

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO IMUNOESTIMULANTE DA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA DA *PROPIONIBACTERIUM*
ACNES NO CONTROLE DA VERMINOSE
EM OVINOS**

Tatiana Venturini Ferreira

São Paulo

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO IMUNOESTIMULANTE DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA
DA *PROPIONIBACTERIUM ACNES* NO CONTROLE DA
VERMINOSE EM OVINOS**

Tatiana Venturini Ferreira

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

Área de Concentração: Imunopatologia

Orientador: Profa Dra Lucia Jamli Abel

São Paulo

2010

Ferreira, Tatiana Venturini

Efeito imunoestimulante da fração polissacarídica da *Propionibacterium acnes* no controle da verminose em ovinos/ Tatiana Venturini Ferreira – São Paulo, 2010.

56f. Il. Color.

Dissertação (Mestrado) – Apresentado ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2010.

Área de concentração: Imunopatologia

“Orientação: Prof^a Dr^a Lucia Jamli Abel”

1. Verminose. 2. *Haemonchus contortus*. 3. Imunoestimulante.
4. Ovinos. L. Título

UNIVERSIDADE PAULISTA

Programa de Mestrado em Medicina Veterinária

Candidata Tatiana Venturini Ferreira

Título da Dissertação Efeito Imunoestimulante da Fração Polissacarídica do *Propionibacterium acnes* no controle da verminose em ovinos

Orientadora Profa Dra Lucia Jamli Abel

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../..... considerou a candidata:

Aprovada

Reprovada

1) Examinador(a) _____

Nome _____

Instituição _____

2) Examinador(a) _____

Nome _____

Instituição _____

3) Examinador(a) _____

Nome _____

Instituição _____

**"Viver não é esperar a
tempestade passar... é
aprender como dançar na
chuva."**

(desconhecido)

AGRADECIMENTOS

A meus pais Armando e Maria Luisa e meus irmãos Marcos e Fabio pela paciência, amor, carinho, apoio e incentivo inesgotável, minha gratidão eterna.

Às minhas cunhadas, Fernanda e Marina, pelo apoio, carinho, conselhos, torcida e cuidados.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Lúcia Jamli Abel pela orientação, confiança, apoio, amizade, paciência e pelos ensinamentos.

À Prof.^a Dr.^a Ieda Longo Maugéri, pela colaboração importante no desenvolvimento deste trabalho e cessão do polissacarídeo de *P. acnes*.

Às colegas Carla e a Juliana pelas sugestões técnicas na execução das análises realizadas na UNIFESP.

Às amigas, que sempre estiveram ao meu lado, em todos momentos da minha vida, me apoiando sempre, Sabrina Estrela, Mirian Prado, Juliana Coelho, Juliana Buzzini, Juliana Sawada, Alex Sawada, Andrea Pinheiro, Carol, Neca, Renatinha, Fabiula, Paula e Tia Eliza.

Ao Dr Richard Shaw do Hopkirk Research Institute, AgResearch Grasslands Research Centre, New Zealand, pela cessão dos anticorpos monoclonais para detecção de IgE

A Dr.^a Leoni Bonamim pela sempre disposição em auxiliar no projeto e nas questões sobre histopatologia.

A Prof.^a Dr.^a Selene Dall'Acqua e Prof. Dr.^a Vânia, pelo apoio, paciência, amizade e boas energias.

À Prof.^a Dr.^a Ana Flavia Popi pela disposição em explicar técnicas que foram empregadas no projeto.

Aos professores Drs. da Pós-Graduação pelos ensinamentos sobre Imunopatologia Veterinária.

Ao Prof. Carlos Brunner pelo auxílio da determinação e padronização da técnica cirúrgica empregada.

À Lika Osigui, responsável técnica pelo laboratório, obrigada pelos ensinamentos, pela amizade, companheirismo e risadas desde o início do mestrado, e funcionárias do laboratório.

Ao técnico do laboratório de histologia Paulo, pela inclusão das amostras em parafina e pelo preparo das lâminas de histologia.

Às colegas Maria Carolina S. R. de Assis e Érica Baroni pela amizade, pela ajuda com os animais e com as análises, pela companhia nas viagens, pelas risadas e apoio.

Aos alunos de medicina veterinária da Universidade Paulista, Marcus e Monica Moser, pela ajuda com os animais.

Às técnicas do laboratório de hematologia Fabrícia e Mônica, e pelo auxílio da Dra Ana Carla do Hospital Veterinário da UNIP.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Muito obrigada!!!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ovinos da raça Ile de France P.O. (puro de origem) utilizados no estudo.....	9
FIGURA 2	Tratamento da verminose natural de 10 ovinos Moxidectina (Cydectin [®]), Sulfaquinoxali sódica (Coccifin [®]), Ivermectina (Ivomec [®]) e Nitroxil (Dovenix Supra [®]). Os valores representam a média dos OPG de 10 ovinos em cada semana	10
FIGURA 3	Identificação do linfonodo abomasal no ligamento rumino-abomasal.....	15
FIGURA 4	Localização e identificação do linfonodo abomasal.....	15
FIGURA 5	Valores médios de OPG nos animais do grupo controle (n=5) e tratado (n=5). Os animais tratados receberam 3 doses da fração polissacarídica do <i>Propionibacterium acnes</i> (300ug/ml).....	21
FIGURA 6	Representação da análise de células do linfonodo abomasal para expressão de moléculas T CD4+ e MHC de classe II por citometria de fluxo de células de ovinos controle (A) e tratados com fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> (B).....	23
FIGURA 7	Valores médios de eritrócitos (10 ⁶ /μL). Animais do grupo Tratado (n=5) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina	24
FIGURA 8	Valores médios do Hematócrito (%). Animais do grupo Tratado (n=5) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.....	25
FIGURA 9	Valores médios de leucócitos totais (10 ⁶ /μL). Animais do grupo Tratado (n=5) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.....	26
FIGURA 10	Valores médios de neutrófilos (10 ⁶ /μL). Animais do grupo Tratado (n=5) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução.....	27

FIGURA 11	Valores médios de eosinófilos ($10^6/\mu\text{L}$). Animais do grupo Tratado (n=5) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.....	28
FIGURA 12	Valores médios de linfócitos ($10^6/\mu\text{L}$). Animais do grupo Tratado (n=5) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.....	29
FIGURA 13	Valores médios de monócitos ($10^6/\mu\text{L}$). Animais do grupo Tratado (n=5) receberam 3 ml da fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.....	30
FIGURA 14	Valores médios de proteínas (g/dL). Animais do grupo Tratado (n=5) receberam 3 ml da fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.....	31
FIGURA 15	Valores médios de imunoglobulinas (g/dL). Animais do grupo Tratado (n=5) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.....	32
FIGURA 16	Contagem de ovos nas fezes (OPG) e contagem de ovos no abomaso de animais do grupo controle (n=3) e grupo tratado (n=3).....	33
FIGURA 17	Valores médios de IgE (UI/ml) nos animais do grupo tratado com fração fpolissacarídica de <i>P. acnes</i> (300 ug/ml) (n=5) e os animais do grupo controle (n=5).....	34
FIGURA 18	Valores médios de IL-5 (pg/ml) nos animais do grupo tratado com fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> (300 ug/ml) (n=5) e os animais do grupo controle (n=5).....	35

- FIGURA 19** Representação esquemática de cortes da região fúndica, cárdica e pilórica do abomaso de ovinos tratados com *P. acnes* e sem tratamento (controle). HE, aumento 10X.....37
- FIGURA 20** Análise microscópica dos linfonodos abomasais de ovinos tratados com 3 doses de *P. acnes* e animais controle. Observar presença de numerosos leucócitos globulares, linfócitos e plasmócitos. Seta indica a presença de linfócitos. HE, Objetiva de 120x.....38
- FIGURA 21** Porcentagem de mastócitos degranulados da região fúndica de ovinos do grupo controle e tratados com *P.acnes*.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação Clínica dos 5 ovinos antes (A) e depois (B) das aplicações da fração polissacarídica de <i>Propionibacterium acnes</i>	22
Tabela 2	Matriz de correlação entre OPG e o número de leucócitos.....	26
Tabela 3	Matriz de correlação entre OPG e o número de eosinófilos.....	28
Tabela 4	Matriz de correlação entre OPG e o número de linfócitos.....	29
Tabela 5	Análise histológica da região cárdica, fúndica e pilórica do abomaso e reatividade dos linfonodos de ovinos tratados com <i>P. acnes</i> e animais controle.....	36

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Parâmetros utilizados na análise histológica do abomaso de ovinos.....	17
QUADRO 2	Parâmetros histológicos dos mastócitos degranulados e não degranulados da região fúndica do abomaso de ovinos. Coloração HE, objetiva de 20X.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASPACO – associação paulista de criadores de ovinos

CSO – clara de ovo de galinha

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA – teste enzimático

GALT - tecidos linfóides associados ao intestino

GM-CSF - citocinas

H₂O₂ – água oxigenada

H. contortus. – *Haemonchus contortus*

Ig - imunoglobulina

IL-5 - interleucina

INF - interferon

L3 – estágio larval

LPS - lipopolissacarídeo

MHC – complexo de histocompatibilidade

NO - óxido nítrico

OPG – ovos por grama de fezes

OVA - ovoalbumina agregada

P. acnes – *Propionibacterium acnes*

PBS – soro fetal bovino

PFA - paraformaldeído

T. colubriformis – *Trichostrongylus colubriformis*

TNF – fator de necrose tumoral

RESUMO

Entre os efeitos exercidos pela *Propionibacterium acnes*, o mais relevante é a capacidade de modular a resposta imune celular Th1 /Th2. Recente trabalho do nosso grupo demonstrou que ovinos tratados com imunoestimulante composto de LPS e *Propionibacterium acnes* apresentaram baixa contagem de ovos nas fezes (OPG), aumento nos eosinófilos circulantes e linfócitos e também na resposta proliferativa a mitógeno. Neste trabalho nós avaliamos o efeito modulador da fração polissacarídica solúvel de *P. acnes* no tratamento da verminose em ovinos. Ovinos foram divididos em 2 grupos: I animais que receberam 3 doses de fração polissacarídica de *P. acnes* (300 ug/ml) e II-animais que receberam solução salina 0,9% (grupo controle). Nossos resultados mostraram que o OPG nos animais tratados com fração polissacarídica de *P. acnes* foi significativamente menor que o grupo controle no 7^o e 10^o dia após a primeira administração. No mesmo grupo, 5, 7 e 10 dias após o tratamento, ocorreu aumento significativo nas contagens de leucócitos circulantes e eosinófilos com aumento de linfócitos no 10^o dia quando comparado ao grupo controle. Nós observamos correlação significativa entre OPG e a contagem de leucócitos ($r=-0,6263$; $p=0,0264$); OPG e eosinófilos ($r=-0,5547$; $p=0,0481$); OPG e contagem de linfócitos ($r=-0,6084$; $p=0,0310$). Os níveis de IL-5 e IgE foram maiores no grupo tratado em relação ao controle. A porcentagem de células T CD4+ e a expressão de moléculas do MHC de classe II em células do linfonodo abomasal foram maiores nos animais do grupo tratado. Na análise histológica, a mucosa abomasal dos animais tratados apresentou uma maior atividade celular com presença de células linfóides e aumento da reatividade dos linfonodos abomasais em relação ao controle. Nossos achados sugerem que o tratamento com a fração *P. acnes* solúvel pode estimular mecanismos de resistência direcionando a resposta para o tipo Th2 com ativação de células linfóides na mucosa abomasal e linfonodos e desta forma atuar contra a infecção por nematóides.

ABSTRACT

Among the effects exerted by *Propionibacterium acnes*, a most relevant one is its capacity to modulate the Th1/Th2 cellular immune response. Recent work from our group demonstrated that sheep treated with immunostimulant composed of LPS + *Propionibacterium acnes* presented low faecal egg counts (FEC), increase on circulating eosinophils and lymphocytes and also in the lymphoproliferative response to mitogen. In this work, we evaluate the modulatory effect of the soluble polysaccharide fraction of *Propionibacterium acnes* in the treatment of verminosis in sheep. Sheep were divided into 2 groups: I- animals received 3 doses of polysaccharide fraction of *Propionibacterium acnes* (300ug/ml) and II- animals received saline solution 0.9% (control group). Our results revealed that faecal egg counts (FEC) in polysaccharide fraction of *Propionibacterium acnes* treated group was significantly lower than control on 7th and 10th days after first administration. In the same group, on 5th, 7th days and 10th days after treatment, occurred significant increase on circulating leucocytes and eosinophils with increase of lymphocytes counts on the 10th day as compared to control group. We also observed significant correlation between FEC and leucocytes counts ($r=-0,6263$; $p=0,0264$); FEC and eosinophils counts ($r=-0,5547$; $p=0.0481$); FEC and lymphocytes counts ($r=-0,6084$; $p=0,0310$). Both IL-5 and IgE levels were higher in the treated group than controls. The percentage of T CD4+ cells and the expression of MHC class II in lymph node abomasal cells were increase in the treated group. In the histological analyses, the abomasal mucosa in the treated group showed higher cellular activity with presence of lymphoid cells and increase of lymph node reactivity when compared to control. Our findings support the idea that treatment with soluble *P. acnes* polysaccharide can stimulates mechanisms of resistance driven a Th2- type response with activation of lymphoid cells in the abomasal mucosa and lymph nodes, therefore act against nematodes infection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1. Animais.....	9
3.2. Obtenção do polissacarídeo solúvel purificado de <i>P. acnes</i> (PS)..	10
3.3. Delineamento experimental- Tratamento dos animais com fração polissacarídica de <i>P. acnes</i>	11
3.4. Exame Clínico.....	11
3.5. Amostras biológicas.....	11
3.5.1. Hemograma.....	11
3.5.1.1. Contagem global de eritrócitos.....	12
3.5.1.2. Volume globular (Hematócrito).....	12
3.5.1.3. Contagem total de leucócitos.....	12
3.5.1.4. Contagem diferencial de leucócitos e caracterização morfológica dos eritrócitos.....	12
3.5.2. Amostras de fezes- Exame parasitológico.....	13
3.5.2.1. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG).....	13
3.5.2.2. Coprocultura.....	13
3.5.2.3. Identificação das larvas.....	14
3.5.3. Obtenção dos linfonodos abomasais e mesentéricos.....	14
3.5.3.1. Obtenção e cultura das células dos linfonodos abomasais.....	16
3.5.3.2. Análise histológica do material abomasal e linfonodos.....	16
3.6. Análise dos parâmetros imunológicos.....	18
3.6.1. Dosagem de proteínas totais.....	18
3.6.2. Dosagem de imunoglobulina total.....	19
3.6.3. Quantificação de IgE total no soro.....	19
3.6.4. Quantificação de IL-5 no soro.....	19
3.6.5. Análise por citometria de fluxo de células TCD4+ e	
3.6.6. expressão de MHC de classe II de células do linfonodo abomasal.....	20
3.7. Análise Estatística dos Resultados.....	20
4. Resultados.....	21
4.1. Identificação das Larvas	21
4.2. Tratamento com fração polissacarídica de <i>Propionibacterium acnes</i>	21
4.3. Exame clínico.....	22
4.4. Análise das células dos linfonodos abomasais por citometria de fluxo.....	23
5. DISCUSSÃO.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o clima de altas temperaturas e frequência de chuvas, favorece o parasitismo gastrointestinal, responsável por grande parte das perdas observadas em criações de ovinos e caprinos e reduzindo o potencial produtivo desse animais (Urquhart *et al*, 1996).

Os helmintos gastrintestinais mais importantes dos pequenos ruminantes são o *Haemonchus contortus*, a *Ostertagia* spp e o *Trichostrongylus* spp (Silva *et al.*, 2002; Molento, 2001; Prichard, 2001; Uhlinger, 1996), e o *Haemonchus contortus* é fator limitante na ovinocultura (Jasmer & MC Guire, 1996; Taylor *et al.*, 1990; AL-Quaisy, *et al.*, 1987; Gonzáles & Gonçalves, 1973; Yatsuda *et al*, 2003).

O ciclo de vida desses parasitas é direto, os ovos são liberados com as fezes, desenvolvendo-se rapidamente em larvas infectantes. Em circunstâncias ótimas, esse desenvolvimento pode levar de quatro a seis semanas e as larvas podem sobreviver na pastagem por meses. A larva infectante é ingerida com a pastagem e transforma-se em forma adulta, e cerca de duas a quatro semanas os ovos são encontrados nas fezes (Uhlinger, 1996; Soulsby, 1987).

A hemoncose, nos casos de grande infestação, pode provocar uma anemia hemorrágica aguda, pois o parasita pode chegar a consumir cerca de 0,05 mL de sangue por dia, e provocar morte súbita dos animais (Urquhart *et al*, 1996).

O grau e as consequências de uma infestação por parasitas podem estar relacionados a diferentes fatores como estresse (por alimentação, manejo e ambiente), idade do animal, espécie do parasita e genética do hospedeiro (Hawkins, 1993). A influência da idade e do sexo nas cargas de helmintos parece ser em grande parte hormonal, pois em animais em que o ciclo sexual é sazonal, os parasitas tendem a sincronizar o seu ciclo reprodutivo com os dos seus hospedeiros. Por exemplo, as ovelhas mostram elevação primaveril nos ovos de nematóides fecais coincidindo com o parto e o início da lactação. O desenvolvimento das larvas de helmintos ingeridas pelos bovinos no início do

inverno tende a ser inibido até a primavera em um fenômeno chamado hipobiose (Tizard, 2009).

Alguns trabalhos mostram que a habilidade dos ovinos adquirirem imunidade contra os nematóides gastrintestinais é controlada geneticamente e varia entre as diferentes raças (Stern & Murray, 1994).

A participação da resposta imune na verminose em ovinos pôde ser verificada em experimentos 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).

A imunidade contra nematóides adultos em ruminantes também pode se manifestar pela expulsão dos vermes adultos, por alterações na morfologia dos parasitas e pela redução na fecundidade das fêmeas. Já a resistência contra os estágios imaturos dos nematóides se manifesta pela eliminação das larvas infectantes ou pela inibição do desenvolvimento das mesmas (hipobiose) (Balic *et al.*, 2000). Os vermes podem ser eliminados pelas células efetoras da resposta imune, o que ocorre nos animais resistentes ou os parasitas podem persistir no hospedeiro como ocorre nos animais suscetíveis. A verminose pode se manifestar nos animais susceptíveis do rebanho, já em animais resistentes o parasitismo não causa prejuízos, sendo esta resistência associada à idade e raça dos animais, como observado em cordeiros da raça Santa Ines e Suffolk. A resposta imunológica além de ser controlada geneticamente é influenciada pelo meio ambiente e especialmente pela condição nutricional (Amarante, 2004).

O organismo do hospedeiro pode encontrar certa dificuldade em eliminar os parasitas, pois alguns são capazes de se adaptar ao sistema imune (Tizard, 2009; Balic *et al.*, 2006; Wakelin, 1984).

Um dos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência aos helmintos são as alterações na mucosa do trato gastrintestinal e nos tecidos linfóides, associados à hiperplasia de mastócitos, aparecimento de leucócitos globulares, eosinofilia, e a produção de anticorpos específicos contra antígenos de helmintos (Balic *et al.*, 2006). A combinação de antígenos de helmintos às IgEs ligada a mastócitos desencadeia degranulação e liberação de moléculas

vasoativas e proteases. Essas moléculas estimulam a contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular. A contração violenta dos músculos intestinais e o aumento da permeabilidade dos capilares intestinais permitem um fluxo do fluido no lúmen, levando ao desalojamento e expulsão de muitos vermes, fenômeno denominado de autocura. Os eosinófilos são atraídos aos locais de invasão de helmintos por meio de moléculas quimiotáticas liberadas por mastócitos em degranulação (Abbas *et al.*, 2008).

É conhecido o papel importante da resposta imune, mediada por linfócitos T CD4+ do tipo Th2, produtores de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, no recrutamento de eosinófilos, produção de anticorpos da classe IgE e aumento do número de mastócitos na mucosa, favorecendo a eliminação dos helmintos (Abbas *et al.*, 2008; Meeusen *et al.*, 2005). Os anticorpos IgE ligam-se à superfície de helmintos, depois os eosinófilos são ativados para secretar grânulos enzimáticos destruindo os parasitas, principalmente a principal proteína básica. 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 (Balic *et al.*, 2006; Rainbird *et al.*, 1998). A IL-4 também desempenha importante papel na ativação dos mastócitos intraepiteliais no tecido abomasal de ovinos, (Huntley *et al.*, 1992; Shaw *et al.*, 1997; Balic *et al.*, 2006).

O principal mecanismo de defesa aos parasitas helmintos é a resposta imune do tipo Th2. Nas infecções por protozoários que sobrevivem dentro de macrófagos, a ativação de macrófagos com produção de citocinas do tipo Th1 constitui o principal mecanismo de defesa. No caso da leishmaniose, a resistência à infecção está associada a uma ativação de linfócitos T CD4+ Th1 específicas com produção de INF-gama e ativação de macrófagos e destruição dos parasitas intracelulares (Abbas *et al.*, 2008).

A resposta anti-helmíntica mediada por eosinófilos IgE- constitui o mecanismo de resistência mais importante nas verminoses, e a produção de IgE é dependente de IL-5 em ovinos resistentes infectados por *Trichostrongylus colubriformis* e *Haemonchus contortus* (Pernthaner *et al.* 2005; Gill *et al.* 2000).

Em outros trabalhos, ovinos infectados por *T. colubriformis* e bovinos infectados com *Dictyocaulus viviparus*, a IgE está associada aos mecanismos

de proteção (Shaw *et al.*, 1997; Stankiewicz *et al.*, 2000; Kooyman *et al.*, 2002). Outros anticorpos produzidos por linfócitos B na vigência da infecção neutralizam proteases das larvas, bloqueiam os poros oral e anal das larvas por meio de imunocomplexos, impedem a ecdise e inibem o desenvolvimento larval (Tizard, 2009; Abbas *et al.*, 2008).

Os linfócitos T CD4+ desempenham importante papel nos mecanismos de defesa à infecção por nematóides gastrintestinais em ovinos (Katona *et al.*, 1988; Urban *et al.*, 1991; Koyama *et al.*, 1995; Karanu *et al.*, 1997).

Em outros trabalhos, os animais resistentes à verminose e tratados com anticorpos monoclonais anti-TCD4+, apresentaram uma diminuição significativa na resposta imune celular e humoral e níveis de OPG significativamente maiores em relação aos animais não tratados, sendo essa resposta associada a uma hiperplasia de mastócitos da mucosa, eosinofilia tecidual (Gill *et al.*, 2000; Penã *et al.*, 2004).

Em outro trabalho, Karanu *et al.*, 1997, demonstraram que a depleção de linfócitos TCD4+ não promovia proteção em ovinos vacinados com antígenos intestinais, quando desafiados à infecção por *H. contortus*.

De uma maneira geral, os anti-helmínticos são utilizados para tratar surtos clínicos, ou profilaticamente, a partir da epidemiologia da doença. Os mais utilizados são os benzimidazóis, os agonistas nicotínicos, o praziquantel, o triclabendazole, e as lactonas macrocíclicas. Nesse grupo, incluem-se as ivermectinas e as milbectinas (moxidectina), as mais recentemente desenvolvidas (Sangster, 2001).

O uso inadequado de anti-helmínticos tem favorecido o aparecimento de cepas de parasitas resistentes aos anti-helmínticos (Sangster, 2001).

A situação é alarmante em países como Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil, onde se encontram os maiores níveis de resistência anti-helmíntica do mundo (Márquez Lara, 2003). Há relatos da ineficácia de diversos princípios ativos no controle das parasitoses, incluindo até os representantes da família das lactonas macrocíclicas, um dos grupos químicos mais modernos (Thomaz-Soccol *et al.*, 1996; Molento, 2004). Nem a mais potente das lactonas macrocíclicas, a moxidectina, conseguiu permanecer eficaz, pois Veale (2002)

identificou cepas de parasitos resistentes à moxidectina em diferentes regiões da Austrália.

A mesma situação foi relatada por Molento (2004) e Thomaz-Soccol *et al.* (1996) no Brasil. Por essa razão, o uso da combinação de princípios ativos com mecanismos de ação diferentes pode ser uma medida para melhorar a eficácia de cada droga, isoladamente, até mesmo na prevenção da resistência parasitária (FAO, 2003).

A resistência aos anti-helmínticos sintéticos pelos parasitas agiliza a busca por drogas mais eficazes, já que as helmintoses gastrintestinais são muito freqüentes e influenciam diretamente a produtividade (Sotomaior & Soccol, 2001; Le Jambre, 1995; Maciel *et al.*, 2006). Em outro trabalho, ovinos tratados com adjuvante completo de Freund antes, durante e após a infecção com 10.000 larvas de L3 de *H. contortus* apresentaram redução significativa no número de vermes, com ativação de macrófagos e linfócitos T presentes no GALT (tecidos linfóides associados ao intestino) quando comparado a animais não tratados (Bautista –Garcia *et al.*, 1991)

Recentemente, foi demonstrado que a administração simultânea de LPS + *Propionibacterium granulosum* associada a anti-helmíntico, foi capaz de aumentar os parâmetros hematológicos, principalmente linfócitos e eosinófilos em ovinos naturalmente infectados (Martins, 2006). A utilização de anti-helmíntico associado à imunostimulante promoveu uma maior diminuição da carga parasitária em relação aos animais tratados somente com anti-helmíntico, sugerindo a participação de mecanismos imunológicos semelhantes aos encontrados em animais resistentes (Denapoli *et al.*, 2008).

As drogas imunomoduladoras são utilizadas na prática veterinária como alternativa terapêutica, com o propósito de induzir uma resposta imune mais efetiva e intensa contra agentes infecciosos e parasitários em animais susceptíveis à doença (Quinn, 1990). A modulação da resposta imune por bactérias e seus produtos pode ser uma alternativa promissora, haja vista que o *Propionibacterium acnes* tem se mostrado um potente adjuvante (Perry & Lambert, 2006). A *P. acnes* tem sido utilizada na medicina veterinária para tratamento da doença respiratória equina e pioderma crônica em cães (Evans *et al.*, 1988, Becker *et al.*, 1989). Além disso, a administração de *P. acnes* protege

animais em modelos experimentais de infecções virais e bacterianas quando desafiados (Cox 1988; Mara *et al.*, 1994)

A bactéria *Propionibacterium acnes* é um bacilo Gram positivo pertencente à microbiota da pele do animal e apresenta atividade tumoricida, atua como adjuvante para anticorpos, ativa o sistema fagocitário mononuclear, além de aumentar a resistência a infecções e estimula a produção de citocinas como INF γ , IL-1- α , IL-6 e TNF- α , IL-18 e IL-12, auxiliando o combate contra os parasitas (Kligman *et al.* 1976; Leyden *et al.*, 1998; Ananias *et al.*, 2001; Halpern *et al.*, 1966; Squaiella *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 1993). A bactéria *P. acnes* é utilizada, em alguns trabalhos, como uma ferramenta para o estudo da resposta imune celular, sendo considerada indutora de resposta Th1 (Mac Donald *et al.*, 2002).

Entretanto, dependendo do esquema de tratamento com a *Propionibacterium acnes*, 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, em que 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 (Braga *et al.*, 2003).

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. 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). Neste trabalho, foi utilizada uma suspensão de *P. acnes* inativada por fenol, cujo componente polissacarídico foi preservado.

Outros autores já haviam observado o efeito modulador de polissacarídeos obtidos de sobrenadantes de cultura de *Corynebacterium parvum* (Dawes *et al.*, 1974; Tomecki & Mara, 1987). Assim como o extrato de *P. acnes*, a injeção intraperitonal do polissacarídeo de *P. acnes* foi capaz de induzir a produção de NO (óxido nítrico) e liberação de TNF- α com aumento da

atividade fagocítica de macrófagos peritoneais (Longhini *et al.*, 2001) além de serem capazes de promover resistência à infecção (Ananias *et al.*, 2001; Longhini *et al.*, 2001).

Em outro trabalho, a fração polissacarídica de *P. acnes* é mais efetiva na indução e maturação de células tronco *in vivo* e *in vitro* (Squaiella *et al.*, 2006) e promovendo a modulação das populações celulares no exudato peritoneal de camundongos C57Bl/6 com aumento no número de macrófagos, linfócitos B1a, células dendríticas imaturas e células NK1.1+ CD3+ (Ananias *et al.*, 2001).

O mecanismo pelo qual a bactéria é capaz de promover o aumento de células-tronco é pouco conhecido, mas pode estar relacionado à síntese de citocinas, principalmente GM-CSF, cujos níveis estão elevados em camundongos tratados (Foster *et al.*, 1977).

Recente trabalho do nosso grupo mostrou que animais tratados com imunoestimulante, composto à base de *P.acnes* e LPS de *E. coli*, 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.*, 2009).

2. OBJETIVOS

De acordo com achados preliminares do nosso grupo, a *P. acnes* juntamente com LPS foi capaz de estimular a resposta imune do tipo Th2 com produção de IgE, tendo papel importante na eliminação dos helmintos em modelo de verminose experimental em ovinos. Neste trabalho, procuramos verificar se a fração polissacarídica de *P. acnes* apresentava efeito semelhante na resposta imune de ovinos com verminose, através da análise dos parâmetros hematológicos, imunológicos e análise histológica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 10 ovinos da raça Ile de France P.O (puro de origem), registrados na ASPACO, machos, adultos, com idade média de 9 meses, com 50 kg de peso vivo cada animal, adquiridos de uma propriedade particular localizada em Bragança Paulista e alojados no Hospital Veterinário da Universidade Paulista, onde foram mantidos estabeulados em baias higienizadas com cal e iodo 10%, sendo realizada a troca da cama de maravalha a cada dois dias, os animais eram alimentados com feno de capim e ração comercial, suplementados com sal mineral e identificados.



Figura 1. Ovinos da raça Ile de France P.O. (puro de origem) utilizados no estudo.

No início do projeto, os animais apresentavam alta carga parasitária, com número médio de OPG de 1970. O tratamento da verminose experimental foi realizado em jejum de doze horas, com o anti-helmíntico à base de Moxidectina (Cydectin[®]) por via oral 1ml /10 kg de peso vivo; Sulfaquinoxalina sódica (Coccifin[®]) por via oral 100ml/100g, Ivermectina (Ivomec[®]) por via subcutânea 1ml/50Kg e Nitroxinil (Dovenix Supra[®]) por via intramuscular 1ml/30Kg; com intervalo mensais entre eles. Na Figura 2, há uma diminuição do OPG após a administração da Moxidectina (Cydectin[®]). Os vermífugos Sulfaquinoxalina sódica (Coccifin[®]) e Ivermectina (Ivomec[®]) não apresentaram

eficiência. A administração de Nitroxinil (Dovenix Supra[®]) reduziu de 1480 para 405, ou seja, houve uma redução de 72% na carga parasitária. Após 3 semanas, a carga parasitária novamente começou a aumentar.

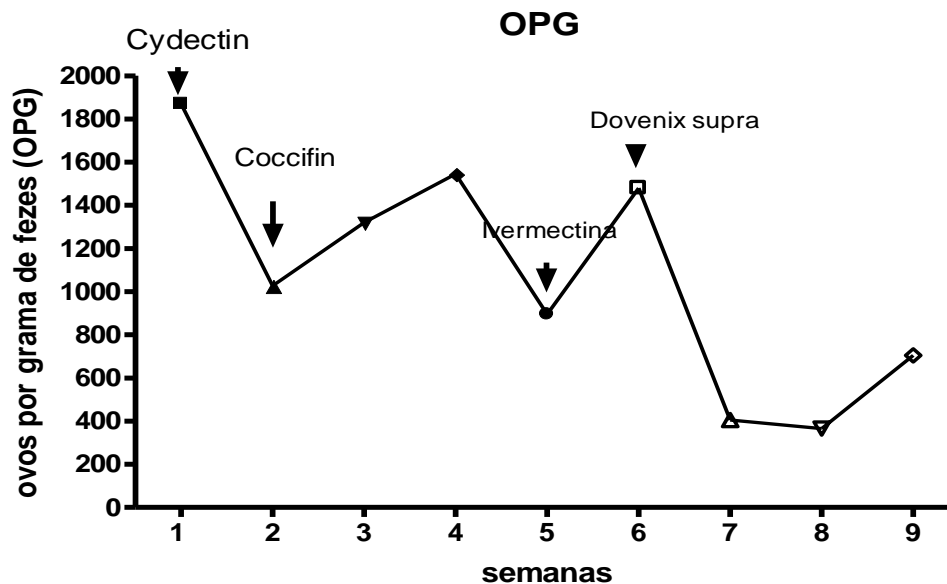


Figura 2. Tratamento da verminose natural de 10 ovinos Moxidectina (Cydectin[®]), Sulfaquinoxalina sódica (Coccifin[®]), Ivermectina (Ivomec[®]) e Nitroxil (Dovenix Supra[®]). Os valores representam a média dos OPG de 10 ovinos em cada semana.

3.2. Obtenção do polissacarídeo solúvel purificado de *P. acnes* (PS)

O método de extração da fração polissacarídica solúvel de *P. acnes* foi padronizado por Longhini (2002), tendo como base o método de extração fenólica de Palmer & Gerlough (1940). O polissacarídeo solúvel de *P. acnes* foi obtido conforme protocolo descrito em Squaiella *et al*, 2006, e cedido gentilmente pela Dra Ieda Longo Maugeri da Universidade Federal de São Paulo.

3.3. Delineamento experimental- Tratamento dos animais com fração polissacarídica de *P. acnes*.

TRATADO n=5	CONTROLE n=5
Animais receberam fração polissacarídica de <i>P. acnes</i> (300ug/ml)	Animais receberam solução salina

Os animais foram divididos em 2 grupos, de maneira a apresentar juntos OPG (ovos por grama de fezes) médio de 750. Grupo Tratado (n=5) foram tratados com a fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses, com intervalo de 3 e 2 dias; animais do grupo controle (n=5), receberam solução salina.

3.4. Exame Clínico

O exame clínico foi realizado em todos os animais, durante seis horas após a aplicação do polissacarídeo e uma vez por dia durante o experimento onde avaliou-se coloração das mucosas (oculopalpebrais, oral e nasal), presença de secreções, tempo de preenchimento capilar (TPC), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), frequência dos movimentos ruminais (FMRu) e temperatura.

3.5. Amostras biológicas

3.5.1. Hemograma

Foram coletados 15 ml de sangue dos animais através da venopunção na jugular com auxílio de agulhas montadas em sistema de Vacutainer®. O sangue foi distribuído em tubo com EDTA. As coletas das amostras foram feitas antes da aplicação da fração polissacarídica de *P. acnes*, no dia 0 e nos dias 3, 5, 7, e 10 após a administração da 1ª dose.

3.5.1.1 Contagem global de eritrócitos

A contagem global de eritrócitos foi feita com auxílio de pipeta de Thoma e a contagem de eritrócitos foi feita na câmara de Neubauer, em microscópio óptico em aumento de 40x. O número de eritrócitos foi calculado multiplicando-se o número encontrado por 1.000, para se obter o número de eritrócitos por μL de sangue (Feldman *et al*, 2003).

3.5.1.2 Volume globular (Hematócrito)

O hematócrito foi realizado em tubos capilares preenchidos, e em seguida, os tubos foram selados com massa apropriada e centrifugados durante 5 minutos a velocidade de 11.000 rpm. A leitura foi realizada com o auxílio da escala de leitura de microhematócrito e o resultado expresso em porcentagem (Feldman *et al*, 2003).

3.5.1.3 Contagem total de leucócitos

A contagem total de leucócitos foi feita através do método do hemocítômetro, como preconiza Hewitt (1984), 20 μL de sangue total e, em seguida, foram adicionadas 400 μL de líquido de Turk como diluidor. A contagem dos leucócitos foi feita na câmara de Neubauer no microscópio óptico com aumento de 100x nos quatro quadrados maiores, sendo o valor de leucócitos calculado a partir da soma das células encontradas nesses quadrados multiplicadas por 50. O valor dos leucócitos totais foi expresso em μL de sangue (Feldman *et al*, 2003).

3.5.1.4 Contagem diferencial de leucócitos e caracterização morfológica dos eritrócitos

A contagem diferencial foi realizada em extensão sanguínea corada pelo Kit Panóptico[®], e as quantidades percentuais de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos, obtidas no exame diferencial, foram multiplicadas pela

quantidade de leucócitos totais, fornecendo o valor absoluto dessas células, expresso em células/ μ l de sangue (Hewitt, 1984).

3.5.2 Amostras de fezes- Exame parasitológico

3.5.2.1 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). As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal do animal antes da aplicação da fração polissacarídica de *P. acnes*, no dia 0 e nos dias 3, 5, 7 e 10 após a administração da 1^o dose.

Dois gramas de fezes foram homogeneizados e misturados 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 estrongilídeos foi efetuada através do microscópio óptico (objetiva 100x).

3.5.2.2 Coprocultura

Foi realizada coprocultura para identificação e contagem de larvas, conforme a técnica de Roberts & O'Sullivan (1950). 20 a 30 g de fezes de ovinos infectados foram misturadas a vermiculita, na proporção de aproximadamente 1 parte de vermiculita para 1 de fezes, dentro de um frasco de vidro de boca larga. O frasco foi tampado com atadura de gaze para assegurar a aerobiose do cultivo, e mantido em temperatura ambiente por 10 dias. Após esse período, o frasco foi destampado, preenchido com água a 37°C até a borda, tampado com placa de Petri e invertido bruscamente para evitar extravasamento de água. Foram adicionados 5 a 10 mL de água morna na placa de Petri, que permaneceu apoiada em espátulas em um de seus externos, de maneira a ficar levemente inclinada. Depois de 4 horas, o conteúdo da placa de Petri foi coletado com pipeta e colocado num tubo de ensaio. Esse conteúdo permaneceu na geladeira por três horas para decantação das larvas, após esse período o sobrenadante foi retirado, deixando o líquido com 3 a 4 cm de profundidade. Seguiu-se a identificação de larvas no mesmo dia.

3.5.2.3 Identificação 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 inclinando lentamente o tubo de ensaio, ficando um pouco de água (0,5mL) no fundo. Esse sedimento foi agitado e uma pequena amostra com uma pipeta de Pasteur foi colocada sobre uma lâmina, adicionando-se uma gota de Lugol. A lamina foi observada no microscópio óptico em objetiva de 100x, contando-se 100 larvas.

Os elementos analisados para identificação das larvas L3 foram: 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.

3.5.3 Obtenção dos linfonodos abomasais e mesentéricos

Para a obtenção dos linfonodos abomasais e mesentéricos, os animais foram submetidos à eutanásia através de injeção de anestésico em concentração 20% maior do que seu peso. A eutanásia foi iniciada com a administração de 2 ml de xilazina intramuscular, após dez minutos, foram administrados 2 gramas de tiopental sódico, dissolvidos em 40 ml de cloreto de potássio 19,1% por via endovenosa. Após 3 minutos o animal entrou em óbito. As vias de acesso para obtenção dos linfonodos abomasais foram através do flanco esquerdo e da linha ventral, sendo esta mais eficaz (figura 3).

O animal foi colocado em decúbito dorsal e realizada assepsia da região ventral com iodo. A incisão foi feita na linha branca, dando acesso à cavidade abdominal, e localizadas as regiões do abomaso e do rúmex, onde estavam os linfonodos abomasais (figura 4). Posteriormente, os linfonodos abomasais foram colocados em meio de cultura DMEM completo e mantidos em gelo. O abomaso foi retirado, e foi realizada a identificação de possíveis parasitas na mucosa; o muco abomasal foi coletado e congelado a -20°C.

Amostras das regiões cárdica, fúndica e pilórica do abomaso foram retiradas e mantidas em formol 10 % para a análise histológica.



Figura 3. Identificação do linfonodo abomasal no ligamento rumino-abomasal.



Figura 4. Localização e identificação do linfonodo abomasal.

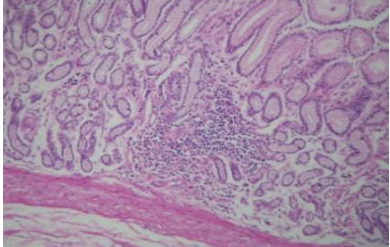
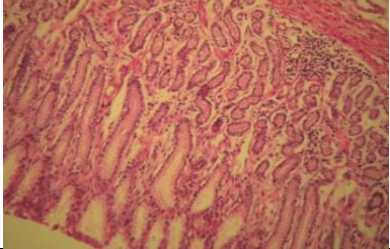
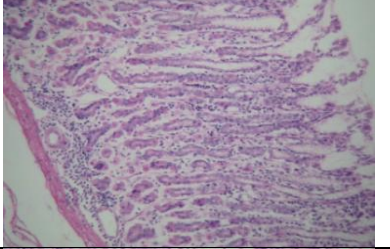
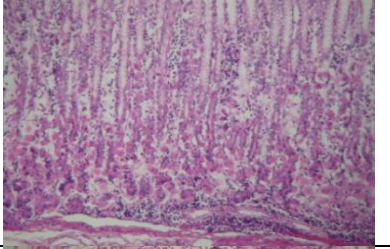
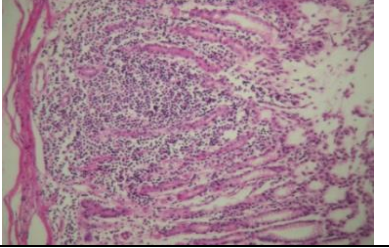
3.5.3.1 Obtenção e cultura das células dos linfonodos abomasais

Os linfonodos abomasais foram macerados com auxílio de embolo de seringa de 5 ml e cultivadas em meio completo (DEMEN + 10% soro fetal bovino). As células foram centrifugadas a 2500 rpm, durante 10 minutos à 10°C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas e ressuspensas em meio completo (DEMEN + 10% soro fetal bovino). Foi obtido o rendimento celular de $3,5 \times 10^6$ cél/ml e a viabilidade celular foi avaliada através de azul de Trypan. Uma parte da suspensão celular foi submetida para cultura na dosagem de IL-5 e outra para análise por citometria de fluxo.

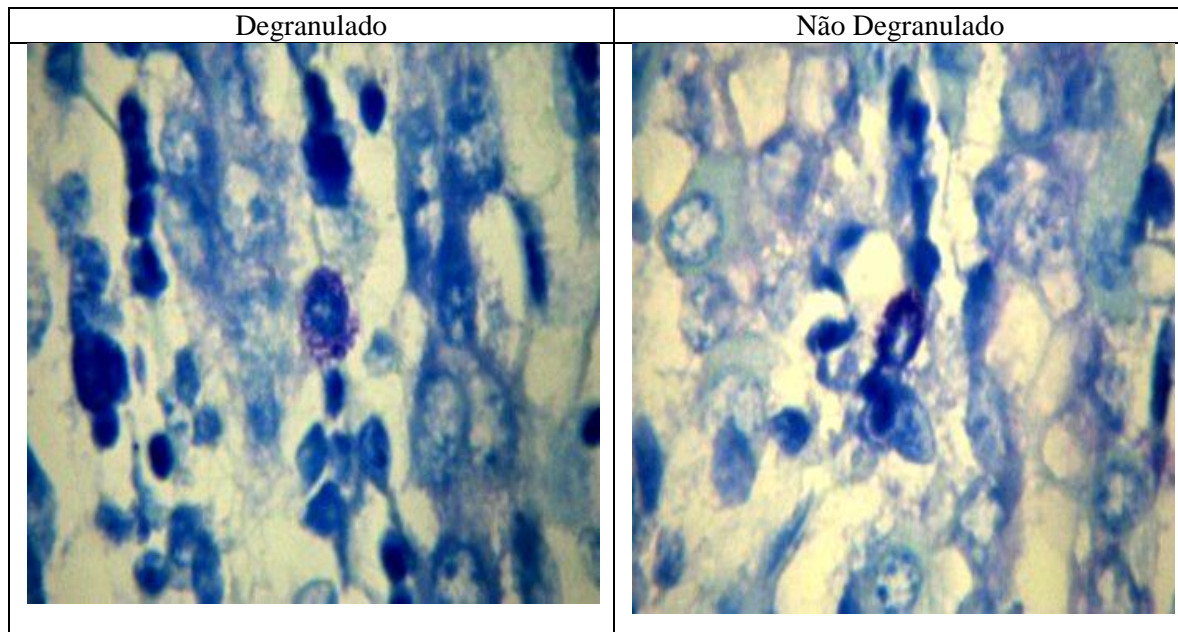
3.5.3.2 Análise histológica do material abomasal e linfonodos

As partes do abomaso (cárdica, fúndica e pilórica) foram analisadas no Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Paulista, sob orientação da Profa Dra Leoni Bonamin. Amostras da região fúndica, cárdica e pilórica do abomaso e também amostras dos linfonodos abomasais foram fixados em uma solução tampão de formalina (10%) e embebidos em parafina. Os cortes de tecidos entre 5-7 μm foram corados por Hematoxilina e Eosina, ácido de Schiff (PAS) e azul de toluidina (mastócitos). Cortes histológicos das regiões cárdica, fúndica e pilórica foram analisados por um sistema de cruzes (+), conforme abaixo:

Quadro 1. Parâmetros utilizados na análise histológica do abomaso de ovinos

	Descrição	FOTOS
Sem alteração	-Preservação da lâmina própria; ausência de infiltrado inflamatório	
+	-Inflamação discreta crônica (infiltrado linfo-histio-plasmocitário)	
++	-Inflamação difusa moderada crônica (infiltrado linfo-histio-plasmocitário)	
+++	- Inflamação difusa severa crônica (infiltrado linfo-histio-plasmocitário)	
++++	- Inflamação difusa severa crônica (infiltrado linfo-histio-plasmocitário) com atrofia de mucosa e focos de organização folicular linfóide terciária	

Quadro 2. Parâmetros histológicos dos mastócitos degranulados e não degranulados da região fúndica do abomaso de ovinos. Coloração HE, objetiva de 20X.



3.6 Análise dos parâmetros imunológicos

Amostras de soro de ovinos dos grupos I e II foram coletadas antes da aplicação da fração polissacarídica de *P. acnes*, no dia 0 e nos dias 3, 5, 7, e 10, após a administração da 1^o dose para análise de proteínas totais, imunoglobulina total, IgE e IL-5.

3.6.1. Dosagem de proteínas totais

A dosagem das proteínas plasmáticas totais foi realizada pela técnica de refratometria. Após a centrifugação do capilar de hematócrito, uma gota de plasma sanguíneo foi colocado sobre o refratômetro. 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).

3.6.2. Dosagem de imunoglobulina total

A dosagem de imunoglobulinas foi realizada pelo método de turbidimetria utilizando uma solução de sulfato de zinco. Em um tubo de ensaio, 100µl do soro foram adicionados a 6 ml de solução de sulfato de zinco. A mistura foi homogeneizada e permaneceu em repouso durante uma hora. A absorbância foi determinada em fotocolorímetro a 480nm (Quick Lab, Drake).

3.6.3. 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. Em seguida, foram adicionados OPD e H₂O₂ como substrato enzimático. A leitura da placa foi feita em espectrofotômetro em 492nm. O soro referência obtido de um pool de soros de ovinos com alta concentração de IgE (100 UI/ml) foi utilizado para preparar a curva padrão. As concentrações de IgE foram determinadas, a partir da curva padrão.

3.6.4. Quantificação de IL-5 no soro

Os níveis de IL-5 foram determinados pelo método de ELISA em amostras de soro e foram calculados a partir de uma curva padrão para IL-5 entre 15 pg/ml a 4000 pg/ml. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-IL-5 (Biosource, Camarillo, CA, USA) na concentração de 2 mg/ml e incubadas 12 horas em temperatura ambiente. As placas foram bloqueadas com PBS1% BSA em temperatura ambiente por 1 hora e IL-5 recombinante (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) e amostras de soro foram adicionadas em cada poço, permanecendo em temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período, adicionou-se anticorpo anti-IL-5 biotinizado (BD, Pharmigen) durante 2 horas e, em seguida, a reação foi amplificada com conjugado estreptoavidina peroxidase (BD Pharmingen) por 30 minutos. A atividade de peroxidase foi avaliada com OPD e, em seguida, adicionou-se 4N H₂SO₄ para parada da reação e a leitura realizada a 492 nm.

3.6.5. Análise por citometria de fluxo de células TCD4+ e expressa de MHC de classe II de células do linfonodo abomasal

As células dos linfonodos abomasais foram obtidas conforme descrito acima, e para a contagem e análise da viabilidade celular utilizando corante azul de Trypan. 1×10^6 células foram adicionadas em eppendorfs e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C. As células foram bloqueadas com 5% do soro de carneiro por 30 minutos a 4°C e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado sendo adicionados os anticorpos monoclonais anti-CD4- FITC (44-97-Serotec) e anti-MHC de classe II-PE (44-38-Serotec) e 100 µl de PBS 1% BSA, e as células foram incubadas por 1 hora a 4°C. As células foram centrifugadas, o sobrenadante desprezado, e as células fixadas com 100 µl de PBS e 400 µl de PFA 1% e mantidos a 4°C e analisadas no citômetro de fluxo FACScan utilizando o software CELLQUEST.

3.7. Análise Estatística dos Resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente empregando o software SigmaStat for Windows version 1.0 (2000). Para verificar a eficácia do tratamento, utilizou-se ANOVA e o método Mann-Withney Rank Sum para comparar os grupos tratados e controle. A correlação de Pearson foi utilizada para correlacionar as diferentes medidas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de Ética da Universidade Paulista, protocolo n. 007/08 CEP/ICS/UNIP.

4. Resultados

4.1. Identificação das Larvas

Foram identificadas 3 gêneros de nematódeos nas fezes dos ovinos. O gênero predominante foi *Haemonchus spp*, sendo 96% de *Haemonchus spp*, 2% de *Ostertagia spp* e 2% *Trichostrongylus spp*.

4.2. Tratamento com fração polissacarídica de *Propionibacterium acnes*

Os animais foram divididos em 2 grupos, de maneira a apresentar OPG (ovos por grama de fezes) médio semelhante nos 2 grupos. Os animais do grupo tratado receberam 3 ml da fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses, com intervalo de 3 e 2 dias e os animais do grupo controle receberam solução salina.

Os animais do grupo tratado apresentaram níveis de OPG significativamente menores em relação ao grupo controle 7 e 10 dias após a 1ª administração do *P. acnes*, conforme a figura 5.

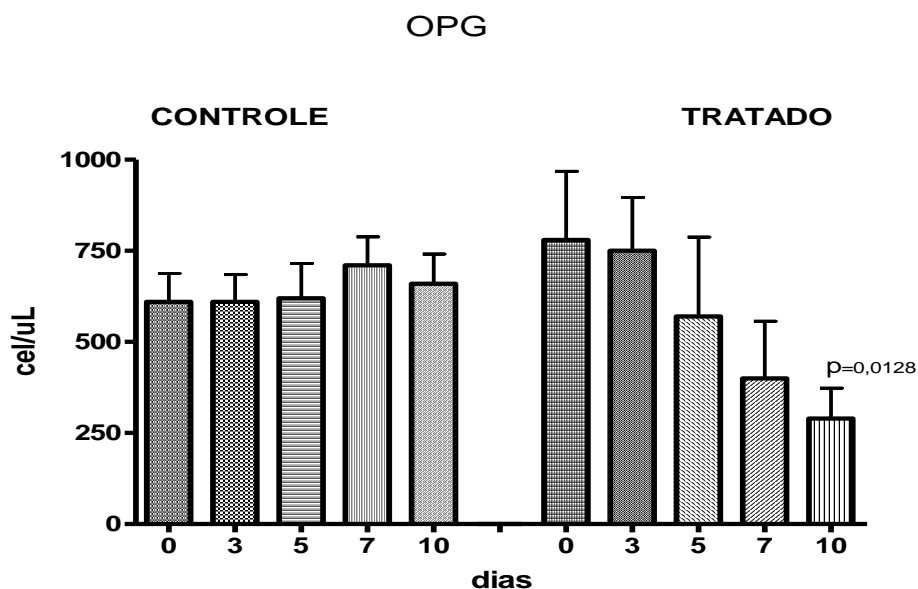


Figura 5. Valores médios de OPG nos animais do grupo controle (n=5) e tratado (n=5). Os animais tratados receberam 3 doses da fração polissacarídica do *Propionibacterium acnes* (300ug/ml). Valores de $p < 0,05$ indicam diferença estatística.

4.3. Exame clínico

Durante todo o experimento, os animais apresentaram padrões normais de frequência respiratória, cardíaca, temperatura, antes e após a aplicação da fração polissacarídica de *P acnes*.

Tabela 1- Avaliação Clínica dos 5 ovinos antes (A) e depois (B) das aplicações da fração polissacarídica de *Propionibacterium acnes*.

A

Animal	Frequência Cardíaca(min)	Frequência respiratória(min)	Frequência dos movimentos ruminantes	Temperatura(°C)	Mucosas
1	92	70	5 mov/5min	38.6	normocoradas
2	98	72	5 mov/5min	38.7	normocoradas
93	100	70	4 mov/5min	38.8	normocoradas
111	110	74	5 mov/5min	39.5	normocoradas
118	110	76	6 mov/5min	39.0	normocoradas

Valores de referência frequência cardíaca – 90 a 110 batimentos/min, frequência respiratória – 20 a 80, temperatura – 38.5 a 39.5 (°C).

B

Animal	Frequência Cardíaca(min)	Frequência respiratória(min)	Frequência dos movimentos ruminantes	Temperatura(°C)	Mucosas
1	98	74	6 mov/5min	39.0	normocoradas
2	100	74	4 mov/5min	39.1	normocoradas
93	120	86	5 mov/5min	38.8	normocoradas
111	124	84	4 mov/5min	39.5	normocoradas
118	120	80	4 mov/5min	39.5	normocoradas

Valores de referência: frequência cardíaca – 90 a 110 batimentos/min, frequência respiratória – 20 a 80, temperatura – 38.5 a 39.5 (°C).

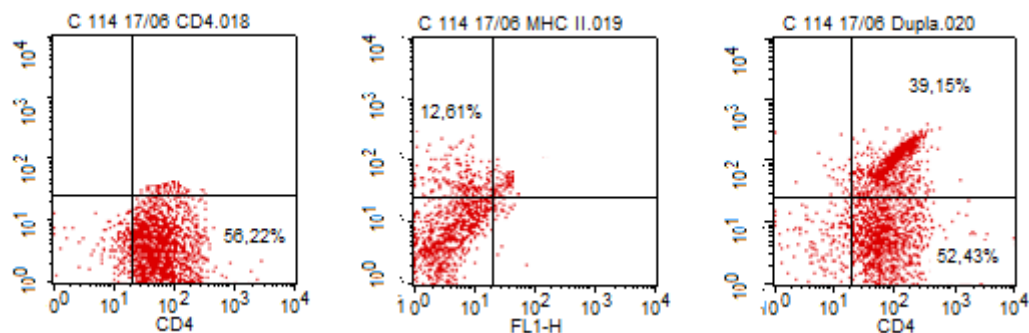
4.4. Análise das células dos linfonodos abomaisais por citometria de fluxo

Células do linfonodo abomasaal foram processadas para identificação de linfócitos TCD4+ e moléculas MHC de classe II, utilizando-se anticorpos monoclonais CD4- FITC (44-97) e MHC de classe II-PE (44-38) Serotec.

A porcentagem de células T CD4+ do linfonodo abomasaal dos animais tratados com *P. acnes* foi de 81,33% e nos animais do grupo controle foi de 56,22%, conforme figura 6.

A porcentagem de células do linfonodo abomasaal expressando moléculas do MHC de classe II foi de 29,26% no grupo de animais tratados com *P. acnes* e 12,61% no grupo de animais controle, sendo maior a porcentagem de células duplamente marcadas no grupo tratado.

A



B

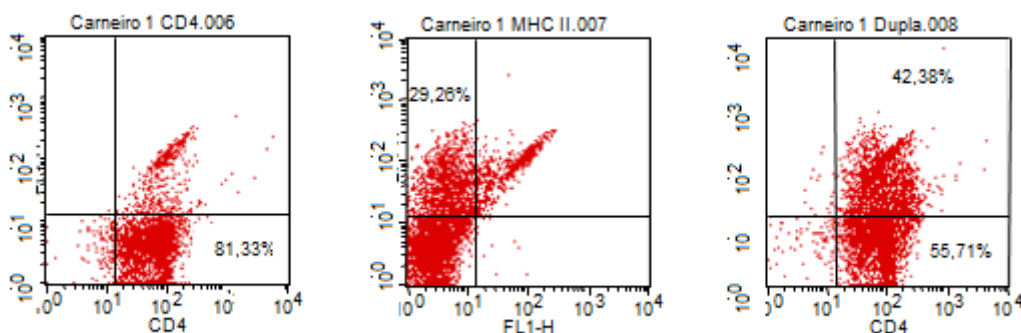


Figura 6. Representação da análise de células do linfonodo abomasaal para expressão de moléculas T CD4+ e MHC de classe II por citometria de fluxo de células de ovinos controle (A) e tratados com fração polissacarídica de *P. acnes* (B).

No período de imunização com a fração polissacarídica de *Propionibacterium acnes*, os animais do grupo controle e tratado apresentaram média de OPG 610 e 780, respectivamente. Por se tratar de uma infecção provocada por *Haemonchus contortus*, foi realizada a análise de eritrócitos durante todo o experimento. Os animais apresentaram valores de eritrócitos dentro dos valores de referência, conforme figura 7.

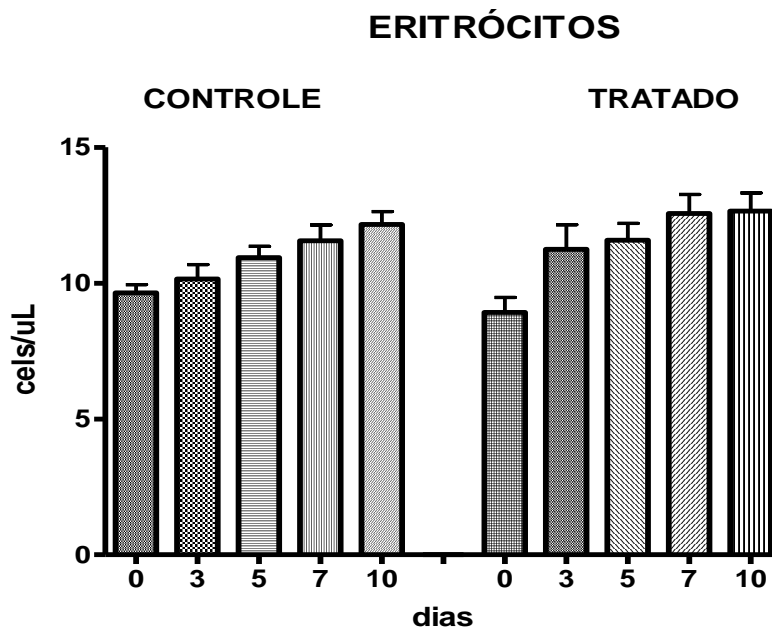


Figura 7. Valores médios de eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$). Animais do grupo Tratado (n=5) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$ por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.

Não houve diferença nos valores de hematócrito, os valores foram mantidos dentro dos valores de referência estabelecidos para ovinos.

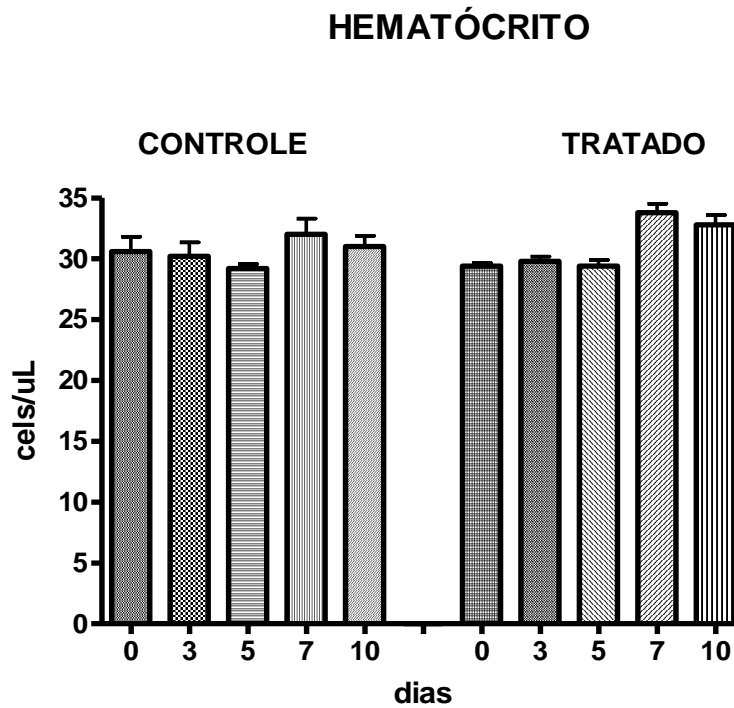


Figura 8. Valores médios do Hematócrito (%). Animais do grupo Tratado (n=5) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de *P acnes* na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.

A figura 9 mostra o aumento significativo no número de leucócitos no grupo de animais tratados 5, 7 e 10 dias após administração da 1ª dose da fração polissacarídica de *P. acnes* ($p=0,0317$; $p=0,0030$; $p=0,0083$, respectivamente).

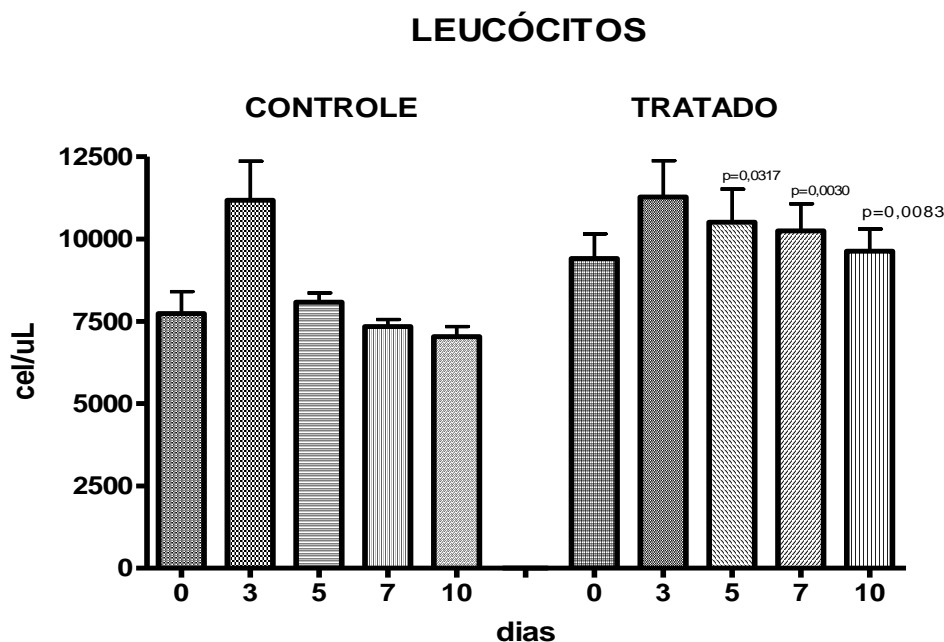


Figura 9. Valores médios de leucócitos totais ($10^6/\mu\text{L}$). Animais do grupo Tratado ($n=5$) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$ por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle ($n=5$) receberam solução salina. Valores de $p<0,05$ indicam diferença estatística.

Conforme podemos observar na Tabela 2, encontramos correlação estatística entre OPG e o número de leucócitos, com diferença estatística no 7º dia após o tratamento com fração polissacarídica de *P. acnes*.

Tabela 2. Matriz de correlação entre OPG e o número de leucócitos.

Variável	OPG
	7º dia
Leucócitos	-0,6263*

* indica correlação significativa ($P=0,0264$)

Em relação ao número de neutrófilos, não foi observada diferença estatística entre os animais do grupo tratado e controle.

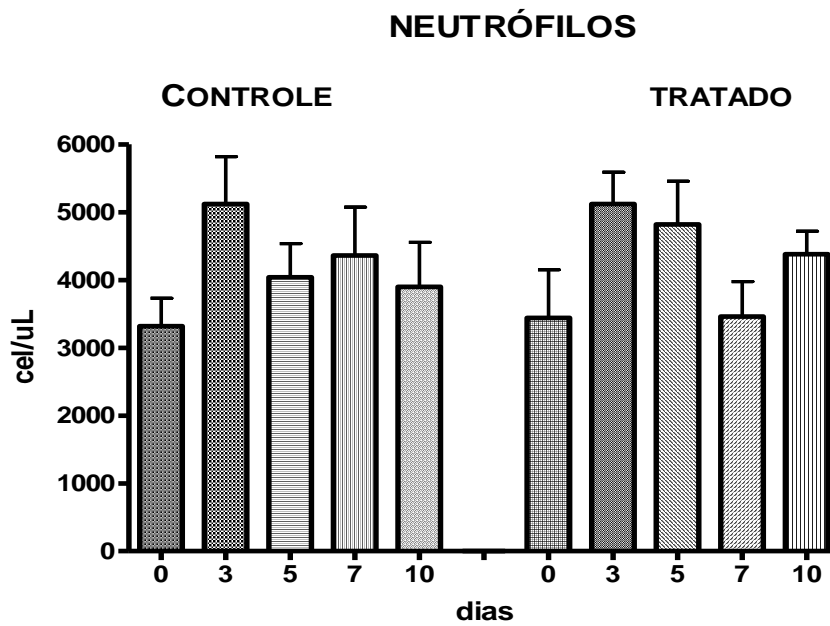


Figura 10. Valores médios de neutrófilos ($10^6/\mu\text{L}$). Animais do grupo Tratado ($n=5$) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$ por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle ($n=5$) receberam solução salina.

Os animais do grupo tratado apresentaram número significativamente maior de eosinófilos em relação ao grupo controle, 5, 7 e 10 dias após o tratamento com fração polissacarídica de *P. acnes*, conforme figura 11.

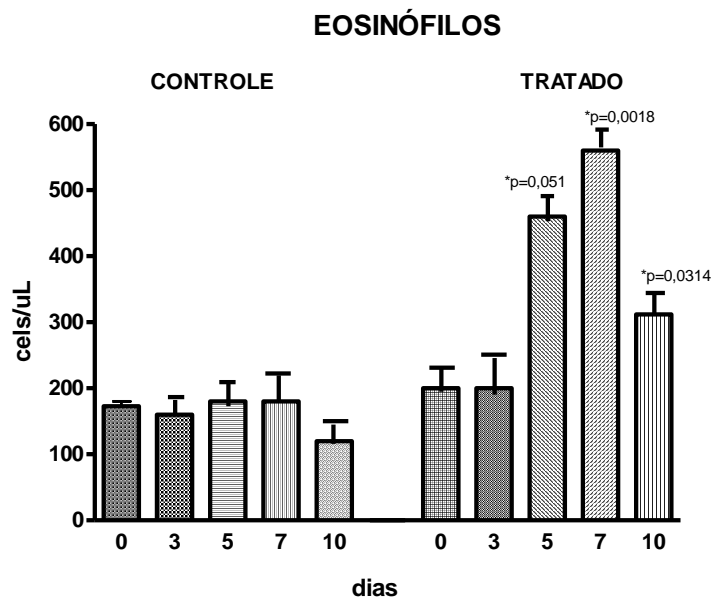


Figura 11. Valores médios de eosinófilos ($10^6/\mu\text{L}$). Animais do grupo Tratado ($n=5$) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$ por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle ($n=5$) receberam solução salina.

Conforme podemos observar na Tabela 3, encontramos correlação estatística entre OPG e o número de eosinófilos, com diferença estatística no 7^o dia após o tratamento com fração polissacarídica de *P. acnes*.

Tabela 3. Matriz de correlação entre OPG e o número de eosinófilos.

Variável	OPG
	7 ^o dia
eosinófilos	-0,5547*

* indica correlação significativa ($P = 0,0481$)

Cerca de 7 e 10 dias após a 1ª administração da fração polissacarídica do *P. acnes*, houve um aumento do número de linfócitos nos animais do grupo tratado em relação ao grupo controle, com diferença estatística no 10º dia após a 1ª administração. Observamos uma correlação negativa significativa entre contagem de linfócitos e os valores de OPG com $r = -0,6084$ ($p = 0,0310$).

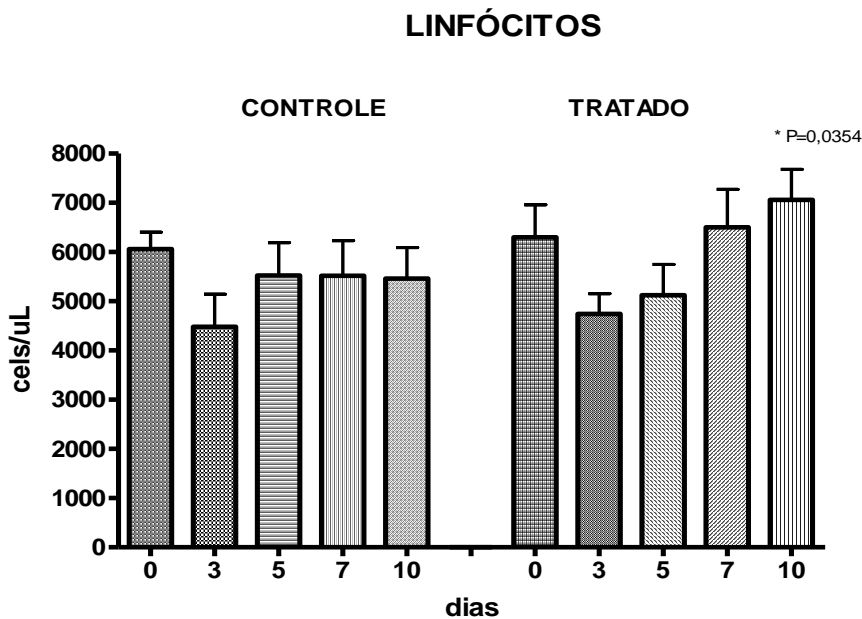


Figura 12. Valores médios de linfócitos ($10^6/\mu\text{L}$). Animais do grupo Tratado ($n=5$) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$ por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle ($n=5$) receberam solução salina.

Tabela 4. Matriz de correlação entre OPG e o número de linfócitos.

Variável	OPG
	7 dia
linfócitos	-0,6084*

* indica correlação estatística ($P = 0,0310$)

Os animais tratados com fração polissacarídica de *P. acnes* apresentaram aumento no número de monócitos, porém sem diferença estatística em relação ao grupo controle.

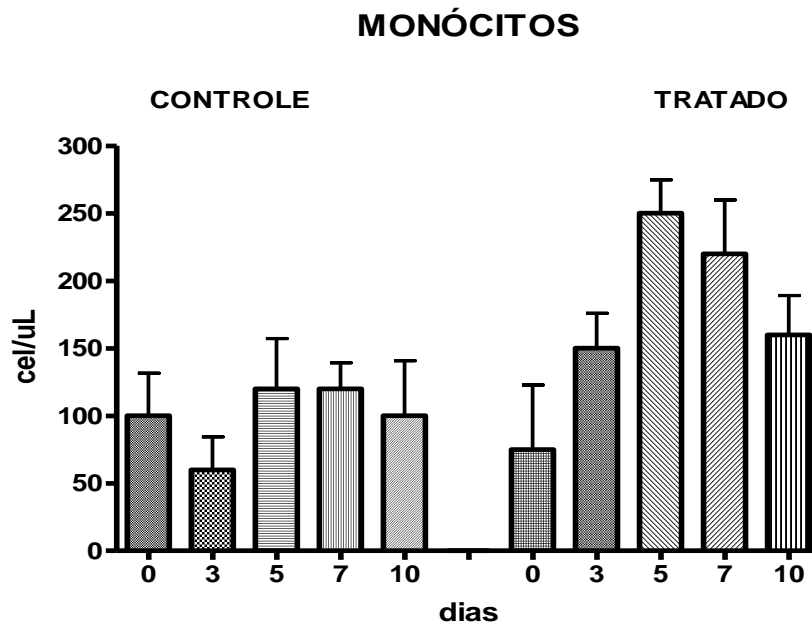


Figura 13. Valores médios de monócitos ($10^6/\mu\text{L}$). Animais do grupo Tratado ($n=5$) receberam 3 ml da fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$ por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle ($n=5$) receberam solução salina.

Os animais tratados com a fração polissacarídica de *P. acnes* apresentaram níveis significativamente maiores de proteínas totais quando comparados aos animais do grupo controle 7 e 10 dias após a 1^a dose.

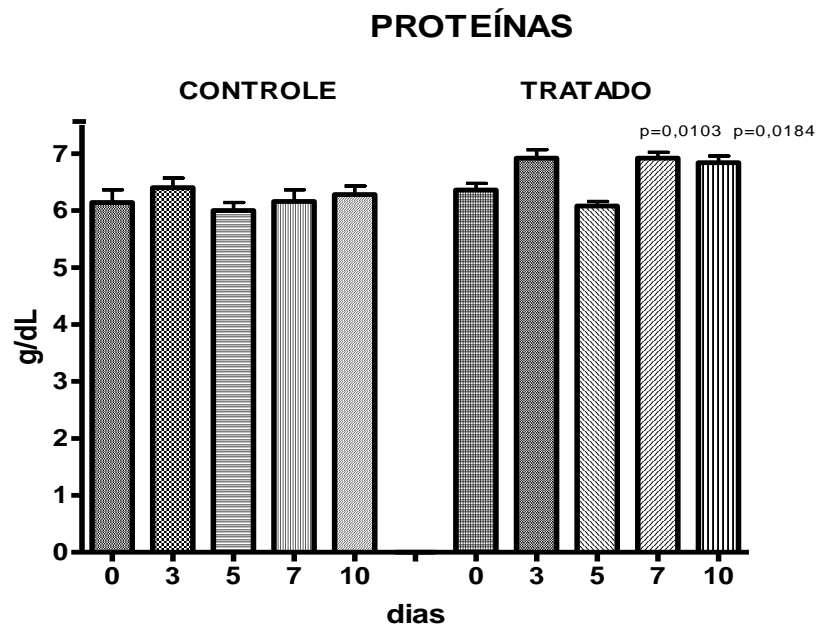


Figura 14. Valores médios de proteínas (g/dL). Animais do grupo Tratado (n=5) receberam 3 ml da fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.

Os animais que receberam fração polissacarídica de *P. acnes*, apresentaram valores significativamente maiores de imunoglobulinas em relação ao grupo controle, 7^o e 10^o dia após a administração da 1^a dose, conforme figura 15.

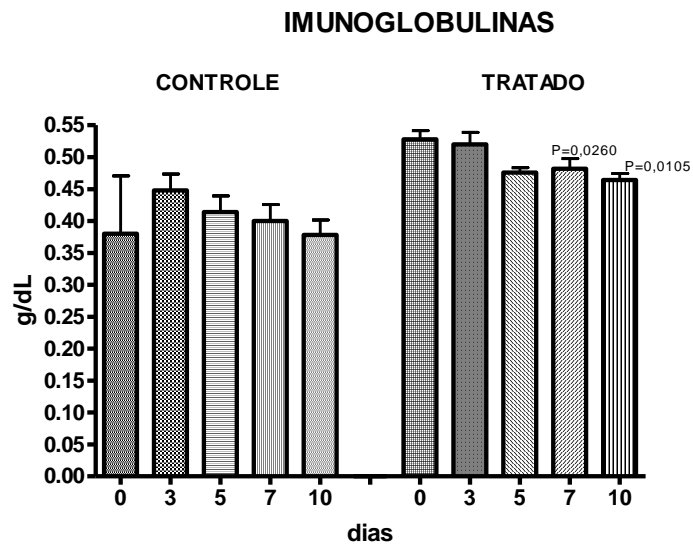


Figura 15. Valores médios de imunoglobulinas (g/dL). Animais do grupo Tratado (n=5) os animais receberam 3 ml da fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 ug/ml por via intramuscular em 3 doses com intervalo de 3 e 2 dias entre as doses, e os animais do grupo controle (n=5) receberam solução salina.

Após a retirada do abomaso, realizou-se a contagem de parasitas na mucosa abomasal nos animais do grupo controle e tratado. Os animais do grupo controle apresentaram número maior de ovos quando comparado ao grupo tratado, com diferença estatística conforme figura 16.

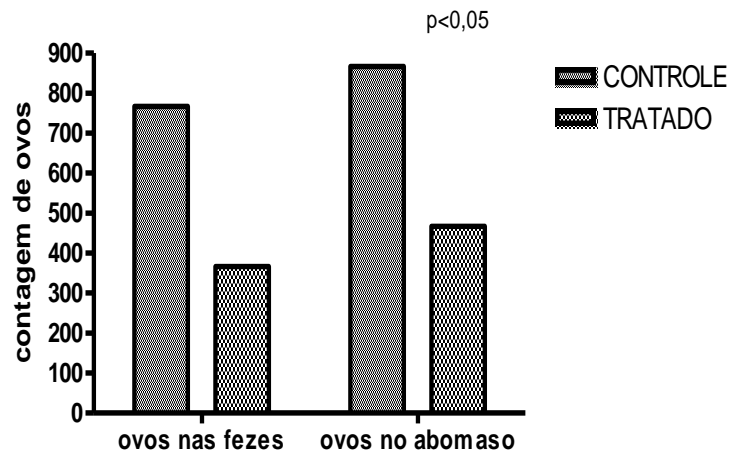


Figura 16. Contagem de ovos nas fezes (OPG) e contagem de ovos no abomaso de animais do grupo controle (n=3) e grupo tratado (n=3).

Os níveis de IgE nos animais do grupo tratado foi significativamente maior que os animais do grupo controle, com diferença estatística no 3^o dia após o tratamento com *P. acnes* ($p=0,046$), conforme figura 17.

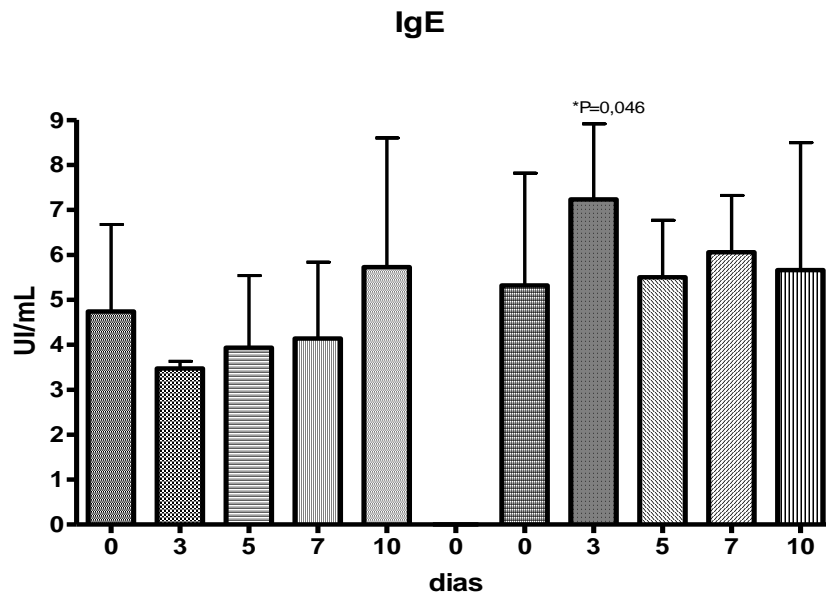


Figura 17. Valores médios de IgE (UI/ml) nos animais do grupo tratado com fração polissacarídica de *P. acnes* (300 ug/ml) (n=5) e os animais do grupo controle (n=5).

Os níveis de IL-5 foram maiores no grupo de animais tratados em relação ao grupo de animais controle, com diferença estatística nos dias 3 e 10 após o tratamento, conforme figura 18.

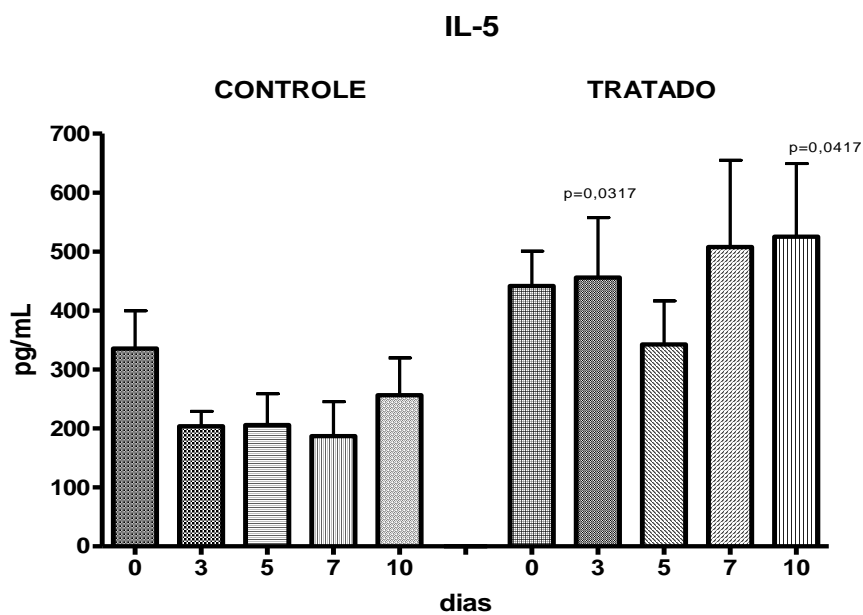


Figura 18. Valores médios de IL-5 (pg/ml) nos animais do grupo tratado com fração polissacarídica de *P. acnes* (300 ug/ml) (n=5) e os animais do grupo controle (n=5).

Tabela 5. Análise histológica da região cárdica, fúndica e pilórica do abomaso e reatividade dos linfonodos de ovinos tratados com *P. acnes* e animais controle.

GRUPO	REGIÃO CÁRDICA	REGIÃO FÚNDICA	REGIÃO PILÓRICA	LINFONODO
tratado	++	++	+	
tratado	++++	++	++	++++ reatividade
tratado	++	++	+	
controle	++	++++	++	++reatividade
controle	++	++	sem alteração	
controle	+ / com erosão	+	+	

Legenda: sem alteração (ausência de infiltrado inflamatório); + (inflamação discreta infiltrado linfo-histio-plasmocitário); ++ (inflamação difusa moderada); +++ (inflamação difusa severa crônica-infiltrado linfo-histio-plasmocitário) e ++++ (inflamação difusa severa crônica) infiltrado linfo-histio-plasmocitário com atrofia de mucosa e focos de organização folicular linfóide terciária

Como podemos observar na figura 19, nos animais do grupo tratado, a região abomasal apresentou aspecto pseudo-folicular com presença de células linfóides, com uma camada de muco contendo mistura de poucos linfócitos e muitas células epiteliais presentes nas mucosas. No grupo de animais controle observamos a mucosa com aspecto difuso com pouca reação celular no abomaso.

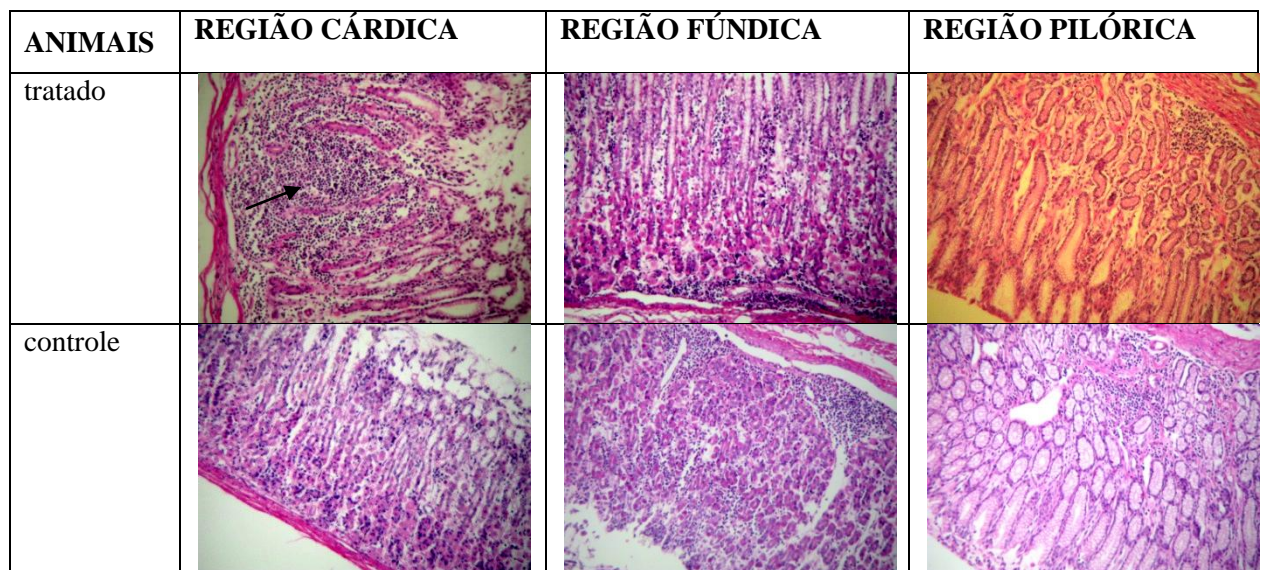


Figura 19. Representação esquemática de cortes da região fúndica, cárdica e pilórica do abomaso de ovinos tratados com *P. acnes* e sem tratamento (controle). Seta indica presença de linfócitos HE, aumento 10X.

Os linfonodos abomasais apresentaram hiperplasia dos folículos, com grandes centros germinativos e uma fina corona de linfócitos nos grupos tratados e controle. Porém, as áreas corticais e medulares apresentavam-se mais largas nos animais do grupo tratado quando comparado ao controle com grande número de infiltrado inflamatório contendo linfócitos organizados em folículos na mucosa formando um GALT (tecido linfóide associado ao intestino).

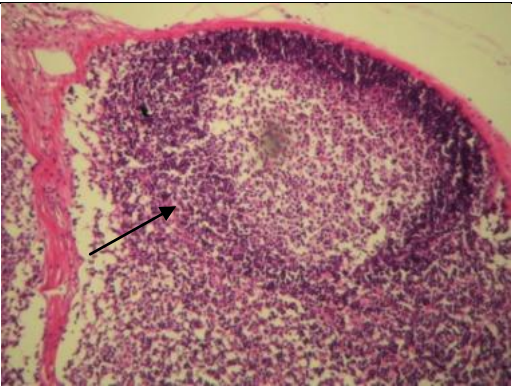
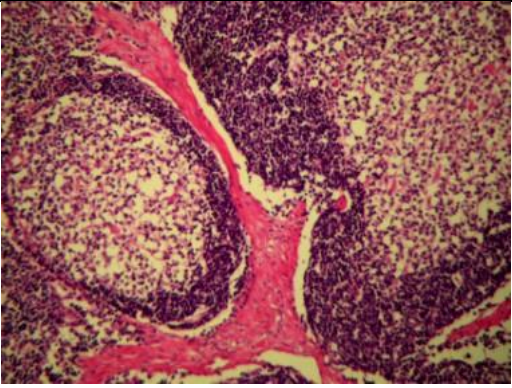
ANIMAIS	LINFONODO	REATIVIDADE
tratado		++++
controle		+

Figura 20. Análise microscópica dos linfonodos abomasais de ovinos tratados com 3 doses de *P. acnes* e animais controle. Observar presença de numerosos leucócitos globulares, linfócitos e plasmócitos. Seta indica a presença de aglomerado de linfócitos. HE, Objetiva de 120 x.

Não observamos diferença estatística entre a porcentagem de mastócitos na região fúndica quando comparamos ao grupo tratado e controle.

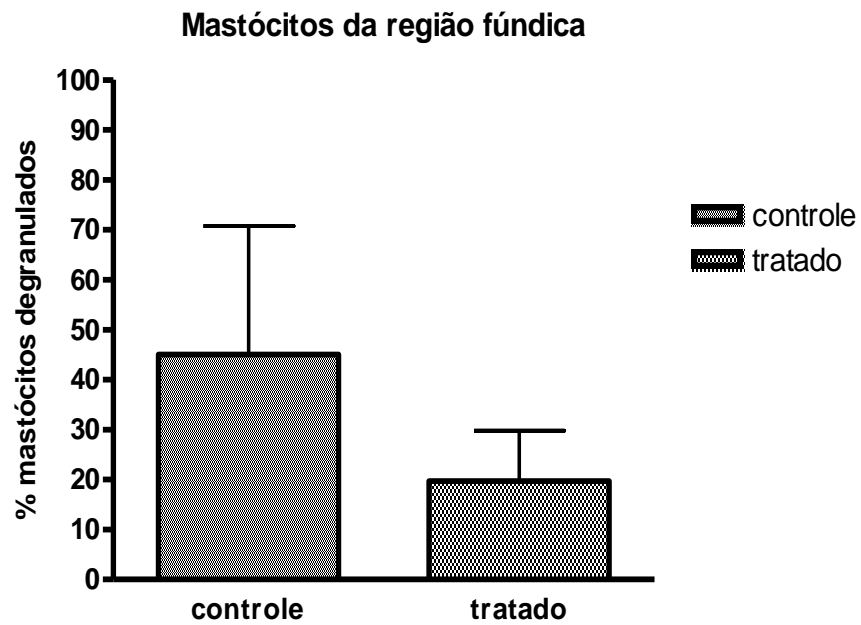


Figura 21. Porcentagem de mastócitos degranulados da região fúndica de ovinos do grupo controle e tratados com *P.acnes*.

5. DISCUSSÃO

O controle de nematóides gastrintestinais é largamente baseado no uso supressivo e terapêutico de anti-helmínticos (Charles *et al.*, 1996). Falhas neste tipo de controle é o primeiro sinal do aparecimento de resistência anti-helmíntica (Sangster, 2001).

Neste trabalho constatamos a grande dificuldade do controle da verminose natural em ovinos (Fig 2). Somente através de um tratamento prolongado, alternado e ininterrupto com vermífugo, alternando os diferentes princípios ativos, foi possível controlar a verminose natural, porém sem conseguirmos a eliminação efetiva do parasita (figura 2). Este procedimento torna-se impraticável devido alto custo no tratamento e mão de obra para os produtores. A modulação da resposta imune por bactérias e seus produtos pode ser uma alternativa promissora, haja vista que o *Propionibacterium acnes* é um potente adjuvante.

Embora a *P. acnes* seja indutora de citocina proinflamatórias e do tipo Th1, 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). Essa modulação da resposta mediada pela *P. acnes* pode ser observado em recentes resultados do nosso grupo, onde o tratamento de animais com LPS e *Propionibacterium acnes* e imunizados com larvas de *H. contortus*, foi

capaz de inibir o desenvolvimento da verminose experimental. Essa inibição ocorreu pela ação imunomoduladora do LPS e *Propionibacterium acnes*, induzindo uma resposta do tipo Th2, verificado através da produção de IL-5 e IgE (Abel *et al.*, 2009).

Neste estudo foram dadas 3 doses de fração polissacarídica de *P. acnes* na concentração de 300 ug/ml previamente testada. Sabendo-se que a *P. acnes* e fração polissacarídica é um adjuvante promotor da resposta Th1 com produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF-alfa (Longhini *et al.*, 2001; Okamura, 1995; Tsuji *et al.*, 1999), realizamos exame clínico dos animais para saber se havia alguma alteração nos sinais clínicos. Como podemos observar na tabela 2, durante todo o procedimento, os animais apresentaram exame clínico dentro dos parâmetros normais.

O OPG médio dos ovinos do grupo tratado era 780 e no grupo controle 610. A partir da 2^o dose da fração polissacarídica de *P. acnes* verificamos uma diminuição significativa do OPG no grupo tratado. Com o início do tratamento, os animais do grupo tratado começaram a apresentar diminuição da carga parasitária, com diferença estatística no 10^o dia após a administração da 1^o dose ($p=0.0128$).

Neste projeto, os animais apresentaram uma infecção moderada por *Haemonchus contortus*. Sabendo-se do hábito hematófago deste parasita, os parâmetros hematológicos foram avaliados em todo o experimento. Não observamos alterações no número de eritrócitos e no hematócrito durante o tratamento, sendo mantidos dentro dos valores de referência. (Figura 8 e 9). Alguns autores não observaram mudanças nos parâmetros eritrocitários induzidas pela hemoncose nos estágios iniciais da doença (Silverman *et al.* 1970).

Apesar de não observamos alteração nos eritrócitos e hematócrito, o tratamento dos ovinos com fração polissacarídica da *Propionibacterium acnes* promoveu aumento significativo no número de leucócitos 5, 7 e 10 dias após a administração da 1^o dose da fração polissacarídica de *P. acnes* com $p=0,0317$; $p=0,0030$; $p=0,0083$, respectivamente (figura 10). Estes resultados corroboram com recentes achados onde tratamento de ovinos com LPS + *P. granulosum* promoveu aumento de leucócitos circulantes principalmente

linfócitos e eosinófilos (Abel *et al.*, 2009). Observamos ainda que o grupo de animais tratados apresentaram aumento significativo de linfócitos e eosinófilos, e baixa carga parasitária, com correlação $r=-0,5547$; $p=0,0048$ e $r=-0,6084$, $p=0,0310$ respectivamente. Esses resultados mostraram o efeito imunestimulante da fração polissacarídica na resposta imune aumentando a resistência do animal. É sabido que o tratamento de animais com *P. acnes* morta aumenta a população de linfócitos como linfócitos B, TCD4+, TCD8+ e células NKT, potencializando suas funções (Quinn, 1990; Ananias, 2001; Mussalem *et al.*, 2006), bem como aumenta a resistência a infecções (Brener, 1976; Teixeira, 1996).

Ao lado da modulação de linfócitos, este tratamento também induziu um elevado número de eosinófilos. O aumento dessas células é compatível com resposta imune do tipo Th2, intimamente relacionada com mecanismos de resistência e expulsão dos vermes (Gill *et al.*, 2000). A associação de resistência e eosinofilia têm sido demonstradas em modelos *in vitro* e *in vivo* (Terefe *et al.*, 2007; Rainbird, 1998; Balic *et al.*, 2006).

Recentes trabalhos mostram que a presença de linfócitos T CD4+ produtores de citocinas do tipo Th2 no tecido abomasal, é de grande importância para a ativação de eosinófilos e na eliminação das larvas de *H. contortus*, já que são células ativadas na presença de IL-5, anticorpo e complemento (Balic *et al.* 2006). As mudanças na população de linfócitos na mucosa abomasal, linfonodos e sangue periférico na vigência da infecção por *H. contortus* em ovinos tem sido descritas (Balic *et al.*, 2006).

Em outro trabalho, o mesmo autor relata que a resposta imune a larvas caracterizada pela ativação de linfócitos T CD4+ e linfócitos B e recrutamento de eosinófilos e linfócitos B nos tecidos infectados, contudo em infecções com verme adulto ocorre um aumento de mastócitos (Balic *et al.*, 2000).

A resistência genética de ovinos a nematóides gastrointestinais é imunologicamente mediada com participação de linfócitos T CD4+ com papel pivotal na geração de hiperplasia de mastócitos da mucosa, eosinofilia tecidual e anticorpos anti-*Haemonchus* (Gill, 1993). O número de mastócitos da mucosa e leucócitos globulares durante o desenvolvimento da resistência a

nematóides é maior em ovinos com baixa carga parasitaria (Pfeffer *et al*, 1996; Bisset *et. al*, 1996), com aumento de eosinófilos sanguíneos e da mucosa após infecção por nematóides (Douch *et al.*, 1996).

Neste trabalho, procuramos avaliar o efeito do tratamento com polissacarídeo de *P. acnes* sob a população de linfócitos T CD4+ e expressão de moléculas do MHC de classe II. Como podemos observar na figura 7, a porcentagem de células T CD4+ do linfonodo abomasal dos animais tratados com *P.acnes* foi de 81% e nos animais do grupo controle foi de 56%.

Em experimentos realizados por Maddox *et al.*, 1985, cerca de 38% dos linfócitos dos linfonodos abomasais foram marcados com mesmo anticorpo monoclonal anti- TCD4+. Levando-se em conta a população total de linfócitos TCD4+, observamos que os animais do grupo tratado apresentaram maior numero de células em relação ao controle.

A porcentagem de células do linfonodo abomasal expressando moléculas do MHC de classe II foi de 29,26% no grupo de animais tratados com *P. acnes* e 12,61% no grupo de animais controle. Entretanto, Balic *et al.*, 2006 demonstraram que 48,4 % da população de linfócitos obtidas de linfonodo abomasal expressavam MHC de classe II. Na figura 6, observamos dupla marcação para TCD4+ e MHC de classe II em 42,38% e 39,15% das células do linfonodo abomasal dos animais dos grupos tratado e controle respectivamente. Resultados apresentados por Puri *et al.*, 1985 demonstraram que o anticorpo anti-MHC de classe II do clone SBU 28.1 (o mesmo utilizado neste trabalho) reagiu exclusivamente com linfócitos B, e pouco com células slg- (células T ativadas) sendo que 50% e 42% das células obtidas de sangue periférico e de linfonodos mesentéricos e abomasais expressavam MHC de classe II, respectivamente.

A detecção de IL-5 seguiu o mesmo protocolo descrito por Gill *et al* 2000. Neste trabalho animais resistentes e infectados por *H. contortus* produziram níveis maiores de IL-5 e produção de IgE específica e elevada infiltração de mastócitos e eosinofilia na mucosa abomasal. O recrutamento de leucócitos granulares ao sitio da infecção é mediada por uma resposta Th2 polarizada envolvendo produção de IL-5 local que é conhecida estimular mastócitos e eosinófilos. A redução na carga parasitária pode ter ação pela

degranulação de leucócitos (Wakelin, 1984) em modelos murinos de helmintíase e em muitos casos a expulsão é auxiliada pela presença de anticorpos parasita específicos.

Os níveis de IL-5 foram maiores no grupo de animais tratados em relação ao grupo de animais controle, com diferença estatística nos dias 3 e 10 após o tratamento. A resposta imune Th2 foi também evidenciada em ovinos em animais geneticamente resistentes a *T. colubriformis* com elevada expressão de IL-4 mRNA nos tecidos linfáticos do trato gastrointestinal e sangue periférico.

Como podemos observar na figura 18, os níveis de IgE nos animais do grupo tratado foi significativamente maior que os animais do grupo controle, com diferença estatística no 3^o dia após o tratamento com *P. acnes* ($p=0,046$). Os níveis de IgE em resposta a várias infecções nematóides intestinais tem sido descritos (Shaw, 1997).

A ação da *P. acnes* nas células do sistema imune pôde ser evidenciada através de experimentos, onde a inoculação de *P. acnes* intraperitonealmente em camundongos após 24 horas, promoveu aumento de macrófagos, células NKT, aumento na liberação de TNF- α e NO e da expressão de moléculas do MHC de classe II, receptores de Fc, CD11b e CD11c (Ananias *et al.*, 2001). O efeito direto de *P. acnes* nos macrófagos *in vivo* poderia explicar a resistência dos animais a vários patógenos demonstrado pelo aumento da sobrevivência e diminuição da parasitemia como descrito (Hill, 1987; Abath, *et al.*, 1988).

Em outro trabalho, Ananias *et al.*, 2007 demonstraram que camundongos tratados com *P. acnes* e sua fração polissacarídica apresentaram aumento na população de macrófagos, células dendríticas imaturas, linfócitos B1a e células NK1.1+, TCD3+ sendo que a fração polissacarídica solúvel foi responsável principalmente pelo recrutamento de macrófagos, e aumento no número de células presente no exudato peritoneal.

Sabe-se que linfócitos derivados de precursores da medula migram para a cavidade peritoneal, se auto renovam e prontamente proliferam em resposta a antígenos timo independente, como a fração polissacarídica solúvel além de ativarem células dendríticas (Squaiella *et al.*, 2006 ;Stall *et al.*, 1996).

As mudanças histológicas evidenciadas na resposta imune a parasitas gastrointestinais são caracterizadas por uma hiperplasia celular com aumento no número de eosinófilos, aumento de IgA na mucosa abomasal, leucócitos globulares, e da interação entre mastócitos e eosinófilos, podendo variar de acordo com a idade do animal e o estágio da infecção (Salman & Duncan, 1984). Um aumento de eosinófilos e mastócitos após a infecção na região intestinal responsáveis pela expulsão do verme foi observado em animais ativamente imune ao parasita (Kelly & Ogilvie, 1972; Murray, 1972).

Na análise histológica do abomaso, os animais do grupo tratado apresentaram a região abomasal com aspecto pseudo-folicular e presença de células linfóides, com uma camada de muco contendo mistura de poucos linfócitos e muitas células epiteliais presentes nas mucosas. No grupo de animais controle observamos a mucosa com aspecto difuso com pouca reação celular no abomaso. Os linfonodos abomasais apresentaram hiperplasia dos folículos, com grandes centros germinativos e uma fina camada de linfócitos nos grupos tratados e controle. Porém, as áreas corticais e medulares apresentavam-se mais largas nos animais do grupo tratado quando comparado ao controle com grande número de infiltrado inflamatório contendo linfócitos organizados em folículos na mucosa formando um GALT (tecido linfóide associado ao intestino).

Nossos achados sugerem que o tratamento com a fração polissacarídica de *P. acnes* foi capaz de estimular os mecanismos de resistência direcionando a resposta para o tipo Th2, com ativação de células linfóides na mucosa abomasal e linfonodos, desta forma pode atuar contra a infecção por nematóides, e estratégia no controle da verminose em ovinos. É possível que o uso de *Propionibacterium acnes* e suas frações associadas a anti-helmíntico possa minimizar a resistência aos vermífugos comerciais.

6. 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.** 6° ed. São Paulo: Editora Revinter, 2008. 560 p.
- ABEL L.C.J.; CHEN S.; RICCA L.; MARTINS M.F;GARCIA, M. ANANIAS,J.S.; MUSSALEM,C.C.;SHAW,R. AND LONGO-MAUGERI, I.M.. Adjuvant effect of LPS and killed *Propionibacterium acnes* on the development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. **Parasite Immunology**, v31,p.1- 9, 2009.
- AL-QUAISY, H.H.; AL-ZUBAIDY, A.J.; ALTAIF, K.I., MAKKAWI, T.A. The pathogenicity of haemonchosis in sheep and goats in Iraq: 1. Clinical, parasitological and haematological findings. **Vet Parasitol.** v.24, n.(3-4), p.221-228, 1987.
- AMARANTE, A.F.T., BRICARELLO, P.A., ROCHA R.A., GENNARI, S.M. Resistance of Snata Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology** v.120, p.91-106, 2004.
- ANANIAS, R.Z.; BRAGA, E.G.; LONGHINI, A.L.F.; MUSSALEM,J.S.; SQUAIELLA,C.C., LONGO-MAUGERI. In vitro non-specific anti-tumoral activityand surface molecules expression in cells obtained from mice treated with killed *P. Acnes*. **Scand. J. Immunol.** v. 54(1), p. 133, 2001.
- BALIC, A. BOWLES, V.M. and MEEUSEN, E.N.T Cellular profile in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Immunology Immunopathology** v.75, p. 109-120, 2000.
- 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.

- 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.
- BECKER, A.M., JANIK, T.A. AND SMITH, I.K. *Propionibacterium acnes* immunotherapy in chronic recurrent canine pyoderma. **J. Vet Intern Med.** v.3, p26-30., 1989.
- 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 fecal worm egg count. *Vet. Parasitol.* V.6., p.249-263, 1996.
- 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 JE. Nonspecific resistance against *Trypanosoma cruzi* enhanced by *Corynebacterium parvum*. **J Parasitol**; v.62 645-646, 1976.
- 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.
- 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.
- COX, W.I. Examining the immunologic and hematopoietic properties of an immunostimulant **Vet Med**, v6, p424-428, 1988.
- DAWES J, TUACH SJ and MCBRIDE W.H. Properties of an antigenic polysaccharide from *Corynebacterium parvum*. **J Bacteriol**; 20:24-30, 1974

- DENAPOLI, P.M. Efeito imunoestimulante associado a anti-helmíntico no tratamento da verminose experimental em ovinos. **Tese de Mestrado** – UNIP Universidade Paulista, 2008.
- DOUCH,P.G.C.; MORUM,P.E.; RABEL,B. Secretion of Anti-parasite substances and leukotrienes from ovine gastrointestinal tissues and isolated mucosal mast cells. **Int. Jr. Parasitol.** V.26, n2, p205-211, 1996.
- EVANS, D.R. ; ROLLINGS , J.B., HUFF, G.K. HARTGROVE, T.B. and VAN KAMPEN, K.R. Inactivated *Propionibacterium acnes* (Imunoregulin) as adjuvant to conventional therapy in the treatment of equine respiratory disease. **Equine Pract.** V 10, p17-21, 1988.
- FAO. **Resistência a los antiparasitarios:** Estado actual com ênfasis en América Latina. Roma: Dirección de Producción y Salud Animal, 2003. 52p
- FELDMAN,B.F.; REBAR,A.H.; MACWILLIAMS,O.S. **Guia de hematologia para cães e gatos** .Ed. Roca, 1ª Ed. 2003.
- FOSTER, R.S., MACPHERSON, B.R., BROWDIE, D.A. Effect of *Corynebacterium parvum* on colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony formation. **Cancer Res.** 37, 1349–1355, 1977.
- 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: **22° Congresso Mundial de Buiatria, Hanover, Alemanha. Proceedings**, 2002.
- 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.
- 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.

- GONZALES, J.C. & GONÇALVES, P.C. Proteção anti-helmíntica do 2,6-diiodo-4-nitrofenol na haemoncose ovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.8, p.21-24, 1973.
- 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.
- HAWKINS, J.A. Economic benefits of parasite control in cattle. **Veterinary Parasitology**. v. 46, p.159-173, 1993.
- 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 on the pattern of development of experimental disseminated Leishmaniasis by *Corynebacterium parvum*. **J. Leukoc Biol**, v 41, p165-169, 1987.
- HUNTLEY, J.F.; NEWLANDS, G.F.J.; JACKSON, F.; MILLER, H.R.P. The influence of challenge dose, duration of immunity, or steroid treatment on mucosal mast cells and on the distribution of sheep mast-cell proteinase in *Haemonchus contortus* infected sheep. **Parasite immunol**. v.14, p.429-440, 1992.
- 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.
- KARANU, F.N., MCGUIRE, T.C., DAVIS, W.C., BESSER, T.E, JASMER, D.P.,. CD4+ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. **Parasite Immunol**. v.19, 435–445,1997.
- KATONA, I.M., URBAN, J.F., FINKELMAN, F.D. The role of L3T4+ and Lyt-2+ T cells in the IgE response and immunity to *Nippostrongylus brasiliensis*. **J. Immunol**. 140, 3206–3211, 1988.

- KELLY, J.D. AND OGILVIE, B.M. Intestinal mast cell and eosinophil numbers during worm expulsion in nulliparous and lactating rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Int Arch Allergy Appl. Immunol** v 43, p497-509, 1972.
- KERR, M. G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2ed. São Paulo: Roca, 2003. 436p.
- KLIGMAN, A.M.; LEYDEN, J.J.; Mc GINLEY. Bacteriology. J. Invest. Dermatol. v.67, p.160-168, 1976.
- 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.
- KOYAMA, K., TAMAUCHI, H., ITO, Y., 1995. The role of CD4+ and CD8+ T cells in protective immunity to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. **Parasite Immunol**. v.17, 161–165, 1995.
- LE JAMBRE, L. F. Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus* infected sheep. **International Journal for Parasitology**, Elmsford, v.25, n.3, p.269-273, 1995.
- LEYDEN, J.J.; Mc GINLEY; Vowels, B. *Propionibacterium acnes* colonization in acne and nonacne. **Dermatology**. v.196, p. 55-58, 1998.
- LONGHINI, A.L.F., MUSSALEM, J.S., TAKAHASHI, H., STRAUS, A., LONGO-MAUGE´ RI, I.M. Soluble polysaccharide from *Propionibacterium acnes* with biological effects. In: 11th International Congress of Immunology, Scand. **J. Immunol**. 54 (Suppl. 1),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.
- MADDOX, J.F.; MACKAY, C.R. AND BRANDON, M.R. Surface antigens, SBU-T4 and SBU-T8, of sheep T lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies. **Immunology** v. 55(4):739-748, 1985.
- MÁRA M, JULÁK J, BEDNÁR M, OCENÁSKOVÁ J, MIKOVÁ Z, DOHNALOVÁ A. The influence of *Propionibacterium acnes* (*Corynebacterium parvum*) fractions on immune response in vivo. **Zentralbl Bakteriologie**. 1994 Nov;281(4):549-55.
- MÁRQUEZ LARA, D. Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. **Revista Corpoica**, v.4, p.55-71, 2003.
- MARTINS, M. F. Avaliação da resposta imune com o uso de anti-helmíntico e imunoestimulante em ovinos com verminose. **Tese de Mestrado** – UNIP Universidade Paulista, 2006.
- 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
- 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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.21, n.3, p.117-121, 2001.
- MOLENTO, M.B. Multidrug resistance in *Haemonchus contortus* associated with suppressive treatment and rapid drug alternation. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.272, 2004.
- MURRAY, M. Immediate hypersensitivity effector mechanisms II. In vivo reactions In E.J.L. Soulsby (Editor). **Immunity to Animal Parasites**. Academic PRESS, New York, p155-190., 1972.

- MUSSALEM, J.S.; VASCONCELOS J. R.C.; SQUAIELLA, C.C.; ANANIAS, R.G.; BRAGA, E.G.; RODRIGUES, M.M.; LONGO-MAUGERI, I.M. Adjuvant effect of the *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on the immunization with plasmidial DNA containing a *Trypanosoma cruzi* gene. **Microbiol. Immunol.** V.50, N.4, P253-263, 2006.
- OKAMURA, H., TSUTSUI, 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-g production by T cells. **Nature** v.378, 88–91, 1995.
- PALMER JW, GERLOUGH TD. Scientific apparatus and laboratory methods. **Science**;v.92:155–6, 1940
- PENÃ, M.T., MILLER, J.E., HOROHOV, D.W., 2004. Effect of dexamethasone treatment on the immune response of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. **Vet. Parasitol.** v.119, 223–235.
- PERNTHANER A; R.J. SHAW; McNEILL M.M.; MORRISON L. AND HEIN W.R. Total and nematode-specific IgE response in intestinal lymph of genetically resistant and susceptible sheep during infection with *Trichonstrongylus columbriformis* **Veterinary Immunology Immunopathology** v. 104 p.69-80, 2005.
- PERRY, A.L. & LAMBERT, P.A. *Propionibacterium acnes*. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 42, p.185-188, 2006.
- 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 immunomodulators used in veterinary medicine. **Adv Vet Sci Com Med.** v.35, p.43-99, 1990.
- RAINBIRD MA, MACMILLAN D, MEEUSEN EN. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of

antibody, complement and interleukin-5. **Parasite Immunol** v.20 93-103.48, 1998.

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**. 1ºed. 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.

SALMAN, S.K.; DUNCAN , J.L. The abomasal histology of worm-free sheep given primary and challenge infections of *Haemonhcus contortus*. **Vet Parasitol**, v. 16 p43-54, 1984.

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

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.

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.

SILVERMAN, P.; MANSFIELD, M.E.; SCOTT H.L. 1970. *Haemonchus contortus* infection in sheep: effects of various levels of primary infections on nontreated lambs. **American Journal of Veterinary Research**, vol.31, n. 5, p. 841-854.

SMITH WD. Protection in lambs immunised with *Haernonchus contortus* gut membrane proteins. **Res Vet Sci** 1993; 54: 94–101.

SOCCOL VT, SOUZA FP de, SOTOMAIOR C, CASTRO EA, MILCZEWSKI V, MOCELIN G e SILVA M do CP e. Resistance of Gastrointestinal Nematodes to Anthelmintics in Sheep (*Ovis aries*), 2004.

SOTOMAIOR, C. S & SOCCOL, V. T. Infecção parasitária em ovinos criados em sistema intensivo: acompanhamento de evolução do parasitismo durante um ano. **A Hora Veterinária**, v.20, n. 119, p. 10-15, jan./fev. 2001.

SOULSBY, E.J. The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. **Immunol Lett.** v.16, n.(3-4), p.315-320, 1987.

SQUAIELLA,C.C.; ANANIAS,R.Z; MUSSALEM,J.S.;BRAGA,E.G.RODRIGUES, E.G.R; TRAVASSOS, LR; LOPES J.D. AND LONGO-MAUGERI,I.M. *In vivo* and *in vitro* effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on mouse bone marrow stem cells and dendritic cell differentiation. **Immunobiology** v.211 105–116,2006.

STALL AM, Wells SM, Lam KP. B1-cells: unique origins and functions. **Immunology** v 8, p. 45–59, 1996.

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(9),p.758-61, 2000.

STEAR,M.J. ;MURRAY,M. Genetic resistance to parasitic disease of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v54, p161-176, 1994.

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.

- TEREFE,G.; LACROUX,C.; ANDREOLETTI,O.; GRISEZ,C.; PREVOT,F.; BERGEAUD,J.P.;PENICAUD,J. Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. **Parasit. Immunol** V.29, p.415-424,2007.
- THOMAZ-SOCCOL, V.T.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F.P.; CASTRO, E.A.; SILVA, M.C.P.; MILCZEWSKI, V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Veterinary Record**, v.139, p.421-422, 1996.
- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 8^a ed. São Paulo: Editora Roca, 2009.
- TOMECKI, J.& MARA, M., 1987. The immunological activities of components isolated from *Corynebacterium parvum* in mice injected with polyoma tumor cells. **Neoplasma** v. 34, 15–22.
- TSUJI, H., MUKAIDA, N., HARADA, A., KANEKO, S., MATSUSHITA, E., NAKANUMA, Y., TSUTSUI, H., OKAMURA, H., NAKANISHI, K., TAGAWA, Y., IWAKURA, Y., KOBAYASHI, K., MATSUSHIMA, K., 1999. Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in *Propionibacterium acnes*-primed INF-gdeficient mice by a concomitant reduction of TNF- α , IL-12 and IL-18 production. **J. Immunol.** v.162, 1049–1055.
- 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, p. 1685-1709,1996.
- URBAN, J.F., KATONA, I.M., FINKELMAN, F.D. *Heligmosomoides polygyrus*: CD4+ but not CD8+ T cells regulate the IgE response and protective immunity to mice. **Exp. Parasitol.** v.73, 500– 511, 1991.
- 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

VEALE, P.I. Resistance to macrocyclic lactones in nematodes of goats. **Australian Veterinary Journal**, v.80, p.303-304, 2002.

WAKELIN, D. Evasion of the immune response: survival within low responder individuals of the host population. **Parasitology**. v.88, p.639-657, 1984.

YATSUDA, A.P.; KRIJGSVELD, J.; CORNELISSEN, A.W.C.A.; HECK, A.J.R.; VRIES, E. Comprehensive analysis of 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.

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](#)