

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Gustavo Toscan

**PARÂMETROS IMUNOPARASITOLÓGICOS DE CORDEIROS
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Haemonchus* spp., *Teladorsagia*
spp. E *Trichostrongylus* spp.**

Santa Maria, RS, 2016

Gustavo Toscan

**PARÂMETROS IMUNOPARASITOLÓGICOS DE CORDEIROS NATURALMENTE
INFECTADOS POR *Haemonchus* spp., *Teladorsagia* spp. E *Trichostrongylus* spp.**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**

Orientadora: Prof^a. Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS, 2016

Gustavo Toscan

**PARÂMETROS IMUNOPARASITOLÓGICOS DE CORDEIROS NATURALMENTE
INFECTADOS POR *Haemonchus* spp., *Teladorsagia* spp. E *Trichostrongylus* spp.**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**

Aprovado em 10 de março em 2016

Fernanda Silveira Flores Vogel (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Luís Antônio Sangioni (UFSM)

Sônia Ávila Botton (UFSM)

Tiago Gallina Corrêa (UNIPAMPA)

Luciana Mori Viero (UNIJUÍ)

Santa Maria, RS, 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, a Nossa Senhora Aparecida pela saúde, força e por guiar meus caminhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM (PPGMV), pela oportunidade e estrutura oferecidas para a realização deste trabalho. Às agências Financiadoras CAPES e CNPq, que apoiaram neste projeto.

À minha orientadora Dra. Fernanda Silveira Flores Vogel, pelos ensinamentos, conselhos e pela compreensão ao longo destes longos anos de convívio e amizade. Pelas cobranças sinceras e por me incentivar a superar os obstáculos que se impõe ao longo da minha caminhada.

Ao professor Dr. Luís Antônio Sangioni, pela convivência, ensinamentos e extraordinário companheirismo demonstrados durante o trabalho no Laboratório de Doenças Parasitárias.

Aos Laboratórios Labimed e Lacvet-UFSM que disponibilizaram toda a sua estrutura, equipamentos e equipe para realização das atividades e processamento das amostras.

À Maria, pela competência, organização e empenho na execução de suas atividades como secretária do PPGMV.

Aos competentes e fiéis amigos Gustavo C. Cadore e Alfredo S. Cezar, sempre dispostos a ajudar a enfrentar os desafios desde a graduação.

Ao meu pai Gelavir Toscan e minha mãe Salete Toscan, pelo amor incondicional, confiança, serenidade, carinho e por apoiarem minhas decisões ao longo da minha trajetória.

Aos meus irmãos Ângelo Toscan Neto e Angelisa Toscan, pela alegria e sinceridade nas palavras, demonstrações de incentivo, dispostos e solícitos em qualquer circunstância.

À Roberta Carneiro da Fontoura Pereira, minha noiva, por todos esses momentos, bons e ruins, por todo o amor e incentivo, pelo companheirismo de todos estes dias, por desejar meu sucesso e por estar ao meu lado continuamente em cada novo desafio.

À Sra. Neyt Carneiro da Fontoura Pereira pela amizade, confiança e apoio em todos os momentos.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFSM, pelos bons e alegres momentos que compartilhamos e excelente ambiente de cooperação e ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PARÂMETROS IMUNOPARASITOLÓGICOS DE CORDEIROS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Haemonchus* spp., *Teladorsagia* spp. E *Trichostrongylus* spp.

AUTOR: GUSTAVO TOSCAN
ORIENTADOR: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL
Santa Maria, 10 de março de 2016.

No contexto produtivo da ovinocultura atual, o controle da infecção parasitária estabelece um desafio constante aos produtores, isso porque os parasitas gastrointestinais apresentam altas prevalências nos rebanhos, possuem elevada patogenicidade e frequentes resistências aos produtos antiparasitários. As infecções parasitárias em ovinos caracterizam-se por ocorrer simultaneamente por vários gêneros de nematódeos, no entanto, *Haemonchus contortus* é considerado o principal parasita gastrointestinal dos ovinos. Em algumas situações, métodos integrados de controle parasitário disponíveis tornam-se ineficazes diante de uma situação crítica, agravada pela resistência dos parasitas aos anti-helmínticos. Diante disso, a resposta imune animal torna-se ponto central na dinâmica e limitação das consequências relacionadas a infecção parasitária. A resposta imunológica sistêmica e local compõem um conjunto de mecanismos restritivos ou não, caracterizadas de acordo com a idade animal, condição fisiológica, manejo e estado nutricional. Contudo, preceitos dos quais o sistema imunológico atua e a maneira como ocorre ainda não está completamente elucidado, existindo alguns fatores a serem desvendados para que se possa estabelecer uma proteção imune segura e duradoura contra os parasitas gastrointestinais. No Capítulo 1, demonstra-se as características da resposta imune de ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrointestinais mantidos em campo nativo. O estudo envolveu um conjunto de técnicas imunológicas, parasitológicas e clínicas para caracterizar e estabelecer as vias da resposta imune de animais resilientes. Neste estudo, foi possível estabelecer uma fraca correlação negativa entre eosinófilos e OPG em ovinos Corriedale resilientes. Interleucina 6, TNF- β , IFN- γ e imunoglobulinas (Ig) G, A e E tiveram aumento progressivo durante o estudo refletido na modulação e melhora da resposta imunológica dos ovinos. No Capítulo 2, demonstra-se resposta imune de ovinos naturalmente infectados com *Haemonchus* spp. em diferentes níveis alimentares, submetidos a pastagem nativa e pastagem cultivada. Os animais foram alocados em pastagem nativa por 42 dias e em seguida transferidos para pastagem cultivada até o dia 84. Ovinos alimentados com pastagem cultivada de aveia (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium multiflorum*) tiveram redução de OPG e aumento da eficiência da resposta imune. A melhora no suporte nutricional aos animais induziu um aumento significativo na resposta imune dos ovinos, caracterizada por eosinofilia periférica e o aumento das concentrações séricas de IgE, IgA, IgG, TNF- β , IFN- γ e IL-6.

Palavras-chave: Resposta imune, interleucinas, ovinos, nutrição.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

IMMUNOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL PARAMETERS OF LAMBS NATURALLY INFECTED WITH *Haemonchus* spp., *Teladorsagia* spp. AND *Trichostrongylus* spp.

AUTHOR: GUSTAVO TOSCAN
ADVISER: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL
Santa Maria, March, 10th 2016.

In the context of the current sheep-rearing, control of parasitic infection establishes a constant challenge to producers, because the gastrointestinal parasites have high prevalence in flocks, highly pathogenic and frequents resistance to anthelmintic products. The parasitic infections of sheep are characterized by simultaneously occur for several genera of nematodes, however, *Haemonchus contortus* is considered the major gastrointestinal parasites of sheep. In some situations, integrated methods of parasite control available become ineffective in the face of critical situation, aggravated by the parasite resistance to anthelmintics. Therefore, animal immune response became a central point in the dynamics and limiting the consequences related to parasitic infection. The systemic and local immune responses comprise a set of restrictive mechanisms or not characterized according to the animal's age, physiological condition, nutritional and management status. However, precepts of which the immune system works and how occurs is not fully understood, there are some factors to be revealed so that we can establish a secure and lasting immune protection against gastrointestinal parasites. In Chapter 1, shows the characteristics of the immune response of sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes kept on native pasture. The study involved a set of immunological, parasitological and clinical techniques to characterize and establish the pathways of the immune response in resilient animals. In this study, was possible to establish a weak negative correlation between Eos and OPG in resilient Corriedale sheep. Interleukin-6, TNF- β , IFN- γ and In this study, a immunoglobulins (Ig) G, A and E had progressive increase during the study reflected in modulation and improves the immune response in sheep. In Chapter 2, demonstrated immune response of sheep naturally infected with *Haemonchus* spp. in different feeding levels, submitted in native pasture and cultivated pasture. The animals were allocated into native pasture for 42 days and then transferred to cultivated pasture until 84 days. Sheep feed with pasture cultivated of oats (*Avena sativa*) and ryegrass (*Lolium multiflorum*) had reduction in OPG and increased efficiency immune response. The improvement in nutritional support to animals induced a significant increase in the immune response of sheep, characterized by peripheral eosinophilia and increased serum concentrations of IgE, IgA, IgG, TNF- β , IFN- γ and IL-6.

Keywords: Immune response, interleukins, sheep, nutrition.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I:

Figure 1. Immune profiles of resilient Corriedale sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. Averages and standard deviations of Immunoglobulins (Igs) - IgE, IgG and IgA (A); Interleukin 6 - IL-6 (B); Interleukin 10 - IL-10 (C); Interferon-gamma - IFN- γ (D); Tumor necrosis factor-beta - TNF- β (E) in serum of sheep. Different letters in each region indicate significant differences between averages ($p < 0.05$).....27

CAPITULO II:

Figure 1. Mean eggs per gram (EPG) and standard deviation of the mean in lambs naturally infected with *Haemonchus* spp.. Day 42 corresponds to date of the pasture change. Different letters in each region indicate significant differences between means ($P < 0.05$).....42

Figure 2. Mean of eosinophil concentration and standard deviation of the mean in lambs naturally infected with *Haemonchus* spp.. Day 42 corresponds to date of the pasture change. Different letters in each region indicate significant differences between means ($P < 0.05$).....42

Figure 3. Means and standard deviations of interleukin-6 - IL-6 (a), IL-10 (b), tumor necrosis factor-beta - TNF- β (c) and interferon-gamma - IFN- γ (d), in serum of lambs naturally infected with *Haemonchus* spp.. Day 42 corresponds to date of the pasture change. Different letters in each region indicate significant differences between means ($P < 0.05$).....43

Figure 4. Means and standard deviations of immunoglobulins in serum of lambs naturally infected with *Haemonchus* spp.. Day 42 corresponds to date of the pasture change. Different letters in each line region indicate significant differences between means ($P < 0.05$).....43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3. CAPITULO I - Immune profiles of resilient Corriedale sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes.....	20
Abstract.....	20
Resumo.....	21
Ethics Committee.....	25
References.....	25
Figure 1.....	28
4. CAPITULO II - Immune response in sheep naturally infected with <i>Haemonchus</i> spp. in different nutritional conditions.....	29
Abstract.....	29
Resumo.....	30
Introduction.....	30
Material and Methods.....	31
Experimental design.....	31
Fecal and blood sampling.....	32
Fecal and blood analysis.....	32
Pasture chemical analysis.....	33
Statistical analysis.....	33
Results.....	33
Parasitological data.....	33
Immune response.....	34
<i>Haematocrit and circulating eosinophil concentrations</i>	34
<i>Interleukins level</i>	34
<i>Serum immunoglobulins levels</i>	34
Pasture analysis.....	34
Discussion.....	35
Conclusion.....	37
References.....	38
Figure 1.....	42

Figure 2	42
Figure 3	43
Figure 4	43
5. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

Nematódeos gastrointestinais são considerados, atualmente, os parasitas causadores de uma das principais enfermidades do rebanho de ovinos. As endoparasitoses exercem um papel central nas criações de ovinos, relacionadas principalmente aos prejuízos econômicos e produtivos, podendo ser consideradas como um dos principais fatores restritivos à viabilidade em diversas criações de pequenos ruminantes (BIFFA; JOBRE; CHAKKA, 2006; LEATHWICK et al., 2009).

Embora os ovinos possam ser infectados simultaneamente por diferentes espécies de nematódeos, o principal parasita que acomete os ovinos, certamente por apresentar características como: prevalência, patogenicidade e intensidade da infecção é o *Haemonchus contortus* (O'CONNOR et al., 2006, ALBA-HURTADO & MUÑOZ-GUZMÁN, 2013).

Controle destes parasitas, no contexto produtivo baseia-se, quase inteiramente, na administração de compostos químicos anti-helmínticos. Infelizmente, um dos problemas gerados pelo uso intenso e indiscriminado destes produtos é o aumento da resistência a essas drogas e esta situação tem consequências enormes nos países em que a produção de ovinos é importante economicamente (CEZAR et al., 2010). Com o aumento dos relatos de resistência aos anti-helmínticos, há uma tendência para o surgimento de estratégias alternativas para o controle dos nematódeos como: métodos integados de controle, método Famacha (MOLENTO et al., 2004) e produção de vacinas e moduladores da resposta imune (ALBA-HURTADO & MUÑOZ-GUZMÁN, 2013).

Os mecanismos envolvidos na resposta imunológica diante deste desafio parasitário não estão totalmente esclarecidos, no entanto as respostas inata e adaptativa estão envolvidas. Este conjunto das ações do sistema imune animal e das características da infecção, especialmente com *H. contortus*, determinam as características de indivíduos resistentes, resilientes e susceptíveis a uma infecção parasitária.

Os trabalhos apresentados nesta tese foram realizados com o objetivo de investigar, através de um conjunto de parâmetros clínicos, imunológicos e parasitológicos, as características da resposta imune em ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrointestinais, mantidos em campo nativo. Além disso, estabelecer o perfil imune de ovinos infectados naturalmente com *Haemonchus* spp. em duas condições alimentares distintas (pastagem nativa e pastagem cultivada).

Nesse sentido, este trabalho conta com uma revisão de literatura sobre a importância da ovinocultura, abordando os principais endoparasitas dos ruminantes, resistência parasitária aos

anti-helmínticos e principais mecanismos da resposta imune dos ovinos. Em seguida, são apresentados dois capítulos: Capítulo I: Perfis imunológicos de ovinos Corriedale resilientes naturalmente infectados por nematódeos gastrointestinais; Capítulo II: Resposta Imune de ovinos naturalmente infectados com *Haemonchus* spp. em diferentes condições nutricionais. As conclusões gerais desses estudos são apresentadas em conjunto, no fechamento desta tese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Infecções por nematódeos gastrointestinais são considerados as principais enfermidades dos rebanhos de ovinos, causando perdas importantes na cadeia produtiva da ovinocultura. As consequências das infecções estão relacionadas com os enormes prejuízos econômicos e manifestam-se de diversas formas, atribuído ao impacto negativo na produção e ao bem estar, determinando queda na conversão alimentar, retardo no crescimento e desenvolvimento, perda de peso, palidez de mucosas/anemia, diminuição no potencial e desempenho reprodutivo e frequentemente determina a morte de animais mais debilitados, especialmente de ovinos jovens (MacRAE, 1993; McLEOD, 1995; BAHIRATHAN et al., 1996; KAGIRA & KANYARIA, 2001; WEST et al., 2009). Somado a isso, o déficit produtivo em infecções subclínicas, que representam a maioria dos quadros clínicos das parasitoses gastrointestinais, acarreta ainda mais impactos econômicos (FORBES et al., 2002) pois, muitas vezes podem passar despercebidas pelo produtor em um rebanho ovino (WEST et al., 2009).

Ovinos podem ser parasitados simultaneamente por várias espécies de nematódeos gastrointestinais. Os principais gêneros que acometem os ovinos pertencem a Classe *Nematoda*, Ordem *Strongylida*, Superfamília *Trichostrongyloidea*. *Trichostrongylus colubriformis* é um parasita do intestino delgado, é considerada uma espécie muito importante em ovinos, especialmente em animais jovens. Esta espécie provoca diarreia, lesão na mucosa intestinal com exsudação das proteínas séricas causando, frequentemente, edema submandibular nos ovinos (AMARANTE 2004). *Cooperia* spp. é considerado um parasita menos prevalente, de baixa patogenicidade, também localizado no intestino delgado, que pode causar enterite catarral e edema da mucosa intestinal em infecções moderadas a graves (MONTEIRO et al., 2010). *Teladorsagia (Ostertagia)* spp. é um parasita do abomaso dos ovinos, considerado importante na produção de animais onde o clima da região apresenta períodos longos de frio (MEDEROS et al., 2010) e caracteriza-se principalmente, por estabelecer latência, especialmente as formas larvais no interior das glândulas abomasais (MONTEIRO et al., 2010). Dentre todos parasitas, o *Haemonchus contortus* é o principal parasita que acomete os ovinos e se destaca por apresentar intensidade nos requisitos básicos de prevalência, patogenicidade e magnitude da infecção. Quanto a prevalência devido o parasita estar distribuído em muitas regiões do mundo, inclusive no Brasil (ALBA-HURTADO & MUÑOZ-GUZMÁN, 2013). Para a patogenicidade e intensidade de infecção, o fato do seu comportamento hematófago e estar associado com a hemorragia e espoliação sanguínea provocada no abomaso de ovinos infectados (WALLER, & CHANDRAWATHANI 2005).

H. contortus está envolvido nas principais perdas de produção/econômicas em pequenos ruminantes (BAMBOU et al., 2009) e este efeito negativo da infecção pode levar à anemia grave nos animais, diminuição da conversão alimentar, hipoproteinemia em diferentes graus, perda de peso e elevada mortalidade (AMARANTE, 2001) especialmente em animais jovens (WEST et al., 2009). A infecção pelo *H. contortus* e pelos demais gêneros, se caracteriza pela ingestão de pastagens contaminadas com larvas em terceiro estágio (L3) que apresentam dupla cutícula protetora (CARVALHO 2015). A bainha externa confere proteção extra para as larvas no meio ambiente, que mais tarde se perde quando as larvas entram em contato com o fluido ruminal, onde as larvas recebem estímulo para iniciar a infecção. Este estímulo é desencadeado pelo pH, reflexo de um sistema H_2CO_3/HCO_3^- -tampão no rúmen (HERTZBERG et al., 2002). O grau de infecção nos animais, dependente de fatores relacionados com as condições climáticas tais como: taxa de contaminação da pastagem, comportamento de pastoreio, infecções prévias e o estado fisiológico do animal (WALLER & CHANDRAWATHANI 2005). As larvas aderidas na mucosa do abomaso na infecção pelo *H. contortus*, induzem hiperplasia das glândulas abomasais, com intensa substituição por novas células não secretoras de ácido clorídrico (HCl) e reação de hipersensibilidade imediata que se caracteriza pela secreção de imunoglobulinas E, hiperplasia de mastócitos na mucosa e marcada eosinofilia periférica e tissular (BALIC et al., 2000).

Na infecção parasitária, o sistema imunológico animal é desafiado e imediatamente contrapõe ao ataque através das respostas imune inata e adaptativa, que são essenciais para o combate e/ou controle da infecção no hospedeiro (MEEUSEN et al., 2005). O sistema imune inato é considerado a primeira barreira de defesa, estando presente a partir do nascimento do animal, atuando de maneira inespecífica para qualquer agente e sem produzir células de memória. As células que participam desta barreira são as células fagocitárias (macrófagos, neutrófilos e mastócitos), leucócitos e células natural killer (NK). Diante de infecções por endoparasitas, a resposta inicial do sistema imune está associada à reação inflamatória local, retardo na infecção e recrutamento de outras células inflamatórias pela liberação de proteínas sinalizadoras, denominadas citocinas (DELCENSERIE et al., 2008). Além disso, participação da resposta imune inespecífica é determinada principalmente através do sistema complemento (via alternativa) especialmente diante de estágios larvais do parasita. Este mecanismo, quando ativado, libera substâncias vasoativas e quimiotáticas, mobilizando eosinófilos para o local da infecção, que promovem efeitos citotóxicos, independentemente de mecanismos específicos.

A expulsão das larvas de *H. contortus* na mucosa do abomaso em ovinos pode ocorrer de forma imediata ou tardia. A expulsão imediata ocorre quando as larvas são atacadas por

mastócitos e leucócitos teciduais, logo após a invasão destas mesmas larvas ao epitélio glandular do abomaso. Simultaneamente, outros mecanismos são desencadeados como hipermotilidade, hipersecreção gástrica, hiperplasia de células caliciformes com subsequente aumento de produção de muco (MEEUSEN & BALIC, 2000; BALIC, 2002). Estas reações são adotadas, na tentativa de provocar condições para inviabilizar o estabelecimento das larvas no tecido do hospedeiro (MEEUSEN & BALIC, 2000). Estes mecanismos podem explicar porque algumas raças ou genótipos geneticamente resistentes aos nematódeos neutralizam a infecção durante estágios iniciais (ALBA-HURTADO & MUÑOZ-GUZMÁN, 2013).

Em contrapartida ao ataque parasitário, o sistema imune desenvolve uma resposta específica e muito mais consistente e duradoura. A expulsão tardia das larvas de *H. contortus* ocorre quando a resposta imune específica é organizada contra as larvas presentes nas glândulas abomasais. Esta ação é coordenada por linfócitos T CD4+ e deliberada por linfócitos B de memória, anticorpos IgA e IgE, eosinófilos citotóxicos dependentes de anticorpos e via clássica do complemento (BALIC, 2002).

Dependendo do estímulo induzido pela infecção parasitária, as células T CD4+, por influência de citocinas produzidas pelas células apresentadoras de antígenos, se desenvolvem em células T auxiliares (Th), que se diferenciam em Th1, Th2 ou Th17, e T reguladoras (Treg) (GILL et al., 1993). Linfócitos tipo 1 (Th1) são caracterizados pela produção de IL-2, IFN- γ e TNF- β que participam como mediadores da resposta celular e proteção contra parasitas intracelulares como é o caso de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, por exemplo. O predomínio da resposta por linfócitos Th1 em animais infectados por helmintos, na maioria das vezes, está relacionado com uma baixa ou menor capacidade de eliminação do agente, caracterizando na maioria das vezes, uma infecção crônica (TIZARD, 2008). É nestes casos, onde se faz necessário os tratamentos com medicamentos antiparasitários controlar e auxiliar o a infecção parasitária neste animal (TIZARD, 2008).

O direcionamento da resposta tipo 2 (Th2), caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, participam sinalizando a resposta humoral e estão associadas aos mecanismos efetores envolvendo imunidade contra a presença de helmintos. O tipo Th2 promove a formação destes mediadores, que quando ativados, promovem o recrutamento de eosinófilos, proliferação de mastócitos na mucosa abomasal (JASMER, et al., 2007) e estimulam a proteção sistêmica com anticorpos (IgG parasita-específico) (LACROUX et al., 2006; MILLER & HOROHOV, 2006). Esta condição determina a habilidade dos animais em eliminar os helmintos e por vezes caracteriza ovinos resistentes a infecção (TIZARD, 2008).

A produção de IL-4 é necessária para o desenvolvimento das células Th2 e inibitória para Th1. Da mesma maneira, a expressão de INF- γ inibe Th2 e, juntamente com IL-12, estimula Th1 (LIEW, 2002). A resposta Th1 e Th2 são antagonistas uma da outra e como a resposta efetiva à infecção por parasitas gastrointestinais é normalmente dependente de células Th2, em níveis elevados de citocinas produzidas por Th1 podem limitar a resposta imune do hospedeiro (ALBA-HURTADO & MUÑOZ-GUZMÁN, 2013).

A resistência à infecção e a eliminação dos helmintos não depende somente de uma célula em particular ou um único mecanismo molecular, múltiplas vias estão envolvidas para a degradação e eliminação parasitária (MAIZELS et al., 2012). A suscetibilidade e resistência aos parasitas gastrointestinais, especialmente ao *H. contortus* dependem do tipo de resposta imune montada frente ao parasita. Linfócitos CD4+ aumentam durante a infecção em animais susceptíveis e resistentes, entretanto, os dois grupos respondem a presença do parasita, mas de diferentes maneiras. Comparando aos ovinos resistentes a infecção, os animais susceptíveis produzem mais INF- γ e menos anticorpos específicos, eosinófilos circulantes e abomasais, portanto, suscetibilidade está associado à resposta Th1 e resistência a resposta Th2 (GILL, et al., 2000).

A habilidade de animais tornarem-se susceptíveis, resilientes ou resistentes às infecções parasitárias está diretamente relacionada com os mecanismos adotados pelo sistema imune diante do desafio. Os animais se infectam com diferentes gêneros de parasitas e em diferentes níveis. Animais resistentes as estas infecções não rejeitam completamente a doença, mas tem uma carga parasitária inferior aos animais susceptíveis (ALBA-HURTADO & MUÑOZ-GUZMÁN, 2013). Em resposta a infecção por *H. contortus*, por exemplo, um grupo de ovinos do rebanho (5-10%) desenvolvem características imunológicas eficientes, tornando-se animais resistentes a infecção e capazes de limitar o parasitismo e os prejuízos atribuídos a ela. Por outro lado, os animais susceptíveis do rebanho (5-20%) são incapazes de responder imunologicamente de forma satisfatória, apresentando sinais clínicos da haemoncose, eliminando nas fezes grande quantidade de ovos do parasita (PAOLINI, 2005). A maior parte do rebanho, (60-70%) é classificada como animais resilientes e desenvolvem competência imunológica possuindo características peculiares em permanecer com intenso parasitismo, desenvolvendo a capacidade de serem tolerantes à infecção, sofrendo nulas ou baixas perdas produtivas (WOOLASTRON & BAKER, 1996). Estes animais estabelecem habilidade compensatória ao efeito negativo, por manter seus parâmetros produtivos sem manifestar sinais clínicos da infecção, com variável eliminação de ovos nas fezes (PAOLINI, 2005). Esta

tolerância à infecção é transitória e os ovinos nesta condição, no decorrer do período, poderão sofrer as consequências da intensa carga parasitária (ALBERS et al., 1987).

Os helmintos também induzem mecanismos para regular a imunidade do hospedeiro não somente em seu favor, mas em busca de um ambiente mutuamente benéfico para a sobrevivência de ambos - parasita e hospedeiro. Dessa forma, a importância da infecção por helmintos inclui não somente o efeito patogênico do parasita, mas também o efeito modulatório sobre o sistema imune. Além disso, alguns fatores relacionados ao indivíduo são fundamentais para determinar a eficiência da resposta imune. A idade dos ovinos no momento da infecção pode determinar uma maior susceptibilidade aos nematódeos. Ovinos jovens, não possuem efetividade satisfatória na ação contra os helmintos e apresentam susceptibilidade maior que comparados a animais adultos. Cordeiros jovens com idade de três a seis meses de idade possuem baixa população de linfócitos T CD4+ na mucosa do abomaso e com isso reduzida capacidade de sucesso na ação contra os nematódeos (WATSON, et al., 1994).

Condições fisiológicas distintas também podem influenciar na magnitude e intensidade na resposta imune. Animais gestantes e fêmeas em lactação demonstram modificações nas vias efetoras da resposta imune, favorecendo dessa maneira os parasitas (KAHN, et al 2003; GREER, 2008). Durante o “spring rise”, que é o período que antecede o nascimento do cordeiro e também alguns dias após o parto, ocorrem adaptações hormonais no organismo da fêmea gestante, que tem interferência direta sobre a atividade das células efetoras do sistema imune (KAHN et al., 2003).

Manejo e estado nutricional podem ser bastante determinantes na relação de infecção entre parasita-hospedeiro. Animais que recebem alimentação de boa qualidade podem apresentar aumento na habilidade de enfrentar as consequências adversas ao parasitismo e limitar o estabelecimento das larvas infectantes (COOP & KYRIAZAKIS, 2001). Ovinos parasitados requerem quantidade extra de proteína metabolizável para reparar ou substituir tecidos lesados, bem como expressar uma resposta imunológica satisfatória. Estima-se que esta quantidade proteica aumente entre 20 – 25% quando os animais são expostos às infecções, especialmente cordeiros em crescimento e ovelhas no periparto (KYRIAZAKIS; HOUDIJK, 2006). A resposta imune eficiente, contra infecções por helmintos, gera um custo ao metabolismo do animal e estima-se que a manutenção da imunidade contra nematódeos gastrointestinais em ovinos implica em perdas de 15% na produtividade (GREER, 2008). Estudos demonstram que, dietas com elevado nível de proteína melhoram a resposta imunológica, redução no grau de infecção por helmintos e melhora no desempenho produtivo de cordeiros (LOUVANDINI et al., 2006).

O controle parasitário é imprescindível para o sucesso dos sistemas de produção de ruminantes e atualmente, é baseado na administração de compostos químicos anti-helmínticos. Entretanto, o maciço e indiscriminado uso destes produtos tem aumentado o número de populações de helmintos resistentes (RAMOS, et al., 2004) e a realidade que se observa no campo, é compatível com a amplitude dos problemas de resistência parasitária em diferentes regiões (KAPLAN, 2004a; WOLSTENHOLME et al., 2004).

Embora com surgimento de novas drogas, que aparecem como soluções para casos com resistência múltipla (KAMINSKY et al., 2008), os nematódeos gastrointestinais têm elevada diversidade genética sujeitos a seleção quando submetidos aos medicamentos antiparasitários, assim os parasitas resistentes carregam genes ou alelos do gene e transmite aos seus descendentes, que reduz a susceptibilidade a uma droga (GEARY et al., 1999). Isso ocorreu com o monepantel, na Nova Zelândia onde dois anos após a introdução do medicamento nas propriedades já foram reportados casos de resistência à *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* em cabras e ovelhas (SCOTT et al., 2013) e em ovinos no Uruguai com populações de *H. contortus* (MEDEROS et al., 2014).

A resistência aos antiparasitários não é uma característica pontual, ela se desenvolve gradualmente no rebanho e é consequência da utilização incorreta dos fármacos, seja pela frequência elevada de tratamentos, superdoses, formulações de longa ação e alternância de bases químicas (CEZAR et al., 2010) que estabelecem uma pressão de seleção ao grupo de parasitas e determina, um estímulo para a sobrevivência e proliferação de genótipos parasitários resistentes (WOLSTENHOLME et al., 2004; KENYON et al., 2009). Neste aspecto, a compreensão das características que determinam a resistência aos anti-helmínticos, torna-se ponto chave para a caracterização de estratégias que preservem a sua eficácia e viabilizem a produção ovina.

Aliado a isso, os métodos integrados de controle parasitário, são complementares aos tratamentos antiparasitários, que são baseados no gerenciamento de estratégias e alternativas que objetivam reduzir o uso de produtos anti-helmínticos, diminuindo a seleção de parasitas resistentes, ao mesmo tempo que expõe os animais a diferentes níveis da doença oportunizando os ovinos a imprimir naturalmente a resposta imunológica (MOLENTO et al., 2009), uma vez que este contato é necessário para o estímulo à resposta imune (CEZAR et al., 2008).

O tratamento seletivo dos animais pode ser utilizado com a finalidade terapêutica (animais apresentando sinais clínicos como anemia e/ou diarreia) ou motivado por razões produtivas, que é o caso de redução da condição corporal e ganho de peso, por exemplo. O método mais comum e prático que aborda estes aspectos é conhecido como Famacha e

estabelece critérios simples e aplicáveis no campo para condicionar os tratamentos antiparasitários (van WYK e BATH, 2002; KAPLAN et al., 2004b; MOLENTO et al., 2004). Este método baseia-se em observar a intensidade da coloração da mucosa ocular e classificar os animais em escalas que variam de 1 a 5, assim através desta magnitude é possível identificar clinicamente animais com diferentes graus de anemia, possibilitando o tratamento de forma seletiva (van WYK e BATH, 2002).

Embora o Famacha possa ser utilizado em animais infectados pelo *H. contorus*, a avaliação individual e tratamentos seletivo dos animais têm enormes vantagens para diversos tipos de propriedades, incluindo seleção de animais mais resistentes/tolerantes e redução no número de tratamentos com antiparasitários (BATH et al, 2001; MOLENTO et al, 2009). Além disso, estima-se que a redução média de 58,4% nos custos com a aquisição de antiparasitários para o controle destes parasitas (van WYK e BATH, 2002).

A utilização de pastagens descontaminadas pode auxiliar no controle parasitário, fundamentando-se na redução do número de larvas no pasto e/ou inviabilizando larvas e ovos. Estes locais podem ser obtidos em áreas onde são utilizadas alternadamente atividades pecuárias e agrícolas (STUEDEMANN et al., 2004), utilização de pastejo rotacionado com alternância de espécies de herbívoros (AMARANTE, 2004) ou implantação de nova pastagem (ECHEVARRIA et al., 1993).

A seleção de hospedeiros resistentes aos parasitas é uma das mais promissoras alternativas para o manejo integrado e considerada por WALLER & THAMSBORG, 2004, "Última ferramenta sustentável no controle de parasitas". A seleção de hospedeiros pode ser obtida através de aspectos genotípicos que considera, por exemplo, animais com marcadores genéticos para reações imunológicas mais eficientes ou selecionando indivíduos que são resistentes ou resilientes (tolerantes) as infecções, utilizando a escolha de certas características que se sobrepõe em nível de produção ou mercado (fenotípica). A seleção genética é estabelecida quando consideramos raças de ovinos adaptadas ao ambiente e ao desafio parasitário ou este mesmo cenário estabelece variabilidade fenotípica e genotípica dentro de um mesmo rebanho (HAILE et al 2002). MORRIS et al. (2004) selecionaram cordeiros resilientes com base em ganho de peso e frequência de tratamentos anti-helmínticos requerida quando expostos à pastagem contaminada, o que resultou em incremento de resiliência ao rebanho.

Marcadores genéticos potenciais (genes, fatores hormonais e imunológicos) têm sido identificados pelos estudos e podem criar uma nova possibilidade prática ao controle de parasitas, uma vez que a estes marcadores sejam inseridos no contexto produtivo e que respondam de maneira satisfatória, ao longo de gerações, a nível genotípica-fenotípica (HAILE

et al 2002; KEMPER et al., 2009). No caso da seleção de animais resilientes o objetivo é minimizar os efeitos clínicos e patogênicos da infecção (MOLENTO et al., 2009). Muitas pesquisas apontam nesta direção (BISHOP & MORRIS, 2007; HUNT et al., 2008) e estabelecem novos e prósperos caminhos no controle destes parasitas.

O efeito da qualidade da dieta e intensidade da infecção é inversamente proporcional, ou seja, animais submetidos às condições de baixa nutrição ou pastagens de má qualidade apresentam infecções mais intensas por parasitas gastrointestinais (HAILE et al., 2002). A condição nutricional na qual os ovinos estão submetidos tem reflexos diretos na resposta imunológica dos animais, onde maiores níveis proteicos na dieta fornecida aos animais podem limitar o estabelecimento de larvas infectantes, o desenvolvimento e a fecundidade dos nematódeos e, até mesmo, causar a eliminação dos parasitas já estabelecidos no trato gastrointestinal (COOP & KYRIAZAKIS, 2001; BRUNET et al., 2007).

Os benefícios de uma melhor nutrição na resistência adquirida contra infecções por nematódeos têm sido extensivamente documentadas (SHAW et al., 1995; COOP & HOLMES, 1996; DATTA et al., 1998; BRICARELLO et al., 2005; LOUVANDINI et al., 2006; KHAN et al., 2012), enquanto a baixa ingestão alimentar e privação energético-proteica prejudicam o desenvolvimento e expressão da imunidade protetora do hospedeiro contra os nematódeos gastrointestinais (ROBERTS & ADAMS, 1990).

3. CAPÍTULO I

Immune profiles of resilient Corriedale sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes

Perfis imunológicos de ovinos Corriedale resilientes naturalmente infectados por nematódeos gastrointestinais

(Artigo submetido a *Ciência Rural*)

Gustavo Toscan^{I*}, Gustavo Cauduro Cadore^I, Thiago Leal Neves^I, Giovani Busanello Ávila^I, Luís Antônio Sangioni^I, Cinthia Melazzo de Andrade^{II}, Fernanda Silveira Flores Vogel^I

-NOTE-

ABSTRACT

Infections by gastrointestinal nematodes cause substantial economic losses in sheep-rearing worldwide. This study characterized the immune response in sheep naturally infected by gastrointestinal nematodes. Thirty Corriedale sheep of both genders, aged 8 to 12 months, were monitored weekly for 77 days, through fecal and blood samples to determine the eggs per gram of feces (EPG), hematocrit, eosinophil count (Eos), interleukins (IL) and immunoglobulins (Igs) levels. Means of EPG, hematocrit and Eos did not show significant difference along the time during the experimental period. The fluctuations of serological dynamics were similar considering IgG, IgA and IgE, but increased significantly from the beginning to the end of the study. Interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor-beta (TNF- β) and interferon-gamma (IFN- γ) were initially present at lower levels, but increased significantly at the end of the study ($p < 0.05$). Interleukin 10 (IL-10) did not show a difference between the beginning and end of the study, but its level increased from day 35 up to day 63 ($p < 0.05$). Although EPG excretion rates fluctuate along the time, no clinical signs and no need for anthelmintic treatments were

^I Laboratório de Doenças Parasitárias. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil.

^{II} Laboratório de Patologia Clínica, Departamento de Clínica Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria-RS, Brazil.

*Corresponding author: Laboratório de Doenças Parasitárias. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS. 97105-900, Brazil. Phone: +55 55 32208071. E-mail: gugatoscan@hotmail.com

observed, revealing that all sheep kept a resilience status during the experimental period. A weak negative correlation ($r = -0.14$; $P = 0.001$) was observed between Eos and OPG in these animals. IL-6, TNF- β and IFN- γ increased progressively from the beginning to the end of the study. The serum immunoglobulins (IgG, IgA, and IgE) increased, primarily in response to elevation of IL-10 from of day 35 (D-35) of the study.

Keywords: Interleukins, ovine, parasitosis, immune response.

RESUMO

Infeções por nematódeos gastrointestinais causam perdas econômicas substanciais em criação de ovinos de todo o mundo. Este estudo caracteriza a resposta imune em ovinos infectados naturalmente por nematódeos gastrointestinais. Trinta ovinos Corriedale de ambos os gêneros, com idade de 8 a 12 meses, foram monitorados semanalmente durante 77 dias, através amostras fecais e de sangue para determinar os ovos por grama de fezes (OPG), hematócrito, contagem de eosinófilos (Eos), níveis de interleucinas (IL) e imunoglobulinas (Igs). Nas médias de OPG, hematócrito e Eos não houve diferenças significativas durante o período experimental. As variações da dinâmica sorológica foram semelhantes considerando IgG, IgA e IgE, mas aumentaram significativamente entre o início e o final do estudo. Interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral-beta (TNF- β) e interferon-gamma (IFN- γ) foram inicialmente presentes em baixos níveis, mas aumentaram significativamente no final do estudo ($p < 0,05$). Interleucina 10 (IL-10) não demonstrou diferença entre o início e o final do estudo ($p < 0,05$), mas o nível aumentou do dia 35 até o dia 63 ($p < 0,05$). As taxas de excreção de OPG variaram ao longo do tempo, não foram observados sinais clínicos e não foi necessário o uso de tratamentos anti-helmínticos, revelando que todas as ovelhas mantiveram um status de resiliência durante o período experimental. Foi observada uma fraca correlação negativa ($r = -0.14$; $P = 0.001$) entre Eos e OPG nestes animais. IL-6, TNF- β , IFN- γ aumentaram progressivamente desde o início até ao final do estudo. As imunoglobulinas séricas (IgG, IgA e IgE) aumentaram, principalmente em resposta a elevação da IL-10 a partir do dia 35 (D-35) do estudo.

Palavras-chave: Interleucinas, ovinos, parasitoses, resposta imune.

Gastrointestinal nematodes can cause a negative impact on health and production of small ruminants (SUAREZ et al., 2009). The immunological mechanisms which lead sheep to have or acquire status of susceptibility, resilience or resistance to gastrointestinal nematodes are not completely known, however, these status depends on the type of immune response (Th1/Th2) mounted against the parasites. Animals that produce higher levels of some

interleukins are naturally more resistant to parasitic infections and they have the ability to suppress the establishment and/or progression of such infections (JASMER et al., 2007). Resilient (or tolerant) sheep develop ability to maintain a level of production relatively undepressed, without clinical signs, despite the infection (ALBERT, et al., 1987). Jointly, immunoglobulins (Igs) and immune effector cells are mechanisms and the combination of these factors that determine host's ability or not to resist or tolerates the infection (TIZARD, 2008). Immunological profile varies depending on genetics, nutrition, age group, infection rate and several other factors (ALBA-HURTADO & MUÑOZ-GUZMÁN, 2012). Therefore, this study aimed to investigate, through a set of immunological, parasitological and clinical parameters, the immune profile of Corriedale sheep naturally infected by gastrointestinal nematodes under an extensive grazing system.

This experiment was conducted from February to April, 2015, on a farm located at southern Brazil in a subtropical area (29°49'52.63"S - 53°42'49.66"O). Fifteen Corriedale sheep of both genders, aging 8 to 12 months, were weekly monitored through clinical, parasitological and immunological aspects during 77 days, after an acclimation period of 30 days. The animals were kept on native pasture and without anthelmintic treatment. Fecal samples were collected from the rectums of the animals for parasitological analysis. Eggs per gram of feces (EPG) were individually counted by McMaster technique (sensitivity of 100 EPG) and larvae were cultured from pools of feces at each collection day for nematode genera identification (as recommended by VAN WYK et al., 2004).

The immunological study entailed weekly collections of blood from animals to investigate eosinophil (Eos), interleukin (IL-6 and IL-10), tumor necrosis factor-beta (TNF- β), interferon-gamma (IFN- γ) and immunoglobulin (class IgG, IgA and IgE) levels. The concentrations of interleukin (IL-6, IL-10, TNF- β and IFN- γ) and Igs were assessed using ELISA kits for sheep samples in accordance with the manufacturer's instructions (Cusabio Biotech Co., Ltd., China). Cytokines tested were selected based on a previously recognized, that describe in resistant animals increment of between IL-6 and IL-10 (with a predominantly T helper 2 (Th2) response), while TNF- β and IFN- γ were reduced because of their association with susceptible animals (with a predominantly T helper 1 (Th1) response) (ABBAS; LICHTMAN & PILLAI, 2014). Clinical indicators were evaluated by magnitude color of the ocular mucosa and classified according to the Famacha method (MOLENTO et al., 2004) and clinical signs of haemonchosis were assessed.

Statistical analyses of data were performed using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC). The data were evaluated on regards to normal distribution (by the Kolmogorov-

Smirnov test, $P > 0.05$) and transformed by ranking as necessary. Values were presented as the mean \pm standard deviation and were compared using an analysis of variance (ANOVA) for repeated measures. Tukey's test was used for *post hoc* analysis, with a 95% confidence level ($p < 0.05$).

All evaluated sheep kept a resilience status during the experimental period based on the Famacha scale (ranging from 1 to 2), the absence of clinical signs, hematocrit and the fluctuation of their EPG excretion rates along the time. Thus, no need for anthelmintic treatments was observed. Hematocrit levels did not change significantly over the course of the experiment, however the levels ranged between 27% and 35% (mean 29.7%), while remaining within the reference (KANEKO, et al., 2008) and established by the Famacha method for resilient animals (VAN WYK, et al., 1997). In the analysis of the results of EPG and Eos count did not change significantly through the course of the study. The EPG average ranged from 500 (day 28) up to 2900 (day 7), however, the EPG profile showed no significant trend over time, showing that animals were kept infected during the study. *Haemonchus* spp. was the predominant genera in the flock, as shown in the larval cultures performed at each fecal collection (*Haemonchus* spp., 93%; *Trichostrongylus* spp., 5%; *Teladorsagia* spp., 2%).

The average Eos count remained constant throughout the study period, with Eos ranging from 206.5 Eos/ μ L (day 49) risen to 562.1 Eos/ μ L (day 35). Eos are considered markers of parasitic infections. As effector cells against these agents, they present cytotoxic effects during a nematode infection, causing tissue damage and death in the larval stages (KLION & NUTMAN, 2004). In this study, a weak negative correlation ($r = -0.14$; $P = 0.001$) was observed between circulating Eos and OPG in the animals. A negative correlation between the Eos count and EPG has been described in the abomasal mucosa (AMARANTE et al., 2005).

The immune response of the host to helminthes is complex and occurs simultaneously with the establishment of the infection. Humoral, cellular and inflammatory immune mechanisms are all involved (MACKINNON et al., 2010). Helminth infections induce the liberation of cytokines (IL-4, 5, 6 and 13) associated with Th cells and promote eosinophilia and immunoglobulin production (AMARANTE et al., 2005). The dynamics of serum Igs (IgG, IgA and IgE) are shown in Figure 1A. Although their dynamics were similar, the mean levels of each class of antibody progressively increased until the end of the study. At the beginning of the study (Day 7), the mean levels were 131.5 mg/dL (IgG), 47 mg/dL (IgA) and 147.2 U/mL (IgE). The peak in immunoglobulin levels occurred at day 70 of the experiment, with mean values of 159 mg/dL (IgG), 75.9 mg/dL (IgA) and 185.4 U/mL (IgE). All three immunoglobulin classes differed significantly between the beginning and end of the study ($p < 0.05$). Igs are

involved in the adaptive immune response and they are produced by stimulated B cells, driven by a Th2 response and play an important role in the immune response against helminths. Furthermore, mastocytes, eosinophils and neutrophils release their granules (histamine, prostaglandins and others mediators), inducing an inflammatory process, mucus production and increases the contraction of smooth musculature causing the expulsion of the parasite (MULCAHY et al., 2004). Associated with the humoral immune response, an increase in IgE is related with an immediate hypersensitivity response in response to binding of parasite antigens, causing degranulation of the effectors cells and resulting in the expulsion or death of the parasites (AMARANTE et al., 2005).

The immune response is dependent upon the pattern of cytokine expression induced during infection. Th2-type responses is typically characterized by increases in the levels of interleukin 4 (IL-4) and other Th2-type cytokines (including IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13), activation and expansion of CD4+ T cells, plasma cells secreting IgE, eosinophils, mast cells and basophils. By contrast, IFN- γ and TNF- β are cytokines typically evoked by Th1-type responses and are associated with increases in the numbers cytotoxic CD8+ T cells, neutrophils and macrophages (ANTHONY et al., 2007). IL-6 and IL-4 are correlated cytokines, i.e., they have synergistic and redundant activities and so it is possible to link the serum levels of IL-6 with cellular activity Th2. IL-10 is secreted primarily by Th2 cell and is also characterized by downregulate Th1 activity. (ANTHONY et al., 2007; ABBAS; LICHTMAN & PILLAI, 2014). Interleukins levels associated with a Th2 response (IL-6 and IL-10) showed different profiles over time. IL-6 (Figure 1B) showed an initial concentration of 110.5 pg/mL, with an increase in the mean until day 28 (125.6 pg/mL), after which the levels were maintained for the remainder of the study ($p < 0.05$). However, for IL-10 (Figure 1C), there was no difference between the mean levels in the first four collections (7, 14, 21, and 28 days) and in the last two collections (70 and 77 days), but during of period of 35 (84.9 pg/mL) and 63 day (85.3 pg/mL) the interleukin levels were higher than those found in the beginning of the study (72.2 pg/mL, day 7) and final period of experiment (74.8 pg/mL - day 77) ($p < 0.05$).

IFN- γ did not differ between the first analysis until day 28 day, but after this period there was a gradual increase to 167.3 $\mu\text{g/mL}$ (35 day) until achieve the peak of 176.9 $\mu\text{g/mL}$ was achieved on day 77 (Figure 1D). TNF- β showed an increase at days 7 and 14 and then remained stable, with levels virtually unchanged for the remainder of the study (Figure 1E). TNF- β remains constant during the study, but the IFN- γ increased steadily over the analysis. These cytokines (IFN- γ and TNF- β) are associated with a Th1 response. Although it is a generic analysis (serum) is understandable that in resilient animals may be levels high, since IFN- γ also

participates in the activation of macrophages, dendritic cells and differentiation of cells Th1 (ABBAS; LICHTMAN & PILLAI, 2014) and is possible that resistant animals have the Th1 response totally suppressed. All interleukins showed a statistical difference between the first (day 7) and last observation (day 77), except for IL-10, whose levels remained similar in both point analyzed ($p < 0.05$).

The average Eos count remained constant for most of the study period. However, there was a discreet increase over the first 35 days that coincided with the increase in IgA, IL-10 and IFN- γ . Eos can be activated by binding of parasite antigen to IgA and IgG cell surface receptors. In this way, both Eos and IgA are needed to damage gastrointestinal parasites and reduce the fecundity of nematodes in resistant hosts (AMARANTE et al., 2005; MACKINNON et al., 2010). Although a difference was not observed in IL-10 levels between the beginning and the end of the study, between days 35 and 63, there was a significant increase in its mean levels. A slight increase in immunoglobulin (IgA, IgE and IgG) levels followed this increase in IL-10.

Some cytokine and antibodies demonstrated a progressive increase over the course of the study, supporting the hypothesis that animals with an increased production of these factors have modulated their immune response and are more tolerant to infection with gastrointestinal parasite or to sustained parasitism.

In this study, a weak negative correlation was observed between Eos and OPG in resilient Corriedale sheep. Interleukins IL-6, TNF- β and IFN- γ progressively increase in resilient animals, but IL-10 showed no difference between the beginning and end of the study. The serum immunoglobulins (IgG, IgA and IgE) increased, primarily in response to elevation of IL-10 from day 35 (D-35) of the study.

ETHICS COMMITTEE

All procedures of animal handling and experimentation were performed according to the recommendations of the Brazilian Committee and Experimentation (COBEA; law # 6.638 of May 8, 1979). The animal experiments were approved by Animal Care and Use Committee of this institution, registration number 127/2014.

REFERENCES

ABBAS, A.K. et al., **Cellular and molecular immunology**. Elsevier Health Sciences, 2014.

AMARANTE, A.F.T. et al., Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of

sheep. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.1, p.99-107, 2005. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03044401704005400>> Accessed: Jun. 26, 2015. doi:10.1016/j.vetpar.2004.11.021.

ANTHONY, R.M. et al., Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v.7, n.12, p.975-987, 2007. Available from: <<http://www.nature.com/nri/journal/v7/n12/abs/nri2199.html>> Accessed: Nov. 19, 2015. doi:10.1038/nri2199.

ALBA-HURTADO, F. & MUÑOZ-GUZMÁN, M.A. Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. **BioMed Research International**, v. 2013, 2012. Available from: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/162158/abs/>> Accessed: Set. 03, 2015. doi: dx.doi.org/10.1155/2013/162158.

ALBERS, G.A.A. et al., The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young Merino sheep. **International Journal for Parasitology**, v.17, n.7, p.1355-1363, 1987. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0020751987901032>> Accessed: Jun. 26, 2015. doi:10.1016/0020-7519(87)90103-2.

JASMER, D.P. et al., *Haemonchus contortus* intestine: a prominent source of mucosal antigens. **Parasite Immunology**, v.29, n.3, p.139-151, 2007. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3024.2006.00928.x/full>> Accessed: Jun. 26, 2015. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00928.x.

KANEKO, J.J. et al., **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. (ed). Academic Press, 2008.

KLION, A.D. & NUTMAN, T.B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.113, n.1, p.30-37, 2004. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009167490302534X>> Accessed: Jun. 09, 2015. doi:10.1016/j.jaci.2003.10.050.

MACKINNON, K.M. et al., Differences in immune parameters are associated with resistance to *Haemonchus contortus* in Caribbean hair sheep. **Parasite Immunology**, v.32, n.7, p.484-493, 2010. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3024.2010.01211.x/full>> Accessed: Jun. 09, 2015. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.01211.x

MOLENTO, M.B. et al., Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção pelo *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1139-1145, 2004. Available from: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/crural/article/view/17911>> Accessed: Jun. 09, 2015.

MULCAHY, G. et al., Helminths at mucosal barriers-interaction with the immune system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.6, p.853-868, 2004. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X03002709>> Accessed: Jun. 10, 2015. doi:10.1016/j.addr.2003.10.033.

SUAREZ, V.H. et al., Epidemiology and effects of gastrointestinal nematode infection on milk productions of dairy ewes. **Parasite**, v.16, n.2, p.141-147, 2009. Available from: <<http://www.parasite-journal.org/articles/parasite/abs/2009/02/parasite2009162p141/parasite2009162p141.html>> Accessed: Jun. 10, 2015. doi: dx.doi.org/10.1051/parasite/2009162141.

TIZARD, I. **Imunologia Veterinária - Uma Introdução**. Editora: Elsevier Saunders, 8ª Ed. 2008, 587p.

VAN WYK, J.A. Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa—what are the options? IN: 16 INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, SUN CITY (SOUTH AFRICA), 1997. **Proceedings...** South Africa, WAAVP. Aug. 1997. p.10-15. Accessed in Jun. 10, 2015. Online. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ZA1998000155>.

VAN WYK, J.A. et al., Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary parasitology**, v. 119, n. 4, p. 277-306, 2004. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401703004734>> Accessed: Jun. 26, 2015. doi:10.1016/j.vetpar.2003.11.01.

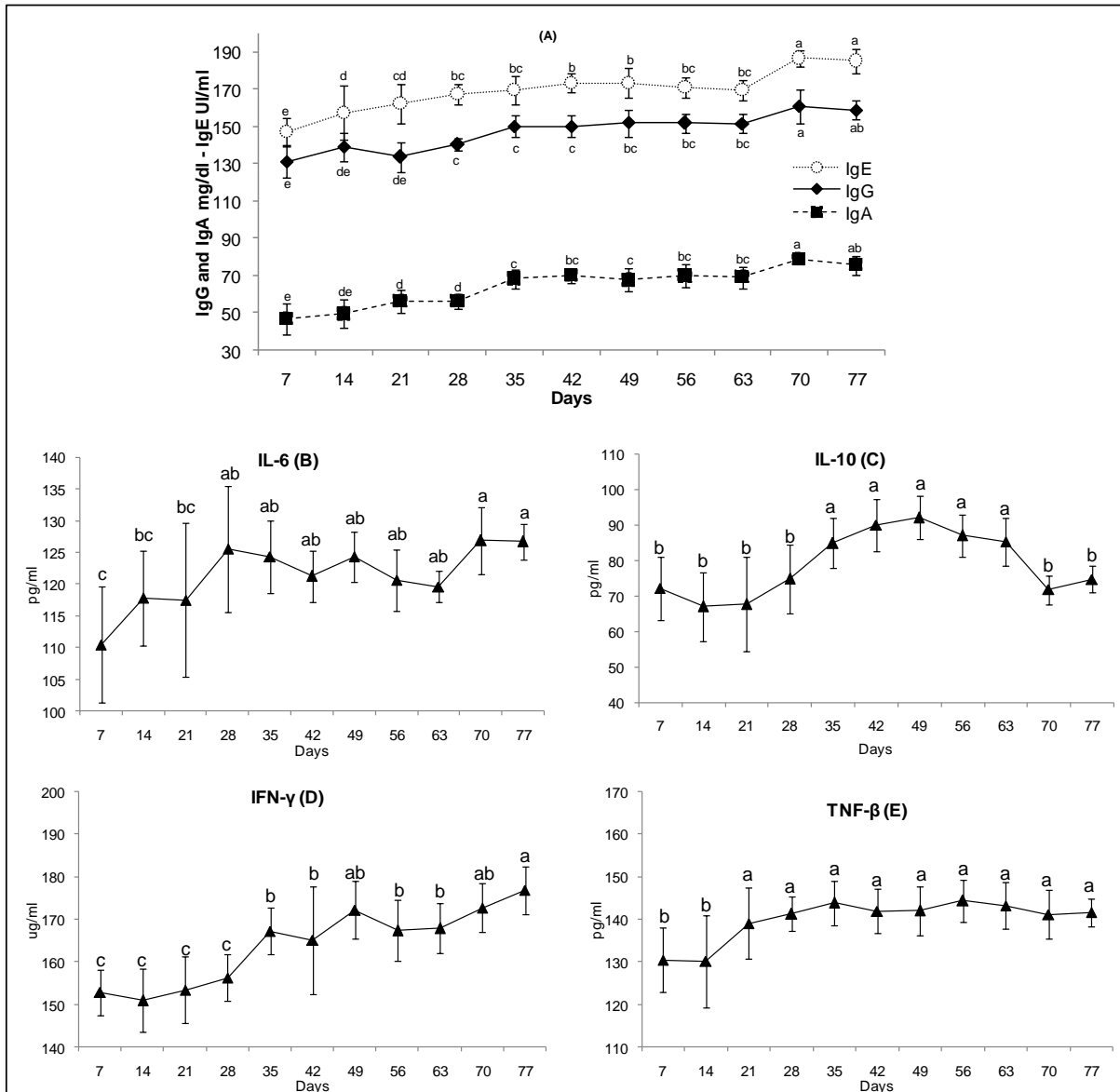


Figure 1 - Immune profiles of resilient Corriedale sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. Averages and standard deviations of Immunoglobulins (Igs) - IgE, IgG and IgA (A); Interleukin 6 - IL-6 (B); Interleukin 10 - IL-10 (C); Interferon-gamma - IFN- γ (D); Tumor necrosis factor-beta - TNF- β (E) in serum of sheep. Different letters in each region indicate significant differences between averages ($p < 0.05$).

4. CAPÍTULO II

Immune response in sheep naturally infected with *Haemonchus* spp. in different nutritional conditions¹

(Artigo submetido a revista Pesquisa Veterinária Brasileira)

Gustavo Toscan^{2*}, Gustavo C. Cadore², João F.T. Limana², Augusto Weber², Heloísa E. Palma³, Marta M.F. Duarte⁴, Luís A. Sangioni², Fernanda S.F. Vogel²

ABSTRACT. - Toscan, G., Cadore, C.G., Limana, J.F.T., Weber, A., Palma, H.E., Duarte, M.M.F., Sangioni, L.A., & Vogel, F.S.F. 2014. **Immune response in sheep naturally infected with *Haemonchus* spp. in different nutritional conditions.** Resposta imune em ovinos naturalmente infectados com *Haemonchus* spp. em diferentes condições nutricionais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 97105-900, Brasil. e-mail: gugatoscan@hotmail.com

Parasitic nematodes of digestive tract are one of the main causes of losses in small ruminants. *Haemonchus contortus* is considered the major parasite in sheep farming in worldwide. This study was designed to evaluate immunological response parameters in sheep naturally infected with *H. contortus* in two different feed grounds: native and cultivated pasture. Fecal and blood samples were collected weekly of fifteen Corriedale sheep, aging 8 to 12 months, for counting of eggs per gram of feces (EPG) and measurement of haematocrit, eosinophils and cytokines during 84 days. Pasture samples were collected for bromatological analysis. Respective levels of crude protein and non-fibrous carbohydrates were 9.7% and 12.3% for native pasture and 14.3% and 23.7% for cultivated pasture. No significant difference

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Laboratório de Doenças Parasitárias. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. 97105-900, Brazil. *Autor para correspondência: gugatoscan@hotmail.com

³ Laboratório de Patologia Clínica, Departamento de Clínica Pequenos Animais, Hospital Veterinário, UFSM, Santa Maria, RS. Brazil.

⁴ Laboratório de Análises Clínicas Labimed, Santa Maria, RS. Brazil.

($p < 0.05$) in haematocrit level between periods in different pastures. However, significant differences were found in EPG, eosinophils, interleukins and immunoglobulins levels since 21 days after pasture change. These data indicate that induction of immune response was characterized by significantly peripheral eosinophilia and increased serum IgE, IgA, IgG, TNF- β , IFN- γ and IL-6. The improvement in forage condition resulted in reduction of EPG and contributed to immune response against *Haemonchus* spp. in naturally infected sheep.

INDEX TERMS: immunity, gastrointestinal nematode, dietary protein, cytokines, parasite control.

RESUMO - [Resposta imune de ovinos naturalmente infectados com *Haemonchus* spp. em diferentes condições nutricionais.] Parasitas nematódeos do trato digestivo são uma das principais causas de perdas em pequenos ruminantes. *Haemonchus contortus* é considerado o principal parasita na criação de ovinos em todo o mundo. Este estudo foi delineado para avaliar parâmetros da resposta imunológica em ovinos naturalmente infectados com *H. contortus* em dois diferentes grupos alimentares: pastagem nativa e cultivada. Amostras de fezes e de sangue foram coletadas semanalmente de quinze ovinos Corriedale, com idade de 8 a 12 meses, para a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e avaliação do hematócrito, eosinófilos e citocinas durante 84 dias. Amostras de pastagem foram coletadas para análise bromatológica. Níveis de proteína bruta e carboidratos não-fibrosos foram respectivamente, 9,7% e 12,3% para pastagem nativa e 14,3% e 23,7% para pastagem cultivada. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no nível de hematócrito entre os períodos nas diferentes pastagens. Entretanto, foram encontradas diferenças significativas no OPG, eosinófilos, interleucinas e níveis imunoglobulinas desde o 21º dia após a mudança de pastagem. Estes dados indicam que a indução da resposta imune foi caracterizada por significativa eosinofilia periférica e aumento no soro de IgE, IgA, IgG, TNF- β , IFN- γ e IL-6. A melhoria na condição de forragem resultou em redução de OPG e contribuiu para a resposta imune contra *Haemonchus* spp. em ovinos naturalmente infectados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: imunidade, nematódeos gastrointestinais, dieta proteica, citocinas, controle parasitológico.

INTRODUCTION

Infections by gastrointestinal nematodes are deleterious to the health and productivity of animals. These infections are a major cause of economic losses in small ruminants (Holmes, 1987; Suarez et al., 2009). *Haemonchus contortus* is a blood-feeding abomasal nematode, which causes reduction of productivity, weight loss and death in small ruminants (Idris et al., 2012). Control of gastrointestinal nematodes is based on repeated use of anthelmintic drugs and complimentary management practices aiming to diminish pasture contamination and re-infection rate. However, clean pasture condition is not commonly available in semi-intensive grazing systems. Besides, there is an increasing occurrence of multiple parasite resistance to anthelmintics (van Wyk et al., 1997; Cezar et al., 2010). Multi-drug resistant parasites dissemination highlights the importance of the knowledge about host-parasite relationships for development of new control strategies against sheep nematodes (Bricarello et al., 2004).

Nutrition can influence on the consequences of parasitism in three different ways: (1) hosts can develop tolerance or resilience mechanisms, increasing their ability to surpass parasitism consequences; (2) hosts can develop resistance to parasites, improving their ability to contain or overcome infections by limiting the establishment, growth rate, fecundity and/or persistence of a parasite population; (3) susceptible hosts can counterbalance severe exploitation with good nutrition. Thus, management of host nutrition is an alternative to improve the host response against parasitic infections, reducing anthelmintic drugs dependence (van Houtert & Sykes, 1996).

The general immune response of sheep infected by *Haemonchus* spp. is characterized by eosinophilia, mastocytosis, increased IgA and IgE production (Schallig, 2000; Meeusen et al., 2005). Resistant hosts appear to have stronger T helper type 2 cells (Th2) immune response in comparison to susceptible hosts (Pernthaner et al., 2005a; Shakya et al., 2009). Some nutrients ingested by hosts, such as fats, appear to have immunosuppressive properties that are favorable to parasite populations (Chandra, 1993). However, evidences show that protein intake contributes to nematodes control in ruminants, by increasing levels of circulating eosinophils and intestinal sheep mast cell proteases (van Houtert et al., 1995). Therefore, the aim of this study was to evaluate the general immune response in sheep naturally infected with *Haemonchus* spp. in two different feed grounds, grazing on native and cultivated pasture.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

Fifteen Corriedale sheep of both genders, aging 8 to 12 months, and naturally infected by gastrointestinal nematodes were kept in grazing areas contaminated by several species of

nematodes (*Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. and *Teladorsagia* spp.). However, *Haemonchus* spp. were the most prevalent genera, as noticed based on larvae cultures performed throughout the experimental period. Animals were allocated in native pasture during 42 days. Since day 43, these animals were transferred to a cultivated pasture area with oats (*Avena sativa*) and ryegrass (*Lolium* spp.) up to day 84. Sheep were weekly evaluated regarding clinical, parasitological and haematological aspects during all the experimental period. The experiment was conducted on a farm with tropical climate, between April and June of 2014. Cultivated and native pasture area were 3 hectare (ha) each. For similar pasture contamination and parasite challenge in both pastures, the animals/ha (1.25 animal units/ha) was the same throughout the experiment. Previous pasture contamination with infected animals was performed 30 days before the beginning of each experimental period.

Fecal and blood sampling

Fecal samples were taken weekly from the rectum of the animals for fecal egg count (FEC). Peripheral blood samples with and without anticoagulant (ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA) were collected weekly by jugular vein puncture for evaluation of the haematocrit level and eosinophil counts in total blood, and interleukin-6 (IL-6), IL-10, tumor necrosis factor-beta (TNF- β), interferon-gamma (IFN- γ), immunoglobulin G (IgG), IgA and IgE levels in blood serum. These cytokines were elected regarding the correlation among IL-6, IL-10 and resistance against nematodes and TNF- β , IFN- γ and parasite infection susceptibility (Abbas & Lichtman, 2003).

All procedures of animal handling and experimentation were performed according to recommendations of Brazilian Committee and Experimentation (Cobea; law # 6.638 of May 8, 1979) and were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of Universidade Federal de Santa Maria, registration number 127/2014.

Fecal and blood analysis

Fecal samples were analyzed individually used for fecal egg counts (FEC) by modified McMaster technique, with a minimum sensitivity of 100 EPG (Whitlock, 1948). Larvae cultures were performed by the Roberts & O'Sullivan modified technique (Ueno & Gonçalves, 1998) and the genera of the gastrointestinal nematodes were identified following the recommendations of van Wyk et al. (2004), counting 100 infective larvae from each collection pool of feces. The coproculture was performed at the beginning and end of each phase of the experimental (native pasture and cultivated pasture).

Peripheral blood samples without and with anticoagulant (EDTA) were collected. Blood samples treated with EDTA were used for haematocrit and eosinophil counts by the method of Hargreaves & Hutson (1990). The eosinophil counts were performed in a Newbauer chamber using panoptic staining (Panótico rápido, Laborclin, PR, Brazil), according to manufacturer instructions. Serum samples, obtained by centrifugation of blood (10 min at 1000 rpm), was preserved at -20°C until analysis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The concentrations of IL-6, IL-10, TNF- β , IFN- γ , IgG, IgA and IgE were assessed using ELISA kits to sheep, in accordance with the manufacturer instructions (Cusabio Biotech Co., Ltd., China).

Pasture chemical analysis

Native and cultivated (*Avena sativa* and *Lolium multiflorum*) pasture samples were harvested of 15 different areas in each pasture and submitted to chemical analysis. The concentration of crude protein was obtained by total nitrogen content analysis by the method of Weende (1984). Dietary fiber content was determined by the method of van Soest et al. (1991).

Statistical analysis

All data were analyzed using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC). EPG data was transformed using log (x+10) before analysis. The data was presented as mean \pm Standard Deviations and compared using analysis of variance (ANOVA) for repeated measures. Tukey test was used for post hoc analysis, with a 95% confidence level (p<0.05).

RESULTS

Parasitological data

The reallocation from native to cultivated pasture resulted in significant EPG reduction (Fig. 1). EPG mean ranged from 600 (day 7) up to 1400 (day 35) in native pasture, and was of 1200 at the point in which sheep were transferred to cultivated pasture area (day 42). After 21 days in cultivated pasture (day 70), the EPG mean had been a significant decrease to under 100 (Fig. 1).

Haemonchus spp. predominate in the flock throughout all the experimental period, as showed through the larvae cultures performed in fecal collection (*Haemonchus* spp. 90%; *Trichostrongylus* spp. 7%; *Teladorsagia* spp. 3%). Mean EPG did not differ significantly between the first (day 7) and the last (day 42) analysis on native pasture. Besides, also were no different between EPG mean the first (day 7) and end (day 84) of experiment, considering the

total period of evaluation (Fig. 1). However, EPG mean was higher when animals leave the native pasture than at day 84, after 42 days in cultivated pasture ($p < 0.05$).

Immune response

Haematocrit and circulating eosinophil concentrations

No significant difference ($p < 0.05$) was found in haematocrit levels in different pasture conditions (data not shown). The analysis of mean concentration of circulating eosinophils decreased from 562 eosinophil/ μ l (day 7) to 207 eosinophil/ μ l (day 21) during native pasture grazing, and increased from 379 eosinophil/ μ l (day 42) up to 867 eosinophils/ μ l at day 70 (after 28 days in cultivated pasture grazing). This peak of eosinophils concentration at day 70 was higher ($p < 0.05$) when compared to concentrations observed throughout the period in native pasture grazing (Fig. 2). Increased levels of eosinophils were associated to EPG reduction ($p < 0.05$) from day 70 until the end of the experimental period (Fig. 1 and Fig. 2).

Interleukins level

Increased levels of TNF- β , IFN- γ and IL-6 and decreased levels of IL-10 occurred during cultivated pasture grazing period (Fig. 3). Significant differences in evaluated interleukins were observed between day 7 and day 84. Considering the first (day 7) and the last (day 84) observation mean levels of IL-6, IFN- γ and TNF- β (Fig. 3) ranged from 124.3 to 144.3 pg/ml, 167.3 to 195.9 pg/ml, and 143.9 to 148.9 pg/ml, respectively. However, IL-10 concentration mean (Fig. 3) decreased from 84.9 (day 7) to 47.9 pg/ml (day 84). Significant changes ($p < 0.05$) in interleukins levels were observed since 21 days after pasture change (day 63) up to the study ending.

Serum immunoglobulins levels

Significant differences ($p < 0.05$) in serum levels of immunoglobulin isotypes IgA, IgG and IgE were detected comparing native and cultivated pasture conditions. Immunoglobulin levels remained similar up to 21 days after pasture area change (day 63). Increasing serum levels of immunoglobulins IgA, IgG and IgE ($p < 0.05$) were observed since day 63 until the end of the experimental period.

Pasture analysis

The native pasture presented 42.5% of dry matter (DM), 84.2% of organic matter (OM), 9.7% of crude protein (CP), 1.5% of ether extract (EE), 12.3% of non fibrous carbohydrates (NFC) and 60.7% of neutral detergent fiber (NDF). Cultivated pasture presented 22.4% of DM, 88.7% of OM, 14.3% of CP, 2.4% of EE, 23.7% of NFC and 48.3% of NDF.

DISCUSSION

Resistance to nematodes is defined as the ability of animals to prevent the establishment of larvae and promote the elimination of those parasites which were able to colonize their gastrointestinal tract (Albers, 1987). Parasitological and immunological (such as immunoglobulins, defense cells and cytokines) parameters are frequently used as markers for resistance. In our study, the evaluation of these parameters revealed significant differences in immune response of sheep when assigned to two different grazing systems. Most the variables considered to be indicators of higher resistance to parasitism by gastrointestinal nematodes were increased in a better forage condition (cultivated pasture), indicating that greater energy intake and higher levels of protein ingestion were directly linked to a more satisfactory immune response.

The nematode infection effects can be influenced by nutritional status of the host (Knox et al., 2003). Well-fed animals can better withstand infection than animals kept in inadequate diet conditions. It is also true that nematodes interfere with the ability of the host to utilize nutrients efficiently (Miller & Horohov, 2006). In general, gastrointestinal nematodes reduce nutrient availability to the host depressing appetite and voluntary feed intake and/or reducing nutrients absorption efficiency (Dynes et al., 1998). Notably, we observed that an adaptive period was needed (about 21 days) to promote increasing in immune response after the change of diet (native to cultivated pasture) because this change in the immune response of the animals is not instantaneous and takes place gradually as is given to them the higher quality diet, demonstrating to EPG, eosinophils and cytokines (Figure 1, 2 and 3).

EPG is the parameter that best correlates with parasite burden in sheep (Douch et al., 1996). Exchange of pasture condition caused EPG reduction, indicating reduction in spoliation caused by haemonchosis. The lower EPG counts, obtained 28 days after change in nutritional condition could be due to several factors such as inhibition of infective larvae establishment; suppression of egg production diminishing pasture contamination and (re)infection rate; and due to better nutritional intake that carried a significant improvement in immune status of the animals. Decrease in EPG coincided with decreasing IL-10 concentration and increasing IL-6, TNF- β , IFN- γ , IgA, IgE and IgG levels. EPG reduction that occurred since 28 days after pasture exchange may be an indicative of self cure with elimination of adult parasites and/or reduced fecundity of them. Eosinophils are important elements in immune response against helminthes. Eosinophilia both in blood and in tissues is frequently associated with the expression of higher resistance to nematodes (Dawkins et al., 1989; Douch et al., 1996). The noticeable eosinophilia

observed after pasture change, resulting probably from the better nutritional intake, suggests the involvement of these cells in improvement of the immune protection preventing the development of larval stages in the animals.

Immunity against gastrointestinal nematodes also involves production of IgA, IgG and IgE. IgA production may be a major mechanism in controlling fecundity of *Haemonchus* spp. and IgA response magnitude is influenced by the diet quality (Strain & Stear, 2001). An increase in total and parasite-specific IgE is an important factor in the host response to helminth infection (Hagan, 1993). *H. contortus* infection induces increasing in serum IgE levels in sheep at 2-4 weeks after infection and there is negative correlation between total IgE serum levels and parasite counts at necropsy (Kooyman et al., 1997). Eosinophils and IgE are involved in antibody dependent cell-mediated cytotoxicity. Therefore, eosinophilia and increased IgE levels may be correlated with anti-*Haemonchus* resistance in sheep (Shakya et al., 2009).

Housed sheep experimentally infected with nematodes showed less-severe pathophysiological consequences of infection when the supply of metabolizable protein to the intestine was increased by feeding protein (van Houtert & Sykes, 1996). Protein supplementation was associated with better resistance, indicated by lower levels of parasite egg excretion (Etter et al., 2000). Reductions in blood parameters such as haematocrit, total serum protein and albumin concentrations were less marked in animals to which a high level of metabolizable protein is offered than in animals with low to moderate protein availability (Coop & Holmes, 1996). In our study, the haematocrit parameters no ranged significantly.

Mucosal mast cells, eosinophils and immunoglobulins are components commonly measured for anti-parasite immunity evaluation, since they play a major role in resistance (Lacroux et al., 2006). Delayed expulsion of *Haemonchus* spp. larvae occurs when a specific immune response is mounted against the larvae in the abomasum's glands. This action is regulated by lymphocytes, IgA and IgE antibodies, eosinophils and the classic complement pathway (Balic et al., 2002).

The immune response against gastrointestinal parasites is complex and the contribution of each of their components can vary without necessarily interfering with the general effectiveness of this response (Wakelin, 1995). This study showed that most of the parameters used to evaluate sheep immune response against gastrointestinal parasites were favorably influenced by better nutritional condition reached in cultivated pasture grazing.

Sheep response to gastrointestinal nematodes infection can be mediated by Th1 or Th2 lymphocytes. Th1 lymphocytes produce several cytokines, notably IL-2, IFN- γ and TNF- β , resulting in cell mediated immune response. Th2 lymphocytes response is characterized by

increased immunoglobulin secretion by B cells, mainly IgG and IgE, and proliferation of eosinophils (Schallig, 2000). A typical characteristic of helminthic infections is the induction of specific IgE response, which results from a Th2 stimulation. However, individual, nutritional or parasite factors can influence this condition. IgE induces antibody-dependent cytotoxicity in eosinophils, mast cells and macrophages. Thus, increased IgE levels have been associated with resistance to gastrointestinal nematodes in sheep (Pernthaner et al., 2005b; Pernthaner et al., 2006). In *in vitro* assays, IgE recognizes nematode surface allergens and guides eosinophils and mast cells to attack the parasite cuticle (Terefe et al., 2009).

The greater expression of IFN- γ after 21 days period in cultivated pasture may be indicating an exchange to the Th2 type in the pattern of immune response of this sheep. This is because IFN- γ is the main macrophage-activating cytokine and, in this period, cell response is characterized by increased concentration of eosinophils and IgE. Besides, IFN- γ and IL-10 are antagonists and IL-10 seems to inhibit IFN- γ production (Endharti et al., 2005).

Constant increasing in IL-6 expression may be associated with the increased IgG expression and amplified number of circulating eosinophils. Decreased expression of IL-10, markedly observed at day 70, can be related with synergistic property between IL-6 and IL-10 in stimulation of the Th2 response pathway, although IL-10 is involved in the ability to inhibit activation of macrophage activity (Abbas & Lichtman, 2003).

Th1 and Th2 responses are antagonistic to each other and the interleukins control this activity. Th2 response inhibits Th1 response through IL-10 signaling (Gill et al., 2000). Blood lymphocytes from lambs produce less IFN- γ and, in general, young sheep mount smaller antibody responses than do mature animals (Colditz et al., 1996). These findings may explain why EPG had significant reduction while IFN- γ levels were increased.

Increased dietary protein appears to be an attractive issue to improve the sheep response against gastrointestinal nematodes, diminishing reliance on anthelmintic drugs. Our results reinforce the evidences that infected animals eating a higher protein diet have significant improvement in their clinical condition, with reduction in EPG, and are more resistant to re-infection than the animals on a basal diet (Bundy & Golden, 1987). As showed by van Houtert et al. (1995), protein intake overcame debilitating effects and clinical symptoms caused by trichostrongylosis in sheep. Therefore, nutritional status of the host can influence the rate of acquisition of immunity against parasites (Bundy & Golden, 1987; Wan et al., 1989; Bown et al., 1991).

CONCLUSION

Cultivated pasture grazing provided EPG reduction and increased immune response in sheep. Improved nutritional support induced immunological response characterized by significantly peripheral eosinophilia and increased serum concentrations of IgE, IgA, IgG, TNF- β , IFN- γ and IL-6. These immunological parameters were associated with EPG reduction in sheep naturally infected by *Haemonchus* spp.

REFERENCES

- Abbas, A.K. & Lichtman, A.H. 5th ed. 2003 Cellular and molecular immunology. Philadelphia:Saunders. 562 pp.
- Albers, G.A.A., 1987. Breeding for worm resistance: a perspective. *Int. J. Parasitol.* 17, 559-566.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T., 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol.* 24, 39-46.
- Bown, M.D. Poppi, D.P., Sykes, A.R., 1991. The effect of post-ruminal infusion of protein or energy on the pathophysiology of *Trichostrongylus colubriformis* infection and body composition in lambs. *Aust. J. Agric. Res.* 42, 253-267.
- Bricarello, P.A., Gennari, S.M., Oliveira-Siqueira, T.C.G., Vaz, C.M.S.L., Gonçalves de Gonçalves, I., Echevarria, F.A.M., 2004. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Res.* 51, 75-83.
- Bundy, D.A.P., Golden, M.H.N., 1987. The impact of host nutrition on gastrointestinal helminth populations. *Parasitology*, 95, 623-635.
- Chandra, R.K., 1993. Nutrition and the immune system. *P. Nutr. Soc.*, 52, 77-84.
- Cezar, A.S., Toscan, G., Camillo, G., Sangioni, L.A., Ribas, H.O., Vogel, F.S., 2010. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 173, (1), 157-160.
- Colditz, I.G. Watson, D.L., Gray, G.D., Eady, S.J., 1996. Some relationships between age, immune responsiveness and resistance to parasites in ruminants. *Int. J. Parasitol.* 26, 869-877.
- Coop, R.L., Holmes, P.H., 1996. Nutrition and parasite interaction. *Int. J. Parasitol.* 26, 951-962.
- Dawkins, H.J., Windon, R.G., Eagleson, G.K., 1989. Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 19, 199-205.

- Douch, P.G.C., Green, R.S., Morris, C.A., Mcewan, J.C., Windon, R.G., 1996. Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int. J. Parasitol.* 26, 899-911.
- Dynes, R.A., Poppi, D.P., Barrell, G.K., Sykes, A.R., 1998. Elevation of feed intake in parasite-infected lambs by central administration of a cholecystokinin receptor antagonist. *Br. J. Nutr.* 79, 47-54.
- Endharti, A.T., Rifa'i, M., Shi, Z., Fukuoka, Y., Nakahara, Y., Kawamoto, Y., Takeda, K., Isobe, K., Suzuki, H. 2005. Cutting Edge: CD8⁺ CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN- γ production and proliferation of CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 175, 7093-7097.
- Etter, E., 2000. The effect of two levels of dietary protein on resistance and resilience of dairy goats experimentally infected with *Trichostrongylus colubriformis*: comparison between high and low producers. *Vet. Res.* 31, 247-258.
- Gill, H.S., Altmann, K., Cross, M.L., Husb, A.J., 2000. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology.* 99, 458-463.
- Hagan, P., 1993. IgE and protective immunity to helminth infections. *Par. Immunol.* 15, 1-4.
- Hargreaves, A.L., Hutson, G.D., 1990. Changes in heart rate, plasma cortisol and haematocrit of sheep during a shearing procedure. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 26, 91-101.
- Holmes, P.H., 1987. Pathophysiology of nematode infections. *Int. J. Parasitol.* 17, 443-451.
- Idris, A., Moors, E., Sohnrey, B., Gaulty, M., 2012. Gastrointestinal nematode infections in German sheep. *Parasitol. Res.* 110, 1453-1459.
- Knox, M.R., Steel, J.W., Anderson, C.A., Muir, L.L., ed. 2003. Nutrition-parasite interactions in sheep. *Aust. J. Exp. Agric. (Special Issue).* 43, 1383-1488.
- Kooyman, F.N., Van Kooten, P.J., Huntley, J.F., MacKellar, A., Cornelissen, A.W., Schallig, H.D., 1997. Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. *Parasitology.* 114, 395-406.
- Lacroux, C., Nguyen, T.H., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Dorchies, P., Jacquiet, P., 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* 37, 607-622.
- Meeusen, E.N., Balic, A., Bowles, V., 2005. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Vet. Immun. Immunop.* 108, 121-125.

- Miller, J.E., Horohov, D.W., 2006. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *Anim. Sci.* 84,124-132.
- Pernthaner, A., Cole, S.A., Morrison, L., Hein, W.R., 2005a. Increased expression of interleukin-5 (IL-5), IL-13, and tumor necrosis factor alpha genes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Infect. Immun.* 73, 2175-2183.
- Pernthaner, A., Shaw, R.J., McNeill, M.M., Morrison, L., Hein, W.R., 2005b. Total and nematode-specific IgE responses in intestinal lymph of genetically resistant and susceptible sheep during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Immun. Immunop.* 104, 69-80.
- Pernthaner, A., Cole, S.A., Morrison, L., Green, R., Shaw, R.J., Hein, W.R., 2006. Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with the nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Immun. Immunop.* 114, 135-148.
- Schallig, H.D.F.H., 2000. Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology.* 120, 63-72.
- Shakya, K.P., Miller, J.E., Horohov, D.W., 2009. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet. Parasitol.* 163, 57-66.
- Strain, S.A.J., Stear, M.J., 2001. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 23, 527-531.
- Suarez, V.H., Cristel, S.L., Busetti, M.R., 2009. Epidemiology and effects of gastrointestinal nematode infection on milk productions of dairy ewes. *Parasite.* 16, 141-147.
- Terefe, G., Lacroux, C., Prévot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Bleuart, C., Dorchies, P., Foucras, G., Jacquiet, P., 2009. Eosinophils in *Haemonchus contortus*-infected resistant and susceptible breeds of sheep: abomasal tissue recruitment and *in vitro* functional state. *Vet. Parasitol.* 165, 161-164.
- Ueno, H. & Gonçalves, V.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Tóquio: Japan International Cooperation Agency. 143pp.
- Urban, J.F. 1992. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol. Rev.* 127, 204-246.
- van Houtert, M.F.J., Barger, I.A., Steel, J.W., Windon, R.G., Emery, D.L., 1995. Effects of dietary protein intake on responses of young sheep to infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 56, 163-180.

- van Houtert, M.F.J., Sykes, A.R., 1996. Implications of nutrition for the ability to withstand gastrointestinal nematode infections. *Int. J. Parasitol.* 26, 1151-1168.
- van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- van Wyk, J.A., Malan, F.S., Randles, J.L., 1997. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet. Parasitol.* 70, 111-122.
- Wakelin, D., 1995. Immunity and immunogenetics – new approaches to controlling worm infections in sheep. *Brit. Vet. J.* 151, 111-112.
- Wan, J.M., Haw, M.P., Blackburn, G.L., 1989. Nutritional, immune function and inflammation: an overview. *Proc. Nutr. Soc.* v.48, p.315-335.
- Withlock, H.R., 1948. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique apparatus. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 21, 177-180.

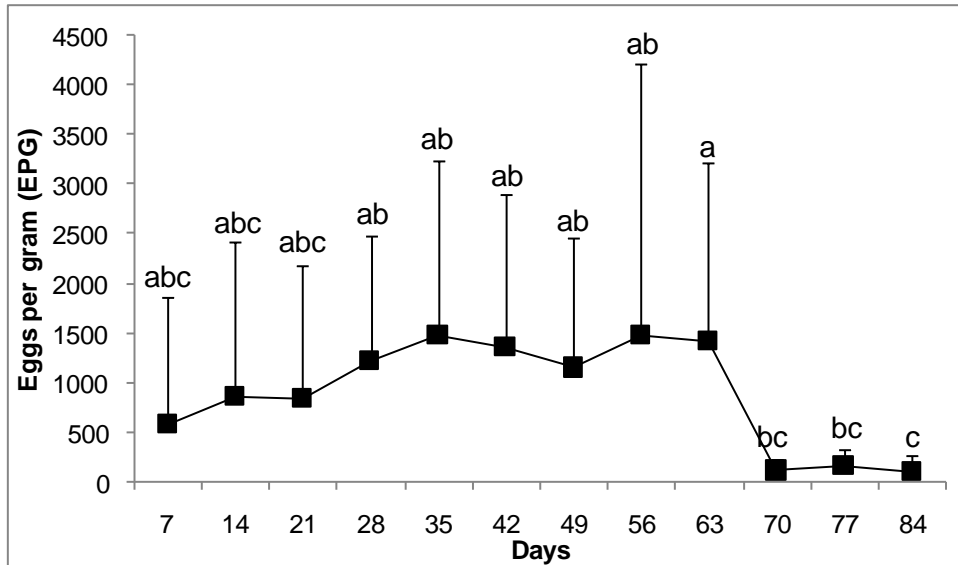


Figure 1. Mean eggs per gram (EPG) and standard deviation of the mean in lambs naturally infected with *Haemonchus* spp.. Day 42 corresponds to date of the pasture change. Different letters in each region indicate significant differences between means ($P<0.05$).

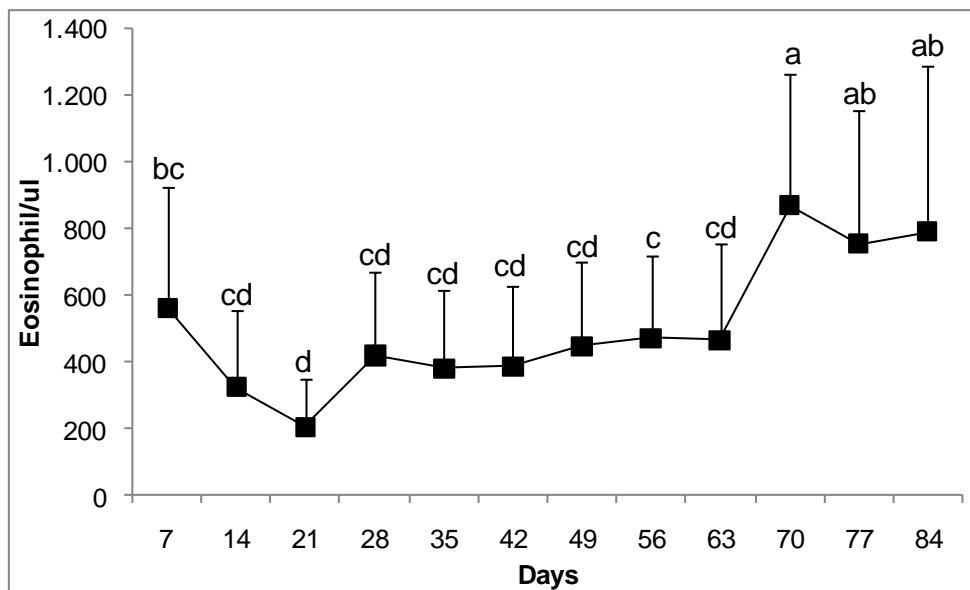


Figure 2. Mean of eosinophil concentration and standard deviation of the mean in lambs naturally infected with *Haemonchus* spp.. Day 42 corresponds to date of the pasture change. Different letters in each region indicate significant differences between means ($P<0.05$).

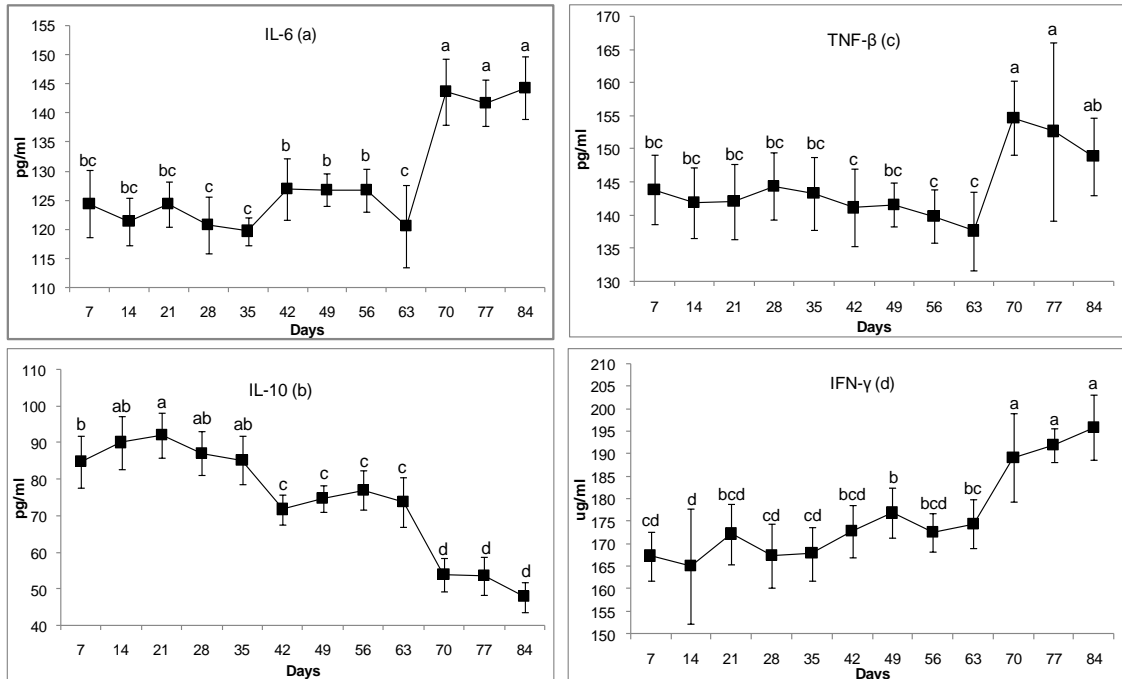


Figure 3. Means and standard deviations of interleukin-6 - IL-6 (a), IL-10 (b), tumor necrosis factor-beta - TNF-β (c) and interferon-gamma - IFN-γ (d), in serum of lambs naturally infected with *Haemonchus* spp.. Day 42 corresponds to date of the pasture change. Different letters in each region indicate significant differences between means (P<0.05).

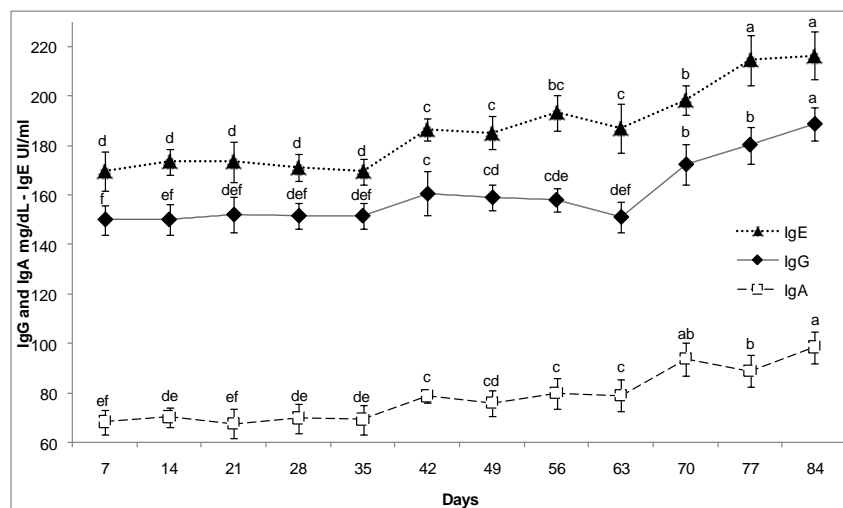


Figure 4. Means and standard deviations of immunoglobulins in serum of lambs naturally infected with *Haemonchus* spp.. Day 42 corresponds to date of the pasture change. Different letters in each line region indicate significant differences between means (P<0.05).

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados, foi possível estabelecer uma fraca correlação entre eosinófilos e OPG em ovinos Corriedale resilientes. Interleucina 6 (IL-6), TNF- β e IFN- γ tiveram aumento progressivo durante o período, mas a IL-10 não demonstrou diferença entre o início e final do estudo. Nestes animais, imunoglobulinas sorológicas (Ig) G, A e E aumentaram, principalmente em resposta a elevação da IL-10 a partir do dia 35 do estudo.

Ovinos naturalmente infectados pelo *Haemonchus* spp. submetidos a pastagem cultivada de aveia (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium multiflorum*) tiveram redução nos valores de OPG e aumento na efetividade da resposta imune. A melhora no suporte nutricional aos animais induziu um aumento significativo na resposta imune dos animais, caracterizada por eosinofilia periférica e o aumento das concentrações séricas de IgE, IgA, IgG, TNF- β , IFN- γ e IL-6.

6. REFERÊNCIAS

- ALBA-HURTADO, F. & MUÑOZ-GUZMÁN, M. A., Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-11, 2013.
- ALBERTS, G.A.A. et al., The genetic resistance and resiliense to *Haemonchus contortus* infection in young Merino sheep. **International Journal for Parasitology**, v.17, p.1355-1363, 1987.
- AMARANTE, A.F.T., Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: **Mattos, W.R.S. (Ed.), A produção animal na visão dos brasileiros. Fealq/SBZ**, Piracicaba, p. 461-473. 2001.
- AMARANTE, A.F.T., Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, supl.1, p.68-71, 2004.
- BAHIRATHAN, M. et al, Susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongylate nematode infection. **Veterinary Parasitology**, v.65, p.259-268, 1996.
- BALIC, A., BOWLES, V.M., MEEUSEN, E.N.T., The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants, **Advances in Parasitology**, v.45, p.181-241, 2000.
- BALIC, A., BOWLES, V.M., MEEUSEN, E.N.T., Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Parasite Immunology**.v.24, p.39-46, 2002.
- BAMBOU, J.C., et al., Peripheral immune response in resistant and susceptible Creole Kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**. v. 82, p. 34–39, 2009.

BATH, G. F. et al., Analysis of phenotypic and genotypic relationships of FAMACHA data compared to other production data. **Sustainable Approaches for Managing Haemonchosis in Sheep and Goats**.FAO, TCP/8821. Section, v. 6, p. 39-56, 2001.

BIFFA, D., JOBRE, Y., CHAKKA, H., Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. **Animal Health Research Reviews**, v. 7, n. 1-2, p. 107-118, 2006.

BISHOP, S. C.& MORRIS, C. A., Genetics of disease resistance in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 70, n. 1, p. 48-59, 2007.

BRICARELLO, P.A. et al., Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 99-109, 2005.

BRUNET, S. et al., The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both in vitro and in vivo. **Parasitology**, v. 134, n.9, p. 1253-1262, 2007.

CARVALHO, N. et al., The effects of Diet and corticosteroid-induced immune suppression during infection by *Haemonchus contortus* in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 214, n. 3, p. 289-294, 2015.

CEZAR, A.S., CATTO, J.B., BIANCHIN, I., Controle alternativo de nematódeos gastrointestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2083-2091, 2008.

CEZAR, A.S., et. al., Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.173, p.157-160, 2010.

COOP, R.L., &HOLMES, P.H., Nutrition and parasite interaction. **International Journal Parasitology**, v. 26, p.951-962, 1996.

COOP, R.L. & KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. **TRENDS in Parasitology**, v. 17, n. 7, p. 325-330, 2001.

DATTA, F.U. et al., Protein supplementation improves the performance of parasitized sheep fed a straw-based diet. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 1269-1278, 1998.

DELCSERIE, V, LAMOUREUX, M.D, BOUTIN, J.A., Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract Cur Issues. **Molecular Biology**, v.10, p.37-54, 2008.

ECHEVARRIA, F.A.M. et al., Use of resseeded pastures as an aid in the control of gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.50, p.151-155, 1993.

FORBES, A.B., et al. Sub-clinical parasitism in spring-born, beef suckler calves: epidemiology and impact on growth performance during the first grazing season. **Veterinary Parasitology**, v.104, p.339-344, 2002.

- GEARY, T.G., SANGSTER, N.C., THOMPSON, D.P., Frontiers in anthelmintic pharmacology. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.275-295, 1999).
- GILL, H.S. et al., Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Immunology**, v.99, n.3, p.458-463, 2000.
- GREER, A.W., Trade-offs and benefits: implications of promoting a strong immunity to gastrointestinal parasites in sheep. **Parasite Immunology**, v.30, p.123-132, 2008.
- HAILE, A. et al., Effects of breed and dietary protein supplementation on the responses to gastrointestinal nematode infections in Ethiopian sheep. **Small Ruminant Research**, v. 44, p.247-261, 2002.
- HERTZBERG, H. et al., Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae in vivo and in vitro. **Parasitology**, v. 125, n. 1, p. 65-70, 2002.
- HUNT, P.W. et al., Genetic and phenotypic differences between isolates of *Haemonchus contortus* in Australia. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 8, p. 885-900, 2008.
- JASMER, et al., *Haemonchus contortus* intestine: a prominent source of mucosal antigens. **Parasitology Immunology**, n.29, p.139-151, 2007.
- KAGIRA, J. & KANYARIA, P.W., The role of parasitic diseases as causes of mortality in small ruminants in a high-potential farming area in central Kenya. **Journal of South African Veterinary Association**, v.72, p.147-149, 2001.
- KAHN, L.P. et al., Regulation of the resistance to nematode parasites of single and twin bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. **Veterinary Parasitology**, v.114, p.15-31, 2003.
- KAMINSKY, R.et. al., Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. **Parasitology Research**.v.103, p.931-939, 2008.
- KAPLAN, R.M., Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v.20, n.10, p.477-481, 2004a.
- KAPLAN, R.M. et al., Validation of the FAMACHA eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 105-120, 2004b.
- KEMPER, K.E. et al., *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* did not adapt to long-term exposure to sheep that were genetically resistant or susceptible to nematode infections. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 5, p. 607-614, 2009.
- KENYON, F. et al., The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 1, p. 3-11, 2009.
- KHAN, F.A. et al., Effect of dietary protein on responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. **Livestock Science**, v. 150, n. 1, p. 143-151, 2012.

- KYRIAZAKIS, I. & HOUDIJK, J., Immunonutrition: nutritional control of parasites. **Small Ruminant Research**, v. 62, p. 79-82, 2006.
- LACROUX, C, et al., *Haemonchus contortus* (Nematoda: *Trichostrongylidae*) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. **Veterinary Research**, p. 607-622, 2006.
- LEATHWICK, D.M. et al., Managing anthelmintic resistance: Is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class? New Zealand **Veterinary Journal**, v. 57, n. 4, p. 181-192, 2009.
- LIEW, F.Y., TH1 and TH2 cells: a historical perspective. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.1, p.55-60, 2002.
- LOUVANDINI, H. et al., Influence of protein supplementation on the resistance and resilience on young hair sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes during rainy and dry seasons. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 103-111, 2006.
- MacRAE, J.C., Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proceedings of The Nutrition Society**, v.52, p.121-130, 1993.
- MAIZELS, R.M., HEWITSON, J.P., SMITH, K.A., Susceptibility and immunity to helminth parasites. **Current Opinion in Immunology**, v.24, n.4, p.459-466, 2012.
- McLEOD R.S., Costs of major parasites to the Australian livestock industries. **International Journal Parasitology**, v.25, p.1363-1367, 1995.
- MEDEROS, A.E.et. al., First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites & Vectors**, v.7, n. 1, p. 1-4, 2014.
- MEEUSEN E.N.T. & BALIC A., Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? **Parasitology Today**, v.16, n.3, p.95-101, 2000.
- MEEUSEN, E.N., BALIC, A.,BOWLES, V., Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. **Veterinary Immunology Immunopathology**.v.108, p.121-125, 2005.
- MILLER, J.E., HOROHOV, D.W., Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. **Journal Animal Science**, v.84, p.124-132, 2006.
- MOLENTO, M.B. et. al., Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1139-1145, 2004.
- MOLENTO, M.B. et al., Frequency of treatment and production performance using the FAMACHA method compared with preventive control in ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 3, p. 314-319, 2009.
- MONTEIRO, S.G., **Parasitologia na Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, p. 25-26, 2010.
- MORRIS, C.A. et al., Resilience to nematode parasite challenge in industry and AgResearch selection flocks. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.64, p.300-303, 2004.

- O'CONNOR, L.J., WALKDEN-BROWN, S.W., KAHN, L.P., Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, v.142, p. 1–15, 2006.
- PAOLINI, V. et al., Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.3-4, p.277–283, 2005.
- RAMOS, C.I. et al., Epidemiologia das helmintoses gastrointestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1889-1895, 2004.
- ROBERTS, J.A.&ADAMS, D.B., The effect of level of nutrition on the development of resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, n. 3, p. 89-91, 1990.
- SCOTT, I. et al., Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary parasitology**, v. 198, n. 1, p. 166-171, 2013.
- SHAW, K. L. et al. Effects of weaning, supplementation and gender on acquired immunity to *Haemonchus contortus* in lambs. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 381-387, 1995.
- STUEDEMANN, J.A. et al., Bermuda grass management in the Southern Piedmont USA. V: Gastrointestinal parasite control in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.375-385, 2004.
- TIZARD, I., **Imunologia Veterinária - Uma Introdução**. Editora: Elsevier Saunders, 8ª Ed. 2008, 587p.
- VAN WYK, J.A.; BATH, GARETH F., The Famacha system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, n. 5, p. 509-529, 2002.
- WALLER, P.J.& THAMSBORG, S.M., Nematode control in 'green' ruminant production systems. **Trends in parasitology**, v. 20, n. 10, p. 493-497, 2004.
- WALLER, P.J. & CHANDRAWATHANI, P. *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics-Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. **Tropical Biomedicine**, v. 22, n. 2, p. 131-137, 2005.
- WATSON, D.L. et al., Age-dependent immune response in Merino sheep. **Research in Veterinary Science**, v.57, n.2, p.152–158, 1994.
- WEST, D. et al., Estimating the cost of subclinical parasitism in grazing ewes. **Small Ruminant Research**, v.86, n.1, p.84-86, 2009.
- WOLSTENHOLME, J. et al., Drug resistance in veterinary helminthes. **Trends in Parasitology**, v.20, n.10, p.469-476, 2004.
- WOOLASTRON, R.R.& BAKER, R.L., Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. **International Journal for Parasitology**, v.26, n.8/9, p.845-855, 1996.