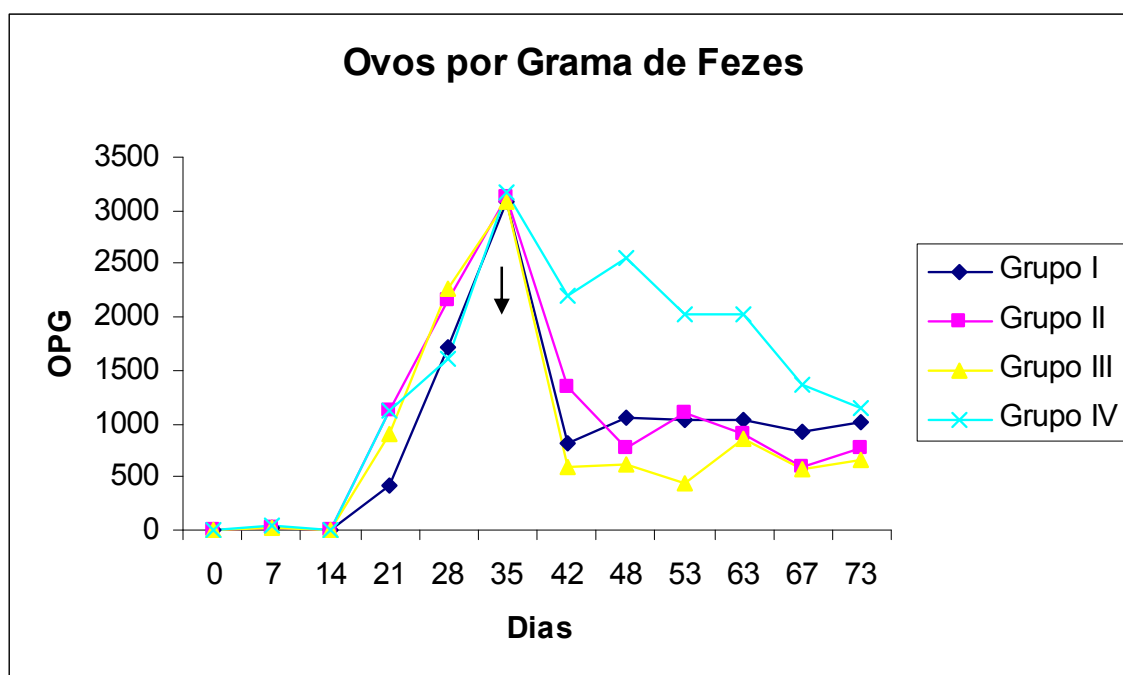


Figura 3: Valores médios de OPG dos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas L3 por via oral. A seta indica o início do esquema terapêutico, realizado no 35º dia.

Tabela 2: Valores médios de OPG ao longo dos 73 dias de experimento após a indução da verminose experimental. No 35º dia, foi iniciado tratamento: os animais do grupo I receberam suspensão de LPS e *P. acnes* e anti-helmíntico, grupo II- suspensão de *P. acnes* e anti-helmíntico; grupo III anti-helmíntico e grupo IV sem tratamento.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
7	25 ± 14	12.5 ± 12.5	25 ± 25	33.3 ± 28
14	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
21	425 ± 183	1125 ± 499	912.5 ± 576	1116.7 ± 555
28	1725 ± 659	2161.5 ± 482	2275 ± 626	1600 ± 542
35 (TRATAMENTO)	3075 ± 1704.1 a,b	3125 ± 1386.5 a,b	3087 ± 2131.2 a,b	3166.7 ± 2500.6 a,b
42	812.5 ± 85.1	1337.5 ± 723.2	600 ± 215.1 *	2200 ± 1235.2
48	1050 ± 174.4	775 ± 142.2	625 ± 125 *	2550 ± 909.7
53	1037.5 ± 349	1100 ± 380.2	450 ± 93.5 *	2033.3 ± 794
63	1037.5 ± 349	900 ± 237.17	850 ± 244.1 *	2033.3 ± 220.4
67	918,75 ± 297.5	587.5 ± 94.37	575 ± 154.7 *	1366.7 ± 495.3
73	1012.5 ± 222.1	775 ± 110,9	662.5 ± 275.6 *	1150 ± 264.6

Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média.

^a Indica diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação aos dias 0,7,14,21,28.

^b Indica diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação aos dias 42,48,53,63,67 e 73.

* Indica diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação ao grupo IV

No pico de OPG, alcançado no 35º dia, foi iniciado o tratamento dos animais. Os resultados mostraram que os animais dos grupos I, II e III apresentaram redução no número de ovos por grama de fezes quando comparados aos animais do grupo IV (Fig.3, Tab.2). No entanto verificamos que os animais do grupo III apresentaram valores de OPG estatisticamente menores, quando comparados aos animais do grupo IV, independente do dia considerado após o tratamento (Tab.2).

5.4 IgE

No início do experimento (dia 0) todos os animais apresentavam valores de IgE entre 3,0 a 4,0 U/ml (Tab.3). Com o início da infecção, esses valores aumentaram significativamente a partir do 21º dia, em todos os grupos com diferença estatística em relação aos valores de IgE encontrados nos dias 0, 7 e 14 (Fig. 4, Tab. 3).

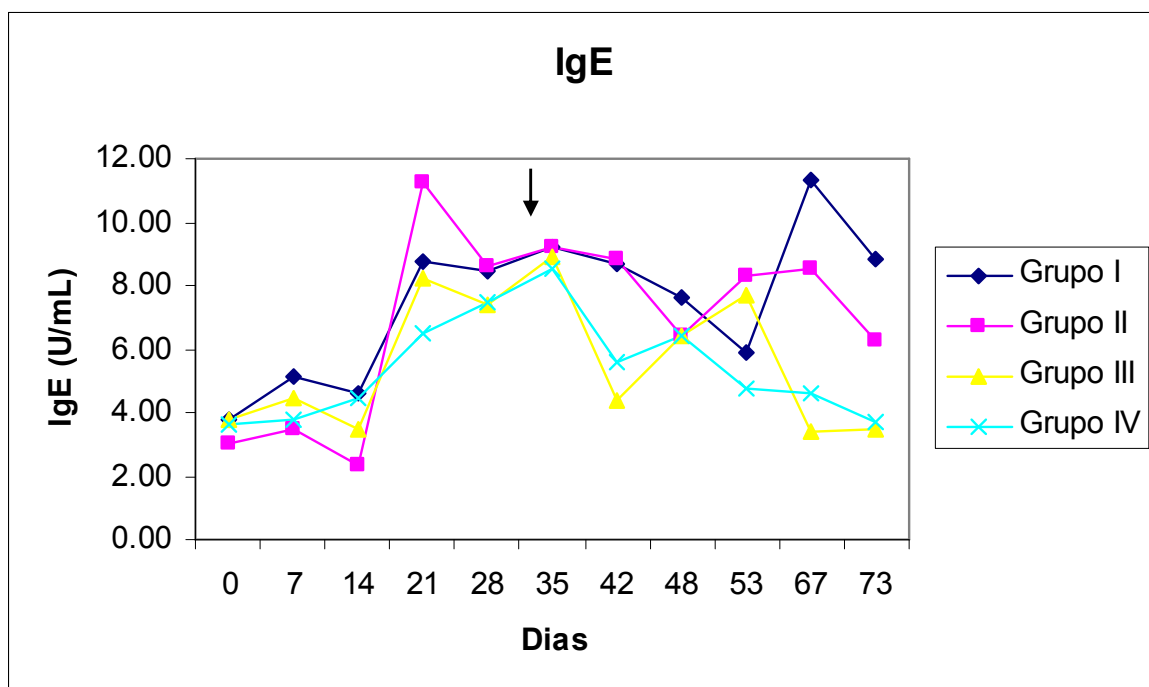


Figura 4: Valores médios de IgE, expressos em U/ml, dos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral. A seta indica o início do esquema terapêutico, realizado no 35º após a infecção.

Tabela 3: Valores médios de IgE, em U/mL, realizados ao longo dos 73 dias de experimento após a indução da verminose experimental. No 35° dia, os animais do grupo I, II e III receberam tratamento.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	3.76±1.91	3.0±2.09	3.81±1.03	3.61±1.76
7	5.10±1.54	3.51±2.04	4.47±0.98	3.74±1.98
14	4.57±3.06	2.32±0.68	3.44±1.69	4.48±1.43
21	8.79±1.98	11.25±2.06	8.21±1.26	6.51±2.94
28	8.47±1.10	8.59±1.09	7.43±1.69	7.44±0.58
35 (TRATAMENTO)	9.24±7.63 a,	9.2±4.64 a	8.94±5.34 a	8.53±6.45 a
42	8.71±1.94	8.85±2.76	4.35±1.64	5.55±3.78
48	7.61±3.08	6.38±2.15	6.4±3,98	6.4±2.94
53	5.92±1.04	8.32±0.87	7.67±4.87	4.77±2
67	11.3±8.23	8.56±1.66	3.43±0.99	4.59±3.25
73	8.8±7.06	6.27±1.68	3.45±1.2	3.67±2.27

Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média.

^a Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia 0,7,14.

A partir do tratamento iniciado no 35° dia, os animais do grupo III apresentaram uma diminuição nos níveis de IgE no 42° dia em relação aos animais dos demais grupos, porém sem significância. No 67° e 73° dia, os animais do grupo I e II apresentaram níveis maiores de IgE em relação aos animais dos grupos III e IV, porém sem diferença significativa (Fig. 4).

Ao analisarmos os resultados de IgE e de OPG, observamos uma correlação negativa em todos os grupos, no entanto apenas os animais do grupo I apresentaram correlação negativa significativa (Tab. 4)

Tabela 4. Matriz de correlação entre OPG e a variável IgE.

Variável	OPG			
	I	II	III	IV
<i>IgE</i>	-0,61 *	-0,04	-0,01	-0,13

* indica correlação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao OPG para o grupo analisado.

5.5 Ensaios de proliferação de linfócitos T

5.5.1 Proliferação de linfócitos T na presença de Concanavalina A (Con-A)

Para verificarmos a condição de imunoestimulação dos animais durante o desenvolvimento da verminose e nos animais submetidos a diferentes tratamentos, realizamos ensaios de proliferação de linfócitos T na presença do mitógeno concanavalina-A. Durante o período de desenvolvimento da verminose experimental, observamos que os maiores índices de estimulação foram encontrados nos 28º e 35º após a infecção, coincidindo com o período de pico do OPG. No 35º dia, os animais dos grupos I e II apresentaram valores de IE significativamente maiores em relação aos dias 7, 14 e 21; os animais do grupo III nesta mesma data apresentaram valores significativamente maiores em relação ao dia 0, e finalmente o grupo IV apresentou valores maiores de IE em relação aos dias 0, 7, 14 e 21 (Fig. 5, Tab. 5).

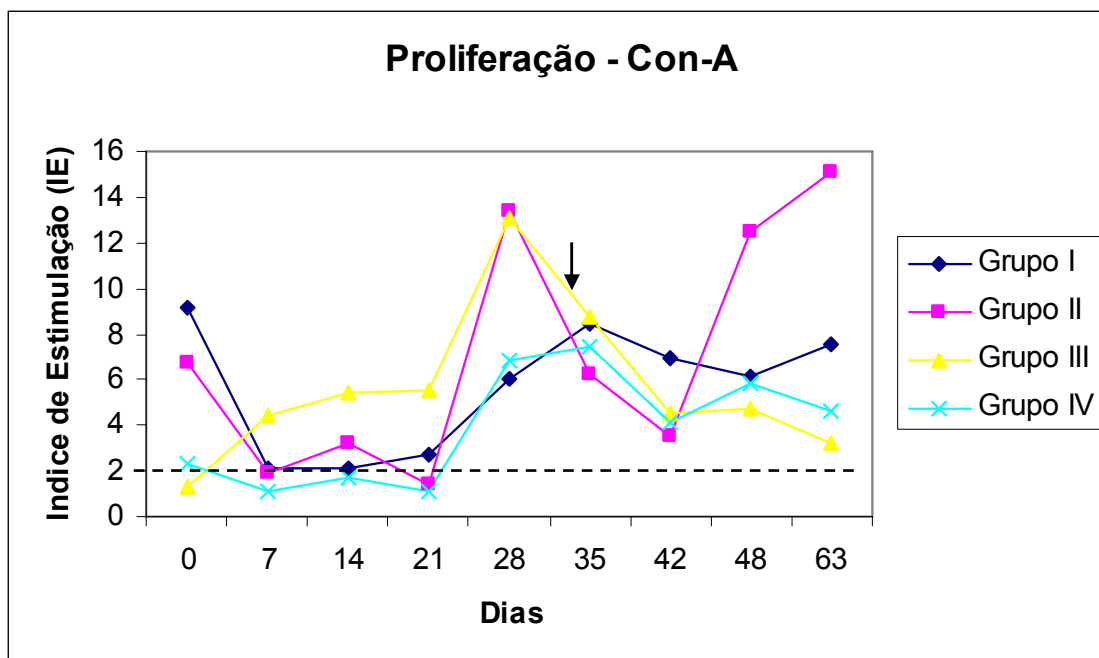


Figura 5: Resposta proliferativa de CMSP frente a Con-A dos ovinos dos grupos I, II, III, e IV, antes e após o início do tratamento iniciado no 35º dia (seta). O índice de estimulação foi considerado positivo quando $IE \geq 2,0$.

Tabela 5. Valores médios do índice de proliferação de linfócitos T na presença de Con-A realizados durante os 73 dias de experimento. O índice de estimulação foi considerado positivo quando $IE \geq 2,0$.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	9.19±7.06	6.72±4.59	1.35±0.64	2.36±0.64
7	2.08±0.54	1.90±0.82	4.46±3.24	1.06±0.17
14	2.16±0.63	3.23±1.93	5.45±2.12	1.69±0.13
21	2.72±0.29	1.38±0.22	5.50±1.26	1.07±0.06
28	6.01±1.75	13.39± 4.87	13.10±4.36	6.87±2.69
35 (TRATAMENTO)	8.46±4,3 b	6.27±3.88 b	8.76±2.85 a	7.41±4.92 a,b
42	6.9±2.14	3.49±0.64	4.53±1.29	4.15±1.84
48	6.13±2.79	12.47±10.44	4.74±2.21	5.84±0.37
63	7.57±0.86	15.05±4.42	3.2±0.75	4.64±1.16

Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média.

^a Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia 0.

^b Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia 7,14,21

Após o início do tratamento, observamos diminuição dos índices de proliferação em todos os grupos. No entanto no 48° e 63° dia após a infecção houve um aumento nos índices de proliferação dos animais do Grupo II, com a média dos índices de proliferação de $IE=12.47$ e $IE=15.05$, respectivamente (Fig. 5; Tab.5).

5.5.2 Proliferação de linfócitos T na presença de extrato de larvas

Para avaliarmos a resposta imune celular específica durante o desenvolvimento da verminose experimental e durante o tratamento, realizamos ensaios de proliferação de linfócitos T na presença de extrato de larvas. Somente no dia 28° e 35° após a indução da verminose, verificamos valores de IE positivos na presença de extrato de larvas (Fig. 6 e Tab. 6). No 28° dia, os animais dos grupos II e III apresentaram IE positivos, e no 35° dia, os animais dos grupos III e IV apresentaram IE positivo (Fig. 6, Tab.6). Após o início do tratamento no 42° dia, não observamos resposta proliferativa positiva na presença de extrato de larvas (Fig. 6, Tab 6). A alta concentração de extrato de larvas ($878\mu\text{g/mL}$) utilizada nos experimentos, pode ter sido tóxica para as células.

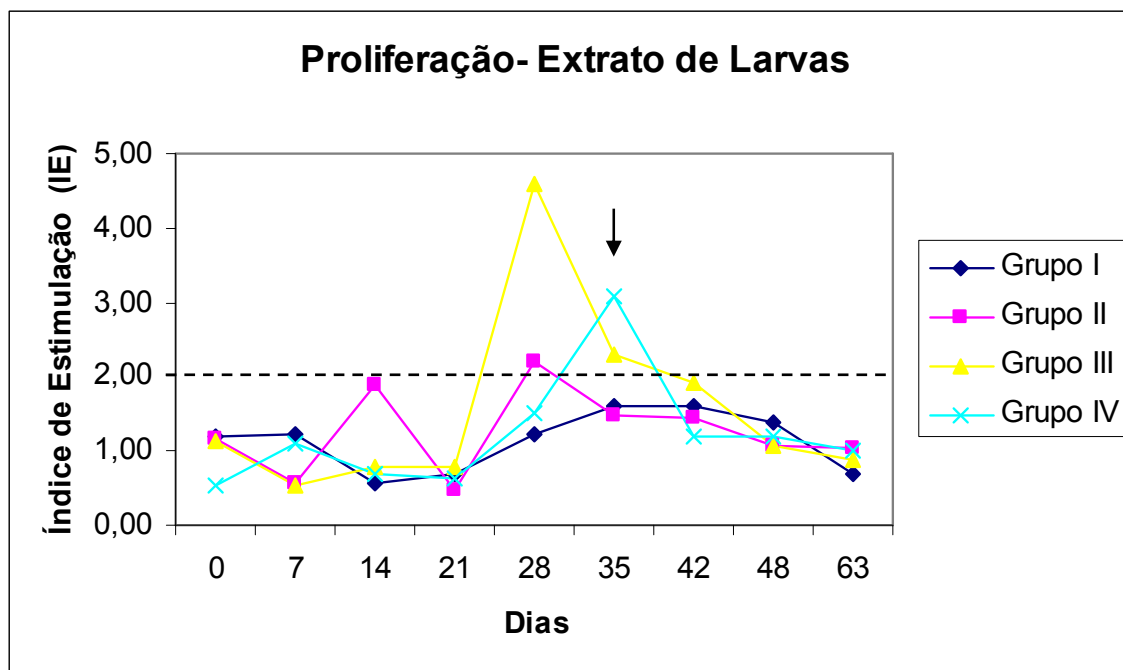


Figura 6: Resposta proliferativa de CMSP frente ao extrato de larvas dos ovinos dos grupos I, II, III, e IV, após o início do tratamento, no 35º dia (seta). O índice de estimulação foi considerado positivo quando $IE \geq 2,0$.

Tabela 6: Valores médios dos índices de proliferação de linfócitos T na presença de Extrato de larvas, durante os 73 dias de experimento. O índice de estimulação foi considerado positivo quando $IE \geq 2,0$.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	1.19±0.37	1.17±0.22	1.14±0.32	0.52±0.15
7	1.22±0.52	0.57±0.20	0.53±0.14	1.09±0.35
14	0.57±0.06	1.89±1.43	0.80±0.11	0.69±0.10
21	0.68±0.09	1.48±0.11	0.80±0.04	0.61±0.18
28	1.23±0.76	2.19±0.91	4.59±1.37	1.52±0.32
35 (TRATAMENTO)	1.62±1.17	1.47±1.15	2.28±1.10	3.10±2.97
42	1.59±0.41	1.44±0.50	1.92±0.28	1.20±0.30
48	1.38±0.12	1.07±0.37	1.08±0.08	1.18±0.48
63	0.69±0.28	1.03±0.15	0.89±0.10	1.00±0.26

Em vermelho $IE \geq 2,0$ foram considerados positivos
 Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média

5.6 Hemograma

5.6.1 Contagem global de Eritrócitos

Com a evolução da verminose experimental, podemos notar que os valores de eritrócitos diminuíram entre o 21° e 35° dia (Fig. 7). No 35° dia após a infecção, os animais dos grupos I, III e IV apresentaram redução significativa de eritrócitos quando comparados aos valores encontrados no 14° dia correspondente ao pico do OPG (Fig. 7, Tab. 7).

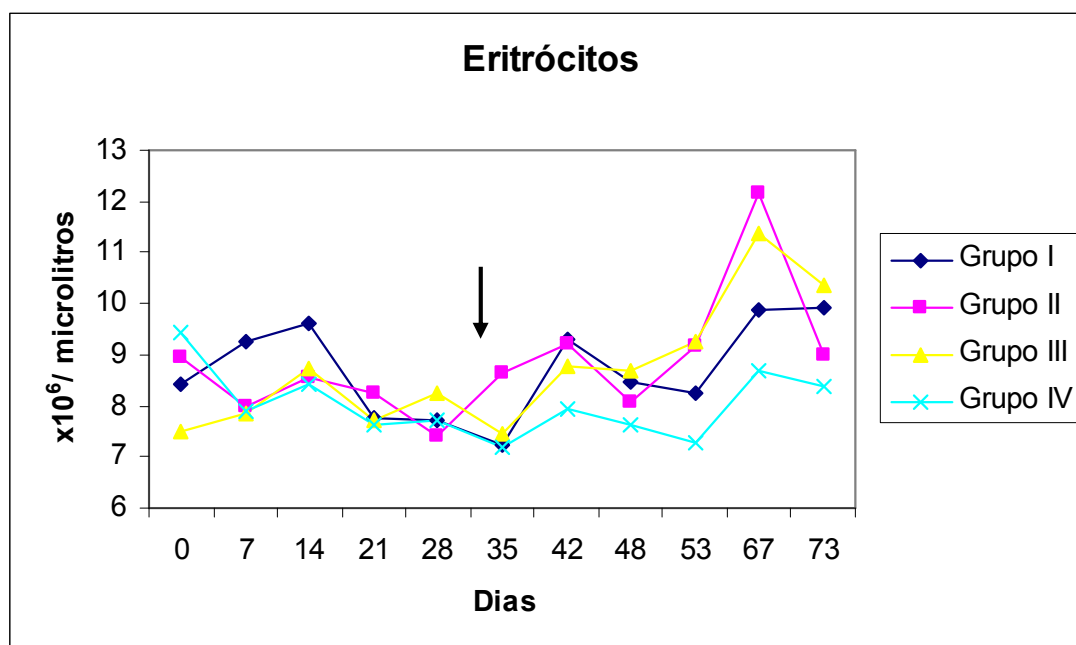


Figura 7: Valores médios de eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

A partir do 42° dia, os animais do grupo I e II mostraram um aumento número de eritrócitos quando comparados ao 35° dia (Fig.7). No 67° dia após a infecção todos os grupos apresentaram um aumento significativo em relação aos dias 35, 42, 48 e 63 (Tab.7). Ao final do tratamento no 73° dia, todos animais apresentaram aumento significativo no número de eritrócitos quando comparados aos dias 35, 48 e 53. No entanto, apesar deste aumento, o grupo IV ainda permaneceu com valor médio abaixo do normal.

Tabela 7. Valores médios de eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35º dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	8.42±0.48	8.95±0.72	7.51±0.42	9.44±0.80
7	9.25±0.70	7.99±0.36	7.87±0.33	7.89±0.37
14	9.60±1.22	8.54±0.40	8.74±0.27	8.41±0.37
21	7.76±0.53	8.26±0.53	7.70±0.36	7.63±0.07
28	7.70±0.43	7.39±0.48	8.27±0.59	7.73±0.09
35 (TRATAMENTO)	7.21±0.97 c,e	8.65±1.10 e	7.46±1.31 c,e	7.17±1.04 c,e
42	9.31±0.79	9.21±0.56	8.79±0.81	7.92±1.49
48	8.48±0.21	8.07±0.30	8.69±0.53	7.64±1.34
53	8.26±0.29	9.15±0.32	9.25±0.76	7.29±01.07
67	9.86±0.39 f	12.18±1.03 f	11.36±1.44 f	8.69±1.02 f
73	9.93±0.62 g	9.01±0.44 g	10.37±0.53 g	8.39±0.85 g

Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média.

^c Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia 14.

^d Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia 35

^e Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia 42,67 e 73

^f Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia 35, 48,53

^g Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia 35, 53 e 67.

Na tabela 8, podemos observar correlação negativa entre os valores de hemácias e OPG nos animais dos grupos II, III e IV. No entanto esta correlação é significativa apenas nos animais do grupo IV (controle) (Tab.8).

Tabela 8. Matriz de correlação entre OPG e a variável Eritrócitos .

Variável	OPG			
	I	II	III	IV
<i>Eritrócitos</i>	0,08	-0,32	-0,08	-0,80 *

* indica correlação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao OPG para o grupo analisado.

5.6.2 Hematócrito (Ht)

Nenhuma alteração significativa foi observada nos valores de hematócrito durante todo o desenvolvimento da verminose e durante o tratamento (Fig. 8 e Tab.9).

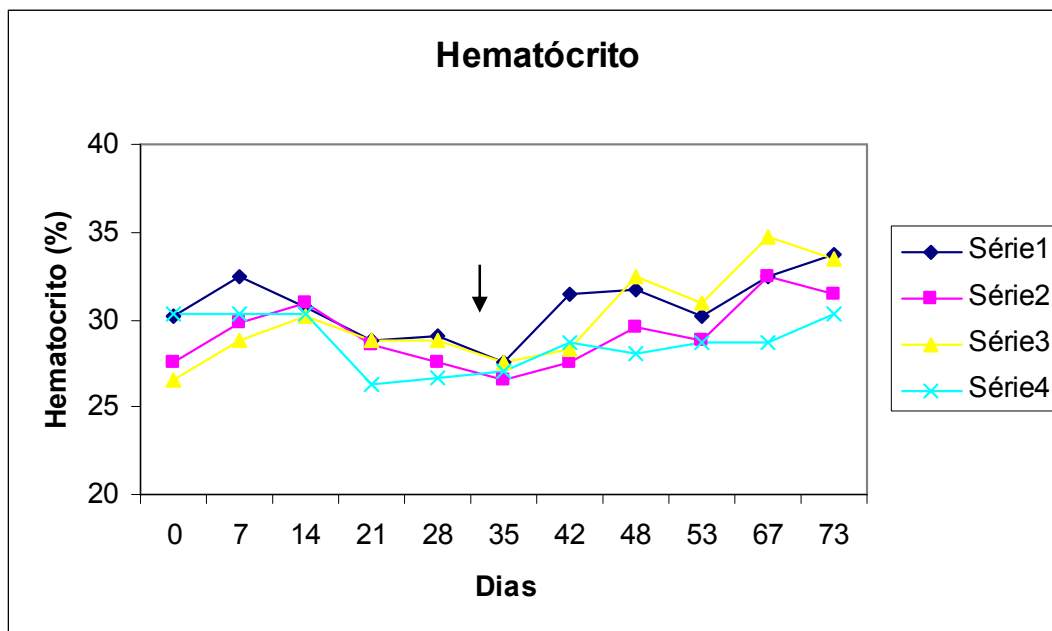


Figura 8: Valores médios de hematócrito (%) dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

Tabela 9. Valores médios de Hematócrito (%) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	30±2.1	28±1.2	27±1.3	30±2.3
7	33±2.8	30±1.1	29±0.6	30±1.3
14	31±2.7	31±1.2	30±0.6	30±1.3
21	29±1.8	29±1.5	29±1.3	26±1.6
28	29±1.1	28±1.5	29±0.9	27±1.3
35 (TRATAMENTO)	28±0.6	27±3.4	28±1.7	27±4.6
42	32±0.9	28±1.3	28±1.2	29±2.8
48	32±0.9	30±2.2	33±0.5	28±2.6
53	30±1.3	29±1.4	31±0.9	29±2.8
67	33±1.2	33±1.6	35±1.3	29±1.8
73	34±1.4	32±1.2	34±1.3	30±1.8

5.6.3. Dosagem de Hemoglobina

Como podemos observar na Figura 9, os níveis de hemoglobina permaneceram normais durante todo o experimento (Fig. 9, Tab. 10). Entretanto, encontramos aumento nos valores de hemoglobina entre o 53° e 73° dia nos animais dos grupos I, II e III.

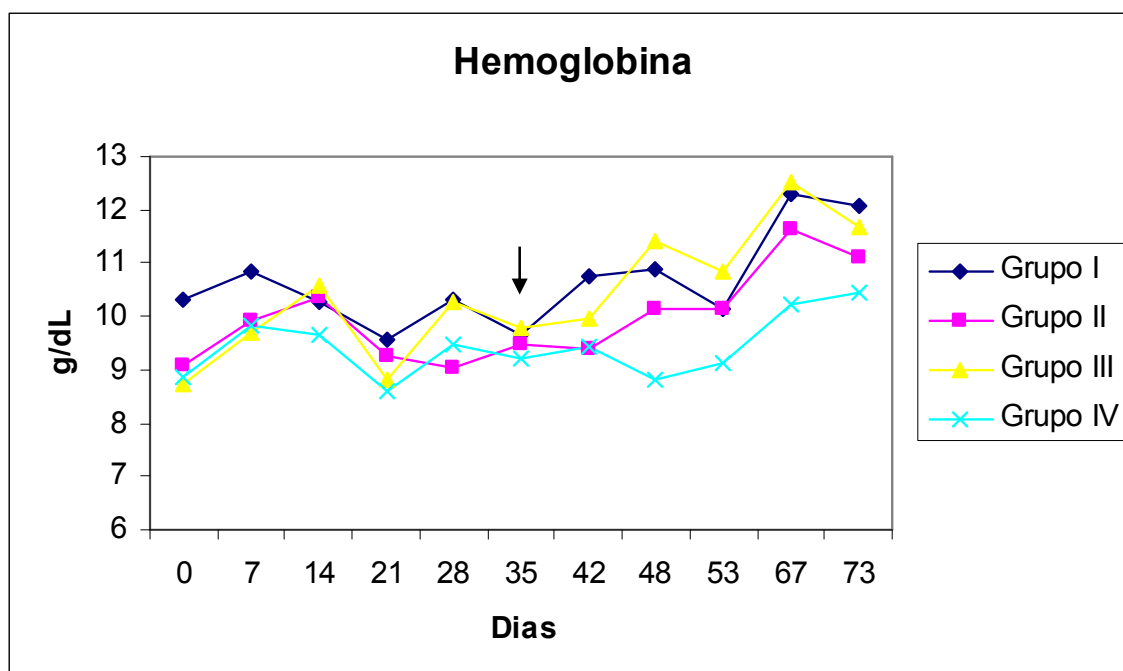


Figura 9: Valores médios de hemoglobina (g/dL) dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

Tabela 10. Valores médios de hemoglobina (g/dL) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia e o tratamento iniciado nesta data.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	10.3±0.64	9.1±0.36	8.8±0.36	8.9±0.38
7	10.8±0.85	9.9±0.34	9.7±0.21	9.8±0.40
14	10.3±0.97	10.4±0.38	10.6±0.14	9.6±0.38
21	9.6±0.67	9.3±0.47	8.8±0.27	8.6±0.40
28	10.3±0.33	9.1±0.49	10.3±0.38	9.5±0.53
35 (TRATAMENTO)	9.6±0.47	9.5±1.25	9.8±0.93	9.2±1.57
42	10.8±0.23	9.4±0.41	10.0±0.56	9.4±0.92
48	10.9±0.25	10.2±0.58	11.4±0.16	8.8±0.88
53	10.1±0.43	10.2±0.37	10.8±0.26	9.1±1.16
67	12.3±0.38	11.7±0.52	12.5±0.24	10.2±0.62
73	12.1±0.35	11.1±0.45	11.7±0.20	10.5±0.69

5.6.4. Índices Hematimétricos

Ao analisarmos os índices hematimétricos no período de indução e tratamento da verminose, não observamos nenhuma alteração significativa. Os valores de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (Fig. 10, Tab. 11), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) (Fig.11, Tab.12) e Volume Corpuscular Médio (VCM) (Fig.12 , Tab.13) mantiveram-se dentro dos valores de referência.

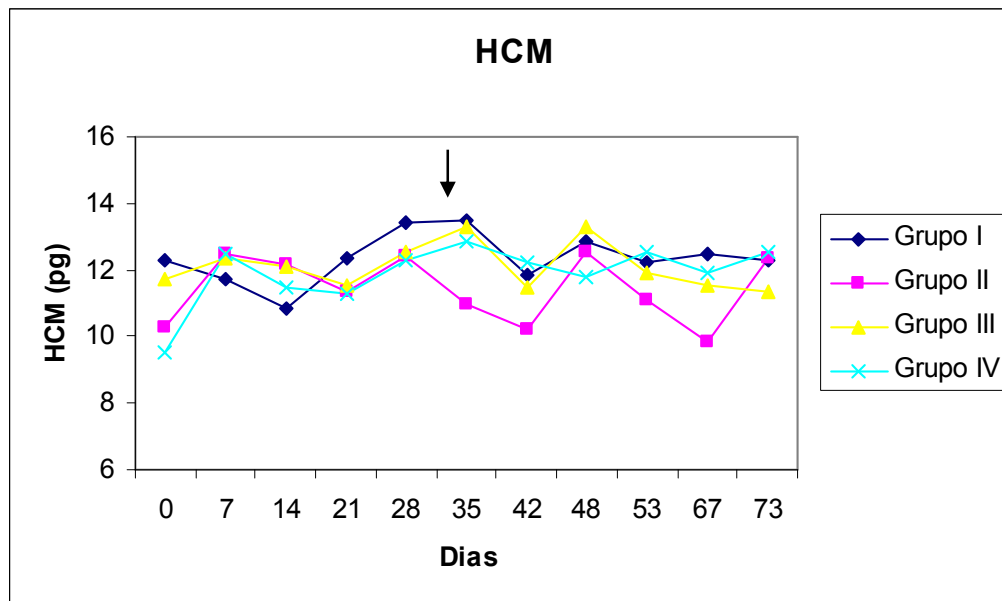


Figura 10: Valores médios de HCM (pg) dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

Tabela 11. Valores médios de HCM (pg) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	12.3±0.92	10.3±0.63	11.8±0.56	9.5±0.45
7	11.7±0.34	12.5±0.40	12.4±0.47	12.5±0.58
14	10.8±0.49	12.2±0.39	12.1±0.35	11.5±0.48
21	12.4±0.17	11.3±0.92	11.6±0.56	11.3±0.44
28	13.5±0.56	12.4±1.09	12.5±0.59	12.3±0.82
35 (TRATAMENTO)	13.5±1.29	11.0±1.12	13.3±2.19	12.8±0.86
42	11.8±0.97	10.2±0.29	11.5±0.88	12.2±0.71
48	12.9±0.17	12.6±0.41	13.3±0.92	11.8±0.70
53	12.3±0.33	11.1±0.22	11.9±0.83	12.6±0.45
67	12.5±0.42	9.8±1.06	11.5±1.39	11.9±0.54
73	12.3±0.74	12.4±0.32	11.3±0.44	12.5±0.31

Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média.

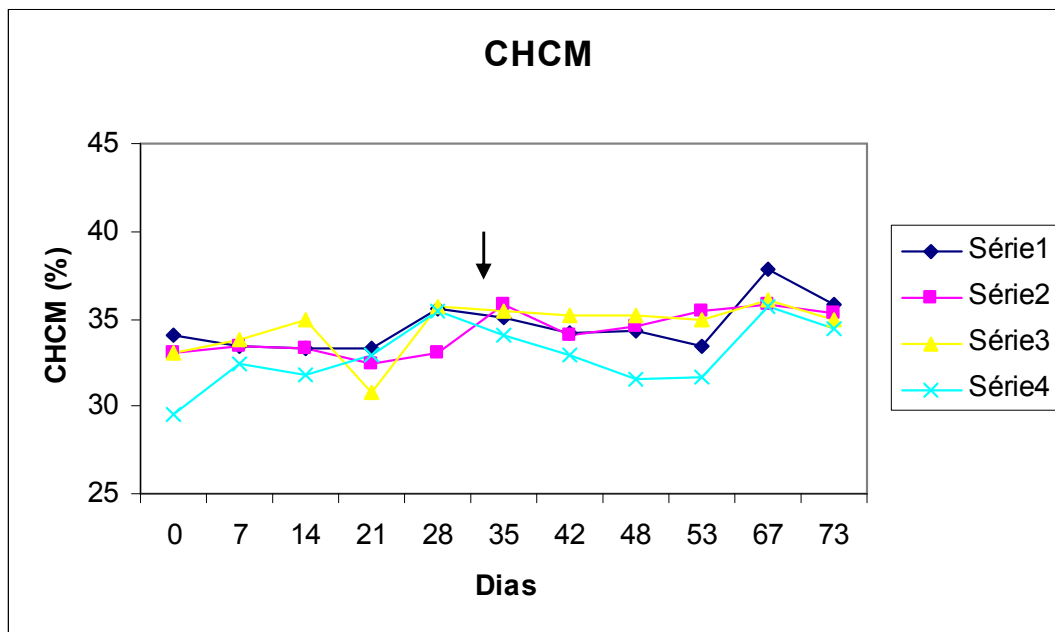


Figura 11: Valores médios de CHCM (%) dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

Tabela 12. Valores médios de CHCM (%) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	34.1±1.05	33.1±0.76	33.0±0.62	29.5±1.25
7	33.4±0.34	33.4±1.04	33.8±0.36	32.4±0.05
14	33.3±0.25	33.4±0.13	35.0±0.64	31.8±0.13
21	33.3±1.20	32.5±0.76	30.8±1.0	32.9±2.34
28	35.6±0.33	33.1±1.94	35.7±0.31	35.5±0.55
35 (TRATAMENTO)	35.0±1.11	35.9±1.85	35.4±1.55	34.0±0.17
42	34.2±0.83	34.1±0.52	35.2±1.15	32.9±0.18
48	34.3±0.31	34.6±0.76	35.2±0.09	31.5±0.78
53	33.5±0.21	35.4±0.59	34.9±0.43	31.7±1.56
67	37.8±0.65	35.9±0.49	36.1±0.75	35.7±0.72
73	35.9±0.74	35.3±0.80	35.0±0.91	34.5±0.40

Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média.

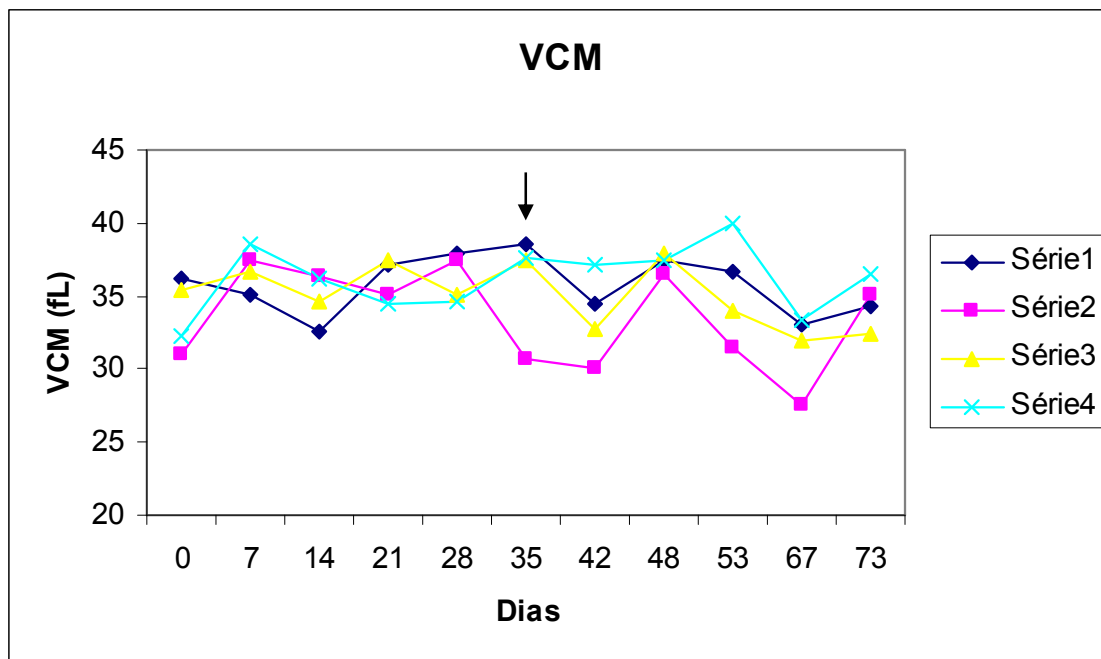


Figura 12: Valores médios de VCM (fL) dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35º dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

Tabela 13. Valores médios de VCM (fL) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35º dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	36.2±2.77	31.0±1.36	35.5±1.65	32.2±0.80
7	35.1±1.29	37.5±2.02	36.7±1.40	38.6±1.75
14	32.6±1.68	36.4±1.20	34.7±0.43	36.2±1.45
21	37.1±0.84	35.0±3.22	37.5±1.59	34.5±1.89
28	37.9±1.68	37.5±2.07	35.2±1.86	34.6±1.98
35 (TRATAMENTO)	38.6±4.43	30.7±1.62	37.5±5.38	37.6±2.76
42	34.5±2.53	30.0±1.18	32.7±2.29	37.1±2.15
48	37.5±0.63	36.5±1.82	37.9±2.56	37.4±1.96
53	36.6±0.93	31.4±1.07	34.1±2.29	40.0±3.38
67	33±0.68	27.5±3.23	31.9±3.61	33.3±1.34
73	34.2±1.78	35.1±1.45	32.4±1.06	36.4±1.09

Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média

5.6.5 Leucócitos Totais

Durante o período de evolução da verminose experimental, não observamos alteração significativa nos animais dos grupos I, II, III e IV.

Após o tratamento, verificamos aumento significativo no número de leucócitos nos 53° e 67° dias, quando comparados aos dias 35 e 48. No 73° dia, estes valores foram significativamente maiores em relação aos dias 35, 42 e 48 (Fig. 13, Tab. 14). No entanto podemos observar um discreto aumento no 53° dia na contagem dos leucócitos dos animais do grupo III em relação aos demais grupos; e no 73° dia nos animais dos grupos I e III, em relação aos animais dos grupos II e IV (Fig. 13).

Não detectamos correlação entre OPG e número de Leucócitos.

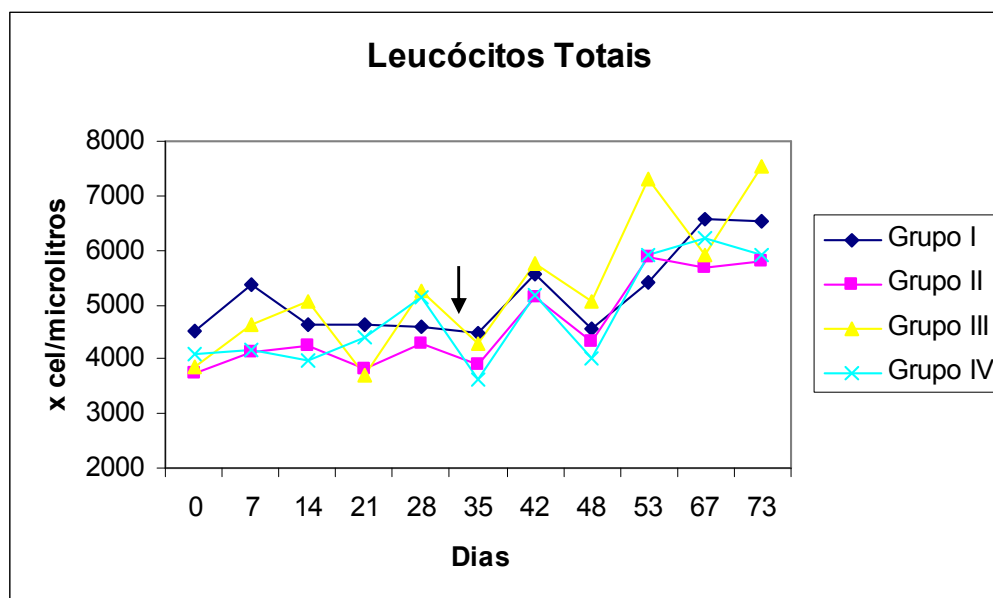


Figura 13: Valores médios de leucócitos totais (células/μL) dos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

Tabela 14. Valores médios de Leucócitos Totais (cél/s/ μ L) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	4502 \pm 846	3754 \pm 138	3872 \pm 550	4095 \pm 394
7	5355 \pm 952	4135 \pm 675	4647 \pm 429	4183 \pm 401
14	4620 \pm 791	4253 \pm 213	5040 \pm 541	3990 \pm 0
21	4633 \pm 392	3807 \pm 250	3688 \pm 451	4393 \pm 149
28	4581 \pm 513	4279 \pm 190	5250 \pm 703	5145 \pm 1016
35 (TRATAMENTO)	4476 \pm 896.3	3885 \pm 708.2	4279 \pm 918	3623 \pm 1300
42	5552 \pm 532.6	5132 \pm 423.5	5762 \pm 816.8	5180 \pm 1235
48	4541 \pm 196.9	4332 \pm 407.9	5066 \pm 901.6	4025 \pm 958.5
53	5408 \pm 493.8 a	5867 \pm 388.5 a	7298 \pm 617.8 a	5915 \pm 876.7 a
67	6563 \pm 530.5 a	5697 \pm 377.7 a	5907 \pm 626.4 a	6213 \pm 1236.4 a
73	6523 \pm 271.3 b	5802 \pm 483.3 b	7534 \pm 951.4 b	5915 \pm 1948.7 b

Dados apresentados na forma de média \pm erro padrão da média.

^a Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia 35 e 48

^b Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao dia 35, 42 e 48

5.6.6 Linfócitos

Não observamos alterações significativas durante o período do desenvolvimento da verminose experimental nos grupos I, II, III e IV.

No entanto, após o tratamento, houve um aumento significativo, em todos os grupos, nos dias 53, 67 e 73 (Tab.15, Fig.14), quando comparados com os valores obtidos nos dias 35, 42 e 48.

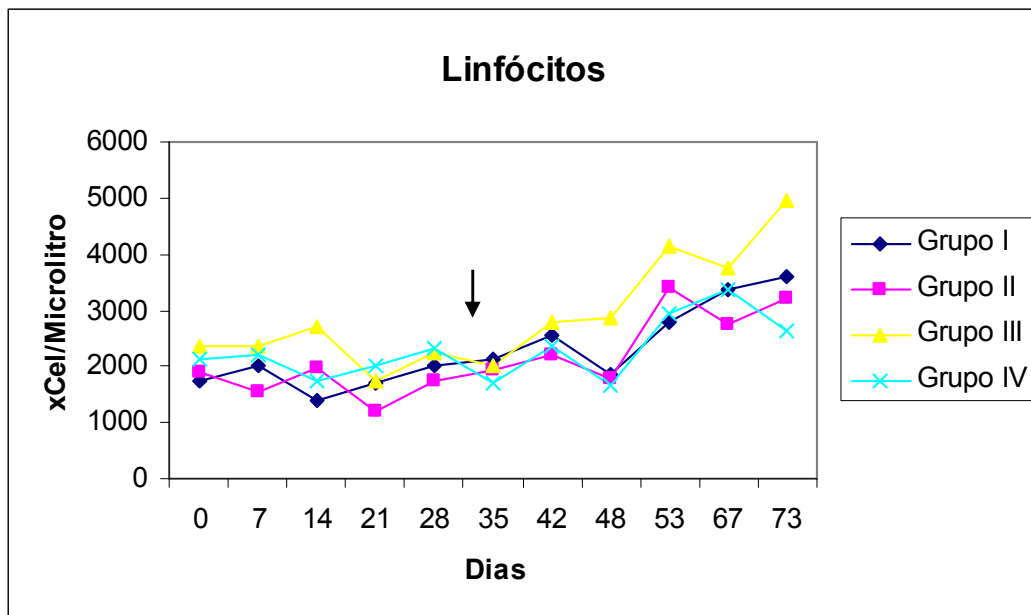


Figura 14: Valores médios de linfócitos (cél/μL) dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35º dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

Tabela 15. Valores médios de linfócitos (cél/μL) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35º dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	1750±235	1892±81	2379±526	2147±172
7	2024±116	1545±112	2357±313	2189±409
14	1075±161	1956±286	2699±523	1742±542
21	1714±297	1192±149	1744±161	2029±342
28	2022±194	1724±385	2254±245	2332±372
35 (TRATAMENTO)	2138±626	1916±729	2024±454	1686±419
42	2560±275	2216±262	2800±565	2378±429
48	1863±435	1766±489	2879±590	1666±325
53	2786±315 a	3394±451 a	4141±415 a	2951±426 a
67	3356±397 a	2751±332 a	3740±375 a	3371±987 a
73	3589±476 a	3199±554 a	4967±713 a	2643±547 a

Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média.

^a Indica diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação ao dia 35,42,48

Ao analisarmos os resultados, observamos uma correlação positiva entre os valores de linfócitos e OPG nos grupo I e II, sendo esta correlação significativa apenas para o grupo I (Tab.16). Os grupos III e IV apresentaram correlação negativa, porém sem significância.

Tabela 16. Matriz de correlação entre OPG e a variável linfócito para cada grupo.

Variável	OPG			
	I	II	III	IV
<i>Linfócitos</i>	0,44 *	0,03	-0,35	-0,23

* indica correlação estatisticamente significante ($P < 0,05$) em relação ao OPG para o grupo analisado.

5.6.7 Neutrófilos

Ao analisarmos os valores de neutrófilos, não encontramos nenhuma diferença significativa entre os grupos, nem mesmo entre os dias de tratamento (Fig. 15, Tab. 17).

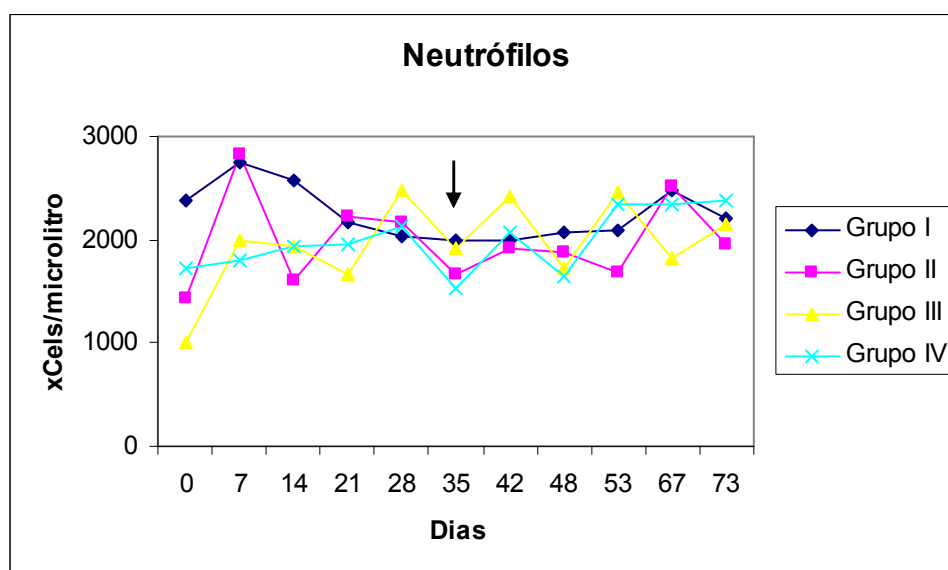


Figura 15: Valores médios de neutrófilos (célis/ μ L) dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35º dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

Tabela 17. Valores médios de neutrófilos (cel/ μ L) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	2387 \pm 802	1430 \pm 312	1009 \pm 118	1716 \pm 315
7	2751 \pm 984	2824 \pm 616	1994 \pm 220	1791 \pm 50
14	2571 \pm 578	1613 \pm 99	1927 \pm 163	1942 \pm 582
21	2176 \pm 143	2221 \pm 252	1657 \pm 235	1962 \pm 441
28	2024 \pm 457	2169 \pm 346	2485 \pm 376	2132 \pm 781
35 (TRATAMENTO)	1990 \pm 799	1664 \pm 91	1917 \pm 672	1536 \pm 523
42	1995 \pm 413	1913 \pm 191	2414 \pm 341	2076 \pm 611
48	2063 \pm 305	1884 \pm 212	1720 \pm 257	1647 \pm 371
53	2084 \pm 327	1684 \pm 209	2462 \pm 195	2345 \pm 508
67	2469 \pm 138	2517 \pm 451	1813 \pm 264	2341 \pm 393
73	2216 \pm 198	1956 \pm 211	2149 \pm 389	2388 \pm 877

Dados apresentados na forma de média \pm erro padrão da média

No entanto os animais do grupo I, apresentaram uma correlação negativa entre neutrófilos e OPG com diferença estatística (Tab. 18).

Tabela 18. Matriz de correlação entre OPG e a variável neutrófilo para cada grupo.

Variável	OPG			
	I	II	III	IV
Neutrófilos	-0,43 *	-0,27	-0,27	0,41

* indica correlação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao OPG para o grupo analisado.

5.6.8 Eosinófilos

Não observamos diferenças significativas nos valores de eosinófilos durante o desenvolvimento da verminose. No entanto no 42° dia houve um aumento no

número de eosinófilos em todos os grupos. No 67° dia, observamos um aumento do número de eosinófilos nos animais do grupo I quando comparados aos demais grupos, porém sem diferença estatística (Fig.16, Tab. 19). No 73° dia, observamos que os animais do grupo IV apresentaram aumento no número de eosinófilos em relação aos animais dos demais grupos, e os animais do grupo III apresentam o menor número de eosinófilos (Fig.16).

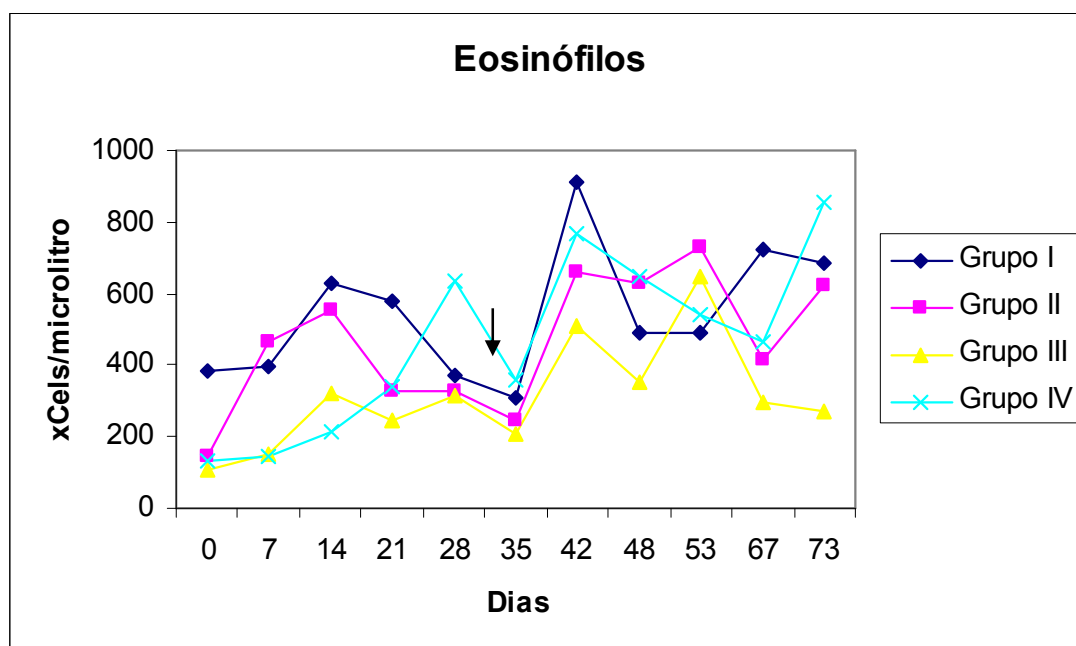


Figura 16: Valores médios de eosinófilos (células/ μ L) dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35° dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

Tabela 19. Valores médios de eosinófilos (cél/μL) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, e o tratamento iniciado no 35° dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	385±76	147±56	108±62	134±66
7	394±86	465±143	151±29	146±67
14	630±178	552±180	318±44	231±42
21	579±168	326±72	242±82	341±95
28	368±102	324±71	313±159	634±271
35 (TRATAMENTO)	310±284	247±98	210±38	356±367
42	911±242	661±307	506±228	766±373
48	492±85	628±212	350±34	649±412
53	493±151	731±278	645±343	541±185
67	720±120	416±67	294±121	466±125
73	687±168	621±117	271±111	854±648

Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média

Ao correlacionarmos a contagem de eosinófilos e os valores de OPG, observamos uma correlação negativa em todos os grupos, porém com diferença significativa nos animais do grupo I (Tab. 20).

Tabela 20. Matriz de correlação entre OPG e a variável eosinófilo para cada grupo.

Variável	OPG			
	I	II	III	IV
<i>Eosinófilo</i>	-0,48 *	-0,13	-0,37	-0,44

* indica correlação estatisticamente significante ($P < 0,05$) em relação ao OPG para o grupo analisado.

5.6.9 Monócitos

Os valores médios de monócitos apresentaram-se dentro dos valores de referência durante todo o experimento (Fig.17, Tab. 21), porém com variações que sugerem uma resposta individual de cada animal.

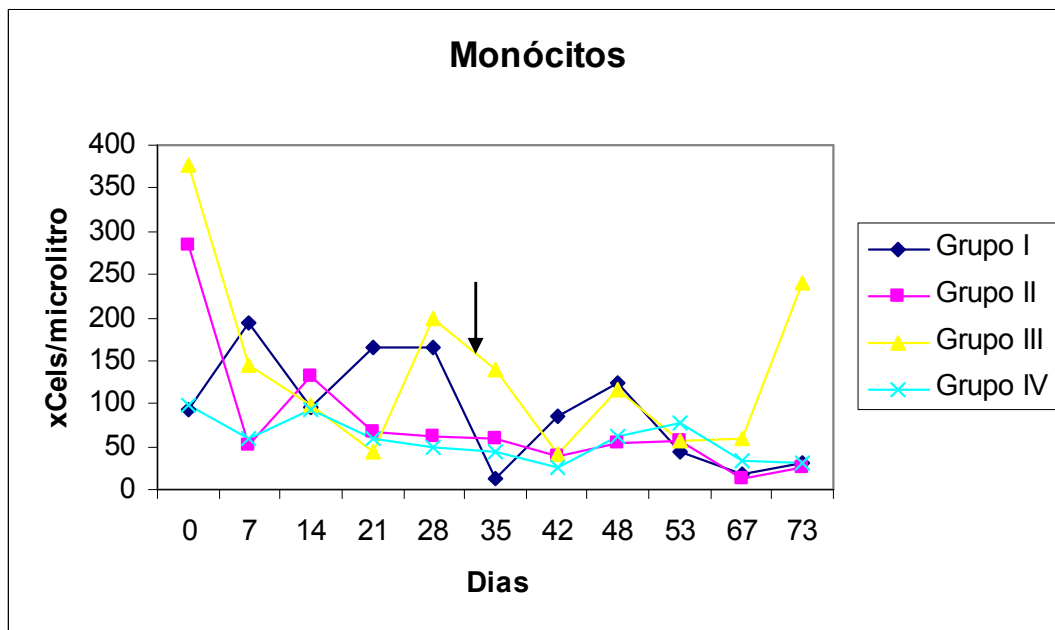


Figura 17: Valores médios de monócitos (céls/ μ L) dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35º dia (seta), dando início ao esquema terapêutico.

Tabela 21. Valores médios de monócitos (céls/ μ L) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, e o tratamento iniciado no 35º dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	94±85	285±187	377±126	98±49
7	194±62	51±21	145±81	58±17
14	56±37	132±47	97±18	93±23
21	165±62	67±20	45±8	60±26
28	166±56	62±21	198±37	48±21
35 (TRATAMENTO)	13±26	58±94	140±110	45±12
42	86±39	39±39	41±16	27±13
48	124±96	53±10	116±44	63±34
53	44±29	58±34	57±36	78±48
67	18±18	12±12	60±41	35±18
73	31±18	25±15	241±108	30±30

Dados apresentados na forma de média \pm erro padrão da média

5.7 Dosagem de Proteínas Plasmáticas

Em relação às proteínas plasmáticas, não observamos alterações significativas. No entanto, como podemos observar na Fig. 18, há uma discreta redução nos níveis de proteínas a partir do 21º dia após a infecção a qual persiste até o 35º dia (o pico do OPG), período de alta carga parasitária. No 35º dia, observamos que os valores de proteínas plasmáticas foram inferiores em relação aos demais dias (Tab.22). Após o tratamento, os animais do grupo IV apresentaram valores menores de proteínas plasmáticas em relação aos grupos que receberam tratamento e os animais dos grupos I e II apresentaram níveis maiores de proteínas plasmáticas (Tab. 22).

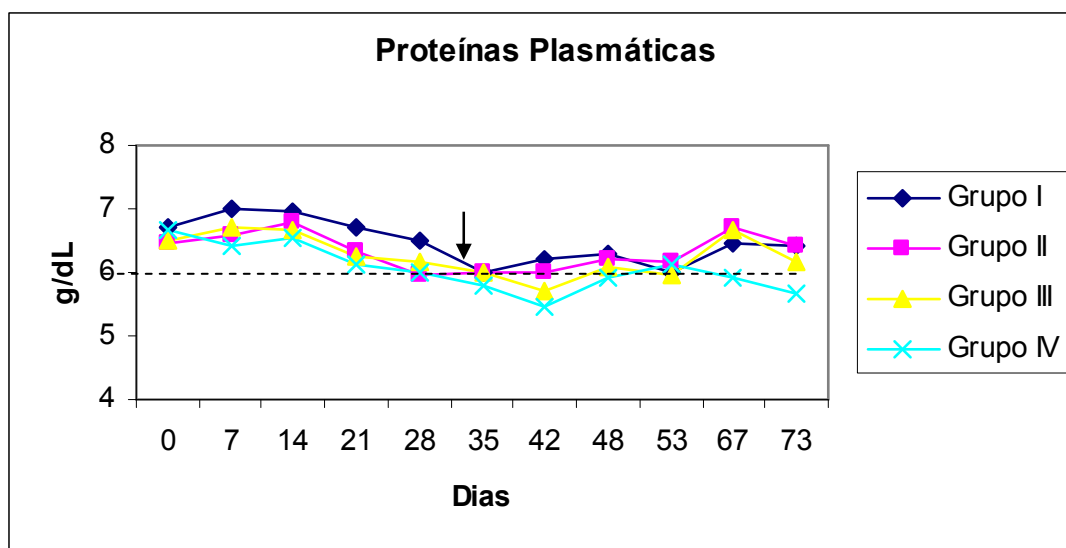


Figura 18: Valores médios de proteínas plasmáticas (g/dL) dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, sendo o pico do OPG detectado no 35º dia (seta) dando início ao esquema terapêutico (valores de referência $\geq 6,0$).

Tabela 22. Valores médios de proteínas plasmáticas (g/dL) nos animais dos grupos I, II, III e IV. No dia 0, os animais receberam 10.000 larvas por via oral, e o tratamento iniciado no 35º dia.

DIAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	6.7±0.26	6.5±0.21	6.5±0.13	6.7±0.06
7	7.0±0.29	6.6±0.22	6.7±0.06	6.4±0.17
14	7.0±0.39	6.8±0.20	6.7±0.15	6.5±0.12
21	6.7±0.30	6.4±0.10	6.3±0.17	6.1±0.12
28	6.5±0.10	6.0±0.05	6.2±0.19	6.0±0.10
35 (TRATAMENTO)	6.0±0.73	6.0±0.54	6.0±0.33	5.8±0.20
42	6.2±0.32	6.0±0.08	5.7±0.19	5.5±0.15
48	6.3±0.21	6.2±0.08	6.1±0.13	5.9±0.12
53	6.0±0.16	6.2±0.15	6.0±0.13	6.1±0.31
67	6.5±0.13	6.7±0.13	6.7±0.17	5.9±0.12
73	6.4±0.14	6.4±0.18	6.2±0.13	5.7±0.12

6. DISCUSSÃO

No Brasil há diversos trabalhos mostrando que o *Haemonchus* é o principal causador da verminose e afeta severamente as criações de ovinos e caprinos. Nossos resultados corroboram com estes achados, uma vez que encontramos a prevalência de *Haemonchus spp* nas coproculturas utilizadas para induzir a verminose experimental.

Os resultados preliminares de OPG mostraram claramente a dificuldade no controle da verminose em ovinos (Fig 1). Somente através de um tratamento prolongado, alternado e ininterrupto com vermífugo, foi possível controlar a verminose natural (21 semanas de Tratamento). O uso alternado de diferentes vermífugos foi uma estratégia que funcionou durante o tratamento, a fim de se evitar o fenômeno de resistência aos vermífugos utilizados. Além da dificuldade do controle da verminose, o tratamento é de alto custo.

Nas duas últimas décadas a ocorrência de resistência a anti-helmíntico tem aumentado (Jackson, 1993; Waller, 1994; Borgsteede *et al.*, 1997; van Wyk *et al.*, 1997; Prichard, 2001) devido ao uso intensivo e inadequado dos anti-helmínticos, muitas vezes administrados em sub-doses, aliado à problemas de manejo, os quais tem selecionado cepas resistentes de *Haemonchus spp*, *Trichostrongylus spp* e *Ostertagia spp*, a vários produtos (Ramos *et al.*, 2002).

Desta forma, para os criadouros de ovinos, a busca de tratamentos alternativos de baixo custo e o desenvolvimento de vacinas tornou-se cada vez mais necessários.

A suspensão de larvas utilizada para a indução da verminose nos ovinos foi composta predominantemente de *Haemonchus spp*, sendo 94% de *Haemonchus spp*, 2% de *Ostertagia spp*, 2% de outros (*Trichostrongylus spp* e *S. papillosus*) (Fig. 2). Esses achados corroboram com relatos da literatura, onde o *Haemonchus contortus* além de ser um dos mais patogênicos é altamente prevalente no Brasil (Amarante, 2001). A verminose experimental foi iniciada no dia 0 através da administração de 10.000 larvas L3 por via oral, e a partir daí os animais foram monitorados semanalmente. Como podemos observar na Figura 3, a verminose experimental procedeu-se com sucesso, com alta carga parasitária evidenciada no

35° dia, com valores médios de OPG de 3000. Desta forma, o tratamento foi iniciado seguindo o protocolo descrito no item métodos.

A avaliação clínica era realizada semanalmente durante todo o período, e todos os animais encontravam-se dentro dos parâmetros normais.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 3, nota-se que a eliminação significativa de ovos nas fezes dos animais ocorreu após 3 semanas da data em que os animais foram infectados. Este período em que os parasitas não apresentaram ovos nas fezes é chamado de Período Pré Patente dos parasitas (PPP), no qual ocorreram as transformações larvais, de L3 a verme adulto, e então começaram a se reproduzir e eliminar seus ovos para o ambiente através das fezes (Fortes, 1997).

Com o início do tratamento, os animais começaram a apresentar níveis de OPG diferentes entre si, como mostra a (Fig. 3). Os animais do grupo IV (controle) apresentaram valores maiores de OPG em relação aos animais dos grupos I, II e III em todo o período avaliado.

Após o tratamento, os animais do grupo III, tratados apenas com anti-helmíntico, apresentaram valores de OPG significativamente menores em relação aos animais do grupo IV, como mostra a Tabela 2 nos dias 42, 48, 53, 63, 67 e 73. Esses resultados não eram esperados, uma vez que os animais dos grupos tratados com imunoestimulantes e anti-helmíntico deveriam apresentar valores menores de OPG em relação aos animais que só receberam o anti-helmíntico. Os resultados anteriores do nosso grupo mostraram eficácia do imunoestimulante composto de LPS e *P. acnes* no desenvolvimento da verminose, utilizando o modelo de verminose experimental, onde foi observado que animais que receberam as larvas juntamente com o imunoestimulante, apresentaram níveis de OPG significativamente menores em relação ao grupo controle, com aumento de eosinófilos (Abel *et al.*, submitted; Chen *et al.*, 2005).

No presente trabalho, o imunoestimulante composto de LPS e *P. acnes* foi utilizado no tratamento da verminose e não na indução da mesma. Além disso neste trabalho, o LPS e *P. acnes* bem como o extrato de *P. acnes* foram administrados juntamente com o anti-helmíntico. A administração associada pode ter inibido o efeito do imunoestimulante, devendo-se levar em consideração que a

resposta imune já estava ativada, devido a alta carga parasitária. Os resultados do grupo II foram muito semelhantes aos resultados do grupo III (tratado apenas com anti-helmíntico), e como o número de animais utilizados em cada grupo foi pequeno aliado à variabilidade genética dos animais, estudos posteriores devem ser realizados para comprovar os resultados do OPG.

O OPG é o teste mais utilizado nos diagnósticos de rotina das helmintíases, devido ao baixo custo e pela facilidade de execução (Cabaret & Berrag, 2004). Este teste estima a eficácia do anti-helmíntico através da contagem de ovos.

No entanto, a contagem de OPG pode levar o pesquisador a um erro analítico, pois causa situações de falso positivo (Grimshan *et al.*, 1996) ou falso negativo (Jackson, 1993) devido aos diferentes estágios larvais do parasita (Jabbar *et al.*, 2006). A correção dos valores de OPG para logaritmo, não foi eficiente para avaliar a eficácia de determinados anti-helmínticos (Torgerson *et al.*, 2005). Para driblar esta situação, testes *in vitro* têm sido desenvolvidos, onde larvas L1 são colocadas em diferentes concentrações de anti-helmíntico, para saber quantas larvas são capazes de se transformar para L3 (Hubert & Kerbaueuf, 1992; Gill *et al.* 1995).

Sabendo da limitação do OPG para avaliar a eficácia do tratamento do anti-helmíntico associado a imunoestimulante, procuramos investigar se as diferenças encontradas no OPG estavam associadas a resposta imune.

É conhecido que a imunoglobulina IgE desempenha papel importante na resposta imune contra nematódeos gastrintestinais (Hagan, 1993; Pritchard, 1993; Shaw *et al.*, 1998).

Como podemos observar na Figura 4, os níveis de IgE começaram a aumentar no 21º permanecendo elevados até o 35º dia após a infecção, coincidindo com o pico do OPG. Estes achados estão de acordo com os estudos de Kooyman *et al.* (1997), que observou um aumento nos níveis totais de IgE, em ovinos infectados com *Haemonchus contortus*, após 2-4 semanas do início da infecção.

Resultados semelhantes foram encontrados pelo grupo de Shaw (1998), onde evidenciaram o pico de IgE total entre 20-27 dias após a infecção com *Trichostrongylus colubriformes* em ovinos.

Todos os grupos apresentam correlação negativa entre os valores de IgE e o OPG, mostrando claramente a participação da IgE na eliminação dos parasitas (Tab 4). Por outro lado somente o grupo I, tratado com LPS e *P. acnes* associado ao anti-helmíntico, apresentou uma correlação negativa significativa entre IgE e OPG, podendo sugerir que a solução de LPS e *P. acnes* estimula a produção de IgE. A correlação negativa entre os valores de IgE e OPG também foi observada nos estudos de Kooyman *et al.* (1997) em ovinos infectados por *Haemonchus contortus*. Em estudos posteriores, Gill *et al.* (2000) verificaram que ovinos geneticamente resistentes a *Haemonchus contortus* apresentaram níveis elevados de IgE e IgG1 com mastocitose local, quando comparados com ovinos suscetíveis. Pernthaner *et al.* (2005) também evidenciou aumento de IgE mediada por IL-5 em ovinos resistentes infectados por *Trichostrongylus colubriformis*.

Como podemos observar na Figura 4 a partir do 67º dia após a infecção, os animais do grupo I apresentaram valores médios de IgE muito superiores em relação aos demais grupos, sugerindo uma possível ação do imunoestimulante na resposta imune humoral, mecanismo encontrado nos animais geneticamente resistentes a infecção.

É conhecido que os linfócitos T são ativados durante a resposta imune contra aos helmintos, como demonstrado por alguns autores. Linfócitos T de ovinos infectados ou imunizados com *Haemonchus contortus*, proliferam na presença de antígenos do parasita (Haig *et al.*, 1989; Torgerson & Lloyd, 1993; Schallig *et al.*, 1994).

Após a infecção experimental, os resultados dos experimentos *in vitro* mostraram que os linfócitos T apresentaram maiores índices de proliferação tanto na presença de Con-A (Fig. 5) quanto na presença de extrato de larvas (Fig. 6) na semana anterior como no pico de OPG (28º e 35º respectivamente). Esses dados sugerem que os linfócitos T são ativados na vigência da infecção, tanto na presença de parasitas como na ausência deste, caracterizando uma ativação resposta imune do hospedeiro frente ao parasita.

No entanto na presença de extrato de larvas o índice de proliferação é positivo nos grupos II, III e IV, apenas nas datas referentes à alta carga parasitária (Fig.6), este dado nos mostra que há uma forte correlação entre a ativação de linfócitos e a carga parasitária (Fig.6 e 3). Pernthaler *et al.* (2005) também observou que respostas proliferativas na presença de antígeno larval é muito pequena quando comparada por aquelas induzidas por Con-A. Uma justificativa para explicar os baixos índices de estimulação é a concentração de extrato de larvas utilizada (280 µg/ml), pode ter sido tóxica para as células, o que explicaria os baixos índices de estimulação encontrados (Fig. 6).

A diminuição dos índices de estimulação de linfócitos T na presença de mitógeno pode ter ocorrido pelo início do tratamento no 35° dia (Fig. 6). Esses resultados sugerem que com o tratamento a carga parasitária diminuiu e conseqüentemente a ativação linfocitária também, embora no 48° e 63° dia após a infecção os animais do grupo II apresentaram índices proliferativos bastante elevados com a média de IE=12,47 e IE=15,05, respectivamente. Estes resultados sugerem que a *P. acnes*, mesmo após a redução do OPG, mantém a atividade linfocitária elevada. Este dado é extremamente importante já que animais geneticamente resistentes contam com a participação de linfócitos TCD4+ (Windon *et al.*, 1987; Gill, 1991; Gill *et al.*, 1993).

Sabendo-se que as verminoses são bastante prejudiciais aos pequenos ruminantes pois causam anemia e debilidade pelo hábito hematófago dos parasitas, os parâmetros hematológicos dos animais de cada grupo foram avaliados durante todo o experimento.

Os resultados da Figura 7 mostraram diminuição do número de eritrócitos no 21° ao 35° dia após a infecção, correspondendo ao momento de pico do OPG. Neste período a média dos valores de eritrócitos de todos os grupos apresentou-se abaixo dos valores normais. Com a eliminação dos vermes adultos pela ação do anti-helmíntico associado ou não ao imunoestimulante, os níveis de eritrócitos se restabeleceram, no entanto os animais tratados com imunoestimulante (Fig.7) apresentaram uma recuperação mais rápida, verificada uma semana após o tratamento, enquanto os animais do grupo III tratados somente com o anti-

helmíntico, apresentaram uma recuperação lenta, restabelecendo os níveis de normalidade após quatro semanas da data do tratamento.

Os animais do grupo IV também apresentaram elevação no número de eritrócitos a partir do 67° dia, apesar deste aumento, o grupo IV ainda permaneceu com valor médio abaixo do normal até o final do experimento (Fig.7). Observamos também que animais do grupo IV apresentaram correlação negativa significativa entre OPG e hemácias, comprovando que a alta carga parasitária pode provocar uma diminuição importante no número de hemácias (Fig.7), como evidenciado por Mattos *et al.* (2005).

A diminuição nos valores de eritrócitos ocorre devido a expressão de pelo menos duas proteinases, membros da superfamília da catepsina B, pelo parasita *Haemonchus*, as quais são capazes de romper a membrana dos eritrócitos (Hartman *et al.*, 2001). Os níveis RNAm destas proteínas são extremamente altos em vermes adultos e baixos em larvas L3 e L4 (Pratt *et al.*, 1990) o que justifica a ação destas proteinases já que nossos resultados demonstram o pico de OPG no 35° dia após a infecção refletindo portanto a maior quantidade de larvas adultas no abomaso dos animais.

Em relação ao hematócrito, observamos uma diminuição dos valores entre os dias 21° e 35° após a infecção (Fig.8) correspondentes ao pico de OPG, mas dentro dos valores de referência (Schalm *et al.*, 1975), corroborando com achados de Kawano *et al.* (2001). Mesmo apresentando alta carga parasitária, não observamos quadro de anemia nos ovinos em todo o período, através de exame clínico. Este fato sugere a capacidade de alguns ovinos resilientes de suportar uma alta infestação parasitária segundo Molento *et al.* (2004). Após o 67° dia após a infecção, observou-se um aumento expressivo do hematócrito, o que não foi verificado no grupo IV (Fig.8). Em todos os momentos analisados, após o tratamento, os animais do grupo IV apresentaram valores menores de hematócrito em relação aos animais dos demais grupos.

Não observamos diferença significativa nos valores de hemoglobina na vigência da verminose (21° ao 35° dia após a infecção). Após o tratamento, verificamos que os valores de hemoglobina no grupo IV (controle) permaneceram menores em relação aos animais dos grupos I, II e III. Os valores de hemoglobina

permaneceram mais elevados nos dias 67° e 73°, nos animais dos grupos I e III, conforme mostra a (Fig.9) dentro dos valores de referencia.

Na Figura 11, verificamos que após o esquema de tratamento, os animais que receberam imunoestimulante e/ou anti-helmíntico apresentaram níveis mais elevados de CHCM em relação ao grupo controle (Grupo IV).

Não foram observadas diferenças estatísticas nos valores de VCM (Fig.12) e HCM (Fig.10) no decorrer da infecção.

Durante o tratamento verificou-se que os leucócitos apresentaram um aumento significativo nos dias 53 e 67, quando comparados com os valores dos dias 35 e 48. No dia 73 os valores obtidos foram significativamente maiores em relação aos dias 35, 42 e 48 (Tab. 14), não foram obtidas diferenças entre grupos e interação entre grupo e dia. No entanto podemos observar um discreto aumento na contagem dos leucócitos do grupo III no 53° dia após a infecção, e nos grupos I e III no 73° dia após a infecção (Fig. 13). No entanto não foi observado quadro de leucocitose, já que os valores observados encontravam-se dentro dos valores de referência.

A partir do 53° dia, observamos aumento significativo nos valores absolutos de linfócitos em todos os grupos em relação aos dias 35, 42 e 48. Entretanto apenas o grupo I apresenta correlação positiva significativa entre linfócitos e OPG, indicando que na vigência da alta carga parasitária o LPS e *P. acnes* foram capazes de estimular linfócitos T, importantes na expulsão das larvas (Fig.14).

Os valores de monócitos e neutrófilos mantiveram-se dentro dos limites de referência, porém com variações que sugerem uma resposta individual de cada animal, aparentemente não tendo relação com o tratamento e sim com a parasitose. Estes achados já eram esperados uma vez que a ação destas células está fortemente associada à infecções bacterianas (Adams, 1993). No entanto, os animais do grupo I apresentaram correlação negativa entre OPG e neutrófilos, e correlação positiva entre linfócitos e OPG, indicando que há uma diminuição de neutrófilos concomitantemente com a elevação de linfócitos mostrando um equilíbrio na resposta imune celular neste grupo na tentativa de eliminação dos parasitas.

Eosinófilia tecidual e periférica é uma característica comum das helmintoses. Neste estudo nenhuma diferença foi observada no número de eosinófilos circulantes. Este dado está de acordo com os achados de Huntley *et al.* (1995), Bisset *et al.* (1996) e Schallig *et al.* (1997).

No entanto, diversos autores têm confirmado a participação de eosinófilos na eliminação das larvas, tanto através da indução por IL-5 (Dubucquoi *et al.*, 1994; Bao *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996; Rainbird *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 2000), quanto pela liberação de histamina proveniente da degranulação dos mastócitos (O' Relly *et al.*, 2002; Arizmendi-Puga *et al.*, 2006), além de experimentos *in vitro* demonstrarem que eosinófilos são capazes de mobilizar a larva (Balic *et al.*, 2006).

Com base nestes achados é evidente que há participação de eosinófilos na eliminação dos parasitas. A ausência de eosinofilia periférica, mostrada neste estudo, pode ser explicada pela ação local destas células no abomaso dos ovinos infectados.

Entretanto ao analisarmos a correlação entre eosinófilos e OPG, apenas o grupo I, tratado com suspensão de LPS e *P.acnes* e anti-helmíntico mostrou correlação negativa significativa, sugerindo participação dos eosinófilos na eliminação das larvas.

Nos momentos de maior infestação parasitária (35° dia após a infecção), os níveis de proteínas plasmáticas sofreram uma redução. Após o tratamento, verificamos um aumento nos níveis de proteínas plasmáticas nos animais dos grupos I, II e III. A partir do 35° dia, os animais do grupo IV apresentaram valores de proteínas plasmáticas abaixo dos limites de referência.

Estes resultados corroboram com os achados de Fernandez *et al.* (2006), Silva *et al.* (2002) e Jones *et al.* (2000), onde demonstraram que as parasitoses gastrintestinais causam inflamação das paredes do trato gastrintestinal, causando um seqüestro de proteínas plasmáticas, além de prejudicar a absorção de nutrientes pelo animal.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que os tratamentos aplicados aos grupos I, II e III foram capazes de reduzir a carga parasitária,

sendo que o grupo III (tratado somente com anti-helmíntico) ao final do tratamento apresentou OPG significativamente menor em relação aos animais dos demais grupos. No entanto, diferenças imunológicas entre os grupos foram evidenciadas.

Os resultados demonstrados pelos animais do grupo I (imunoestimulante + anti-helmíntico), sugerem que o composto a base de LPS e *P. acnes*, estimula a resposta imune, contra os parasitas, evidenciado pelo aumento de IgE, recuperação rápida dos eritrócitos, ativação de linfócitos T (*in vitro*), ativação de linfócito *in vivo* e finalmente ativação dos eosinófilos. Estes mecanismos observados nos animais do grupo I, são os mesmos mecanismos descritos em animais resistentes a infecção por nematódeos gastrintestinais (Windon *et al.*, 1987; Gill, 1991; Gill *et al.*, 1993; Pernthaner *et al.*, 2005).

Ao comparamos os animais do grupo I com os animais do grupo II, notamos que os animais tratados com *P. acnes* também apresentaram níveis elevados de IgE (porém menor que o grupo I), ativação dos linfócitos T *in vitro*, e recuperação rápida dos eritrócitos; mesmo assim o tratamento mais eficiente, em relação aos parâmetros imunológicos, foi do grupo I. Por outro lado, os animais do grupo III, não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros imunológicos.

O mecanismo de ação de moléculas imunoestimulantes sobre a resposta imune vem sendo amplamente estudado. A recente descoberta dos Toll like receptors (TLR) em Drosófilas (Stein *et al.*, 1991) e posteriormente a identificação dos mesmos em mamíferos (Nomura *et al.*, 1994; Medzhitov *et al.*, 1997) pode explicar em partes a ação destes adjuvantes bacterianos no sistema imune.

Os TLR são proteínas presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC), e são caracterizados pela presença de um domínio extracelular com leucinas repetitivas e uma região intracelular (Werling & Jungi, 2003). Esses receptores são capazes de reconhecer componentes encontrados nos patógenos, dentre esses componentes reconhecidos estão o LPS (presente na parede de bactérias gram negativas) e o ácido lipotecóico (TLA) (presente na parede de bactérias gram positivas) usados neste experimento. Além disto, os TLRs são cruciais não só por combater a infecção, mas também para fazer a conexão entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa.

O LPS ao interagir com APC induz preferencialmente uma resposta Th1, através da produção de IL-12 (Werling & Jungi, 2003). Porém recentemente tem sido mostrado que a ativação via TLR por LPS induz uma resposta Th2 (Re & Strominger, 2001), resposta que foi observada neste experimento no grupo tratado com LPS, através da dosagem de IgE, proliferação de linfócitos e avaliação da resposta imune celular.

Ainda não está claro como APCs induzem a diferenciação de linfócitos para Th2 via TLR, porém o mecanismo parece estar envolvido com o TLR4, uma vez que ratos com deficiência neste receptor quando expostos há um alérgeno apresentaram resposta Th2 reduzida (Dabbagh *et al.*, 2002). Resultados de outros grupos também mostraram que há um envolvimento de TLR4 na polarização de Th2 utilizando um produto da parede de um nematódeo (Goodridge *et al.*, 2005; Harnett & Harnett, 2005). Por outro lado, um grupo de pesquisadores realizou um experimento em um modelo de camundongo com TLR4, o qual tinha uma mutação de ponto e tornava-o ineficiente para a ligação de LPS, e o desafiou com o mesmo produto nematódeo do experimento citado acima. Os resultados obtidos demonstraram que parasita ativa o TLR por uma via diferente de LPS, porém o mecanismo de ativação é semelhante (Harnett & Harnett, 2005).

Outros trabalhos mostraram que o imunoestimulante potencializa a resposta imune pré-existente ao tratamento, já que neste trabalho foi demonstrado que, dependendo do esquema de tratamento, a bactéria *P. acnes*, pode suprimir ou potencializar a resposta celular de um antígeno tipicamente Th2 (Braga *et al.*, 2003). Nesse estudo, utilizando um modelo murino de hipersensibilidade imediata, no qual camundongos eram sensibilizados com clara de ovo de galinha (CSO) no tecido subcutâneo e desafiados, 14 dias depois, com ovoalbumina agregada (OVA) na pata, os animais desenvolveram uma reação local eosinofílica tipicamente Th2. O protocolo empregado neste estudo é semelhante ao deste trabalho, já que os animais foram infectados previamente (resposta Th2) e depois tratados. No entanto se ocorrer um pré-tratamento dos animais com *P. acnes*, por via subcutânea, a resposta Th2 na pata dos animais é suprimida, induzindo reação de hipersensibilidade tardia (Th1) quando a última injeção com a bactéria ocorreu uma semana antes do implante com CSO.

Acredita-se que os efeitos de imunomodulação da *P.acnes* estão envolvidos com o TLR9 (Kalis *et al.*, 2005). Recentemente Hemmi *et al.* (2000) descobriu que este TLR é um receptor para ilhas CpG (citosina fosfato guanósina) (região metilada do DNA rica em base C e G), as quais estão presentes no DNA bacteriano. Diversos trabalhos têm mostrado que as CpG quando ligadas ao TLR9 são capazes de estimular linfócitos e APC, inclusive em ruminantes (Brown *et al.*, 1999; Rankin *et al.*, 2001; Shoda *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Pontarollo *et al.*, 2002).

Estes resultados explicariam porque somente o grupo tratado com *P. acnes* apresentou IE elevados nas semanas seguintes ao tratamento, já que neste trabalho utilizamos *P. acnes* sonicada, desta maneira o DNA desta bactéria ficou exposto e foi capaz de estimular linfócitos via TLR 9. Esta hipótese seria reforçada pelo fato dos animais do grupo I não apresentarem estes IE elevados, uma vez que este grupo foi tratado com a célula (inteira) inativada, não deixando portanto o DNA exposto.

Com base em estudos, existem evidências da ligação do TLR 4 na resposta contra infecções helmínticas, geradas ou por prejuízos celulares (Shi *et al.*, 2003) ou por produtos dos próprios parasitas (Goodridge *et al.*, 2005; Harnet *et al.*, 2005). Deve ser ressaltado que estudos demonstraram que o LPS se liga a este receptor desencadeando uma resposta imune, seja ela Th1 ou Th2, de acordo com a situação e o patógeno envolvido (Harnet *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2005).

Desta forma estudos dos TLR e a ação de adjuvantes bacterianos co-administrados com drogas sintéticas, esclareceriam os mecanismos pelos quais eles elicitam a resposta imune, assim permitiriam que estratégias terapêuticas com doses eficientes fossem desenvolvidas.

Estudos realizados pelo nosso grupo estão em andamento para uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos pela ação dos imunostimulantes na eliminação dos helmintos em ovinos.

7. CONCLUSÃO

- ❖ O uso dos imunoestimulantes *P. acnes* e do composto a base de LPS e *P. acnes* em associação ao anti-helmíntico, não foram efetivos no tratamento da verminose experimental pelo exame coproparasitológico (OPG).
- ❖ O tratamento com o composto a base de LPS e *P. acnes* em associação ao anti-helmíntico promoveu aumento na resposta imune celular e humoral nos ovinos, evidenciado pelo aumento de IgE, eosinófilos, neutrófilos em correlação à diminuição do OPG, e aumento de linfócitos T em resposta ao aumento da carga parasitária.
- ❖ A associação entre o aumento da carga parasitária e diminuição nos níveis de eritrócitos pôde ser observada nos animais que não receberam tratamento.
- ❖ Os mecanismos pelo quais os imunoestimulantes estão modulando a resposta imune dos ovinos, utilizando o modelo de verminose experimental, não está claro, requerendo mais estudos, inclusive com base molecular para esclarecer esta ação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABATH, F.C.G.; COUTINHO, E.M.; MONTENEGRO, S.M.I.; GOMES, Y.M.; CARVALHO, A. M. The use of nonspecific immunopotenciators in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 82, p. 73-76, 1988.

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 5° ed. São Paulo: Editora Revinter, 2005. 560 p.

ABEL L.C.J.; CHEN, S.; RICCA, L.; CHATE, S.; MARTINS, M.F.; GARCIA, M. Adjuvant effect of LPS and *Propionibacterium acnes* on development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep (**Parasite Immunol. submitted**).

ABU-GHAZALEH, R.I.; FUJISAVA, T.; MESTEKY, J.; KYLE, R.A.; GLEICH, G.J. IgA-induced eosinophil degranulation. **J. Immunol.** v. 142, 2393- 2397, 1989.

ADAMS, D.B.; Systemic responses to challenge infection with *Haemonchus contortus*. **Inter. J. Parasitol.** v. 12, p. 439-443, 1993.

ADAMS, D.B. & FELL, L.R. The effect of infection with the abomasal nematode, *Haemonchus contortus*, on the avoidance behaviour of sheep in a motivational choice test. **Int. J. Parasitol.** v. 27, n. 6, p. 665-673, 1997.

ADAMS, H.R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 1034p.

ADAMS, J.L.; SEMRAD, S.D.; CZUPRYNSKI, C.J. Administration of bacterial lipopolysaccharide elicits circulating tumor necrosis factor – alpha in neonatal calves. **J. Clin. Microbiol.** v. 28, p. 998-1102, 1990.

ÁLVAREZ, B.; EZQUERRA, A.; GOMEZ del MORAL, M.; ALONSO, F.; TÁRES, J.; MARCA, J.; DOMINGUEZ, J. Analysis of the in vitro effects of the compound Inmudolen® of several parameters of the pig immune response. In: **15th IPVS**, Birmingham, Reino Unido, 1998.

* Referências Bibliográficas padronizadas de acordo com a Norma – NBR 6023/2002, da ABNT.

ALVING, C.R. Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. **Immunobiol.** v. 187, p. 430-446, 1993.

AMARANTE, A. F. T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: MATOS, W.R.S. **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 461-473.

AMARANTE, A. F. T. Controle da verminose ovina. **Revista CFMV.** n.34, p.19-30, 2005.

ANANIAS, R.Z.; BRAGA, E.G.; LONGHINI, A.L.F.; MUSSALEM, J.S.; SQUAIELLA, C.C., LONGO-MAUGERI. In vitro non-specific anti-tumoral activity and surface molecules expression in cells obtained from mice treated with killed *P. Acnes*. **Scand. J. Immunol.** v. 54(1), p. 133, 2001.

ARAÚJO, F.R. & MADRUGA, C.R. Imunidade contra helmintos In: MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p.97-110.

BAKER, D.G. & GERSHWIN, L.J. Inverse relationship between IgE and worm burdens in cattle infected with *Ostertagia ostertagi*. **Vet. Parasitol.** v. 47, p. 87-97, 1993.

BAKKER, N.; VERVELDE, L.; KANOBANA, K.; KNOX, D.P.; CORNELISSEN, A.W.C.A.; VRIES, E.; YATSUDA, A.P. Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol binding fraction from the excretory/secretory products(ES). **Vaccine.** v. 22, p. 618-628, 2004.

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

BALIC, A.; BOWLES, V.M.; MEEUSEN, E.N. Mechanism of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Parasite Immunol.** v. 24, p. 39-46, 2002.

BALIC, A.; CUNNINGHAM, C.P.; MEEUSEN, E.N. Eosinophil and nematode interaction with *Haemonchus contortus* Larvae in the ovine gastrointestinal tract. **Parasite Immunol.** v. 106, p. 118-123, 2005.

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

BAO, S; Mc CLURE, S.J; EMERY, D.L.; HUSBAND, A.J. Interleukin 5 mRNA expressed by eosinophils and gamma/delta T cells in parasite immune sheep. **Eur. J. Immunol.** v. 26, p. 552-556, 1996.

BASTA, S.; KNOETIG, S.; SUMMERFIELD, A.; Mc CULLOUGH, K.C. Lipopolysaccharide and formol 12-myristate 13 acetate both impair monocyte differentiation, realigning cellular function to virus susceptibility. **Immunology.** v.103, p. 488-497, 2001.

BAUTISTA-GARCIA, C.R.; FLORES-HERNANDEZ, O.; QUIROZ-ROMERO, H. Non-specific resistance of sheep against *Haemonchus contortus* with Freund's complete adjuvant. **Parasite Immunol.** v. 13, p. 5065-5069, 1991.

BIGNOLD, L.P. & FERRANTE, A. Mechanism of separation of polymorphonuclear leukocytes from whole blood by the one step Hypaque-Ficoll method. **J. Immunol. Methods.** v. 96, p. 29-30, 1987.

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

BORGSTEEDE, F.H.M.; PEKELDER, J.J.; DERCKSEN, D.P.; SOL, J.; VELLEMA, P.; GAASENBEEK, C.P.; VAN DER LINDEN; J.N. A survey of anthelmintic resistance in nematodes of sheep in the Netherlands. **Vet Q.** v. 19, p. 167-172, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Ann. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, E.G.; ANANIAS, R.Z.; MUSSALEM, J.S.; SQUAIELLA, C.C.; LONGHINI, A.L.; TRAVASSOS, L.R.; LONGO-MAUGÉRI, I.M. Treatment with *Propionibacterium acnes*

modulates the late phase reaction of immediate hypersensitivity in mice. **Immunol. Lett.** v. 88, n. 2, p. 163-169, 2003.

BRENER, Z. & CARDOSO, J.E. Nonspecific resistance against *Trypanosoma cruzi* enhanced by *Corynebacterium parvum*. **J. Parasitol.** v. 62, p. 645-646, 1976.

BROWN, W.C.; SUAREZ, C.E; SHODA, L.K; ESTES, D.M. Modulation of host immune responses by protozoal DNA. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.72, p. 87-94, 1999.

BRUDSON, R.V. Principles of helminth control. **Vet. Parasitol.** v. 6, p. 185-215, 1980, 1980.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos veterinários de pequenos animais.** 1ª ed. São Paulo: Roca, 2004. 376p.

BUTTERWORTH, A.E. & THORNE, K.J.I. Eosinophils and Parasitic Diseases. In: SMITH, H. & COOK, R.M, **Immunopharmacology of eosinophils.** 1ª ed. London: Academic Press, 1993. p. 119-150.

CABARRET, J. & BERRAG, B. Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy: average versus individually based estimations. **Vet. Parasitol.** v. 121, p. 105-113, 2004.

CANALS, A.; ZARLENGA, D.S.; ALMERIA, S.; GASBARRE, L.C. Cytokine profile induced by a primary infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 58, p. 63-75, 1997.

CANALS, A.; ZARLENGA, D.S.; ALMERIA, S.; GASBARRE, L.C. Cytokine profile induced by a primary infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 58, p. 63-75, 1997.

CHARLES, T.P. & FURLONG, J.A. A survey of dairy cattle worm control practices in Southeast Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 65, p. 65-73, 1996.

CHARLEY, B. Effects of immunopotentiating agents on alveolar macrophage properties. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.** v. 9, p. 155-159, 1986.

CHATE, S. **Efeito de imunossupressão no desenvolvimento da verminose em ovinos**. Dissertação (Mestrado em Imunopatologia Veterinária) - Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Paulista, 2005.

CHEN, S.; RICCA, L. G.; CHATE, S.; MARTINS, M. F.; GARCIA, M.; ABEL, L. C. J. Efeito de imunoestimulantes na resposta imune de ovinos experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus*. In: **VI Congresso Brasileiro de Buiatria**, Búzios, 2005.

COLLINS, P.D.; MARLEAU, S.; GRIFFITHING-JOHNSON, D.A.; JOSE, P.J.; WILLIAMS, T.J; Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophils accumulation in vivo. **J. Exp. Med.** V. 182, p. 173-181, 1995.

COX, F.E.G. & LIEW, E.Y. T-cell, subsets and cytokines in parasitic infections. **Parasitology today**.v. 8, p. 371-374, 1992.

DABBAGH, K.; DAHL, M.E; STEPICK-BIEK, P.; LEWIS, D.B. TOLL-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune response: roles of dendritic cells. **J. Immunol.** v. 168, p. 4524-4530, 2002.

DAO, T.; OHASHI, K.; KAYANO, T.; KURIMOTO, M.; OKAMURA, H. Interferon- γ inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. **Cell. Immunol.** v. 173, p. 230-235, 1996.

DUBUCQUOI, S.; DESREUMAUX, P.; JANIN, A.; KLEIN, O.; GOLDMAN, S.M.; TAVERNIER, J.; CAPRON, A.; CAPRON, M. Interleukin 5 synthesis by Eosinophils: Association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. **J. Exp. Med.** v. 179, p. 703-708, 1994.

FERNANDEZ, S. Y.; JESUS, E. E. V.; PAULE, B. J. A.; UZÊDA, R. S.; ALMEIDA, M. A. O.; GUIMARÃES, J. E. Proteinograma de caprinos da raça Pardo-Alpina infectados naturalmente por parasitos gastrintestinais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 58, n. 2, p. 279-282, 2006.

FERRO, A.; MARCA, J.; NAVARRETE, E.; STIPKOVITS, L. Efecto de la combinación Lincomicina + Immodulen para el tratamiento de la desinteria porcina. In: **Resúmenes XX Symposium ANAPORC**, Tavalera de la Reina, Espanha, 1999a

FERRO, A.; MARCA, J.; NAVARRETE, E.; STIPKOVITS, L. Aplicación de Immodulen en una piara afectada por PRSS para el tratamiento de la disenteria porcina. In: **Resúmenes XX Symposium ANAPORC**, Tavalera de la Reina, Espanha, 1999b.

FISHER, B.; BROWN, A.; WOLMARK, N.; FISHER, E.R.; REDMOND, C.; WICKERHAM, D.L.; MARGOLESE, R.; DIMITROV, N.; PILCH, Y.; GLASS, A. Evaluation of the worth of *Corynebacterium parvum* in conjunction with chemotherapy as adjuvant treatment for primary breast cancer. Eight-year results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-10. **Cancer**. v.66, n. 2, p. 220-227, 1990.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 3ªed. São Paulo: Ícone, 1997. 686p.

GALLEGO –OLIVELLA J.; MARTIN RUIZ J.M.; FADURDO TORRUS E. Study of immunostimulating effect of IM-104 in mice. **Immunol. Med. Microbiol.** v. 19, p. 331-333, 1998.

GARCIA, M.; SERTORIO, S.P.; ALVES, G.J.; CHATE, S.C.; CARNEIRO, R.; LALLO, M.A. Experimental induction and evaluation of immunosuppression in ovine. In: **22º Congresso Mundial de Buiatria, Hanover, Alemanha. Proceedings**, 2002.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2ªed. São Paulo: Varela, 2005. p. 169.

GILL, H.S. Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in merino lambs. **Parasite Immunol.** v. 13, p. 617-628, 1991.

GILL, H.S.; WATSON, D.L.; BRANDON, M.R. Monoclonal antibody to CD4 + T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. **Immunology**. v. 78, p. 43-49, 1993.

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

GILL, J.H.; REDWIN, J.M.; van WYK, J.A.; LACEY, E. . Avermectin inhibition of larval development in *H. contortus* effects of ivermectin resistance. **Int. J. Parasitol.** v. 25, n. 4, p. 463–470, 1995.

GÓMEZ-MUNOZ, M.T.; CUQUERELLA, M.; DE LA FUENTE, C.; GOMEZ-IGLESIAS, L.A.; ALUNDA, J.M. Infection induced protection against *Haemonchus contortus* in merino and manchego sheep. Relationship to serum antibody response. **Zentralblat Veterinarmedizin**. v. 45, p. 449-459, 1998.

GONZALEZ, S.; FLORIN, A.; ROUX, M.E. Efeito de Immunomodulador IM-104 sob la poblacion sob la mucosa intestinal de ratas inmunodeficientes. **Imunologia**. v. 12, p. 59-63, 1993.

GOODRIDGE, H.S.; MARSHALL, F.A; ELSE, K.J. Immunomodulation via novel use of TLR4 by a filarial nematode phosphorylcholinecontaining secreted product, ES-62. **J. Immunol**, v. 174, p. 284-293, 2005.

GORDON, H. McL. & WHITLOCK, H.N. A new technique for counting nematode egg in sheep faeces. **J. Commonw. Sci. Indst. Organization**. v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.

GRIMSHAW, W.T.R., HONG, C.; HUNT, K.R. Potential for misinterpretation of the faecal egg count reduction test for levamisole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep. **Vet. Parasitol.** v. 62 n. 3–4, p. 267–273, 1996.

HAGAN, P. IgE and protective immunity to helminth infections. **Parasite Immunol.** v. 15, p.1-4, 1993.

HAIG, D.M.; WINDOW, R.; BLACKIE, W.; BROWN, D.; SMITH, W.D. Parasite-specific T cell responses of sheep following live infection with the gastric nematode *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunol.** v. 11, p. 463-477, 1989.

HALPERN, B.N.; PREVOT, R.; BIOZZI, G., STIFFEL, C., MOUTON, D., MORARD, J.C., BOUTHILLIER, Y., DECREUSENFOUND, C. Stimulation de l'activité phagocytaire du système reticuloendothélial provoquée par *Corynebacterium parvum*. **J. Reticuloendoth. Soc.** v. 83, p.77-96, 1963.

HALPERN, B.N.; BIOZZI, G., STIFFEL, C., MOUTON, D. Inhibition of tumor growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. **Nature**. v. 212, p. 853-854, 1966.

HARNETT, W.; GOODRIDGE, H.S.; HARNETT, M.M. Subversion of immune cell signal transduction pathways by the secreted filarial nematode product, ES-62. **Parasitology**. v. 130, p. 63-68, 2005.

HARNETT, W. & HARNETT, M.M. Molecular basis of worm-induced immunomodulation. **Parasite Immunol.** v. 28, p. 535-543, 2005.

HARTMAN, D.; DONALD, D.R.; NIKOLAOU, D.S.; SAVIN, K.W.; HASSE, D.; PRESIDENTE, P.J.A.; NEWTON, S.E. Analysis of developmentally regulated genes of the parasite *Haemonchus contortus*. **Int. J. Parasitol.** v. 31, p. 1236-1245, 2001.

HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SATO, T.; SANJO, H.; MATSUMOTO, M.; HOSHINO, K.; WAGNER, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. A TOLL-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**. v. 408, p. 740-745, 2000.

HEWITT, S. G. Haematology. In: GRAY, D. E. **Manual of Veterinary Investigation, Laboratory Techniques**. 3^oed. London: Her Majesty's Stationery Office, 1984. p. 72-100.

HILL, J.O. Modulation of the pattern of development of experimental disseminated Leishmaniasis by *Corynebacterium parvum*. **J. Leukoc. Biol.** v. 41, p. 165-169, 1987.

HUBERT, J. & KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Vet. Record**. V. 130, n. 16, p. 442-446, 1992.

HUNTLEY, J.F.; PATTERSON, M.; Mac KELLAR, A.; JACKSON, F.; STEVENSON, L.M.; COOP, R.L. A comparison of the mast cell and eosinophil responses of sheep and goats to gastrointestinal nematode infections. **Res. Vet. Sci.** v. 58, p. 5-10, 1995.

HUNTLEY, J.F.; SCHALLIG, H.D.F.H.; KOOYMAN, F.N. J.; Mac KELLAR, A.; JACKSON, F.; SMITH, W.D. IgE antibody during infection with the ovine abomasal nematode *Teladorsagia circumcincta*: primary and secondary responses in serum gastric lymph of sheep. **Parasite Immunol.** v. 20, p. 565-571, 1998.

JABBAR, A.; IQBAL, Z.; KERBOEUF, D.; GHULAM, M.; KHAN, M.N.; AFAQ, M. Anthelmintic resistance: The state of play revisited. **Life Sci.** v. 79, p. 2413-2431, 2006.

JACKSON, F. Anthelmintic resistance – the state of play. **Br. Vet. J.** v. 149, p. 123-138, 1993.

JACKSON, F. Anthelmintics – What's the alternative? **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 13, n.1, p. 62-68, 2004.

JACOB, D.B. Lypopolisaccharide and the immune response. In: SHOBER, W.; HANSOM, L.A.; SELL, K.W. **Recent advances in mucosal immunology**. 1° ed. Nova York: Flaven Press, 1982. p. 47-55.

JACOBS, H.J; WILTSHIRE, C.; ASHMAN, K.; MEEUSEN, E. Vaccination against the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus* using a purified larval surface antigen. **Vaccine.** v. 17, p. 362-368, 1999.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. 1°ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 417.

JASMER, D.P. & Mc GUIRE, T.C. Antigens with application toward immune control of blood-feeding parasitic nematodes. **Br. Vet. J.** v. 152, n. 3, p. 251-268, 1996.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6°ed. Barueri: Editora Manole, 2000.

KALIS, C.; GUMENSCHWEIMER, M.; FREUDENBERG, N.; TCHAPTCHET, S.; FEJER, G.; HEIT, A.; AKIRA, S.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M. A. Requirement for TLR 9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. **J. Immunol.** v. 174, p. 4295-4300, 2005.

KAWANO, E. L.; YAMAMURA, M. H. RIBEIRO, E. L. A. Efeitos do tratamento com anti-helmíntico em cordeiros naturalmente infectados com helmintos gastrintestinais sobre os parâmetros hematológicos, ganho de peso e qualidade de carcaça. **Arq. Fac. Vet. UFRSG.** v. 29, n. 2, p. 113-121, 2001.

KENNEDY, J.D.; SUTTON, R.C.; CONLEY, F.K. Effect of intracerebrally injected *Corynebacterium parvum* on the development and growth of metastatic brain tumor in mice. **Neurosurgery.** v.25, n. 5, p. 709-714, 1989.

KERR, M. G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia.** 2ed. São Paulo: Roca, 2003. 436p.

KHERLI, M.E. & TOTH, J.A. Chemecally induced immunomodulation in domestic food animals. **Adv Vet Sci Com Med.** v. 35, p. 103-119, 1990.

KLIGMAN, A.M.; LEYDEN, J.J.; Mc GINLEY. Bacteriology. **J. Invest. Dermatol.** v. 67, p. 160-168, 1976.

KLIR, J.J.; SHAHBAZIAN, M.; MATTERI, R.L.; FRISTCHE, K.L.; BECKER, B.A. Effect of thermal environment on response to acute peripheral lipopolysaccharide challenge exposure in neonatal pig. **AJVR,** v. 58, p.364-369, 1997.

KO H.L.; ROSZKOWISKI J.; JELJAJEWICS J.; PULVERER G. Comparative study on the immunostimulatory potency of different *Propionibacterium* strains. **Med. Microbiol. Immunol.** v. 170, p. 1-9, 1981.

KOOYMAN, F.N.J.; VAN KOOTEN, P.J.S.; HUNTLEY, J.F.; Mac KELLAR, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A.; SCHALLIG, H.D.F.H. Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. **Parasitology.** v. 114, p. 395-406, 1997.

KOOYMAN FN, YATSUDA AP, PLOEGER HW, EYSKER M. Serum immunoglobulin E response in calves infected with the lungworm *Dictyocaulus viviparus* and its correlation with protection. **Parasite Immunol.** v. 24(1) p.47-56, 2002.

LEYDEN, J.J.; Mc GINLEY; VOWELS, B. *Propionibacterium acnes* colonization in acne and nonacne. **Dermatology.** v.196, p. 55-58, 1998.

LOVE, S.C.J.; NEILSON, F.I.A.; BIDDLE, A.J.; MICKIMON, R. Moxidectin-resistant *Haemonchus contortus* in sheep in Northern New South Wales. **Aus. Vet. J.** v. 81, p.359- 360, 2003.

LYPSTON, A.; HARVEY, H.A.; BALCH, C.M.; ANTLE, C.E.; HECKARD, R.; BARTOLUCCI, A.A. *Corynebacterium parvum* versus bacille Calmette-Guérin adjuvant immunotherapy of stage II malignant melanoma. **J. Clin. Oncol.** V. 9, n. 7, p. 1151-1156, 1991.

Mac DONALD, A.S.; STRAW, A.D.; BAUMAN, B.; PEARCE, E.J. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. **J. Immunol.** v.167, n.4, p. 1982-1988, 2001.

Mac DONALD, A.S.; STRAW, A.D.; DALTON, M.N.; PEARCE, E.J. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. **J. Immunol.** v. 168, n. 2, p. 537-540, 2002.

MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURCA-VASCONCELOS, A.L.F.; COSTA, C.T.C.; CASTRO, C.M.S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azerdarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.** v. 140, n. 1, p.98-194, 2006.

MAKOWSKA D. I. ;PEJSAK S.; SZMIFGIELSKI S. Adjuvant properties of *P. avium* kp-40 in vaccination against endemic viral and bacterial infections Swine immunized with live attenuated Aujeszky disease virus vaccine and experimental infected with virulent viruses **Zbl. Bakt.** v. 277, p. 539-577, 1992.

MÁRQUEZ LARA, D. Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. **Revista Corpoica.** v. 4, p. 55-71, 2003.

MARSHALL, N.E. & ZIELGLER, H.K. Role of lipopolysaccharide in induction of the expression during infection of gram-negative bacteria. **Infect Immun.** V. 57, p. 1556-1560, 1989.

MATTOS, M. J. T.; OLIVEIRA, C. M. B.; LUSTOSA, A.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. Influência do parasitismo por nematódeos sobre o perfil hematológico de caprinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zool.** v. 57, n. 1, p. 133-135, Minas Gerais, 2005.

MATSUI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H. HYODO, Y.; HAYASHI, N.; HIROISHI, K.; KAWADA, N.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K.; HIGASHINO, K. *Propionibacterium acnes* treatment diminishes CD4⁺ NK1.1⁺ T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. **J. Immunol.** v. 159, p. 97-106, 1997.

MENZONZA, G. **Efecto in Vitro e in vivo de un inmunomodulador compuesto por LPS de E. coli y P. granulosum sobre el sistema imune de el cerdo.** Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - Departamento de anatomia e saúde animal, Faculdade de Veterinária, Universitat Autònoma de Barcelona, 2002.

MEDZHITOV, R.; PRESTON- HURLBURT, P.; JANEWAY JR., C.A. A human homologue of the Drosophila TOLL proteins signals activation of adaptive immunity. **Nature.** v. 388, p. 394-397, 1997.

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

MILLER, H.R.P. The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animal. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.6, p. 167-259, 1984.

MILLER, H.R.P. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes: natural immunity, can it be harnessed? **Inter. J. Parasitol.** v. 26, p. 801-811, 1996.

MOLENTO, M.B. & PRICHARD, R.K. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL347,099 on the efficacy of ivermectina or moxidectina against

unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). **Parasitol. Res.** v. 85, p. 1007-1011, 1999

MOLENTO, M. B. & PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larval. **Pesq. Vet. Bras.** v. 21, n. 3, p.117-121, 2001.

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. **Cienc. Rural.** v. 34, n. 4, p.1139-1145, 2004.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKY, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.** v. 136, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology.** v. 7, p. 145-173, 1989.

MULCAHY, G. & QUINN, P.J. A review of immunomodulators and their applications veterinary medicine. **J. Vet. Pharmacol. Therapy.** v. 9, p. 119-139, 1986.

NEWTON, S.E. & MEEUSEN, E.N.T. Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. **Parasite Immunol.** v. 25, p.283-296, 2003.

NOMURA, N.; MIYAJIMA, N.; SAZUKA, T.; TANAKA, A.; KAWARABAYASI, Y.; SATO, S.; NAGASE, T.; SEKI, N.; ISHIKAWA, K.; TABATA, S. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. Part I: The coding sequences of 40 new genes deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. **DNA Res.** v. 1, p. 27-35, 1994.

NORIMATSU, M.; ONO, T.; AOKI, A.; OHISHI, K., TAKAHASHI, T.; WATANABE, G.; TAYA, K.; SASAMOTO, S.; TAMURA, Y. Lipopolysaccharide-induced apoptosis in swine lymphocytes in vivo. **Infect Immun.** v. 63, p. 1122-1126, 1995.

NUSSENZWEIG, R. Increased nonspecific resistance to malaria produced by administration of killed *Corynebacterium parvum*. **Exp. Parasitol.** v. 21, p. 224-231, 1967.

OKAMURA, H.; TSUITSUI, H.; KOMATSU, T.; YUTSUDO, M.; HAKURA, A.; TANIMOTO, T.; TORIGOE, K.; OKURA, Y.; NUKADA, K.; HATTORI, K.; AKITA, M.; NAMBA, F.; TANABE, K.; KONISHI, S.; FUKUDA, KURIMOTO, M. Cloning of a new cytokine that induces INF- γ production by T cells. **Nature.** v. 378, p. 88-91, 1995.

O'RELLY, M. ALPERT, R.; JENKINSON, S. Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils – role in eosinophil chemotaxis. **J. Recept Signal Transduct Res.** v. 22, p. 431-448, 2002.

ORTIZ, J.M.; VELASCO, F.; DOMINGUEZ, J.; ALVAREZ, B.; MARCA, J.; IRRURE, P.; CALDENTEY, L. Niveles de IgA em el calostro de cerdas tratadas con Inmodulen. In: **Resúmenes XVII Symposium ANAPORC**, Santiago de Compostela, Espanha, 1994.

PADILHA, T. & MENDONZA-de-GIVES, P. Controle microbiano das formas de vida livre dos nematódeos tricostrongilídeos: Uma alternativa para higienização das pastagens. In: Padilha, T. **Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996, p. 215-237.

PANG G.; COUCH L.; BATEY R.; CLANCY R.; CRIPPS A. GM-CSF, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and V-CAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide IL-1 alfa e TNF-alfa. **Clin. Exp. Immunol.** v. 96, p. 437-443, 1994.

PANTAROLLO, R.A.; RANKIN, R.; BABIUK, L.A.; GODSON, D.L.; GRIEBEL, P.J.; HECKER, R.; KRIEG, A.M.; van DRUNNEN, S. Monocytes are required for optimum in vitro stimulation of bovine peripheral blood mononuclear cells by non-methylated CpG motifs. **Vet. Immunol Immunopathol.** v. 84, p. 43-59, 2002.

PELL, J.M. Principles of immunomodulation. **Livest. Prod. Sci.** v. 42, p.123-133, 1995.

PERRY, A.L. & LAMBERT, P.A. *Propionibacterium acnes*. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 42, p.185-188, 2006.

PERTHANER, A.; CABAJ, W.; STANKIEWICZ, M.; DAVIES, J.; MAASS, D. Cytokine mRNA expression and INF- γ production of immunised nematode resistant and susceptible lambs against natural poly-generic challenge. **Acta. Parasitol.** v. 42, v. 182, p. 180-186, 1997.

PERTHANER, A.; COLE, S.A.; MORRISON, L.; HEIN, W.R. Increased expression of interleukin 5 (IL-5), IL-13, and Tumor Necrosis factor alpha genes in Intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. **Infect. Immun.** v. 73, n. 4, p. 2175-2183, 2005.

PRATT, D.; COX, G.N.; MILHAUSEN, M.J.; BOISVENUE, R.J. A developmentally regulated cysteine protease gene family in *Haemonchus contortus*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 43, p. 181-191, 1990.

PRITCHARD, D.I; Immunity to helminths: is too much IgE parasite- rather than host-protective? **Parasite Immunol.** v. 15, p. 5-9, 1993.

PRITCHARD, D.I; QUINNEL, R.J.; WALSH, E.A. Immunity in humans to *Necator Americanus*: IgE, parasite weight and fecundity. **Parasite Immunol.** v. 17, p. 71-75, 1995.

PRITCHARD, D.I. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trend. Parasitol.** v. 17, n. 9, p. 445-453, 2001.

QUINN P.J. Mechanisms of some imunomodulators used in veterinary medicine. **Adv. Vet. Sci. Com. Med.** v.35, p. 43-99, 1990.

RAINBIRD, M.A.; Mac MILLAN, D.; MEEUSEN, E.N.Y. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus*: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin 5. **Parasite Immunol.** v. 20, p. 93-103, 1998.

RAMOS, C.T.; BELLATO, V.; AVILA, V.S.; COUTINHO, G.C.; SOUZA, A.P. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. **Cienc. Rural.** v. 32, n. 3, p.1-8, 2002.

RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P. de; ÁVILA, V.S. de; COUTINHO, G.C.; DALAGNOL, C.A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Cienc. Rural**, v.34, p.1889-1895, 2004.

RANKIN, R.; PANTAROLLO, R.; IOANNOU, X.; KRIEG, A.M.; HECKER, R.; BABIUK, L.A.; van DRUNEN, S. CpG motif identification for veterinary laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. **Antisense Nucl. Acid. Drug. Dev.** v. 11, p. 333-340, 2001.

RE, F. & STROMINGER, J.L. TOLL-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. **J. Biol. Chem.** V. 276, p. 37692- 37699, 2001.

REBAR, A. H.; MACWILLIAMS, P. S.; FELDMAN, B. F.; METZGER JR, F. J.; POLLOCK, R. V. H.; ROCHE, J. **Guia de hematologia para cães e gatos**. 1ªed. São Paulo: Roca, 2003. 291 p.

ROBERTS, F.H.S & O'SULLIVAN. J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Aust. J. Agric. Res.** v. 1, p. 99-102, 1950.

SANGSTER, N.C. Managing parasiticide resistance. **Vet. Parasitol.** v.98, p.89-109, 2001.

SCHALLIG, H.D.F.; VAN LEEUWEN, M.A.W.; HENDRIKX, W.M.L. Immune responses of Texel sheep to secretory/excretory products of *Haemonchus contortus*. **Parasitology**. v. 108, p. 351-357, 1994.

SCHALLIG, H.D.F.; VAN LEEUWEN, M.A.W.; CORNELISEN, A.W.C.A. . Isotype specific serum antibody responses of sheep *Haemonchus contortus* antigens. **Vet. Parasitol.** v. 56, p. 149-162, 1995.

SCHALLIG, H.D.F.; VAN LEEUWEN, M.A.W.; CORNELISEN, A.W.C.A. Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins in sheep. **Parasite Immunol.** v. 19, p. 447-453, 1997.

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

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROL, E. J. **Veterinary Hematology**. 3^oed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1975. 807 p.

SHAW, M.K.; ROOS, D.S.; TILNEV, L.G. Cysteine and serine protease inhibitors block intracellular development and disrupt the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect.** v. 4, n. 2, p. 119-132, 2002.

SHAW, R.J.; Mc NEIL, M.M.; GATEHOUSE, T.K.; DOUCH, P.G. Quantification of total sheep IgE concentration using anti-ovine IgE monoclonal antibodies in an enzyme immunoassay. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 57, n. 3, p. 253-265, 1997.

SHAW, R.J.; GATEHOUSE, T.K. & Mc NEIL, M.M. Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformes*. **Int. J. Parasitol.** v. 28, p. 293-302, 1998.

SHER, A. & COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annu Rev Immunol.** v.10, p. 385-409, 1992.

SHI, Y.; EVANS, J.E.; ROCK, K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. **Nature.** v. 425, p. 516-521, 2003.

SHODA, L.K.; KEGERRIS, K.A.; SUAREZ, C.E.; RODITI, I.; CORRAL, R.S.; BERTOT, G.M.; MORIMINE, J.; BROWN, W.C. DNA from protozoa parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. **Infect. Immun.**v. 69, p. 2162-2171, 2001.

SILVA, M.M.; FARIA Jr., S.P.; MARTINS, M.F.M.; RABELLO, P.; PASCOAL, P.M.; BERTAGNON, H.G.; SCHEIBEL, M.; GARCIA, M. Efeito da verminose na resposta imune em caprinos. **Semina**. v. 23, n. 1, p.15-21, 2002.

SINGH, J.; SIGHU, S.S.; DHALIWAL, G.S.; PANGOANKAR, G.R.; NANDA, A.S.; GREWAL, A.S. Effectiveness of lipopolisaccharide as an intrauterine immunomodulator

in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. **Anim. Reprod. Sci.** v. 59, p. 159-166, 2000.

SISQUELLA, L. **Estudio de un inmunomodulador en aves**. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) - Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, 2000.

SMITH, S.R.; CALZETTA, A.; BANKOWISK, J.; KENWORTHY, B.L.; TERMINELLI, C. Lipopolysaccharide-induced cytokine production and mortality in mice treated with *Corynebacterium parvum*. **J. Leukoc. Biol.** v. 54, p. 23-29, 1993.

SOULSBY, E.J. The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. **Immunol. Lett.** v.16, n. 3, p. 315-320, 1987.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 897p.

STANKIEWICZ, M., HADAS, E., SHAW, R., GREEN, R. Immunization of lambs with drug-abbreviated *Haemonchus contortus* infections: protection against homologous and heterologous challenge. **Parasitol. Res.** v.6, n. 9, p. 758-761, 2000.

STEIN, D.; ROTH, S.; VOGELSANG, E.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. **Cell.** v. 65, p. 725-735, 1991.

SUAREZ, V.H.; Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. **Vet. Res.** v. 33, p. 563-573, 2002.

TAYLOR, M.A.; HUNT, K.R.; WILSON, C.A.; QUICK, J.M. Clinical observations, diagnosis and control of *H. contortus* infections in periparturient ewes. **Vet. Rec.** v. 126, n. 22, p. 555-556, 1990.

TEIXEIRA, K.M.; COUTINHO E.M.; ABATH, F.G.C.; MONTENEGRO, S.M.L. Effects of non-specific immunopotentiators in experimental *Schistosoma mansoni* infection. II *Corynebacterium parvum*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 38, p. 359-363, 1996.

THATCHER, E.F.; GERSHWIN, L.J.; BAKER, N.F. Levels of serum IgE in response gastrointestinal nematodes in cattle. **Vet. Parasitol.** v. 32, p. 153-161, 1989.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 6^a ed. São Paulo: Editora Roca, 2002. 532 p.

THOMAS, P.R.; CANTER, M.R.; DA'DARA, A.A.; DESIMONE, T.M.; HARN, D.A. A helminth glycan induces APC maturation via alternative NF- κ B activation independent of κ B α degradation. **J. Immunol.** v. 175, p. 2082-2090, 2005.

THOMAZ-SOCCOL, V.T.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; SILVA, M.C.E. de. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.47, p.41-47, 2004.

TORGERSON, P.R. & LLOYD, S. The B cell dependence of *Haemonchus contortus* antigen-induced lymphocyte proliferation. **Int. J. Parasitol.** v. 23, n. 7, p. 925-930, 1993.

TORGERSON, P.R.; SCHNYDER, M.; HERTZBERG, H. Detection of anthelmintic resistance: a comparison of mathematical techniques. **Vet. Parasitol.** v. 128 n.3-4, p. 291-298, 2005.

TSUJI, H.; MUKAIDA, N.; HARADA, A.; KANEKO, S.; MATSUSHITA, E.; NAKANUMA, Y.; TSUITSUI, H.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; KOBAYASHI, K.; MATSUSHIMA, K. Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in *Propionibacterium acnes* primed INF- γ deficient mice by a concomitant reduction of TNF- α , IL-12 and IL-18 production. **J. Immunol.** v. 162, p.1049-1055, 1999.

UENO, H. & GONCALVES P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4^o ed. Tokyo: JIICA. 1998. 143 p.

UHLINGER, C.A. Parasite control programs. In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**. 2^o.ed. Sant Louis: Mosby, 1996. p. 1685-1709.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**. 2^oed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 306

VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S. & RANGLES, J.L. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of modern anthelmintics? **Vet. Parasitol.** v. 70, p. 111-122, 1997.

WALLER, P.J. The development of anthelmintic resistance in ruminant livestock. **Acta Tropica**. v. 56, p. 233-243, 1994.

WALLER, P.J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematodes parasites of sheep in Southern Latin America: General over view. **Vet. Parasitol.** v. 62, p. 181-187, 1996.

WARR, G.W. & JAMES, K. Effect of *Corynebacterium parvum* on the class and subclass of antibody produced in the response of different strains of mice to sheep erythrocytes. **Immunology**. v. 28, p. 431-442, 1975.

WEBEL, D.M.; FINCK, B.M.; BAKER, D.H.; JOHNSON, R.W. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolisaccharide. **J. Anim. Sci.** v. 75, p. 1514-1520, 1997.

WERLING, D. & JUNGI, T.W. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 91, p. 1-12, 2003.

WINDON, R.G.; DINEEN, J.K.; WAGLAND, B.M. Genetic control of immunological responsiveness against the intestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis* in lambs. In: **Merino Improvement Programs in Australia**, p. 371, 1987.

YATSUDA, A.P.; KRIJGSVELD, J.; CORNELISSEN, A.W.C.A.; HECK, A.J.R.; VRIES, E. Comprehensive analysis oh the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. **J. Biol. Chem.** v. 278, n. 19, p.16941- 16951, 2003.

ZANG, Y.; SHODA, L.K.; BRAYTON, K.A.; ESTES, D.M. PALMER, G.H.; BROWN, W.C. Induction of interleukin-6 and interleukin-12 in bovine B lymphocytes, monocytes,

and macrophages by a CpG oligodeoxynucleotide containing the GTCGTT motif. **J. Interferon. Cytokine Res.** v. 21, p. 871-881, 2001.

ZHOU, Y.; BAO, S.; ROTHWELL, T.L.; HUSBAND, A.J. Differential expression of interleukin 5 mRNA cells and eosinophils in *Nippostrongylus brasiliensis* infection in resistant and susceptible strains of mice. **Eur. J. Immunol.** v. 26, p. 2133-2139, 1996.

ANEXOS

OPG

Animal	Grupo	Dias											
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	63	67	73
1	I	0	0	0	150	400	600	650	550	250	1650	125	600
2	IV	0	100	0	500	2150	3100	4650	4100	3450	2450	2150	1250
3	II	0	50	0	700	1300	1750	700	650	1000	450	450	550
4	II	0	0	0	250	1500	2750	450	650	2100	1050	750	850
5	I	0	50	0	200	1550	3650	1050	1200	650	650	1350	1200
6	I	0	50	0	950	1400	3550	750	1100	1600	250	800	700
7	IV	0	0	0	2400	350	700	700	950	700	1700	450	650
8	III	0	0	0	1550	3750	3450	850	750	500	1500	1000	650
9	II	0	0	0	2550	3400	5050	3500	1200	1050	1500	750	1050
10	IV	0	0	0	450	2300	5700	1250	2600	1950	1950	1500	1550
11	I	0	0	0	400	3550	4500	800	1350	1650	1600	1400	1550
12	III	0	0	0	950	1850	1700	400	750	650	450	300	0
13	III	0	100	0	150	800	1250	100	250	450	950	400	650
14	II	0	0	0	1000	2450	2950	700	600	250	600	400	650
15	III	0	0	0	1000	2700	5950	1050	750	200	500	600	1350

Anexo 1: Valores Individuais de OPG, realizado semanalmente. Resultados expressos em ovos por grama de fezes. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

IgE

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	8.72	6.3	13.64	14.07	11.01	20.12	11.72	14.99	8.51	35.9	29.9
2	IV	0.33	0.78	7.51	2.69	8.12	2.33	0.72	1.3	8.51	0.21	1.01
3	II	0.98	1.6	0.81	5.38	8.32	3.35	4.88	3.3	6.01	9.58	2.46
4	II	1.56	1.21	2.55	14.4	7.16	7.97	6.08	7.87	8.89	9.11	8.49
5	I	1.09	3.8	2.38	8.33	8.51	7.2	11.7	5.55	4.95	4.15	1.95
6	I	0.44	1.58	1.98	8.25	5.62	7.36	7.8	9.46	3.7	1.25	3.3
7	IV	3.17	2.19	1.81	3.57	6.1	8.07	2.92	6.42	1.67	2.61	8.19
8	III	1.49	2.28	8.29	11.7	12.5	16.65	8.8	17.83	22.21	1.213	6.98
9	II	0.24	1.58	1.85	11.39	9.31	11.37	7.46	2.56	8.23	11.67	4.49
10	IV	7.32	8.24	4.11	13.28	8.11	15.2	13.01	11.48	4.14	10.94	1.8
11	I	4.77	8.72	0.29	4.49	8.72	2.27	3.6	0.44	6.5	3.9	0.05
12	III	2.76	3.49	0.49	5.75	5.52	5.69	1.04	0.8	1.63	6.01	2.73
13	III	6.06	5.4	2.19	7.3	6.1	8.34	3.16	5.89	3.4	2.91	1.63
14	II	9.21	9.63	4.07	13.83	9.56	14.11	16.96	11.79	10.15	3.88	9.64
15	III	4.93	6.69	2.77	8.1	5.6	5.06	4.4	1.09	3.43	3.57	2.45

Anexo 2: Valores individuais de IgE, dosado semanalmente. Resultados expressos em U/mL. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Proliferação – Con-A

Animal	Grupo	Dias								
		0	7	14	21	28	35	42	48	63
1	I	30.3	3.53	2.19	2.98	2.25	14.37	4.89	0.88	7.3
2	IV	1.26	0.78	1.52	1.16	11.72	11.26	2.44	5.89	6.5
3	II	0.71	0.79	0.8	1.22	8.7	1.02	3.04	2.19	28.2
4	II	1.12	1.77	1.63	1.5	4.23	10.39	2.61	0.82	9.5
5	I	1.51	1.56	1.12	1.93	7.85	4.21	13.29	2.11	9.42
6	I	1.17	1.05	1.4	2.67	9.92	8.39	5.22	8.96	8.2
7	IV	2.05	0.95	1.99	0.94	7.83	9.1	7.83	5.18	4.91
8	III	0.41	1.09	1.04	7.89	7.26	8.25	6.78	0.66	3.66
9	II	4.87	4.26	1.51	0.87	13.88	6.94	5.4	3.11	10.2
10	IV	3.77	1.44	1.57	1.12	1.07	1.86	2.18	6.45	2.5
11	I	3.76	2.18	3.94	3.3	4.03	6.86	4.19	12.56	5.34
12	III	3.21	1.07	2.98	1.99	15.12	7.62	6.74	4.72	5.12
13	III	0.66	1.5	10.46	6.57	5.45	6.32	2.24	2.71	2.13
14	II	20.19	0.79	8.98	1.92	26.76	6.72	2.91	43.77	12.3
15	III	1.12	14.18	7.31	5.56	24.58	12.86	2.37	10.87	1.89

Anexo 3: Valores individuais do Índice de estimulação de linfócitos *in vitro* na presença do mitógeno Con-A, realizados durante todo o experimento. Considera-se o índice de estimulação positivo $\geq 2,0$. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Proliferação – Extrato de Larvas

Animal	Grupo	Dias								
		0	7	14	21	28	35	42	48	63
1	I	1.77	2.63	0.39	0.55	3.5	2.69	2.76	0	0.12
2	IV	0.7	1.82	0.71	0.93	1.71	1.54	0.94	0.21	1.24
3	II	1.07	0.38	0.15	0.21	0.15	0.23	0.08	0.23	1.23
4	II	1.77	0.31	0.74	0.74	1.26	0.75	1.75	1.77	0.82
5	I	0.8	0.33	0.62	0.92	0.52	1.09	1.19	1.12	0.33
6	I	0.34	0.55	0.58	0.69	0.43	2.47	1.55	1.47	0.98
7	IV	0.69	0.41	0.48	0.68	2.05	1.23	1.88	1.23	0.4
8	III	0.99	0.76	0.53	0.7	1.85	2.22	2.41	1.25	0.94
9	II	0.73	0.42	0.5	0.48	4.16	2.45	1.46	0.67	0.75
10	IV	0.17	1.03	0.89	0.23	0.81	6.52	0.79	2.11	1.37
11	I	1.83	1.36	0.68	0.55	0.45	0.21	0.87	1.56	1.31
12	III	1.31	0.37	0.98	0.82	3.1	0.76	1.72	1.01	0.64
13	III	0.37	0.76	0.97	0.89	5.32	3.25	1.23	1.16	1.14
14	II	1.09	1.15	6.16	0.48	3.19	2.45	2.45	1.59	1.33
15	III	1.89	0.21	0.7	0.79	8.1	2.89	2.31	0.88	0.85

Anexo 4: Valores individuais do Índice de estimulação de linfócitos *in vitro* na presença de extrato de larvas, realizados durante todo o experimento. Considera-se o índice de estimulação positivo $\geq 2,0$. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Eritrócitos

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	7.98	7.71	6.56	6.36	6.65	8.06	11.2	8.16	8.25	9.52	9.63
2	IV	9.79	8.63	8.42	7.49	7.83	6.01	6.13	6.11	5.67	7	7.04
3	II	9.36	9.04	9.16	8.79	8.32	8.61	10.17	8.76	9.48	12.89	10.28
4	II	10.63	7.43	8.93	7.42	7.07	10.17	10.14	8.38	9.24	9.73	8.46
5	I	9.56	10.91	12.08	8.77	8.54	8.03	8.19	8.9	7.84	8.97	11.57
6	I	7.34	8.56	8.8	7.55	8.22	6.24	7.82	8.07	7.87	10.19	8.59
7	IV	10.83	7.91	9.15	7.64	7.52	8	10.88	10.32	9.3	10.51	9.97
8	III	7.6	8.16	8.77	7.94	7.33	8.28	10.94	9.47	8.64	12.31	10.65
9	II	7.2	7.76	7.39	7.32	6.19	7.57	7.96	7.45	8.22	14.57	8.87
10	IV	7.7	7.14	7.67	7.76	7.84	7.51	6.75	6.5	6.91	8.57	8.16
11	I	8.8	9.8	10.96	8.37	7.37	6.52	10.03	8.8	9.09	10.74	9.94
12	III	6.3	7.18	8.08	6.94	8.13	6.31	9.05	8.29	8.51	9.33	10.7
13	III	8.12	8.64	9.42	7.32	9.95	8.87	7.88	9.64	11.53	15	11.29
14	II	8.6	7.72	8.69	9.5	7.98	8.26	8.57	7.7	9.66	11.54	8.43
15	III	8	7.48	8.7	8.58	7.65	6.39	7.27	7.37	8.3	8.79	8.84

Anexo 5: Valores individuais de eritrócitos, realizados semanalmente. Resultados expressos em $1 \times 10^6/\mu\text{L}$. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Hemoglobina

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	8.5	8.7	7.5	7.8	9.4	10.2	10.4	10.3	9.4	11.5	11.6
2	IV	9.3	9.7	8.9	7.7	8.5	7.8	8	7.2	7.6	9.2	9.3
3	II	10	10.8	11.1	10.3	8.2	10.7	9.6	10.7	10.5	12.8	12.4
4	II	9.3	10.1	10.9	9.8	10.4	10.1	10.4	11.4	10.8	12	10.9
5	I	10.5	12.1	11.5	10.5	10.8	9.8	11	11.2	9.6	12.3	11.9
6	I	10.7	10.2	10.3	9.3	10.2	9.1	10.4	10.7	10.2	12	11.7
7	IV	9.3	10.7	10.4	9.2	10.6	10.9	11.5	10.7	11.8	11.6	12
8	III	8.5	9.5	10.2	8.7	10.2	9.5	10	11.3	10.3	11.9	11.7
9	II	8.5	9.6	9.7	8.5	8.5	7.8	8.5	8.7	9.1	10.3	10.3
10	IV	8	9.1	9.6	8.9	9.3	8.9	8.8	8.6	8	9.9	10.1
11	I	11.5	12.3	11.7	10.7	10.8	9.5	11.3	11.4	11.3	13.3	13.1
12	III	8.2	9.2	10.5	8.2	9.5	10.3	11.5	11.9	11.4	12.9	11.9
13	III	8.5	10	10.8	9.5	11.3	10.7	8.9	11.2	11.1	12.9	12
14	II	8.5	9.2	9.7	8.4	9.1	9.4	9	9.8	10.2	11.5	10.9
15	III	9.8	10.1	10.8	8.9	10	8.6	9.4	11.3	10.5	12.3	11.1

Anexo 6: Valores individuais referentes a dosagem de Hemoglobina, realizada semanalmente. Resultados expressos em g/dL. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Hematócrito

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	26	26	23	24	26	28	31	30	28	31	31
2	IV	30	30	28	25	24	23	24	24	27	25	27
3	II	29	31	33	30	30	28	27	31	29	35	34
4	II	30	32	33	32	30	30	31	35	32	34	33
5	I	29	36	34	33	30	28	30	32	29	31	35
6	I	30	30	31	29	29	27	31	31	30	32	32
7	IV	35	33	33	24	29	32	35	34	35	32	34
8	III	27	29	30	31	29	28	30	32	30	32	32
9	II	25	27	29	26	24	22	25	25	25	28	29
10	IV	26	28	30	30	27	26	27	26	24	29	30
11	I	36	38	35	29	31	27	34	34	34	36	37
12	III	24	27	29	25	27	28	30	34	33	35	34
13	III	25	29	32	30	31	29	25	32	32	38	37
14	II	26	29	29	26	26	26	27	27	29	33	30
15	III	30	30	30	29	28	25	28	32	29	34	31

Anexo 7: Valores individuais de Hematócrito, realizado semanalmente. Resultados expressos em %. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

VCM

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	32.6	33.7	35.1	37.7	39.1	34.7	27.7	36.8	33.9	32,6	32.2
2	IV	30.6	34.8	33.3	33.4	30.7	38.3	39.2	39.3	47.6	35,7	38.4
3	II	31	34.3	36	34.1	36.1	32.5	26.5	35.4	30.6	27,2	33.1
4	II	28.2	43.1	37	43.1	42.4	29.5	30.6	41.8	34.6	34,9	39
5	I	30.3	33	28.1	37.6	35.1	34.9	36.6	36	37	34,6	30.3
6	I	40.9	35	35.2	38.4	35.3	43.3	39.6	38.4	38.1	31,4	37.3
7	IV	32.3	41.7	36.1	31.4	38.6	40	32.2	32.9	37.6	30,4	34.1
8	III	35.5	35.5	34.2	39	39.6	33.8	27.4	33.8	34.7	26,0	30
9	II	34.7	34.8	39.2	35.5	38.8	29.1	31.4	33.6	30.4	19,2	32.7
10	IV	33.8	39.2	39.1	38.7	34.4	34.6	40	40	34.7	33,8	36.8
11	I	40.9	38.8	31.9	34.6	42.1	41.4	33.9	38.6	37.4	33,5	37.2
12	III	38.1	37.6	35.9	36	33.2	44.4	33.1	41	38.8	37,5	31.8
13	III	30.8	33.6	34	41	31.2	32.7	31.7	33.2	27.8	25,3	32.8
14	II	30.2	37.6	33.4	27.4	32.6	31.5	31.5	35.1	30	28,6	35.6
15	III	37.5	40.1	34.5	33.8	36.6	39.1	38.5	43.4	34.9	38,7	35.1

Anexo 8: Valores individuais de VCM, realizado semanalmente. Resultados expressos em fL. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

HCM

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	10.6	11.3	11.4	12.3	14.1	12.7	9.3	12.6	11.4	12.1	12
2	IV	9.5	11.2	10.6	10.3	10.9	13	13.1	11.8	13.4	13.1	13.2
3	II	10.7	11.9	12.1	11.7	9.9	12.4	9.4	12.2	11.1	9.9	12.1
4	II	8.8	13.6	12.2	13.2	14.7	9.9	10.3	13.6	11.7	12.3	12.9
5	I	11	11.1	9.5	12	12.6	12.1	13.4	12.6	12.2	13.7	10.3
6	I	14.5	11.9	11.7	12.3	12.4	14.6	13.3	13.3	13	11.8	13.6
7	IV	8.6	13.5	11.4	12	14.1	13.6	10.6	10.4	12.7	11	12
8	III	11.2	11.6	11.6	11	13.9	11.4	9.1	11.9	11.9	9.7	11
9	II	11.8	12.4	13.1	11.6	13.7	10.3	10.7	11.7	11.1	7.1	11.6
10	IV	10.4	12.7	12.5	11.5	11.9	11.9	13	13.2	11.6	11.6	12.4
11	I	13.1	12.6	10.7	12.8	14.7	14.6	11.3	13	12.4	12.4	13.2
12	III	13	12.8	13	11.8	11.7	16.3	12.7	14.4	13.4	13.8	11.1
13	III	10.5	11.6	11.5	13	11.4	12	11.3	11.6	9.6	8.6	10.6
14	II	9.9	11.9	11.2	8.8	11.4	11.3	10.5	12.7	10.6	10	12.9
15	III	12.3	13.5	12.4	10.4	13.1	13.5	12.9	15.3	12.7	14	12.6

Anexo 9: Valores individuais de HCM, realizado semanalmente. Resultados expressos em pg. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

CHCM

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	32.7	33.5	32.6	32.5	36.2	36.4	33.5	34,3	33.6	37.1	37.4
2	IV	31.1	32.3	31.8	30.8	35.4	33.9	33.3	30,0	28.1	36.8	34.4
3	II	34.5	34.8	33.6	34.3	27.3	38.2	35.6	34,5	36.2	36.6	36.5
4	II	31.1	31.6	33	30.6	34.7	33.7	33.5	32,6	33.8	35.3	33
5	I	36.2	33.6	33.8	31.8	36	34.8	36.7	35,0	33.1	39.7	34
6	I	35.5	34	33.2	32.1	35.2	33.7	33.5	34,5	34	37.5	36.6
7	IV	26.6	32.4	31.5	38.3	36.6	33.9	32.9	31,5	33.7	36.3	35.3
8	III	31.4	32.8	34	28.1	35.2	33.8	33.3	35,3	34.3	37.2	36.6
9	II	34	35.6	33.4	32.7	35.4	35.5	34	34,8	36.4	36.8	35.5
10	IV	30.7	32.5	32	29.7	34.4	34.2	32.6	33,1	33.3	34.1	33.7
11	I	31.9	32.4	33.4	36.9	34.8	35.2	33.2	33,5	33.2	36.9	35.4
12	III	34	34.1	36.2	32.8	35.2	36.8	38.3	35,0	34.5	36.9	35
13	III	34	34.5	33.8	31.7	36.5	36.7	35.6	35,0	34.7	33.9	32.4
14	II	32.7	31.7	33.4	32.3	35	36	33.3	36,3	35.2	34.8	36.3
15	III	32.7	33.7	36	30.7	35.7	34.4	33.6	35,3	36.2	36.2	35.8

Anexo 10: Valores individuais de CHCM, realizado semanalmente. Resultados expressos em %. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Leucócitos Totais

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	6825	8085	6983	5460	4200	5250	6668	4253	5723	6563	5723
2	IV	3308	4883	3990	4305	4568	3150	4568	3518	7088	6510	3465
3	II	4043	6143	4515	3465	4725	3150	5250	5040	6458	6563	6405
4	II	3518	3255	4673	3308	4463	4830	6038	4935	6615	5145	5618
5	I	2783	4673	3780	4358	3308	3780	4515	4200	3938	5093	6720
6	I	4043	3675	4043	3675	5513	3623	4778	4673	5985	7560	6930
7	IV	4095	4358	3990	4725	7403	5093	7560	5880	6458	8190	9765
8	III	2730	4253	4725	3255	4305	4463	6563	3570	7560	5513	8085
9	II	3518	3675	3728	4095	3990	3623	3990	3308	5145	4988	6668
10	IV	4883	3308	3990	4148	3465	2625	3413	2678	4200	3938	4515
11	I	4358	4988	3675	5040	5303	5250	6248	5040	5985	7035	6720
12	III	4620	5828	5618	5040	5040	4988	7665	5460	8348	7245	9398
13	III	4988	4673	6143	3255	7298	4725	4200	7455	7770	6510	7770
14	II	3938	3465	4095	4358	3938	3938	5250	4043	5250	6090	4515
15	III	3150	3833	3675	3203	4358	2940	4620	3780	5513	4358	4883

Anexo 11: Valores individuais referentes a contagem total de leucócitos, realizada semanalmente. Resultados expressos em cels/ μ L. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Linfócitos

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	1706.5	1778.7	1606.1	2184.0	1762.0	1470.0	2067.1	680.5	2117.5	3019.0	2289.2
2	IV	2150.2	2783.3	2992.5	2798.3	3151.9	1606.5	2649.4	2040.4	3331.4	3906.0	2321.6
3	II	1819.4	1597.2	2076.9	797.0	1512.0	1386.0	2887.5	1864.8	3358.2	3347.1	3394.7
4	II	1759.0	1790.3	2616.9	1521.7	2722.4	2994.6	2294.4	3109.1	4564.4	3087.0	3820.2
5	I	1252.4	2336.5	1701.0	1961.1	1852.5	2381.4	3070.2	2226.0	2441.6	2393.7	4300.8
6	I	2385.4	1984.5	1293.8	845.3	1874.4	1811.5	2102.3	1822.5	3531.2	3931.2	3465.0
7	IV	1801.8	2527.6	1077.3	1795.5	2146.9	2139.1	2948.4	1940.4	3422.7	4750.2	3710.7
8	III	1337.7	1913.9	1984.5	1529.9	2238.6	1919.1	3872.2	1856.4	4006.8	3859.1	4931.9
9	II	1864.5	1543.5	1901.3	1228.5	1795.5	1630.4	1635.9	959.3	3292.8	2743.4	4000.8
10	IV	2490.3	1257.0	1157.1	1493.3	1697.9	1312.5	1535.9	1017.6	2100.0	1457.1	1896.3
11	I	1656.0	1995.2	992.3	1864.8	2598.5	2887.5	2999.0	2721.6	3052.4	4080.3	4300.8
12	III	3049.2	3088.8	3089.9	2217.6	2116.8	2693.5	3679.2	3221.4	4257.5	4491.9	6390.6
13	III	3491.6	2663.6	3993.0	1562.4	2919.2	1748.5	1848.0	4398.5	5158.2	3906.0	5516.7
14	II	2126.5	1247.4	1228.5	1220.2	866.4	1654.0	2047.5	1132.0	2362.5	1827.0	1580.3
15	III	1638.0	1763.2	1727.3	1665.6	1743.2	1734.6	1801.8	2041.2	3142.4	2702.0	3027.5

Anexo 12: Valores individuais referentes a contagem de linfócitos, realizada semanalmente. Resultados expressos em $\text{cels}/\mu\text{L}$. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Neutrófilos

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	4777.5	5659.5	4259.6	2511.6	1722.0	2992.5	3000.6	2849.5	2689.8	2756.5	2747.0
2	IV	992.4	1904.4	598.5	947.1	1050.6	1260.0	1461.8	1090.6	3331.4	1822.8	866.3
3	II	2183.2	3685.8	1760.9	2286.9	2882.3	1638.0	2100.0	2469.6	2260.3	2822.1	2433.9
4	II	1688.6	4074.2	1588.8	1488.6	1517.4	1545.6	2354.8	1529.9	1719.9	1697.9	1404.5
5	I	1363.7	1628.3	1663.2	1961.1	1157.8	1134.0	993.3	1596.0	1336.9	2291.9	1881.6
6	I	1576.8	1470.0	2304.5	2315.3	3307.8	1630.4	1863.4	2243.0	1735.7	2646.0	2286.9
7	IV	2006.6	1748.2	2553.6	2409.8	3923.6	2139.1	3299.6	2352.0	2066.6	3112.2	3906.0
8	III	1337.7	1998.9	2315.3	1595.0	1894.2	2097.6	2559.6	1392.3	3024.0	1433.4	2910.6
9	II	1020.2	1874.3	1342.1	2538.9	1635.9	1739.0	1675.8	1918.6	1389.2	1895.4	2000.4
10	IV	2148.5	1720.2	2673.3	2530.3	1420.7	1207.5	1467.6	1499.7	1638.0	2087.1	2393.0
11	I	1830.4	2244.6	2058.0	1915.2	1909.1	2205.0	2124.3	1562.4	2573.6	2180.9	1948.8
12	III	785.4	2564.3	2078.7	2318.4	2116.8	1895.4	2989.4	1856.4	2420.9	2101.1	2725.4
13	III	997.6	1495.4	1658.6	1497.3	3576.0	2646.0	1428.0	2385.6	2253.3	2408.7	1398.6
14	II	827.0	1663.2	1760.9	2571.2	2638.5	1732.7	1522.5	1617.2	1365.0	3654.0	1986.6
15	III	913.5	1916.5	1653.8	1217.1	2353.3	1029.0	2679.6	1247.4	2150.1	1307.4	1562.6

Anexo 13: Valores individuais referentes a contagem de neutrófilos, realizada semanalmente. Resultados expressos em cels/ μ L. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Monócitos

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	0.0	161.7	0.0	0.0	126.0	52.5	66.7	0.0	57.2	0.0	57.2
2	IV	99.2	97.7	119.7	86.1	0.0	31.5	45.7	70.4	0.0	65.1	0.0
3	II	0.0	0.0	45.2	34.7	0.0	0.0	0.0	50.4	129.2	0.0	0.0
4	II	0.0	97.7	140.2	66.2	89.3	0.0	0.0	49.4	0.0	0.0	56.2
5	I	27.8	327.1	75.6	174.3	165.4	0.0	90.3	0.0	0.0	0.0	67.2
6	I	0.0	36.8	161.7	183.8	55.1	0.0	0.0	93.5	119.7	0.0	0.0
7	IV	0.0	43.6	119.7	94.5	74.0	50.9	0.0	117.6	64.6	0.0	0.0
8	III	54.6	127.6	141.8	32.6	129.2	267.8	0.0	35.7	151.2	0.0	80.9
9	II	351.8	36.8	261.0	122.9	79.8	36.2	0.0	33.1	102.9	49.9	0.0
10	IV	195.3	33.1	39.9	0.0	69.3	52.5	34.1	0.0	168.0	39.4	90.3
11	I	348.6	249.4	147.0	302.4	318.2	0.0	187.4	403.2	0.0	70.4	0.0
12	III	554.4	0.0	112.4	50.4	151.2	149.6	76.7	54.6	0.0	0.0	94.0
13	III	299.3	373.8	61.4	65.1	291.9	141.8	42.0	223.7	77.7	65.1	543.9
14	II	787.6	69.3	81.9	43.6	78.8	196.9	157.5	80.9	0.0	0.0	45.2
15	III	598.5	76.7	73.5	32.0	217.9	0.0	46.2	151.2	0.0	174.3	244.2

Anexo 14: Valores individuais referentes a contagem de monócitos, realizada semanalmente. Resultados expressos em cels/ μ L. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Eosinófilo

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	341.3	566.0	1117.3	764.4	588.0	735.0	1533.6	723.0	858.5	787.6	629.5
2	IV	66.2	97.7	279.3	473.6	365.4	252.0	411.1	316.6	425.3	716.1	277.2
3	II	40.4	860.0	632.1	346.5	330.8	126.0	262.5	655.2	710.4	393.8	576.5
4	II	70.4	293.0	327.1	231.6	133.9	289.8	181.1	246.8	330.8	360.2	337.1
5	I	189.2	327.1	640.2	261.5	132.3	164.6	361.2	378.0	157.8	407.4	470.4
6	I	485.2	183.8	283.0	330.8	275.7	181.3	812.3	514.0	598.5	982.8	1178.1
7	IV	286.7	43.6	239.4	425.3	1258.5	763.5	1512.0	1470.0	904.1	327.6	2148.3
8	III	0.0	212.7	283.5	97.7	43.1	178.5	131.3	285.6	378.0	220.5	161.7
9	II	281.4	220.5	223.7	204.8	478.8	217.4	678.3	397.0	360.2	299.3	666.8
10	IV	48.8	297.7	119.7	124.4	277.2	52.5	375.4	160.7	294.0	354.4	135.5
11	I	523.0	498.8	477.8	957.6	477.3	157.5	937.2	352.8	359.1	703.5	470.4
12	III	231.0	174.8	337.1	453.0	655.2	249.4	919.8	327.6	1669.6	652.1	563.9
13	III	199.5	140.2	430.0	130.2	510.9	236.3	882.0	447.3	310.8	130.2	310.8
14	II	196.9	485.1	1023.8	523.0	354.4	354.4	1522.5	1212.9	1522.5	609.0	903.0
15	III	0.0	76.7	220.5	288.3	43.6	176.4	92.4	340.2	220.5	174.3	48.8

Anexo 15: Valores individuais referentes a contagem de eosinófilo, realizada semanalmente. Resultados expressos em cels/ μ L. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Proteínas Plasmáticas

Animal	Grupo	Dias										
		0	7	14	21	28	35	42	48	53	67	73
1	I	7.2	7.8	8	7.2	6.6	6.8	7	6.8	6.4	6.8	6.6
2	IV	6.6	6.2	6.4	6	5.8	5.6	5.2	5.8	6.8	5.8	5.4
3	II	6.8	6.4	7	6.2	6	5.8	6	6.2	6	6.8	6.6
4	II	6.2	6.6	7	6.6	6	5.6	6	6.4	6	6.6	6.2
5	I	7	7	7	7.2	6.6	6.4	6.4	6.4	6	6.4	6.6
6	I	6	6.4	6.2	6	6.6	5.2	5.6	5.8	5.6	6.2	6
7	IV	6.6	6.2	6.4	6	6	6	5.8	6.2	6	6.2	5.8
8	III	6.2	6.6	6.4	6.6	6.4	6.4	6	6.2	6.2	6.8	6.2
9	II	6	6.2	6.2	6.2	5.8	5.8	5.8	6	6	6.4	6
10	IV	6.8	6.8	6.8	6.4	6.2	5.8	5.4	5.8	5.6	5.8	5.8
11	I	6.6	6.8	6.6	6.4	6.2	5.6	5.8	6.2	6	6.4	6.4
12	III	6.6	6.8	6.4	5.8	5.6	5.6	5.2	5.8	5.6	6.2	5.8
13	III	6.4	6.8	7	6.2	6.2	6	5.6	6	6	6.6	6.2
14	II	6.8	7.2	7	6.4	6	6.8	6.2	6.2	6.6	7	6.8
15	III	6.8	6.6	6.8	6.4	6.4	6	6	6.4	6	7	6.4

Anexo 16: Valores individuais referentes a dosagem de proteínas plasmáticas, realizada semanalmente. Resultados expressos em g/dL. Os animais receberam tratamento no dia 35. Grupo I: composto misto de LPS (*E. coli*) + *P. acnes* e moxidectina; Grupo II: *P. acnes* e moxidectina; Grupo III: moxidectina; Grupo IV: salina (controle).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)