

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

EMANUELLE MARTINS DE CAMPOS

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM OVINOS DE
DIFERENTES RAÇAS E HAPLÓTIPOS DA β -
GLOBINA INFECTADOS COM *Haemonchus
contortus***

SÃO CARLOS - SP
2025

EMANUELLE MARTINS DE CAMPOS

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM OVINOS DE DIFERENTES RAÇAS E
HAPLÓTIPOS DA β -GLOBINA INFECTADOS COM *Haemonchus contortus***

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia, pela
Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora: Dr.^a Cintia Hiromi Okino
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Andrea Soares da Costa Fuentes

São Carlos - SP

2025

RESUMO

A infecção por *Haemonchus contortus* é um dos principais desafios na criação de ovinos. A susceptibilidade alterada à essa infecção pode ser atribuída a fatores como raça, idade, estado fisiológico e/ou nutricional e alterações genéticas. Ovinos Santa Inês apresentam elevada resistência, enquanto White Dorper e Texel apresentam maior susceptibilidade. Dentre as variações intra-raciais, foi verificado efeito significativo do polimorfismo da β -globina ovina na resistência ao parasita. A presença do alelo β^A , relacionado ao aumento compensatório da afinidade da hemoglobina por oxigênio em resposta à anemia parasitária, também está associado a uma resposta imune mais robusta e maiores níveis de IgM plasmático anti-*H. contortus*. Sendo um nematódeo gastrointestinal, *H. contortus* interage diretamente com a mucosa do trato digestório, tornando a resposta imune local essencial no combate à infecção. No entanto, poucos estudos avaliaram essa resposta. Este trabalho objetivou desenvolver e aplicar um método para quantificação da resposta humoral local (secreção nasal e oral) em comparação à sistêmica. O antígeno-alvo foi a proteína excretória-secretória de 24 kDa (ES24) de *H. contortus*. Cordeiros das raças White Dorper, Texel e Santa Inês de diferentes haplótipos da β -globina foram experimentalmente infectados. Amostras de swabs nasais, orais e plasma foram coletadas semanalmente (D0 a D28) para quantificação de anticorpos anti-ES24 dos isótipos IgG, IgM e IgA. Maiores títulos de imunoglobulinas foram detectados em secreção nasal comparado à secreção oral. Cordeiros Santa Inês apresentaram maiores níveis de todos os isótipos na mucosa nasal em comparação com outras raças, sem diferenças significativas no plasma e na mucosa oral. Nos cordeiros Santa Inês, o polimorfismo da β -globina influenciou a resposta imune. Animais Hb_AA apresentaram maiores títulos sistêmicos de IgM anti-ES24 e maiores valores de volume globular, enquanto IgA nasal apresentou tendências a níveis inferiores em comparação aos Hb-AB e Hb-BB. Esses achados corroboram com estudos anteriores associando o isótipo IgM à maior resistência contra a hemoncose. A quantificação de anticorpos na mucosa surge como uma ferramenta promissora para avaliar a infecção e a proteção do hospedeiro, contribuindo para estratégias de manejo imuno-profilático da hemoncose.

Palavras-chave: imunoglobulinas, ELISA indireto, resposta humoral local, mucosa, ovinos, isótipos, IgM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotomicrografias de larvas de <i>H. contortus</i> em microscópio óptico com objetiva de 40x (A e C) e em estereomicroscópio (B e D).....	12
Figura 2 - Sequência de aminoácidos da proteína ES24 do <i>H. contortus</i>	24
Figura 3 - Fotografia de análise por SDS-Page e Western blot (acima), e de HPLC (abaixo) da proteína ES24 sintetizada.	25
Figura 4 - Capilar para micro hematócrito posicionado em régua de leitura.	28
Figura 5 – Contagem de <i>Haemonchus contortus</i> (machos adultos, fêmeas adultas e total), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).....	30
Figura 6 - Média de OPG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	31
Figura 7 - Média de VG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	31
Figura 8 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	32
Figura 9 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	32
Figura 10 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	33
Figura 11 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	33
Figura 12 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	34
Figura 13 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com	

as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	34
Figura 14 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	35
Figura 15 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	35
Figura 16 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).	36
Figura 17 - Contagem de <i>Haemonchus contortus</i> (machos adultos, fêmeas adultas e total), de acordo os haplótipos da β -globina em Santa Inês (AA, AB e BB).	36
Figura 18 - Média de OPG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (AA, AB e BB).	37
Figura 19 - Média de VG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (AA, AB e BB)....	38
Figura 20 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).	38
Figura 21 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).	39
Figura 22 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).	39
Figura 23 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).	40
Figura 24 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).	40
Figura 25 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com	

os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).	41
Figura 26 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).	41
Figura 27 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).	42
Figura 28 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Importância dos rebanhos ovinos no Brasil	10
2.2 Classificação e morfologia <i>Haemonchus contortus</i>	10
2.2.1 Patogenicidade	12
2.2.1.1 Sinais clínicos	14
2.3 Manejo e resistência anti-helmíntica	14
2.4 Resposta imune e resistência à hemoncose	15
2.4.1 Associação entre a resistência e haplótipos da β -globina	17
2.5 Resposta humoral à infecção por <i>H. contortus</i>	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivos específicos	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Desenho experimental	22
4.2 Determinação dos haplótipos da β -globina	23
4.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA indireto)	23
4.3.1. Produção da proteína ES24 recombinante	23
4.3.2 ELISA indireto para quantificação de anticorpos anti- <i>H. contortus</i> plasmáticos.	25
4.3.3 ELISA indireto para quantificação de anticorpos anti- <i>H. contortus</i> de mucosa.....	27
4.4 Avaliação fenotípica.....	27
4.4.1 Determinação de ovos por grama de fezes.....	27
4.4.2 Determinação do volume globular	28
4.4.3 Contagem de parasitas abomasais.....	28
4.5 Análise estatística	29
5 RESULTADOS.....	30

5.1 Comparação de resposta humoral em diferentes raças de ovinos	30
5.1.1. Contagem de parasitas abomasais.....	30
5.1.2. Determinação de volume globular e OPG	30
5.1.3 Níveis de imunoglobulinas em plasma e mucosa	31
5.2 Comparação de resposta humoral em cordeiros Santa Inês de diferentes haplótipos da β-globina.	36
5.2.1 Contagem de parasitas abomasais.....	36
5.2.2. Determinação de volume globular e OPG	37
5.2.3. Níveis de imunoglobulinas em plasma e mucosa	38
6 DISCUSSÃO	43
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICE A – Tabelas de médias e desvios padrão das variáveis em estudo	55
APÊNDICE B – Resumo 16ª Jornada Científica – Embrapa São Carlos – 23 de agosto de 2024	58

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura destaca-se como uma atividade de grande relevância econômica e social no Brasil e no mundo, adaptando-se a diferentes condições climáticas e gerando renda para comunidades rurais. No Brasil, o rebanho ovino tem crescido continuamente, impulsionado pela demanda por carne, leite e derivados, consolidando-se como um setor essencial na economia nacional (FREITAS et al., 2013; EMBRAPA, 2023; IBGE, 2022).

Apesar desse crescimento, a ovinocultura enfrenta desafios, principalmente pela infecção por *Haemonchus contortus*, causador da hemoncose. Esse nematódeo hematófago reduz a produtividade dos rebanhos, causando anemia severa, perda de peso e, em casos extremos, morte dos animais, gerando prejuízos econômicos relevantes, especialmente em regiões tropicais (ALMEIDA et al., 2010; CHAGAS et al., 2022; BESIER et al., 2016).

Algumas raças ovinas, como a Santa Inês, têm demonstrado maior resistência à infecção por *H. contortus*, uma característica associada a respostas imunológicas mais robustas. Essas respostas incluem maior produção de citocinas, ativação de células efectoras e produção de anticorpos específicos. A variação na resposta imune humoral de mucosa é um fator essencial na defesa contra parasitas gastrointestinais, explicando parte das diferenças de resistência entre as raças (OKINO et al., 2023; AMARANTE et al., 2004).

Fatores genéticos, como os haplótipos da β -globina ovina, também influenciam o fenótipo de resistência à infecção. Ovinos da raça Morada Nova, albergando o haplótipo β^A , quando infectados naturalmente ou experimentalmente com *H. contortus*, apresentaram menor quantidade de ovos de parasitas nas fezes, níveis mais elevados de hematócrito e maior expressão de genes ligados à proteção das mucosas (ČUPERLIVIĆ et al., 1978; TOSCANO et al., 2020; OKINO et al., 2021).

Isto posto, o presente trabalho tem como finalidade desenvolver um teste de ELISA indireto para mensuração de anticorpos anti-*H. contortus* de mucosa (oral e nasal), avaliar comparativamente a resposta humoral sistêmica (plasma) e local de cordeiros das raças Santa Inês, White Dorper e Texel infectados com *H. contortus*. Para tanto, será realizada a quantificação de anticorpos específicos dos isótipos IgG, IgM e IgA anti-ES24, uma proteína excretória-secretória do parasita, comparando com parâmetros fenotípicos, que incluem quantidade de ovos por grama de fezes (OPG),

volume globular (VG) e contagem de parasitas abomasais.

Ademais, o monitoramento de anticorpos de mucosa via coleta com swab, constitui um método não invasivo para acompanhar a progressão da infecção e da resposta humoral desenvolvida por *Haemonchus contortus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância dos rebanhos ovinos no Brasil

A ovinocultura tem se consolidado como uma atividade de grande relevância econômica e social no Brasil, refletindo tendências observadas no cenário mundial. Globalmente, a criação de ovinos é uma prática difundida, adaptando-se a diversos climas e relevos, o que permite sua exploração tanto em escala econômica quanto para subsistência de famílias rurais (FREITAS et al., 2013).

No Brasil, dados recentes indicam um crescimento contínuo do rebanho ovino. Em 2023, o país alcançou a marca de 21 milhões de cabeças, representando um aumento de 4,94% em relação ao ano anterior, consolidando-se como um setor importante na economia brasileira (IBGE, 2022).

A distribuição regional do rebanho ovino brasileiro destaca o Nordeste como principal polo produtor, concentrando aproximadamente 60% do efetivo nacional, com destaque para a Bahia como o maior estado produtor. Além disso, a região Sul, até o início da década de 1980, destacava-se com o maior rebanho de ovinos, evidenciando a importância histórica da atividade, antes com rebanhos especializados em lã e atualmente para corte (EMBRAPA, 2023; IBGE, 2023).

A importância econômica da ovinocultura no Brasil também está atrelada à geração de emprego e renda, especialmente em comunidades rurais. A atividade contribui para a ocupação de mão-de-obra familiar e é reconhecida por seu potencial econômico, atendendo a uma elevada demanda interna e externa por carne, leite e peles (EMBRAPA, 2014).

Apesar do crescimento, um dos maiores desafios para a ovinocultura no Brasil e no mundo é o impacto das parasitoses gastrointestinais, com destaque para o *Haemonchus contortus*. A hemoncose, como é conhecida a doença causada por esse parasita, é uma das principais causas de perdas econômicas na produção ovina, impactando diretamente na rentabilidade e na produtividade dos rebanhos (ALMEIDA et al., 2010; LINS et al., 2022).

2.2 Classificação e morfologia *Haemonchus contortus*

H. contortus é um nematódeo hematófago que parasita o trato gastrointestinal de pequenos ruminantes, como ovinos e caprinos. Sua classificação taxonômica

reflete características morfológicas e fisiológicas adaptadas ao parasitismo (IRFAN et al., 2014).

Anatomicamente, o parasita apresenta estruturas bucais especializadas para hematofagia, como lanceta no interior da cápsula bucal que perfura os vasos sanguíneos no abomaso. Seu tubo digestivo está adaptado para processar grandes volumes de sangue, enquanto a cutícula externa oferece proteção contra o ambiente hostil do trato gastrointestinal do hospedeiro. Essas adaptações são cruciais para sua sobrevivência e patogenicidade, resultando em perda de sangue e desnutrição do hospedeiro (GILLEARD & REDMAN, 2016).

Os estágios larvais de *H. contortus* exibem adaptações importantes para sobrevivência em diferentes ambientes e transição para o parasitismo. A larva de primeiro estágio (L₁) eclode do ovo, em pastagens, sob condições favoráveis de umidade e temperatura, apresentando estrutura corporal simples. Até atingir o terceiro estágio larval (L₃), seu desenvolvimento ainda ocorre externamente, geralmente nas pastagens. O L₃, sendo o estágio infeccioso, possui uma cutícula dupla que protege contra desidratação e condições adversas, permitindo sua sobrevivência até ser ingerida pelo hospedeiro. Dentro do hospedeiro, as larvas se desenvolvem no abomaso, transformando-se em larvas de quarto estágio (L₄), fase em que se fixam à parede do órgão para iniciar hematofagia ativa, causando anemia e desnutrição (NIKOLAOU & GASSER, 2006; BESIER et al., 2016).

A diferenciação sexual inicia-se no estágio L₄, quando os primórdios genitais já permitem identificar machos e fêmeas antes da maturidade sexual. Machos apresentam estruturas rudimentares do sistema reprodutivo masculino, enquanto fêmeas começam a desenvolver o primórdio do sistema reprodutivo feminino (BLITZ & GIBBS, 1971; REYES-GUERRERO et al., 2024).

No estágio adulto (L₅), o dimorfismo sexual é bem definido. Fêmeas, geralmente maiores, possuem um sistema reprodutivo desenvolvido, visível externamente como um tubo espiralado, com variações morfológicas na vulva (polimorfismo vulvar). Machos possuem uma bolsa copuladora característica na extremidade posterior, usada para a cópula. Assim, embora as diferenças sexuais sejam perceptíveis já no L₄, é no estágio adulto que atingem total maturidade (IRFAN et al., 2014; BESIER et al., 2016).

Figura 1 - Fotomicrografias de larvas de *H. contortus* em microscópio óptico com objetiva de 40x (A e C) e em estereomicroscópio (B e D).



Fonte: Arquivo da autora. (A) Larva L4 com sistema reprodutor feminino pouco desenvolvido; (B) Fêmea adulta com apêndice vulvar totalmente desenvolvido e presença de ovos; (C) Larva L4 com sistema reprodutor masculino pouco desenvolvido; (D) Macho adulto com bolsa copulatória aberta, totalmente desenvolvido.

Durante o estágio adulto, esses nematódeos apresentam maior mobilidade em comparação às larvas, facilitando a reprodução. Para a cópula, machos e fêmeas se deslocam pela luz do abomaso, continuando a se alimentar de sangue, o que agrava os danos ao hospedeiro (TROELL, 2006; BESIÉ et al., 2016; GILLEARD & REDMAN, 2016).

2.2.1 Patogenicidade

H. contortus é um dos parasitas mais patogênicos que afetam pequenos ruminantes, conhecido por causar anemia severa devido à hematofagia ativa no abomaso do hospedeiro. Esse nematódeo consome grandes quantidades de sangue, ingerindo até 0,05 mL por helminto ao dia, o que reduz significativamente a contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina, resultando em fraqueza, mucosas pálidas, perda de peso e, em casos graves, morte do animal. Além disso, a presença

do parasita no abomaso provoca inflamação e danos na mucosa, comprometendo a digestão e a absorção de nutrientes e agravando a debilidade geral do hospedeiro (BESIER et al., 2016; ANGULO-CUBILLÁN et al., 2007).

Os estados clínicos da infecção variam entre agudo e crônico. No estado agudo, a elevada carga parasitária causa rápida perda de sangue, anemia severa, edema submandibular ("papeira") e, em casos graves, morte súbita. Mucosas extremamente pálidas, colapso cardiovascular e fraqueza acentuada são comuns, especialmente em animais jovens ou imunossuprimidos. Já o estado crônico ocorre em infecções subclínicas com menor carga parasitária, desenvolvendo-se de forma progressiva. Nesse caso, manifesta-se como anemia moderada, perda de peso, redução na eficiência produtiva e maior vulnerabilidade a outros patógenos devido à imunossupressão crônica. Essa forma é frequentemente observada em regiões endêmicas, onde os animais são continuamente infectados pelo parasita (FLAY et al., 2022; NISBET et al., 2016).

O impacto na produção animal é significativo. Infecções por *H. contortus* comprometem o ganho de peso e a eficiência alimentar, reduzindo a produção de carne e lã e aumentando os custos com tratamentos, especialmente em sistemas extensivos (ALMEIDA et al., 2010; CHAGAS et al., 2022). Em ovelhas lactantes, a infecção reduz a produção de leite, afetando o crescimento dos cordeiros. Em casos crônicos, há ainda perda na qualidade da lã e redução da fertilidade, intensificando as perdas econômicas, especialmente em rebanhos comerciais localizados em regiões tropicais e subtropicais, onde o parasita é mais prevalente (EMERY et al., 2016; ABOSSÉ et al., 2022).

Além dos efeitos diretos, o parasita exerce pressão sobre o sistema imunológico do hospedeiro, desencadeando respostas inflamatórias intensas que frequentemente são insuficientes para controlar a carga parasitária. Essa resposta ineficaz permite a persistência da infecção e agrava o quadro clínico. Outro desafio relevante é a resistência do parasita a tratamentos antiparasitários, o que exige estratégias integradas e sustentáveis de controle, como seleção genética para resistência, rotação de pastagens e manejo estratégico (ANGULO-CUBILLÁN et al., 2007; BESIER et al., 2016; NISBET et al., 2016).

2.2.1.1 Sinais clínicos

A identificação precoce dos sinais clínicos é essencial para prevenir complicações graves e reduzir perdas econômicas. Métodos como hematócrito, contagem de OPG e FAMACHA são amplamente empregados para avaliar a gravidade da infecção e orientar intervenções. O hematócrito, que mede a proporção de glóbulos vermelhos no sangue, é uma ferramenta eficaz para diagnosticar anemia severa. O OPG, por sua vez, estima a carga parasitária por meio da contagem de ovos de parasitas nas fezes. Já o método FAMACHA oferece uma abordagem prática em campo, avaliando a coloração das mucosas oculares para identificar anemia, classificando-a em uma escala de 1 (normal) a 5 (anemia severa). A combinação desses métodos permite intervenções mais direcionadas e eficazes no manejo do parasita (ABOSSE et al., 2022; EMERY et al., 2016).

2.3 Manejo e resistência anti-helmíntica

O controle da infecção, tradicionalmente, combina o uso de anti-helmínticos com estratégias para reduzir a carga parasitária nos rebanhos. Entre as classes de medicamentos amplamente utilizadas estão os benzimidazóis (como albendazol), as lactonas macrocíclicas (como ivermectina) e os imidazotiazóis (como levamisol). Essas drogas atuam de forma específica: os benzimidazóis inibem a polimerização de microtúbulos, essencial para o metabolismo do parasita; as lactonas macrocíclicas interferem nos canais iônicos, causando paralisia; e os imidazotiazóis induzem paralisia espástica ao agir como agonistas de receptores nicotínicos. Quando utilizados de maneira adequada, esses medicamentos demonstram alta eficácia e constituem a base do controle do parasita em sistemas de produção animal (BESIER et al., 2016; KOTZE & PRICHARD, 2016).

Além dos medicamentos, estratégias complementares de identificação precoce dos sinais clínicos ajudam a direcionar os tratamentos para os animais que realmente necessitam. Práticas como a rotação de classes de anti-helmínticos, o manejo de *refugia* (manutenção de uma população de parasitas não exposta ao tratamento) e o uso de pastagens com baixa contaminação prolongam a eficácia dos medicamentos. Essas abordagens integradas visam equilibrar a pressão de seleção sobre os parasitas e reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistência (SCHEUERLE, 2009; GILLEARD, 2013).

Contudo, o uso prolongado e, frequentemente, inadequado de anti-helmínticos resultou no surgimento e disseminação de resistência em populações de *H. contortus* (RAMOS et al., 2002; CHAGAS et al., 2008). Essa resistência ocorre quando mutações genéticas permitem que alguns parasitas sobrevivam aos tratamentos, transmitindo essas características às gerações subsequentes. Fatores como o uso indiscriminado de medicamentos, doses subterapêuticas, tratamento de todo o rebanho e a ausência de *refugia* aumentam significativamente a pressão seletiva para a resistência. Dessa forma, apenas os parasitas resistentes sobrevivem e se reproduzem, acelerando o aumento de cepas resistentes nas populações (KOTZE & PRICHARD, 2016; GETACHEW et al., 2007).

Casos de resistência aos benzimidazóis, lactonas macrocíclicas e imidazotiazóis já foram relatados em várias regiões do mundo, especialmente em países tropicais e subtropicais onde o parasita é endêmico (ECHAVARRIA et al., 1996; RAMOS et al., 2002; ALMEIDA et al., 2010; BASSETO et al., 2024). Essa resistência reduz drasticamente as opções de controle, resultando em perdas econômicas. O problema é agravado pela falta de novas classes de anti-helmínticos no mercado e pela necessidade urgente de estratégias alternativas, como o uso de plantas com propriedades antiparasitárias e o desenvolvimento de novos tratamentos ou vacinas, que ainda apresentam limitações práticas (GILLEARD, 2013; LAMB et al., 2017).

2.4 Resposta imune e resistência à hemoncose

A hemoncose é marcada pela capacidade do *H. contortus* em evadir e manipular o sistema imunológico, exigindo respostas complexas do hospedeiro. Contudo, indivíduos e raças ovinas mais resistentes à infecção, como Morada Nova e Santa Inês, exibem mecanismos mais robustos de imunidade inata e adaptativa, que envolvem citocinas, imunoglobulinas e células efetoras. Esses fatores têm sido amplamente estudados para compreender as diferenças na resistência entre fenótipos e raças (AMARANTE et al., 2004; LINS et al., 2022; OKINO et al., 2024).

As infecções por *H. contortus* induzem predominantemente uma resposta imunológica do tipo Th2, caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Essas moléculas desempenham papéis cruciais na ativação de eosinófilos e mastócitos, além de estimularem a produção de imunoglobulinas específicas. Ovinos resistentes apresentam maior infiltração de eosinófilos no abomaso e ativação de vias

imunológicas de mucosa, o que resulta em uma expulsão mais eficaz do parasita (ANTHONY et al., 2007; OKINO et al., 2023).

A produção de imunoglobulinas, como IgA, IgG e IgE, também é essencial para neutralizar e eliminar o parasita. A IgA atua na inibição da adesão do parasita à mucosa abomasal, enquanto a IgE ativa mastócitos e eosinófilos, promovendo reações inflamatórias que limitam a infecção (ABD-ALLA; RAVDIN, 2005; OKINO et al., 2023).

Ovinos da raça Santa Inês, reconhecidos por sua resistência natural à hemonose, destacam-se por uma resposta Th2 mais intensa e controlada, associada à maior expressão de genes como MS4A2, que codifica o receptor de alta afinidade para IgE e IL-5, envolvido na diferenciação de eosinófilos. Esses fatores contribuem para a eficácia superior da resposta imunológica dessa raça em comparação a outros animais que compõem os rebanhos brasileiros, como White Dorper e Texel (INGHAM et al., 2008; TOSCANO et al., 2020; OKINO et al., 2023).

Estudos comparativos entre a raça Dorper e outras raças presentes em rebanhos de áreas tropicais e subtropicais, como Merino, Red Maasai e Blackhead Somali, destacam a alta susceptibilidade de Dorper a infecções por *H. contortus*, em razão de maior contagem de OPG e menor volume globular (VG) durante o período avaliado, além de maior mortalidade (MUGAMBI et al., 1997; WANYANGU et al., 1997).

Estudos recentes para a identificação de grupos genéticos mais resistentes, corroboram os resultados de maior susceptibilidade das raças Dorper e Texel em comparação a raça Santa Inês. Enquanto animais Santa Inês necessitaram de menor número de intervenções com anti-helmínticos (4), foram necessários 50 tratamentos para Dorper e 14 em Texel, demonstrando, respectivamente, uma baixa resistência e resistência intermediária, quando comparados com raças adaptadas (GONÇALVES et al., 2018).

Outro aspecto relevante da resposta imune controlada é o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e reguladoras. Ovinos resistentes apresentam maior expressão de IL-10 e TGF- β , citocinas que modulam a inflamação excessiva, prevenindo danos teciduais e promovendo uma resposta imunológica mais eficiente. Esse equilíbrio permite controlar os efeitos patológicos da infecção sem comprometer a eliminação do parasita (NG, 2018; SHER et al., 1992; INGHAM et al., 2008; OKINO et al., 2023).

A imunidade inata também desempenha um papel essencial na resistência à hemoncose. Estudos recentes identificaram as células epiteliais “tuft” no intestino como iniciadoras da resposta Th2, ao liberar IL-25, que ativa células efectoras de mucosa. Essa descoberta destaca a importância da imunidade de mucosa na defesa contra parasitas gastrointestinais (GERBE et al., 2016).

Por fim, os padrões genéticos e imunológicos observados em ovinos resistentes fornecem uma base molecular para estratégias de seleção genética que promovam resistência à hemoncose. A identificação de marcadores imunológicos, como altos níveis de IgA e maior infiltração de eosinófilos, é promissora para programas de melhoramento genético, reduzindo a dependência de anti-helmínticos e mitigando a resistência parasitária (WEN et al., 2023; OKINO et al., 2023; PAL & CHAKRAVARTY, 2020).

2.4.1 Associação entre a resistência e haplótipos da β -globina.

Pesquisas recentes têm aprofundado a relação entre os haplótipos de β -globina em ovinos e os fenótipos de resistência à infecção por *H. contortus*, evidenciando o potencial genético como ferramenta no manejo da hemoncose. Estudos indicam que diferentes haplótipos, β^A e β^B da β -globina, exercem influência significativa na resposta imunológica e nos parâmetros hematológicos de animais infectados (ČUPERLIVIĆ et al., 1978; ALTAIF & DARGIE, 1978; INGHAM et al., 2008; BISHOP, 2012).

O haplótipo β^A tem sido consistentemente associado a melhores indicadores de resistência. Animais Hb-AA apresentam menor carga parasitária, menor contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e alterações fisiológicas menos pronunciadas em comparação aos portadores de hemoglobina Hb-BB. Essa associação sugere que o haplótipo β^A contribui para uma resposta imunológica mais eficaz contra o parasita, possivelmente modulando a atividade inflamatória e favorecendo a defesa do hospedeiro (ČUPERLIVIĆ et al., 1978; OKINO et al., 2021; KAPRITCHKOFF et al., 2024).

O haplótipo β^A está relacionado a melhores parâmetros hematológicos, incluindo níveis mais elevados de hematócrito e hemoglobina total, o que proporciona maior resistência/resiliência ao estresse anêmico induzido pela infecção. Em contrapartida, animais do haplótipo β^B , apresentam menor resistência/resiliência, devido deleção de *locus* gênico contendo beta-globina juvenil (β^C) expressa no cordeiro jovem, que possui maior afinidade por oxigênio, e que volta a ser expressa

na fase adulta em situações de anemia e/ou hipóxia. Essa limitação contribui para maior suscetibilidade à infecção, especialmente em animais homocigotos para alelo β^B (ROY et al., 2014; OKINO et al., 2021).

A resposta imune mais robusta em ovinos com haplótipo β^A também está associada à expressão aumentada de genes envolvidos na resposta Th2, mucinas e lectinas. Esses genes desempenham papéis fundamentais na expulsão dos parasitas e na proteção das mucosas, reduzindo os danos causados pela infecção e promovendo a recuperação dos tecidos abomasais (ČUPERLIVIĆ et al., 1978; ALTAIF; DARGIE, 1978; OKINO et al., 2023).

O desenvolvimento de técnicas moleculares como qPCR e multiplex PCR têm viabilizado a identificação rápida e precisa dos haplótipos de β -globina. Essas metodologias oferecem uma abordagem acessível para programas de melhoramento genético, facilitando a seleção de ovinos mais resistentes à hemonose. Essa estratégia não apenas reduz a dependência aos anti-helmínticos, mas também pode ajudar a mitigar a resistência parasitária (OKINO et al., 2021).

Os resultados desses estudos reforçam a importância da identificação dos haplótipos de β -globina como ferramenta no manejo genético de rebanhos ovinos. A aplicação dessas descobertas pode contribuir para reduzir perdas econômicas, melhorar o bem-estar animal e garantir maior sustentabilidade no setor produtivo, destacando o papel da genética na luta contra a hemonose (ČUPERLIVIĆ et al., 1978; ROY et al., 2014; OKINO et al., 2021).

2.5 Resposta humoral à infecção por *H. contortus*

Entre os métodos sorológicos disponíveis, o ELISA indireto (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) destaca-se como ferramenta precisa e específica, baseando-se na detecção de anticorpos contra antígenos específicos. Nesse contexto, a proteína ES24, um componente excretório-secretório (ES) de *H. contortus*, tem se mostrado promissora devido à sua capacidade de discriminar infecções por esse parasita de outras infecções gastrointestinais em ovinos (LI et al., 2007; SCHALLIG et al., 1997).

A especificidade do ELISA baseado na ES24 é reforçada pela ausência de reatividade cruzada com parasitas como *Fasciola hepática*, tornando-o uma ferramenta confiável para estudos epidemiológicos e clínicos. Ensaios com proteínas recombinantes demonstraram alta sensibilidade na detecção de anticorpos

específicos no soro de animais infectados, permitindo a diferenciação entre animais infectados por *H. contortus* e aqueles com infecções por outros nematódeos ou não infectados (LI et al., 2007; BAKKER et al., 2004).

Além de sua precisão, a ES24 desempenha um papel imunológico significativo ao ser reconhecida por anticorpos específicos em soros de ovinos infectados. Estudos mostram que mais de 50% dos animais de campo em regiões endêmicas apresentam anticorpos contra *H. contortus*, evidenciando a aplicabilidade do ELISA baseado nessa proteína para monitoramento em larga escala (SCHALLIG et al., 1994; LI et al., 2007).

Títulos de anticorpos IgM plasmáticos anti-ES24 e valores de OPG demonstraram coeficiente de correlação negativa moderada em cordeiros infectados experimentalmente com *H. contortus*, além de correlação positiva moderada entre níveis de IgM e valores de VG (OKINO et al., 2024). Nesse contexto, a importância de anticorpos IgM como agentes da imune-proteção dos hospedeiros reforça seu possível papel no aprimoramento imuno-profilático de rebanhos e o seu potencial uso no tratamento passivo frente à infecção por esse parasita.

Ademais, *T. circumcincta*, que também parasita o abomaso de pequenos ruminantes, foi avaliado em relação aos valores de OPG e aos níveis de IgA específicos contra o antígeno somático de larvas L3 em amostras de sangue, secreção nasal e saliva, revelando correlações significativamente positivas. Os maiores coeficientes de correlação foram observados para a secreção nasal, seguidos do soro e, por último, da saliva. O uso dos índices de IgA como potencial biomarcador para essa infecção parasitária, em condições naturais, foi reforçado especialmente para animais mais jovens, com valores de correlação superiores a 0,5 encontrados (Agüero et al., 2023).

A resposta humoral frente a infecções varia conforme a distribuição dos isótipos de imunoglobulinas nos compartimentos biológicos. O soro de um indivíduo imunizado, por exemplo, apresentará uma variedade de anticorpos com afinidades diferentes aos antígenos. Anticorpos do isótipo IgG refletem uma resposta imune sistêmica, sendo um indicador de exposição prévia a patógenos. A presença de anticorpos IgM, por outro lado, são indicativos de infecção recente. Junto a isso, por ser um anticorpo pentamérico, cada imunoglobulina do isótipo IgM é capaz de se ligar a até 10 sítios diferentes de um mesmo antígeno e, por consequência, produzir interações de alta avidéz, favorecendo a formação de complexos imunes e ativação

do complemento. Já em tecidos de mucosa, como no intestino ou vias aéreas, a resposta humoral é predominantemente de IgA, por ser eficientemente secretada no lúmen desses órgãos e neutralizar patógenos antes da invasão aos tecidos (ABBAS, 2019; COOPER, 1985).

3 OBJETIVOS

Desenvolver um teste para quantificação de anticorpos de mucosa específicos de diferentes isótipos contra *H. contortus*. Caracterizar a resposta imune humoral local (mucosa) e comparar com resposta sistêmica (plasma) em cordeiros de diferentes raças (Santa Inês, White Dorper e Texel) e de diferentes haplótipos da β -globina infectados com *H. contortus* por meio da quantificação de anticorpos específicos dos isótipos IgA, IgM e IgG contra o antígeno ES24, utilizando secreções nasais e orais e plasma.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar ELISA indireto para quantificação de anticorpos anti-*H. contortus* dos isótipos IgG, IgM e IgA de mucosa;
- Infectar experimentalmente cordeiros de diferentes raças (Santa Inês, Texel e White Dorper) e de diferentes haplótipos da β -globina com *H. contortus* e monitorar parâmetros clínicos e de resposta humoral durante infecção;
- Quantificar os níveis de imunoglobulinas específicas anti-*H. contortus* (IgA, IgM e IgG) em secreções nasais, orais e em plasma, utilizando ensaios de ELISA indireto;
- Comparar as respostas imunes local (nasal e oral) e sistêmica (plasmática) desenvolvidas em cordeiros de diferentes raças de ovelhas (White Dorper, Texel e Santa Inês);
- Comparar as respostas imunes local (nasal e oral) e sistêmica (plasmática) desenvolvidas em cordeiros da raça Santa Inês de diferentes haplótipos da β -globina (Hb-AA, Hb-BB e Hb-AB);
- Investigar a possível associação entre os títulos de imunoglobulinas específicas e os parâmetros clínicos da infecção, como a contagem de OPG e VG nos diferentes intervalos pós-infecção e contagem de parasitas abomasais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

Foram utilizados 23 cordeiros machos: 4 White Dorper (identificados como ODO, sendo 4 Hb-BB), 7 Texel (identificados como OTX, sendo 4 Hb-BB e 3 Hb-AB) e 12 Santa Inês (identificados como OSI, sendo 4 Hb-AA, 4 Hb-BB e 4 Hb-AB). Os cordeiros foram mantidos em pasto da fazenda experimental da Embrapa Pecuária Sudeste, área considerada endêmica para *H. contortus*, e aos 190 dias de idade alocados em estábulo com piso cimentado. Foi aplicado protocolo de tratamento anti-helmíntico com 1 vermifugação com Nivevun, e após 7 dias, foram realizadas 3 vermifugações (diárias e sequenciais) da associação de Levamisol + Albendazol (doses recomendadas pelo fabricante). Após 15 dias da última vermifugação, foi realizado desafio com 4000 L₃ de *H. contortus* (cepa Echevarria). Nos intervalos D0, D7, D14, D21 e D28 foram colhidas amostras de sangue para mensuração do VG e determinação dos haplótipos da β -globina, fezes para OPG e plasma, swab nasal e swab oral para mensuração de anticorpos anti-*H. contortus*. No intervalo D28 todos os cordeiros foram eutanasiados, e 10% do conteúdo abomasal foi colhido para contagem de parasitas totais.

Amostras de sangue, swabs nasais e orais foram colhidos semanalmente, do D0 (dia da infecção) até o D28, para a quantificação de anticorpos específicos anti-ES24 dos isótipos IgG, IgM e IgA. Cada swab foi acondicionado individualmente em 500 μ L de PBS. As amostras foram armazenadas a -20°C até a realização dos ensaios imunológicos.

Para a obtenção do plasma, utilizado nos ensaios imunológicos, foi realizada a coleta do sangue. Para isso, os cordeiros foram contidos e, utilizando agulha, adaptador e tubo tipo vacutainer contendo EDTA, foi realizada a flebotomia da veia jugular.

Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos, separando o plasma do sedimento celular. O sobrenadante foi pipetado, transferido para microtubos previamente identificados e armazenado em freezer, a -20°C, até a realização dos ensaios.

Todos os procedimentos realizados com os animais experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Embrapa Pecuária Sudeste (processo n. 02/2022), de acordo com os princípios éticos e

recomendações de bem-estar animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

4.2 Determinação dos haplótipos da β -globina

Os ensaios para determinação dos haplótipos da β -globina ovina foram realizados conforme previamente descrito (OKINO et al., 2021). Em resumo, as amostras de sangue total foram submetidas à extração de DNA total utilizando-se o kit Easy DNA (Cat. K180001, Thermofisher). A avaliação de concentração e pureza do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria em espectrofotômetro Nanodrop (Thermofisher). As amostras de DNA foram diluídas a 2,5 ng/ μ L e submetidas à qPCR multiplex com sondas de hidrólise. Esse ensaio foi realizado em todo o rebanho da fazenda experimental, a partir desses resultados foram selecionados cordeiros machos de cada raça e haplótipos da β -globina.

A genotipagem da β -globina neste estudo revelou uma baixa frequência de animais com o haplótipo Hb-AB nas raças White Dorper e Texel, além do haplótipo Hb-AA estar presente apenas em animais Santa Inês. Em decorrência do maior número amostral e da presença dos três haplótipos em Santa Inês, esta foi a raça escolhida para análise comparativa do efeito da β -globina ovina.

4.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA indireto)

4.3.1. Produção da proteína ES24 recombinante

As proteínas recombinantes foram produzidas pelo laboratório parceiro Genscript (Piscataway, NJ, USA). Em resumo, a sequência de nucleotídeos do gene codificador da proteína ES24 do *H. contortus* (número de acesso no Genbank: AY821551) (LI et al., 2007) foi clonada em vetor pET30a com marcador His para expressão em *E.coli*. Foi utilizada estirpe de *E.coli* BL21 star (DE3) para transformação com o plasmídeo recombinante, e então semeada em placa contendo LB e Kanamicina. Uma colônia foi selecionada e inoculada em meio LB contendo Kanamicina. A cultura foi incubada a 37°C a 200 rpm e então foi feita indução com IPTG. SDS-Page e Western blot foram utilizados para monitorar a expressão. Para aumento na escala de expressão, as células transformadas foram inoculadas em meio TB contendo kanamicina e incubadas a 37°C. Quando a DO600 (densidade óptica a 600 nm) alcançou 1,2, a cultura foi induzida com IPTG a 15°C durante 16 horas. As

células foram precipitadas por centrifugação. Os pellets das células foram suspendidos com tampão de lise seguido de sonicação. O sobrenadante colhido após centrifugação foi armazenado para futura purificação. A proteína alvo foi dialisada e esterilizada em filtro de 0,22 µm antes do preparo das alíquotas. A concentração proteica foi determinada pelo teste de Bradford (Thermo Fisher, Cat n. 23236) utilizando como padrão a soroalbumina bovina (BSA). A pureza da proteína e peso molecular foram determinados e confirmados por SDS-PAGE corado com Coomassie Blue e Western Blot sob condições redutoras. A integridade molecular das proteínas foi confirmada por espectrometria de massa em SHIMADZU LC-AB SCIEX Triple TOF 4600, utilizando método C4, com gradiente de 15 minutos.

A sequência de aminoácidos e avaliação da qualidade da proteína ES24 produzida encontram-se nas Figuras 1 e 2.

Figura 2 - Sequência de aminoácidos da proteína ES24 do *H. contortus*.

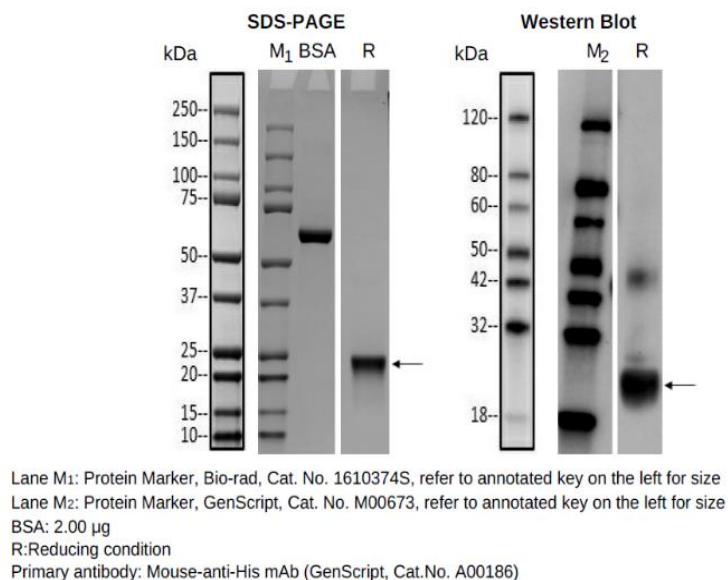
U0604798G0-1_ES24 vector: pET30a

NdeI--ATG--His tag-- ES24--Stop codon--HindIII

Protein Length=219

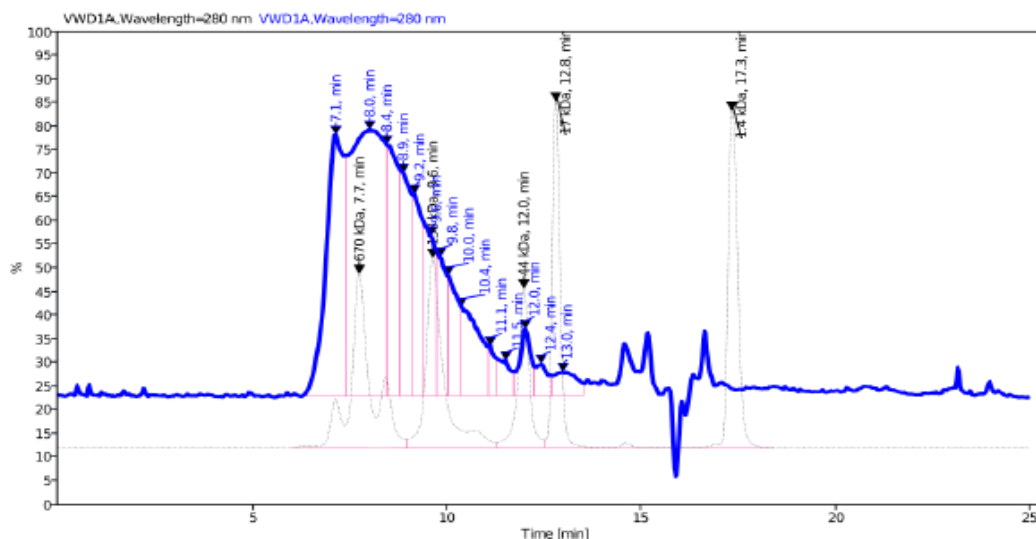
MHHHHHTLLSTSGHASMCPDTNGMSDEVRQTFVNKHNA YRTLVAKGEAKNAKEIGGYAPKAARMLKVTYDCAIEENTMNF AKKCVF
AHNSYSESNNWGQNL YMTSILNQNKTVAAAESVDLWFDELQQNGVPYDNVMTMAVFN RGVGHYTVVWQWSNKIGCAVEWCSDMTF
VACEYDSAGNYMGMP IYEVGNPCTNNE DCKCTNCVCSRDEALCIAP

Figura 3 - Fotografia de análise por SDS-Page e Western blot (acima), e de HPLC (abaixo) da proteína ES24 sintetizada.



SEC- HPLC

Sample name: U0604798G0-1_final sample
Instrument: GR20010025 Agilent 1260 **Location:** 56 **Injection volume:** 12.0
Column Name: XBridge™ Premier SEC 250A **Column No:** 199#
Mobile Phase: 0.1 mol/L Na₂SO₄ in 0.118 mol/L Phosphate Buffer (pH 6.7±0.3)



4.3.2 ELISA indireto para quantificação de anticorpos anti-*H. contortus* plasmáticos.

Os ensaios foram realizados conforme previamente descrito (LI et al., 2007, OKINO et al., 2024).

Em resumo, as placas de poliestireno de 96 poços (Cat. CLS3590-100EA,

Corning) foram inicialmente revestidas com a proteína recombinante ES24 diluída em tampão carbonato-bicarbonato (5.96 mg/mL). Para cada placa, 100 µL proteína ES24 diluída foram adicionados a cada poço, e foram incubadas por aproximadamente 18 horas em câmara úmida a 4°C.

Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de PBST (PBS pH 7,4 acrescida de 0,05% Tween 20) em lavadora automática de microplacas modelo 50TS/12 (Biotek) (todos os passos de lavagem foram realizados neste equipamento) para remoção de proteína não adsorvida. Em seguida, foi realizada uma etapa de bloqueio de interações inespecífica utilizando uma solução de PBS contendo 3% de leite em pó desnatado (LPD) Molico, no volume de 100 µL/poço. As placas foram incubadas a 37°C por 50 minutos.

Realizado o bloqueio, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBST. As amostras de plasma então adicionadas aos poços, sendo diluídas em solução de bloqueio (PBS + 3% LPD) de acordo com o isótipo de imunoglobulina a ser quantificado. Para as amostras de plasma: para IgA, a diluição foi de 1:10, enquanto para IgG e IgM, a diluição foi de 1:100. Os controles positivos e negativos foram adicionados a cada placa. Todas as amostras e controles foram processados em duplicatas. As placas foram incubadas a 37°C por 40 minutos.

Após a incubação das amostras, as placas foram lavadas seis vezes com PBST. Os anticorpos conjugados com enzima peroxidase foram preparados nas seguintes diluições: 1:400 para IgA (Cat. AHP949P, Biorad), 1:800 para IgM (Cat. AHP950P, Biorad), e 1:2000 para IgG (Cat. 5184-2504, Biorad), sendo volume de 50 µL do anticorpo conjugado diluído adicionado a cada poço. As placas foram incubadas a 37°C por mais 40 minutos.

Finalizada a incubação com os conjugados, as placas foram novamente lavadas seis vezes com PBST. A reação enzimática, para leitura final, foi desenvolvida com a adição de 100 µL de substrato cromógeno OPD (dicloridrato de o-fenilenodiamina) SigmaFAST (Cat. P9187, Sigma-Aldrich) a cada poço, e as placas foram incubadas a 25°C por 15 minutos no escuro. A reação enzimática foi bloqueada com a adição de 50 µL de HCl 1M por poço. Finalmente, a leitura das placas foi realizada a 490 nm em um leitora de ELISA modelo 800 TSI (Biotek).

Os resultados de densidade óptica (DO) foram exportados, e avaliados em arquivos formato csv. Para corrigir variações inter-ensaios e garantir padronização da medição, os valores médios de DO das amostras foram corrigidos pelos respectivos

controles positivos e negativos, em valores de amostra/positivo (A/P), com o seguinte cálculo:

Equação 1 - Cálculo do valor de A/P das amostras de ELISA

$$A/P = \frac{DO \text{ amostra} - DO \text{ cn}}{DO \text{ cp} - DO \text{ cn}}$$

Sendo *cn* o controle negativo e *cp* o controle positivo. O desvio padrão entre as duplicatas foi considerado adequado quando abaixo de 0,05.

A quantificação de cada isótipo foi realizada em placas separadas para as amostras.

4.3.3 ELISA indireto para quantificação de anticorpos anti-*H. contortus* de mucosa.

Para mensuração de anticorpos específicos anti-*H. contortus* de mucosa foram avaliadas amostras de swabs nasal e oral. O protocolo utilizado foi similar ao descrito anteriormente para amostras de plasma, exceto pelo processamento e diluição das amostras. Cada amostra contendo o swab foi submetida à agitação em vórtex seguida de centrifugação.

A determinação da diluição ideal das amostras de swabs foi realizada após testagem de diferentes diluições das amostras (1:2, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50 e 1:100), para quantificação de IgG e IgM a diluição ótima foi obtida na proporção de 1:2 em solução de bloqueio, enquanto para IgA foi obtida a proporção de 1:10.

4.4 Avaliação fenotípica

Foram realizados exames parasitológicos para determinar a carga parasitária, incluindo a determinação de ovos por grama de fezes (OPG) nos diferentes intervalos amostrados, o volume globular (VG) e contagem de parasitas abomasais.

4.4.1 Determinação de ovos por grama de fezes

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos cordeiros semanalmente, do D0 ao D28. As amostras foram processadas utilizando o método de flutuação simples modificada, previamente descrito (UENO & GONÇALVES, 1998). Assim sendo, 2 g de fezes foram homogeneizados com bastão em 28 mL de

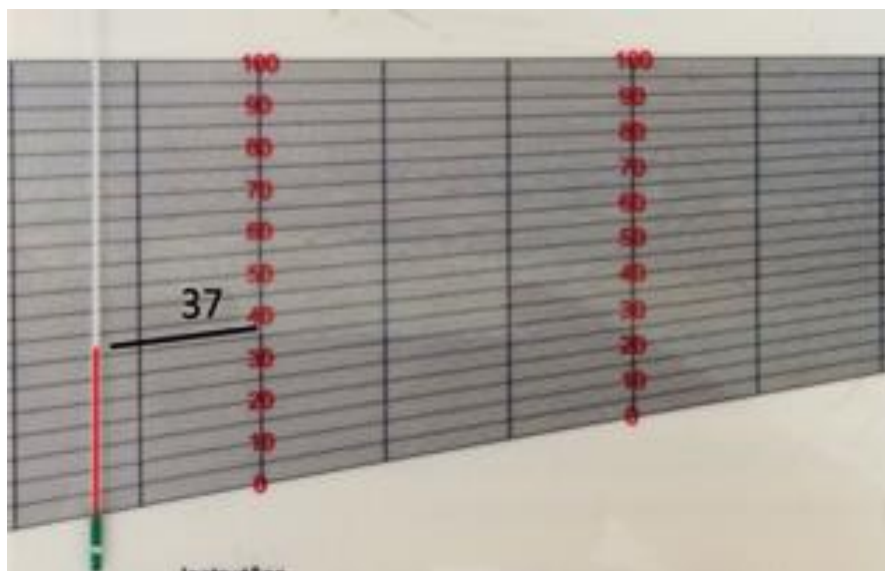
solução saturada de NaCl ($d = 1,2$) em recipiente de vidro. Gotas do material foram adicionadas à câmara McMaster para leitura e contagem dos ovos sob microscopia óptica utilizando lentes objetivas de 10x. O resultado, expresso em OPG, apresentou fator de correção 50x.

4.4.2 Determinação do volume globular

A análise do VG foi realizada seguindo o protocolo utilizado pelo Laboratório de Parasitologia Veterinária da EMBRAPA.

Em cada amostra de sangue foi emergido um tubo capilar para micro hematócrito, sendo preenchido com mais de $\frac{3}{4}$ de sangue. Cada capilar foi vedado com massa moldável, limpo externamente com algodão hidrofílico e submetido a centrifugação de 10800 rpm por 6 minutos, em centrífuga Hettich® EBA 21. A leitura de cada capilar foi realizada com o auxílio de régua leitora de micro hematócrito, ajustando a altura do menisco do plasma até que este atingisse a parte superior do leitor e o menisco dos eritrócitos estivesse alinhado na parte inferior, como demonstrado na Figura 4. O resultado foi dado em porcentagem.

Figura 4 - Capilar para micro hematócrito posicionado em régua de leitura.



Fonte: Protocolo EMBRAPA

4.4.3 Contagem de parasitas abomasais

Aproximadamente 10% do conteúdo abomasal e mucosa foram submetidos à contagem e classificação de parasitas (BURDEN et al., 2024). Os parasitas foram classificados morfologicamente e quantificados em: larva L4 inicial, fêmea L4, macho

L4, macho L5, fêmea L5, macho adulto e fêmea adulta (UENO & GONÇALVES, 1998). A leitura foi feita com auxílio de estereomicroscópio e, quando necessário, visualização em microscópio óptico com objetiva de até 40x.

4.5 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram analisadas utilizando a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey para identificar diferenças entre os grupos. Para as variáveis que não seguiram a distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, e, quando significativo ($p < 0,05$), as comparações pareadas foram realizadas por meio do teste de Wilcoxon, com ajuste de p-valor pelo método de Benjamini-Hochberg.

Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software RStudio versão 2024.12.0.

5 RESULTADOS

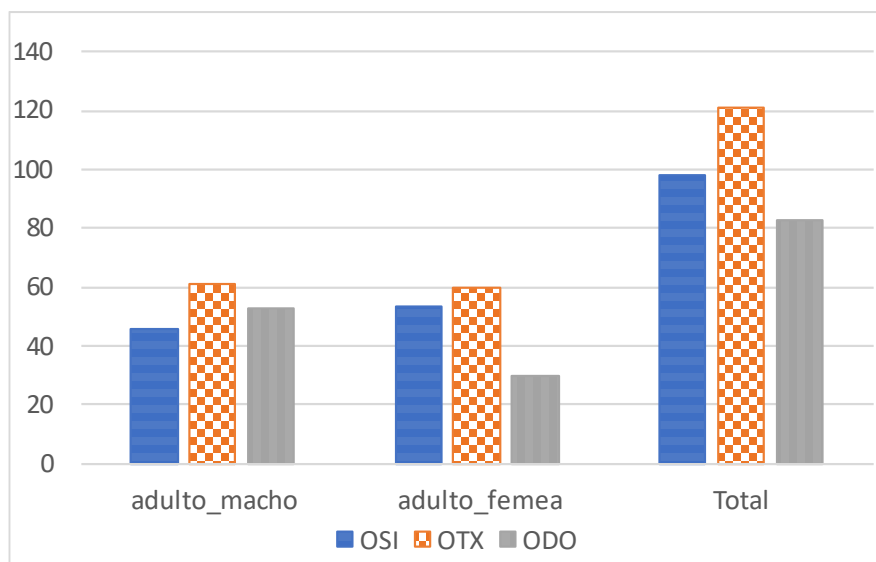
5.1 Comparação de resposta humoral em diferentes raças de ovinos

5.1.1. Contagem de parasitas abomasais

Conforme esperado, devido ao período pré-patente do *H. contortus* (21 dias), devido ao caráter de infecção única, não foram observados parasitas imaturos. Somente parasitas adultos foram encontrados no conteúdo abomasal.

Não houve diferença significativa no número de parasitas entre os grupos (Figura 5).

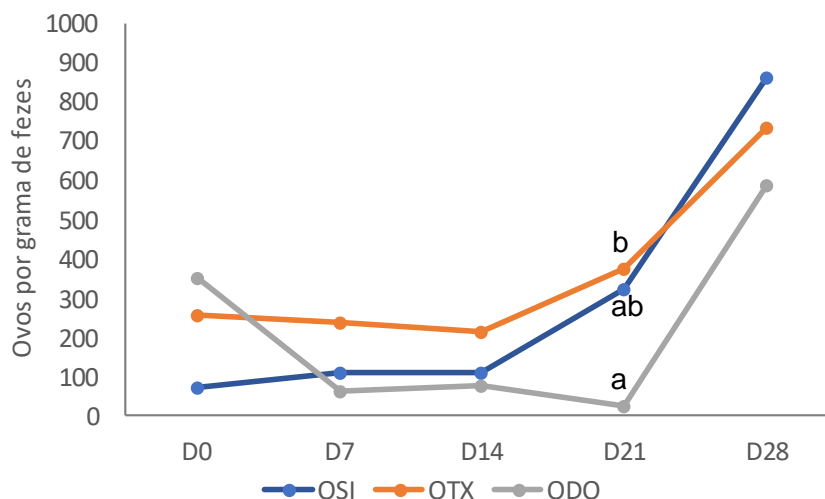
Figura 5 – Contagem de *Haemonchus contortus* (machos adultos, fêmeas adultas e total), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).



5.1.2. Determinação de volume globular e OPG

Em D21, White Dorper apresentou valores médios de OPG inferiores quando comparado com Santa Inês ($p = 0,021$) (Figura 6).

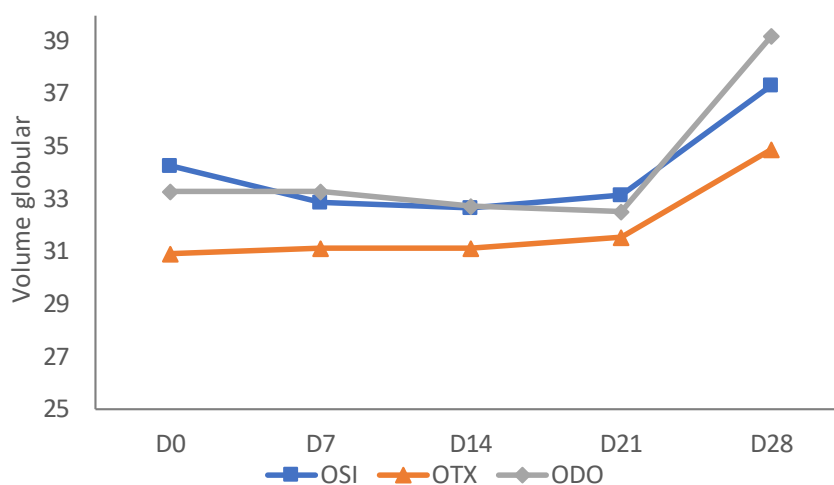
Figura 6 - Média de OPG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).



*Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os níveis médios de VG foram semelhantes entre os animais, não apresentando diferença significativa entre as raças (Figura 7).

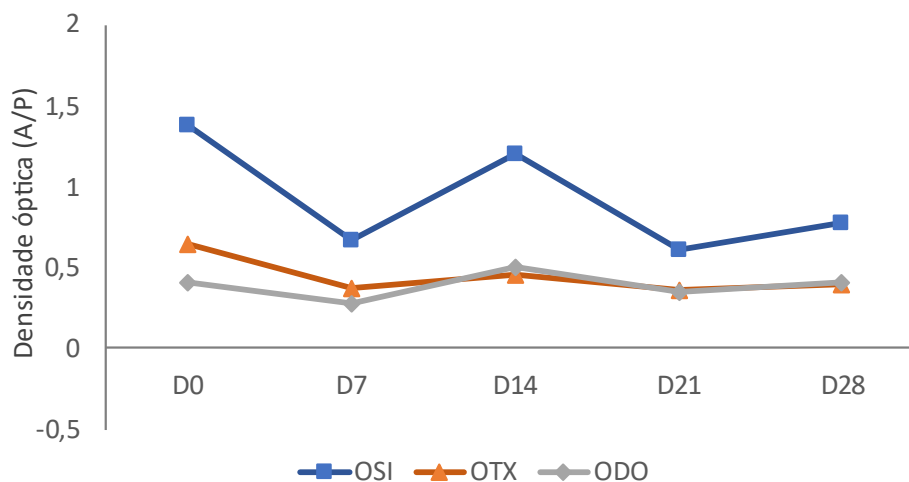
Figura 7 - Média de VG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).



5.1.3 Níveis de imunoglobulinas em plasma e mucosa

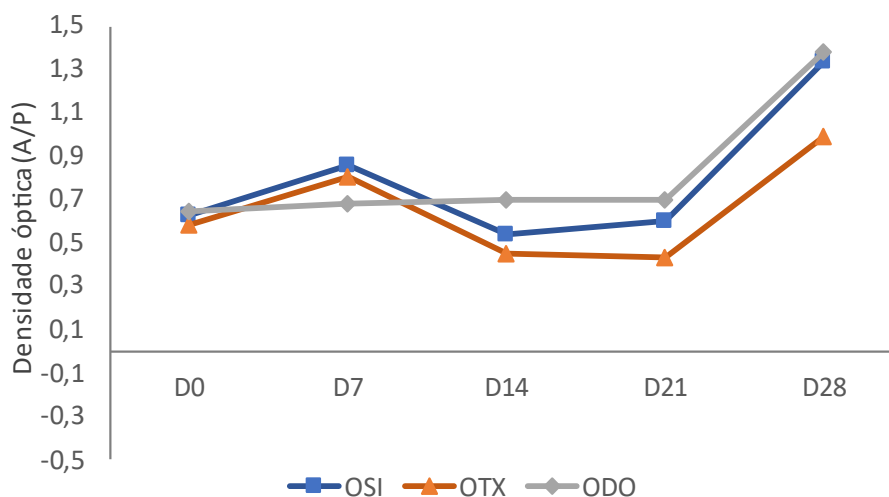
Comparando os níveis médios de anti-ES24 do isótipo IgG plasmáticos (Figura 8), Santa Inês permaneceu com a maiores médias durante toda a infecção, porém não houve diferença significativa.

Figura 8 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).



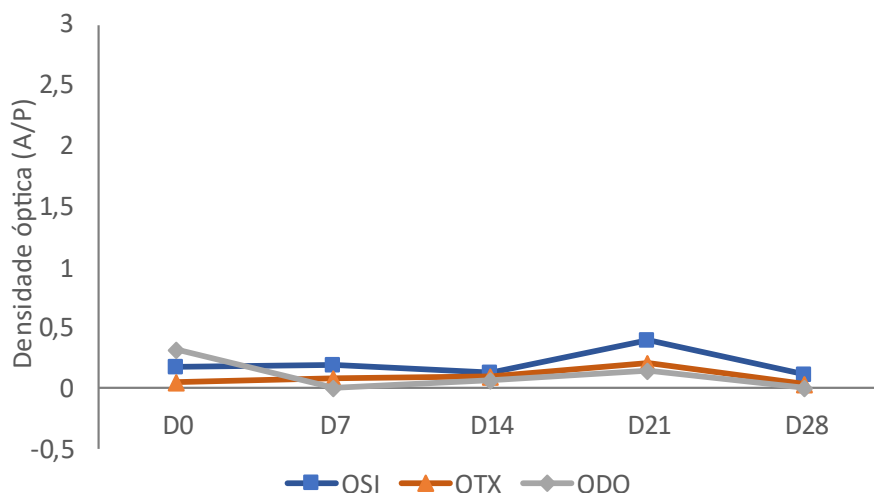
A quantificação de IgM plasmático foi similar e sem diferença significativa entre as três raças (Figura 9).

Figura 9 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).



Níveis do anticorpo IgA foram encontrados em baixa quantidade sistemicamente, sendo semelhante e sem diferença significativa entre as três raças (Figura 10).

Figura 10 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).



Na mucosa oral, os três isótipos de anticorpos anti-ES24 estavam presentes em baixas concentrações. As Figuras 11 e 12 representam, respectivamente, a quantificação média dos isótipos IgG, IgM dos cordeiros nos diferentes intervalos pós-infecção. Não houve diferença significativa dos títulos de IgG e IgM entre as raças.

Figura 11 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).

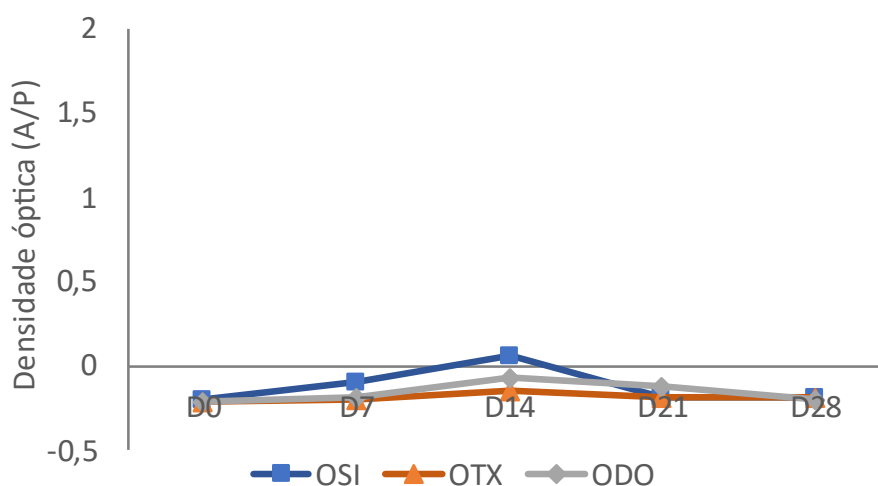
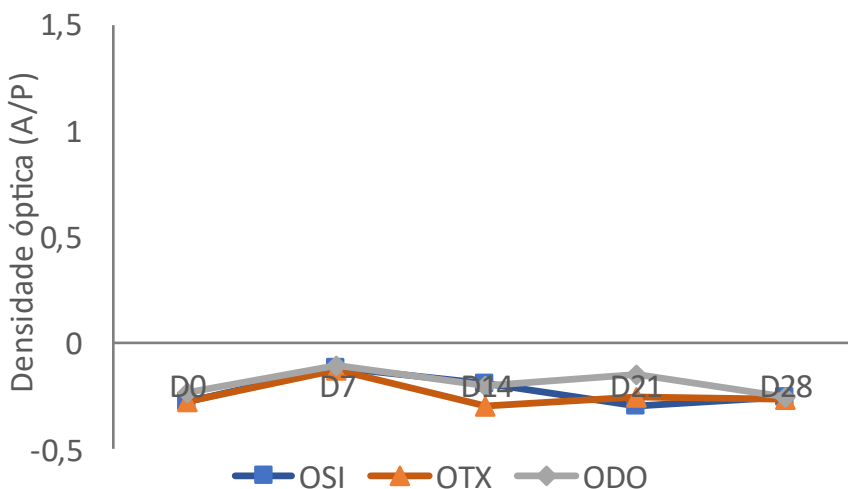
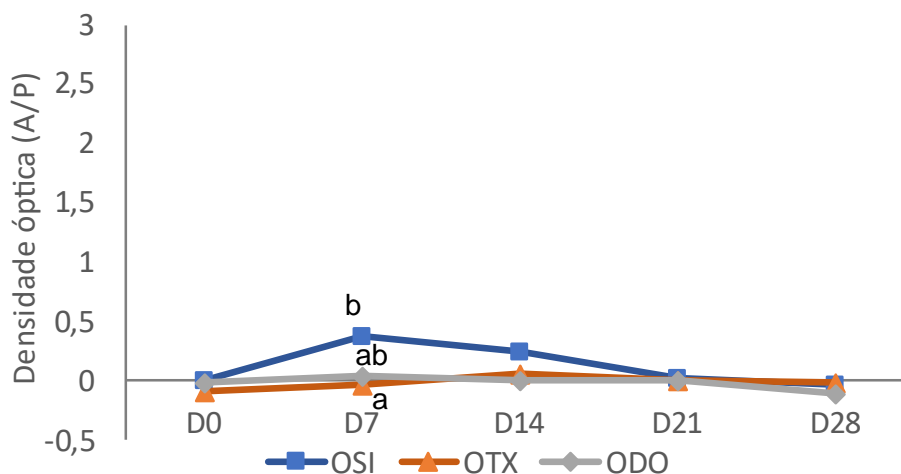


Figura 12 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).



Para as três raças, os níveis de anti-ES24 do isótipo IgA específicos em mucosa oral (Figura 13) foram semelhantes durante os intervalos do experimento, exceto no intervalo D7, no qual títulos superiores foram observados em cordeiros Santa Inês comparados a Texel ($p = 0,022$).

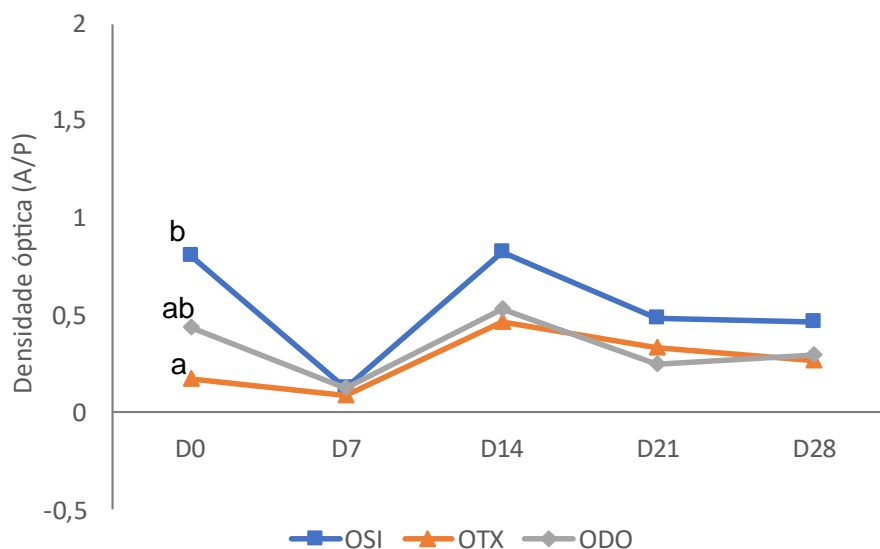
Figura 13 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).



*Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Na mucosa nasal, animais Santa Inês apresentaram maiores valores médios para anticorpos anti-ES24 do isótipo IgG apresentando diferença ($p = 0,032$) quando comparado à Texel em D0 (Figura 14).

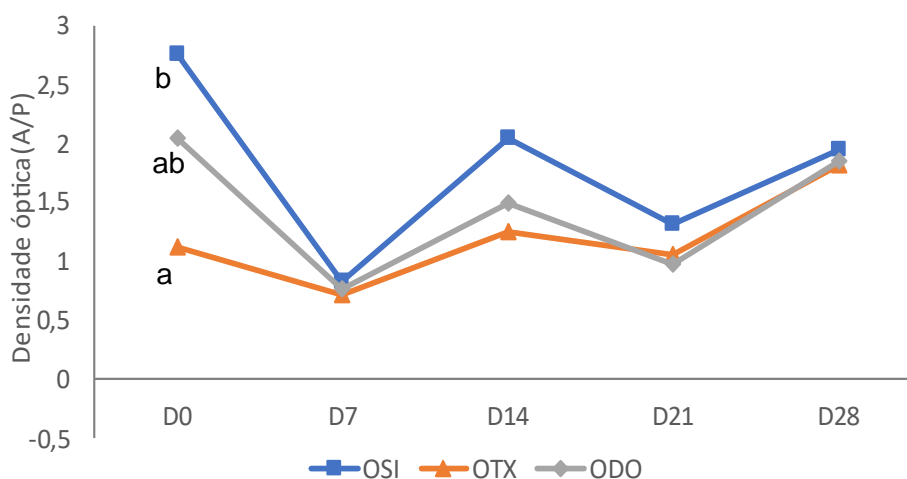
Figura 14 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).



*Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os perfis cinéticos de níveis de anticorpos anti-ES24 do isótipo IgA em mucosa nasal foi semelhante ao observado para IgG (Figura 15). Em D0 foi observado nível superior em Santa Inês ($p = 0,0065$) comparado com Texel.

Figura 15 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).

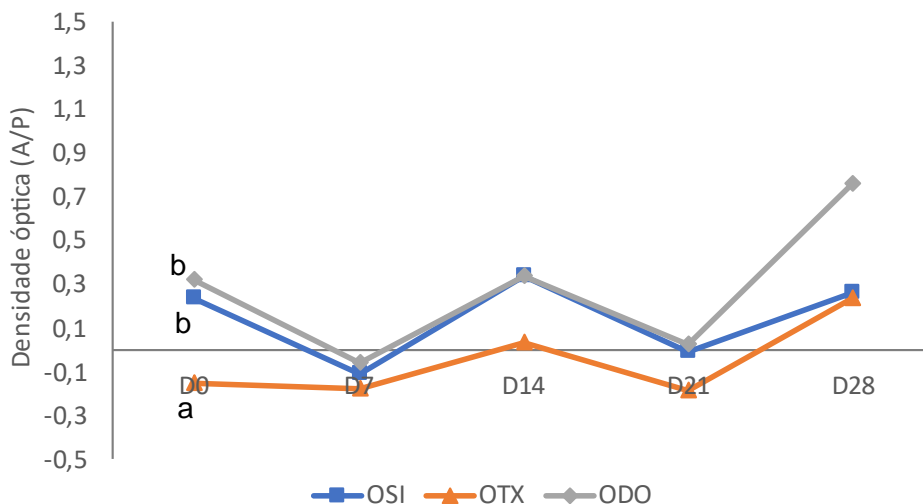


*Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Quanto aos níveis de anticorpos anti-ES24 do isótipo IgM na mucosa nasal, Texel apresentou valores significativamente inferiores comparados a Santa Inês e White Dorper no intervalo D0 ($p = 0,009$). Nos demais intervalos não houve diferença

significativa entre os grupos (Figura 16).

Figura 16 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).



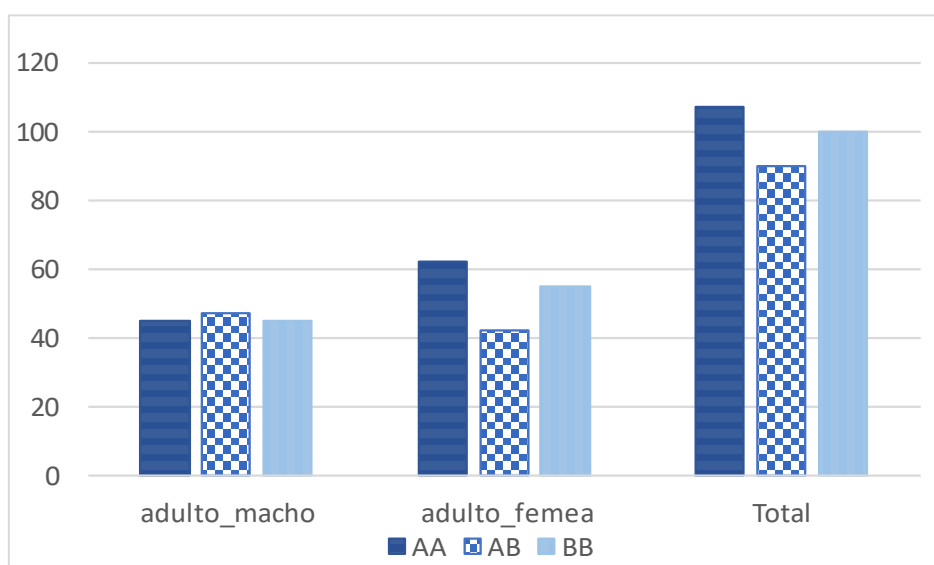
*Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.2 Comparação de resposta humoral em cordeiros Santa Inês de diferentes haplótipos da β -globina.

5.2.1 Contagem de parasitas abomasais

A quantidade de parasitas abomasais (Figura 17) não apresentou diferença significativa entre os grupos.

Figura 17 - Contagem de *Haemonchus contortus* (machos adultos, fêmeas adultas e total), de acordo os haplótipos da β -globina em Santa Inês (AA, AB e BB).

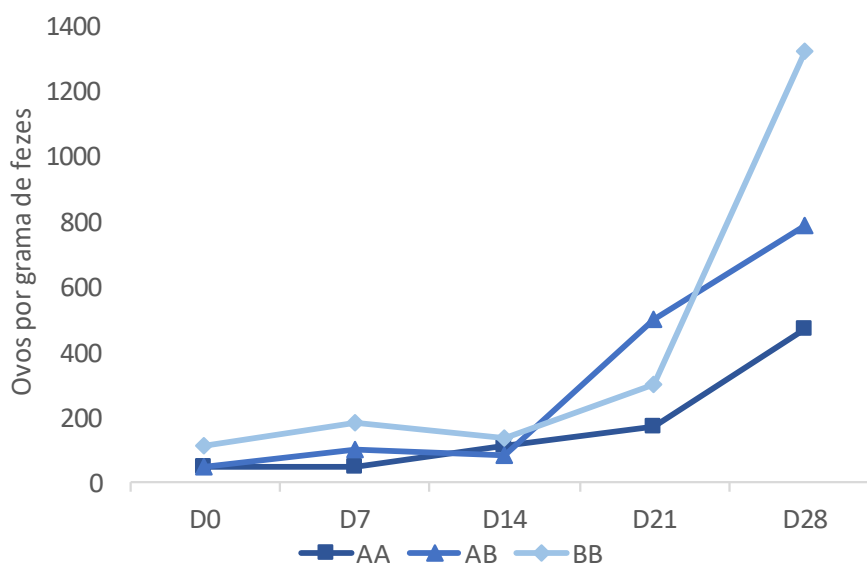


5.2.2. Determinação de volume globular e OPG

As Figuras 18 e 19 representam, respectivamente, os valores médios de OPG e VG dos cordeiros, agrupados em seus genótipos.

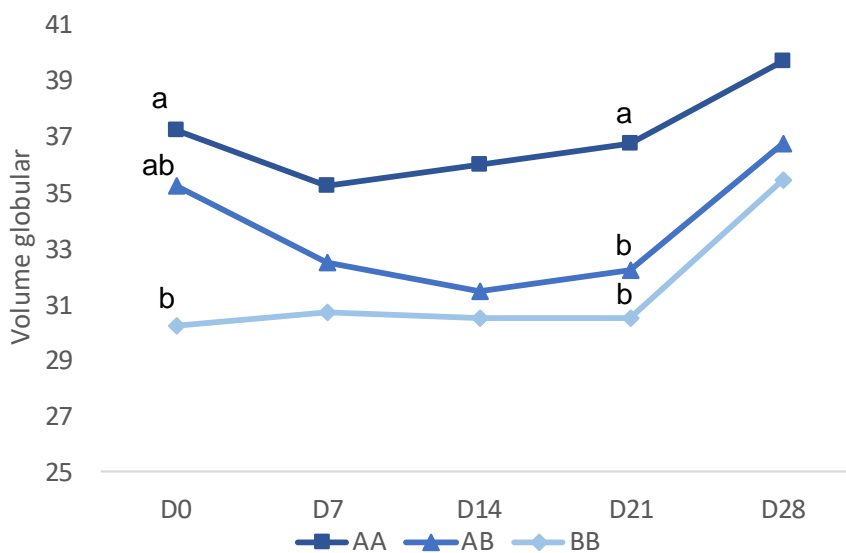
Os dados de OPG não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Figura 18 - Média de OPG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (AA, AB e BB).



Os níveis médios de VG para o grupo Hb-AA, foram superiores, apresentando diferença em D0, quando comparado com Hb-BB ($p = 0,0329$); em D21, houve diferença entre Hb-AA e Hb-BB ($p = 0,00446$) e Hb-AB ($p = 0,02817$); em D28, Hb-AA apresentou tendência a diferir de Hb-BB, com valor próximo à significância ($p = 0,052$).

Figura 19 - Média de VG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (AA, AB e BB).

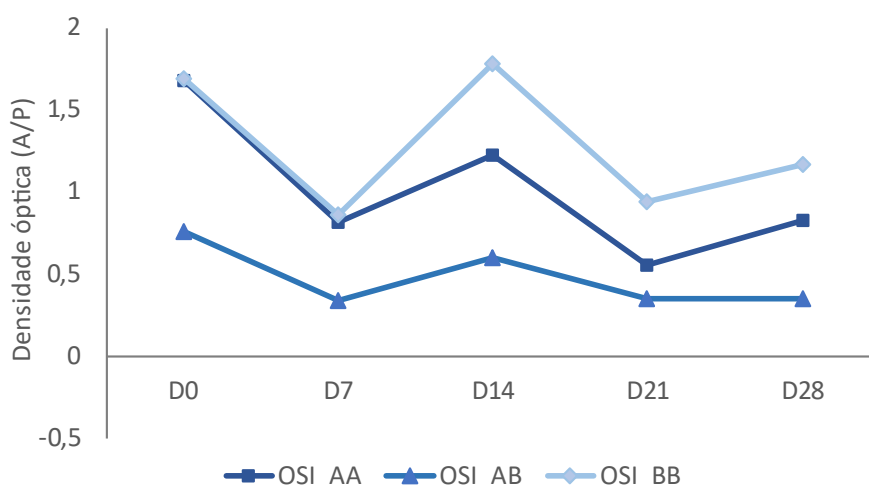


*Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.2.3. Níveis de imunoglobulinas em plasma e mucosa

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para anticorpos plasmáticos anti-ES24 dos isótipos IgG e IgA (Figura 20 e 22).

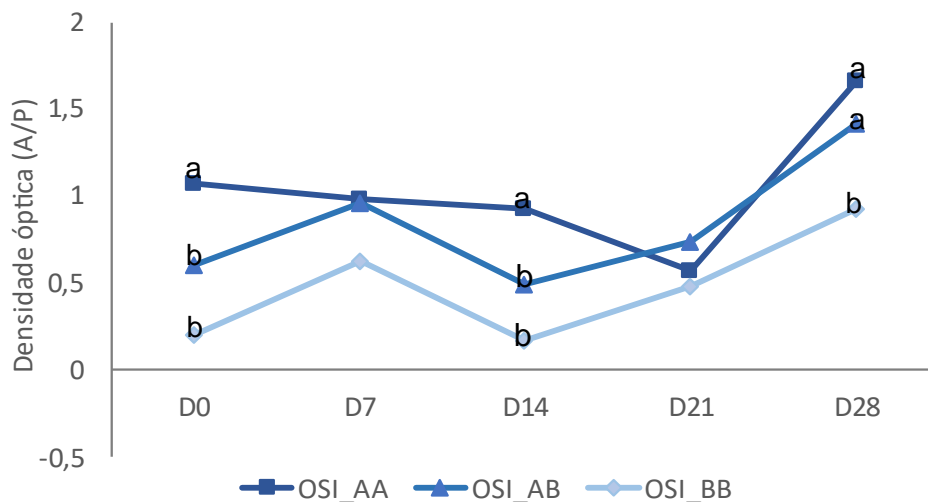
Figura 20 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).



O haplótipo Hb-AA apresentou níveis de IgM plasmáticos superiores aos de Hb-BB nos intervalos D0 ($p = 0,00089$), D14 ($p = 0,00077$) e D28 ($p = 0,0043$). Hb-AA também exibiu títulos mais elevados em relação ao Hb-AB no D0 ($p = 0,0377$) e no

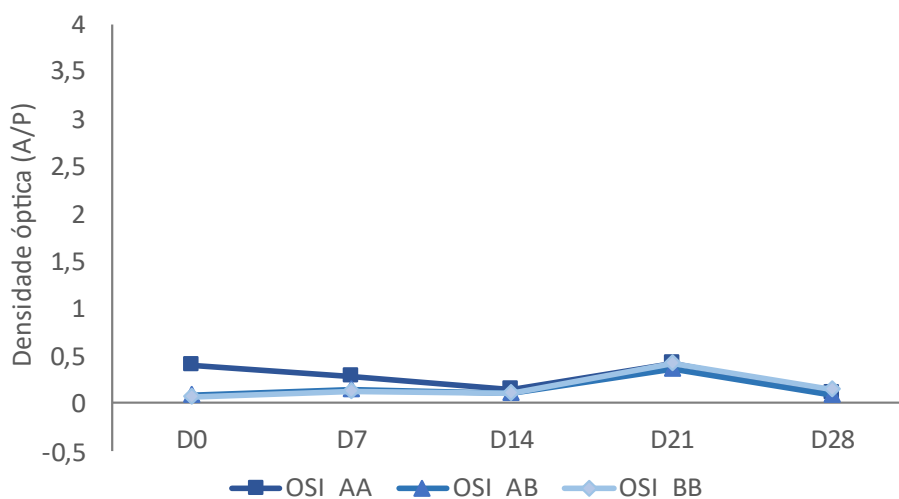
D14 ($p = 0,0244$). No D28, observou-se uma diferença significativa entre Hb-AB e Hb-BB ($p = 0,0366$).

Figura 21 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).



*Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Figura 22 - Média dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).



Na mucosa oral, a quantificação de anticorpos anti-ES24 de todos os isótipos foi baixa. Não houve diferença significativa para anticorpos dos isótipos IgG, IgM e IgA entre os grupos (Figura 23, 24 e 25).

Figura 23 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).

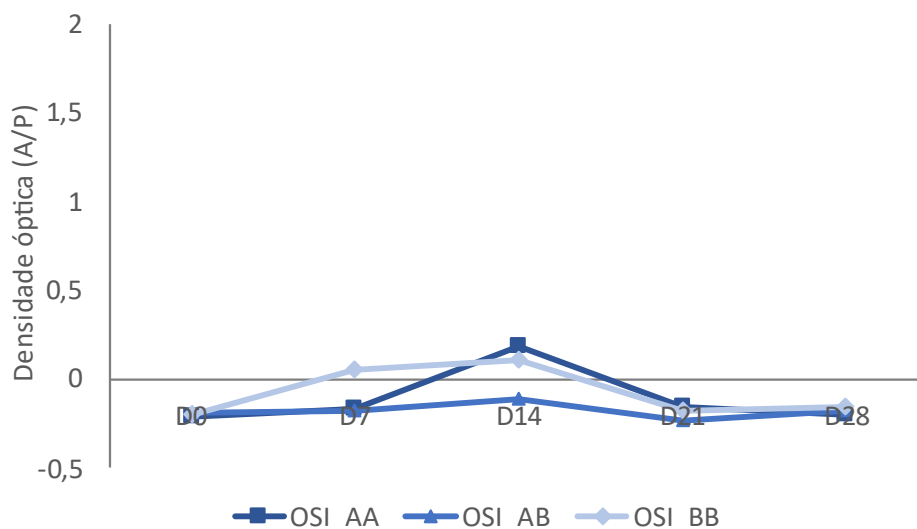


Figura 24 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).

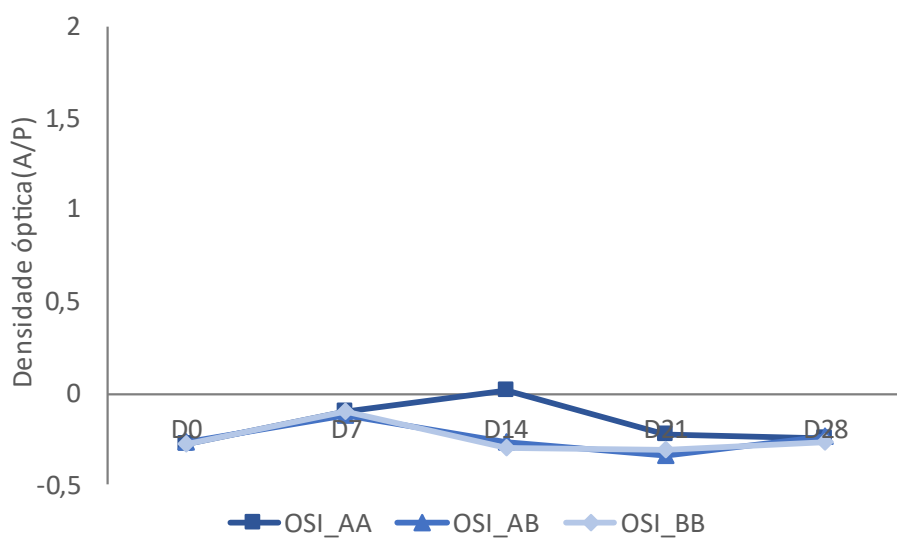
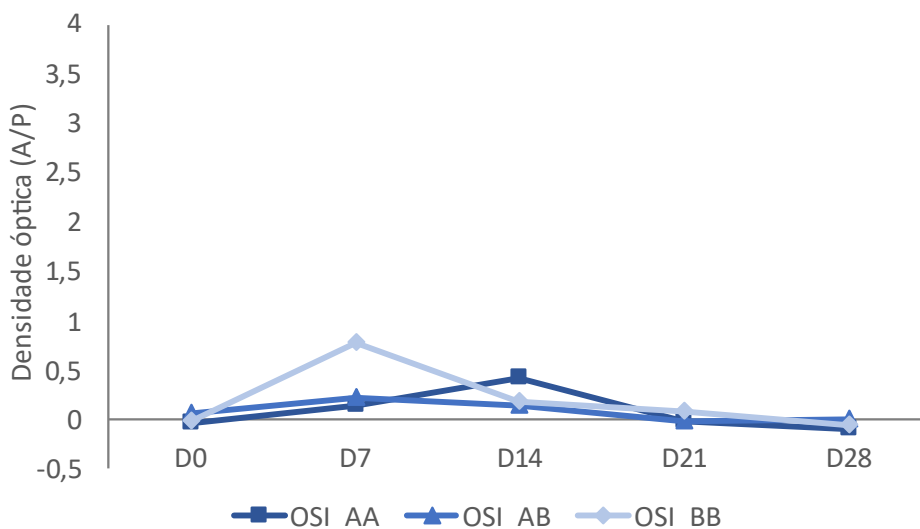


Figura 25 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).



Não foram observadas diferenças significativas quanto à mensuração de anticorpos anti-ES24 dos isótipos IgG e IgM em mucosa nasal (Figuras 26 e 27).

Figura 26 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgG nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).

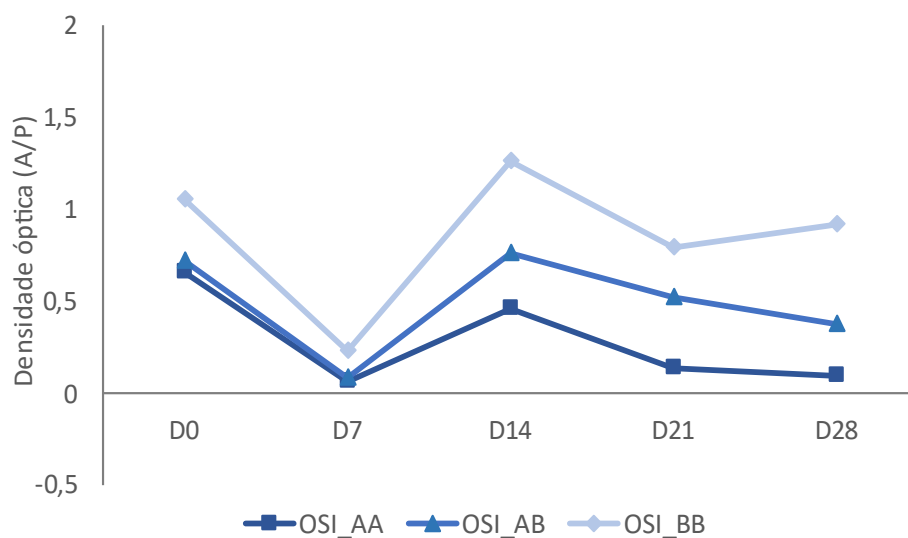
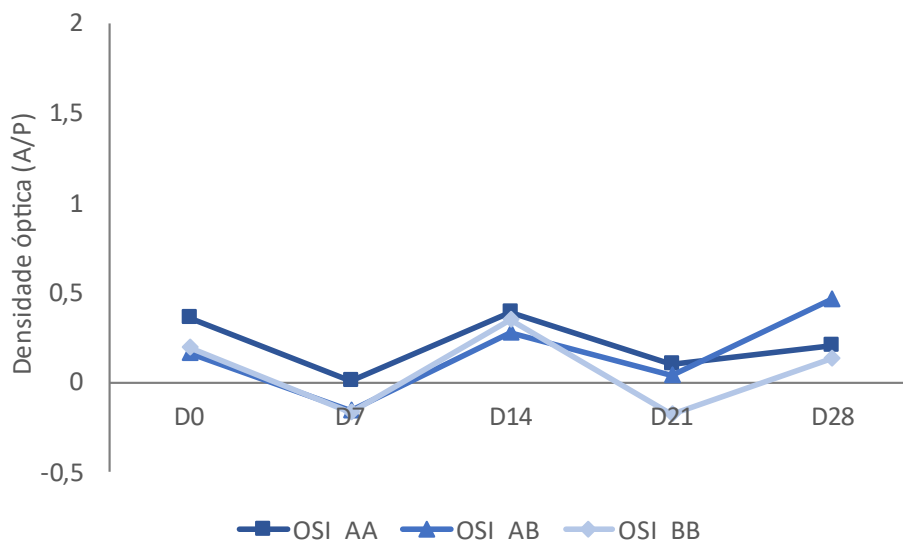
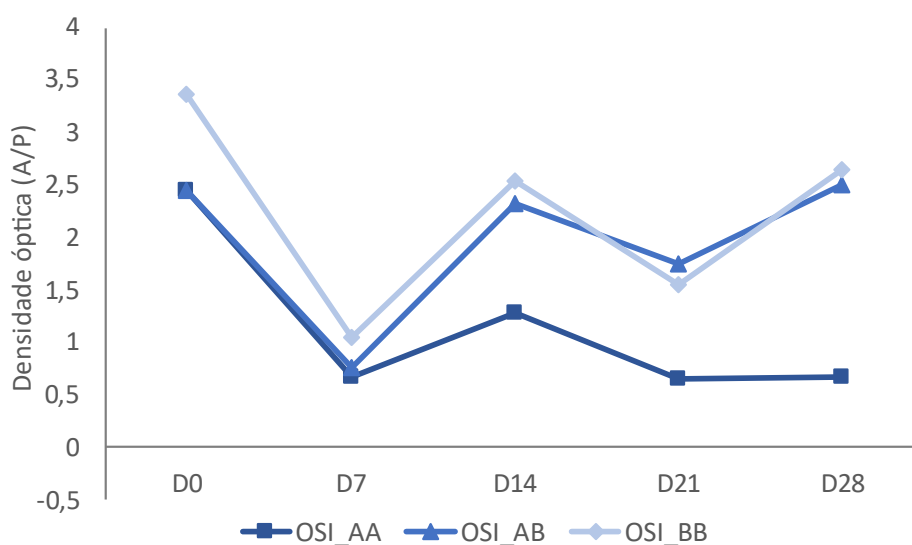


Figura 27 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgM nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).



A quantificação de anticorpos anti-ES24 do isótipo IgA em mucosa nasal foi reduzida em animais Hb-AA (Figura 28), apresentando tendência à diferença entre os grupos ($p = 0,0509$) em D21, sendo que Hb-AA e Hb-AB, nesse dia, apresentaram diferença próxima à significância, com $p = 0,0544$. Em D28, a primeira análise estatística identificou diferença entre os grupos ($p = 0,0425$), sendo próxima a significância entre Hb-AA e Hb-BB ($p = 0,0568$).

Figura 28 - Média dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 do isótipo IgA nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).



6 DISCUSSÃO

Ensaio para mensuração de anticorpos de mucosa específicos de diferentes isótipos para proteína ES24 do *H. contortus* foram desenvolvidos com sucesso durante esse estudo.

Os resultados obtidos indicaram maior sensibilidade de detecção de anticorpos na mucosa nasal comparado à mucosa oral, possivelmente devido ao maior recrutamento da resposta imune local (Shaw et al., 2012). No estudo de Shaw et al. (2012), a IgA salivar foi associada à resistência a nematódeos gastrointestinais, apresentando correlação negativa com OPG, sugerindo que altos níveis de IgA podem estar correlacionados com uma maior resposta imune à infecção. No entanto, sua quantificação pode ser dificultada pela diluição na saliva e deglutição dos animais. Assim, a menor quantidade de IgA na mucosa oral observada no presente estudo pode refletir tanto fatores fisiológicos quanto limitações metodológicas.

Ao comparar cordeiros Santa Inês de diferentes haplótipos da β -globina, observou-se uma tendência a maiores níveis de anticorpos anti-ES24 de isótipo IgA na mucosa nasal em animais Hb-AB e Hb-BB comparados a animais Hb-AA nos intervalos D21 e D28. Esses achados sugerem que os menores níveis de IgA nasal em Hb-AA pode estar associada à menor carga parasitária fecal observada nesse grupo, evidenciada pela menor contagem de OPG em D28 para Hb-AA e maior em Hb-BB. Adicionalmente, identificou-se uma tendência à diferença entre os haplótipos Hb-AA e Hb-BB para os valores VG em D28, com menor mensuração em Hb-BB. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nos dados fenotípicos entre as raças analisadas, os níveis de IgA de mucosa demonstraram diferenças significativas entre Santa Inês e Texel, na mucosa oral no D7 e na mucosa nasal no D0.

Esses resultados, mesmo sendo provenientes de compartimentos biológicos distintos, reforçam a hipótese levantada por Shawn et al. (2012) de que a IgA anti-ES24 pode atuar como um biomarcador imunológico da infecção parasitária causada por *H. contortus*.

Além disso, ao comparar as raças do estudo, outras imunoglobulinas também demonstraram diferenças significativas na mucosa nasal, o que reforça seu papel como um compartimento imunológico relevante. A IgG nasal foi maior em Santa Inês em D0, quando comparada à Texel, enquanto a IgM nasal foi menor em Texel em D0,

comparada a Santa Inês e White Dorper. Já na mucosa oral, apenas a anticorpos específicos do isótipo IgA apresentaram diferenças entre Santa Inês e Texel. Esses resultados sugerem que a mucosa nasal apresenta maior abundância de anticorpos específicos anti-ES24, e conseqüentemente maior sensibilidade de detecção quando comparada à mensuração em mucosa oral, dada a metodologia aplicada neste trabalho.

Dado o número relativamente reduzido de estudos que avaliam comparativamente a resposta imunológica nas mucosas nasal e oral em ovinos, pesquisas adicionais são necessárias para validar a aplicabilidade da IgA nasal como biomarcador da infecção e sua potencial utilidade em estratégias de seleção genética para resistência a nematódeos gastrointestinais.

Os resultados também indicaram que a IgM sistêmica variou significativamente entre os haplótipos da β -globina, além do VG apresentar diferenças significativas, sugerindo uma relação entre a resposta humoral e a manutenção da homeostase eritrocitária durante a infecção por *H. contortus*. A IgM sérica foi maior em Hb-AA quando comparado com Hb-BB em D0 e D14, sendo consistentemente menor em Hb-BB ao longo do experimento. Esse padrão foi acompanhado por maiores valores de VG em Hb-AA, quando comparados a Hb-BB em D0, D21 e D28, sendo que em D21, Hb-AA também apresentou valores superiores a Hb-AB. Paralelamente, Hb-BB apresentou menor titulação de IgM e menor VG, sugerindo um menor controle da infecção e maior impacto hematológico nesse grupo.

Esses achados corroboram os resultados de Okino et al. (2024), que relataram uma forte correlação negativa entre títulos de anticorpos anti-ES24 do isótipo IgM e valores de OPG e uma correlação positiva entre IgM e VG em cordeiros da raça Morada Nova infectados com *H. contortus*, indicando que animais com maior produção de IgM apresentam menor carga parasitária e preservação das condições hematológicas. Ainda nesse estudo (Okino et al., 2024), cordeiros Hb-AA demonstraram maior resistência à infecção, com menor OPG e maior VG, enquanto Hb-BB foi o haplótipo mais susceptível. O presente estudo reforça essa tendência ao demonstrar um padrão semelhante ao observado previamente, onde cordeiros de haplótipo Hb-AA apresentaram maiores títulos de anticorpos anti-ES24 do isótipo IgM e melhor condição hematológica.

Imunoglobulinas do isótipo IgM constituem componentes-chave da resposta imune humoral primária, sendo altamente eficiente na neutralização e aglutinação de

patógenos, além de ativar a via clássica do complemento (Abbas, 2019; Cooper, 1985). Estudos anteriores também destacaram seu papel na contenção de infecções parasitárias, como em *Strongyloides stercoralis* e *Plasmodium chabaudi* (Brigandi et al., 1996; Couper et al., 2005), nos quais a presença de IgM específica esteve diretamente associada à redução da carga parasitária.

Dessa forma, os resultados sugerem que a IgM sistêmica pode atuar como um biomarcador imunológico da resistência a *H. contortus*, cujos níveis foram mais abundantes em animais do haplótipo Hb-AA, considerados mais resistentes à hemoncose. Sua maior produção pode contribuir para um melhor controle da carga parasitária e menor impacto na condição hematológica, tornando-a um possível alvo para seleção genética de ovinos mais resistentes à infecção.

A falta de diferenças estatisticamente significativas em VG e OPG entre as raças, contrasta com os achados de Kapritchkoff et al. (2024), que relataram um VG significativamente maior em animais Hb-AA nas mesmas raças em estudo (Santa Inês, Texel e White Dorper). No entanto, uma diferença metodológica importante deve ser destacada: enquanto no estudo de Kapritchkoff et al. (2024) a comparação entre os haplótipos foi realizada considerando todas as raças do experimento, sujeitas à infecção natural, no presente estudo, essa análise foi restrita à raça Santa Inês, submetidas à infecção artificial única.

Ainda assim, não foi encontrada diferença significativa entre os haplótipos dentro dessa raça. Essa discordância pode estar relacionada a diferenças no tamanho amostral, que podem ter reduzido o poder estatístico para detectar efeitos da β -globina na resposta hematológica, além das diferenças fenotípicas entre as raças.

Outro ponto a ser considerado é que, no estudo de Kapritchkoff et al. (2024), o haplótipo Hb-AA não esteve associado à redução da carga parasitária (OPG), mas sim à mitigação dos efeitos clínicos da infecção (maior VG), reforçando sua associação com tolerância, e não resistência, à hemoncose. No presente estudo, a ausência de diferença significativa entre os haplótipos pode indicar que, sob as condições experimentais adotadas, esse efeito não foi suficientemente expressivo para ser detectado estatisticamente em Santa Inês isoladamente.

Portanto, apesar de serem identificadas diferentes estatísticas relevantes, principalmente entre os títulos de IgM plasmático entre os haplótipos, a principal limitação desse trabalho foi o tamanho populacional amostrado. Tendo uma baixa

quantidade de indivíduos, muitos resultados esperados não foram observáveis, como, por exemplo, o fator raça não ter sido determinante para as diferenças fenotípicas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do desenvolvimento da metodologia, foi possível otimizar o ELISA indireto para a quantificação de anticorpos anti-ES24 de mucosa em ovinos. Os ensaios apresentaram baixa sensibilidade para amostras de swab oral em comparação com swab nasal, sendo que os dados estatisticamente mais relevantes foram observados na mucosa nasal. Destaca-se, ainda, a possível relação entre os valores de IgA e o volume globular ao se compararem os diferentes haplótipos da β -globina na raça Santa Inês.

A presença de valores com tendência à significância estatística, aliada à escassez de estudos sobre a quantificação de imunoglobulinas em amostras de mucosa, reforça a necessidade de pesquisas adicionais com um maior número amostral. Esses estudos são essenciais para validar a aplicabilidade da IgA de mucosa como possível biomarcador da infecção por *H. contortus* e para confirmar os possíveis efeitos da expressão dessa imunoglobulina nos fenótipos de resistência e susceptibilidade.

A comparação entre as raças Santa Inês, White Dorper e Texel revelou poucos dados com relevância estatística, sendo que as diferenças significativas foram observadas principalmente nas amostras de mucosa. O baixo número amostral de Texel e White Dorper pode ter contribuído para a ausência de diferenças fenotípicas significativas, uma vez que a maior resistência da raça Santa Inês já é amplamente reconhecida em comparação às demais.

Por outro lado, a resposta imune sistêmica revelou dados de relevância significativa para IgM na comparação entre diferentes haplótipos. As diferenças estatisticamente significativas dessa imunoglobulina entre Hb-AA e Hb-BB acompanham os maiores valores de VG observados em Hb-AA durante os intervalos analisados. A tendência à significância nesses dados reforça, mais uma vez, a necessidade de estudos com um número amostral ampliado, a fim de investigar a possível correlação entre a maior produção de IgM e melhores condições hematológicas.

Ademais a coleta de amostras de mucosa por swab se destaca como uma alternativa menos invasiva e menos estressante para os animais em comparação a métodos mais invasivos, o que reforça sua viabilidade em estudos futuros. Fatores ambientais durante a coleta podem impactar diretamente o bem-estar animal, e a

menor necessidade de contenção física reduz o risco de complicações, como hematomas ou infecções decorrentes de falhas na punção venosa.

Considerando a escassez de estudos sobre a quantificação de imunoglobulinas em amostras de mucosa em ovinos, a adoção de metodologias menos invasivas pode contribuir para ampliar investigações nesse campo, favorecendo a obtenção de amostras em diferentes contextos experimentais.

Por fim, os estudos de avaliação de respostas humorais são essenciais para a identificação de possíveis biomarcadores imunológicos, sendo potencialmente ferramentas em imunoterapias. Dessa forma contribuindo para o manejo imunoprolático dos rebanhos afetados por *Haemonchus contortus* e o avanço da ovinocultura.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Tradução Anderson de Sá Nunes; Soraya Imon De Oliveira. 9. ed. Rio De Janeiro: Elsevier, 2019.
- ABD-ALLA, M. D.; RAVDIN, J. I. Mucosal Immune Response to Parasitic Infections. **Mucosal Immunology**, v. 3, p. 815–829, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-012491543-5/50048-6>>.
- ABOSSE, J. S.; TEREFE, G.; TESHALE, B. M. Comparative study on pathological changes in sheep and goats experimentally infected with *Haemonchus Contortus*. **Surgical and Experimental Pathology**, v. 5, n. 14, jul. 2022.
- AGÜERO, V. C. G. de ; VALDERAS-GARCÍA, E.; PALACIO, L. G. del ; GIRÁLDEZ, F. J.; BALAÑA-FOUCE, R.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. Secretory IgA as Biomarker for Gastrointestinal Nematodes Natural Infection in Different Breed Sheep. **Animals**, v. 13, n. 13, p. 2189, jul. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ani13132189>>.
- ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, n. 4, p. 622–625, dez. 2010.
- ALTAIF, K. I.; DARGIE, J. D. Genetic resistance to helminths. The influence of breed and haemoglobin type on the response of sheep to primary infections with *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 161–175, out. 1978. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0031182000049362>>.
- AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 1-2, p. 91–106, fev. 2004.
- ANGULO-CUBILLÁN, F. J.; GARCÍA-COIRADAS, L.; CUQUERELLA, M.; FUENTES, C. de la; ALUNDA, J. M. *Haemonchus contortus*-Sheep relationship: A review. **Revista Científica**, v. 17, n. 6, p. 577–587, 2007. Disponível em: <https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-22592007000600005&script=sci_arttext>.
- ANTHONY, R. M.; RUTITZKY, L. I.; URBAN, J. F.; STADECKER, M. J.; GAUSE, W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 12, p. 975–987, dez. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri2199>>.
- BAKKER, N.; VERVELDE, L.; KANOBANA, K.; KNOX, D. P.; CORNELISSEN, A. W. C. A.; VRIES, E. de; YATSUDA, A. P. Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES).

Vaccine, v. 22, n. 5-6, p. 618–628, jan. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.08.025>>.

BASSETTO, C. C., ALBUQUERQUE, C. C., CLÁ, A. A., LINS, J. G., Gabriel, G., MARINHO-SILVA, N. M., CHOCOBAR, M. E., BELLO, H. S., MENA, M. O., NICIURA, S. M., AMARANTE, A. T., & CHAGAS, A. (2024). Revisiting anthelmintic resistance in sheep flocks from São Paulo State, Brazil. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 100527. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2024.100527>>.

BESIER, R. B.; KAHN, L. P.; SARGISON, N. D.; VAN WYK, J. A. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 181–238, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27238006/>>.

BISHOP, S. C. Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. **Animal**, v. 6, n. 05, p. 741–747, maio 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S1751731111000681>>.

BRIGANDI, R. A.; ROTMAN, H. L.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; LEON, O.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. *Strongyloides stercoralis*: Role of Antibody and Complement in Immunity to the Third Stage Larvae in BALB/cByJ Mice. **Experimental Parasitology**, v. 82, n. 3, p. 279–289, abr. 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/expr.1996.0035>>.

BURDEN, D. J.; BARTLEY, D. J.; BESIER, R. B.; CLAEREBOUT, E. C.; ELLIOTT, T. P.; HÖGLUND, J.; REHBEIN, S.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; VAN WYK, J. A. V.; YAZWINSKI, T. Y. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.): Third edition of the guideline for evaluating efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v. 329, n. 110187, p. 110187–110187, 1 abr. 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110187>>.

CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; ESTEVES, S. N.; OLIVEIRA, H.; GIGLIOTI, R.; GIGLIOTI, C.; CARVALHO, C.; FERREZINI, J.; SCHIAVONE, D. Parasitismo por nematóides gastrointestinais em matrizes e cordeiros criados em São Carlos, São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 17, n. supl.1 p. 126–132, set. 2008. Disponível em: <<http://rbpv.org.br/download/17supl.12008/Helmintol008>>

CHAGAS, A. C. de S.; TUPY, O.; SANTOS, I. B. dos; ESTEVES, S. N. Economic impact of gastrointestinal nematodes in Morada Nova sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 3, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1984-29612022044>>.

COOPER, N. R. The Classical Complement Pathway: Activation and Regulation of the First Complement Component. **Advances in Immunology**, v. 37, p. 151–216, 1985. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60340-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60340-5)>.

COUPER, K. N.; PHILLIPS, R. S.; BROMBACHER, F.; ALEXANDER, J. Parasite-specific IgM plays a significant role in the protective immune response to asexual

erythrocytic stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 5, p. 171–180, maio 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00760.x>>.

CUPERLOVIC, K.; ALTAIF, K. I.; DARGIE, J. D. Genetic resistance to helminths: a possible relationship between haemoglobin type and the immune responses of sheep to non-parasitic antigens. **Research in Veterinary Science**, v. 25, n. 1, p. 125–126, jul. 1978. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)33028-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)33028-5)>.

EMBRAPA. Cenários da ovinocultura no Brasil. **Documentos Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/apresentacao>.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 3-4, p. 199–206, abr. 1996.

EMERY, D. L.; HUNT, P. W.; LE JAMBRE, L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 12, p. 755–769, nov. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751916301783>>.

FLAY, K. J.; HILL, F. I.; MUGUIRO, D. H. A Review: *Haemonchus contortus* Infection in Pasture-Based Sheep Production Systems, with a Focus on the Pathogenesis of Anaemia and Changes in Haematological Parameters. **Animals**, v. 12, n. 10, p. 1238, maio 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ani12101238>>.

GADDAHI, J. A.; LI, B.; EHSAN, M.; WANG, S.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; HASAN, M. W.; YAN, R.; SONG, X.; XU, L.; LI, X. Recombinant *Haemonchus contortus* 24 kDa excretory/secretory protein (rHcES24) modulate the immune functions of goat PBMCs in vitro. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, p. 83926–83937, nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.18632/oncotarget.13487>>.

GERBE, F.; SIDOT, E.; SMYTH, D. J.; OHMOTO, M.; MATSUMOTO, I.; DARDALHON, V.; CESSÉS, P.; GARNIER, L.; POUZOLLES, M.; BRULIN, B.; BRUSCHI, M.; HARCUS, Y.; ZIMMERMANN, V. S.; TAYLOR, N.; MAIZELS, R. M.; JAY, P. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. **Nature**, v. 529, p. 226–230, jan. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature16527>>.

GETACHEW, T.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. **Parasite**, v. 14, n. 1, p. 3–14, mar. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/parasite/2007141003>>.

GILLEARD, J. S. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. **Parasitology**, v. 140, n. 12, p. 1506–1522, set. 2013.

GILLEARD, J. S.; REDMAN, E. Genetic Diversity and Population Structure of

Haemonchus contortus. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 31–68, maio 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.009>>.

GONÇALVES, T. C.; ALENCAR, M. M.; GIGLIOTI, R.; BILHASSI, T. B.; OLIVEIRA, H. N.; RABELO, M. D.; ESTEVES, S. N.; OLIVEIRA, M. C. S. Resistance of sheep from different genetic groups to gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 166, p. 7–11, jul. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.07.003>>.

INGHAM, A.; REVERTER, A.; WINDON, R.; HUNT, P.; MENZIES, M. Gastrointestinal nematode challenge induces some conserved gene expression changes in the gut mucosa of genetically resistant sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 3-4, p. 431–442, mar. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agropecuária: Rebanho de Ovinos (Ovelhas e Carneiros)**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>>.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 397–428, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012>>.

LAMB, J.; ELLIOTT, T.; CHAMBERS, M.; CHICK, B. Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 241, p. 48–51, jul. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.008>>.

LI, X.; DU, A.; CAI, W.; HOU, Y.; PANG, L.; GAO, X. Evaluation of a recombinant excretory secretory *Haemonchus contortus* protein for use in a diagnostic enzyme-linked immunosorbent assay. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 3, p. 242–246, mar. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.09.001>>.

LINS, J. G. G.; ALMEIDA, F. A.; ALBUQUERQUE, A. C. A.; BRITTON, C.; AMARANTE, A. F. T. Early-onset immune response to *Haemonchus contortus* infection in resistant Santa Ines suckling lambs compared with susceptible Ile de France. **Veterinary Parasitology**, v. 307-308, p. 109734, jul. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109734>>.

MUGAMBI, J. M.; BAIN, R. K.; WANYANGU, S. W.; IHIGA, M. A.; DUNCAN, J. L.; MURRAY, M.; STEAR, M. J. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 69, n. 3-4, p. 265–273, maio 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(96\)01128-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01128-4)>.

NG, S. S. S. Novel mechanisms of immune regulation during parasitic infections. 2018. 184 f. Tese (PhD em Ciências Ambientais) - **School of Environment and Science**, Griffith University, Brisbane - Queensland, Austrália, 2018. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.25904/1912/1671>>.

NIKOLAOU, S.; GASSER, R. B. Prospects for exploring molecular developmental

processes in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 8, p. 859–868, jul. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.04.007>>.

NISBET, A. J.; MEEUSEN, E. N.; GONZÁLEZ, J. F.; PIEDRAFITA, D. M. Immunity to *Haemonchus contortus* and Vaccine Development. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 353–396, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.011>>.

OKINO, C. H.; CRISTINA, S.; GIARETTA, P. R.; MELITO, G. R.; KAPRITCHKOFF, R. T. I.; SANTOS, I. B. dos; RECH, R. R.; MINHO, A. P.; ESTEVES, S. N.; CHAGAS, A. C. de S. Enhanced mucosal response in sheep harbouring β A beta-globin against haemonchosis. **Parasite Immunology**, v. 45, n. 9, jul. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/pim.13003>>.

OKINO, C. H.; NICIURA, S. C. M.; MINHO, A. P.; ESTEVES, S. N.; MELITO, G. R.; MONTASSIER, H. J.; CHAGAS, A. C. de S. C. Divergent humoral responses between males and females against 24 kDa excretory-secretory protein of *Haemonchus contortus* and influence of ovine β -globin polymorphism. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 159, p. 105216–105216, 1 out. 2024. Acesso em: 5 set. 2024.

OKINO, C. H.; NICIURA, S. C. M.; TOSCANO, J. H. B.; ESTEVES, S. N.; DOS SANTOS, I. B.; VON HAEHLING, M. B.; FIGUEIREDO, A.; OLIVEIRA, M. C. de S.; CHAGAS, A. C. de S. Ovine β -globin gene: A new qPCR for rapid haplotype identification and association with susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 294, p. 109434, abr. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109434>>.

PAL, A.; CHAKRAVARTY, A. K. Genes conferring immunity against parasitic infections. **Genetics and Breeding for Disease Resistance of Livestock**, p. 193–208, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816406-8.00013-9>>.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; ÁVILA, V. S. de; COUTINHO, G. C.; SOUZA, A. P. de. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 473–477, 1 jun. 2002. Acesso em: 31 out. 2023.

ROY, M.; SENAPATI, P. k.; PAKHIRA, M. C.; ROY, S.; NANDI, D. Haemoglobin phenovariants vs resilience status, haematological, biochemical and mineral profile in Garole sheep naturally infected with *Haemonchus contortus*. **Exploratory Animal and Medical Research**, v. 4, n. 2, p. 217-227, 2014. Disponível em: <<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20153145215>>.

SCHALLIG, H. D. F. H.; VAN LEEUWEN, M. A. W.; HENDRIKX, W. M. L. Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 108, n. 3, p. 351–357, abr. 1994.

SCHALLIG, H. D. F. H.; VAN LEEUWEN, M. A. W.; VERSTREPEN, B. E.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of *Haemonchus contortus*. **Molecular and**

Biochemical Parasitology, v. 88, n. 1-2, p. 203–213, set. 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00093-5)>.

SCHEUERLE, M.C. Anthelmintic resistance of *Haemonchus Contortus* and the famacha C-method as a tool to delay the development of anthelmintic resistance, 2018, 113 f. Dissertação (Doutorado em Biologia Veterinária) - **Faculdade de Medicina Veterinária**, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2009. Disponível em: <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/10577/1/Scheuerle_Miriam_C.pdf>.

SHAW, R. J.; MORRIS, C. A.; WHEELER, M.; TATE, M.; SUTHERLAND, I. A. Salivary IgA: A suitable measure of immunity to gastrointestinal nematodes in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1-2, p. 109–117, maio 2012.

SHER, A.; GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; CLERICI, M.; KULLBERG, M. C.; PEARCE, E. J.; BERZOFSKY, J. A.; MOSMANN, T. R.; JAMES, S. L.; MORSEIII, H. C.; SHEARER, G. M. Role of T-Cell Derived Cytokines in the Downregulation of Immune Responses in Parasitic and Retroviral Infection. **Immunological Reviews**, v. 127, n. 1, p. 183–204, jun. 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1992.tb01414.x>>.

TAK, I.-U.-R.; DAR, S. A.; DAR, J. S.; GANAI, B.; CHISHTI, M.; AHMAD, F. A Brief Study of Morphology of *Haemonchus contortus* and its Hematophagous Behaviour. **Global Veterinaria**, v. 13, n. 6, p. 960–965, 2014. Disponível em: <[https://www.idosi.org/gv/gv13\(6\)14/3.pdf](https://www.idosi.org/gv/gv13(6)14/3.pdf)>.

TOSCANO, J. H. B.; OKINO, C. H.; DOS SANTOS, I. B.; GIRALDELO, L. A.; VON HAEHLING, M. B.; ESTEVES, S. N.; BASSETTO, C. C.; DO AMARANTE, A. F. T.; CHAGAS, A. C. de S. Local and systemic immune mediators of Morada Nova lambs with divergent *Haemonchus contortus* resistance phenotypes. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 12, set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/pim.12790>>.

TROELL, K. Genotypic and phenotypic characterization of *Haemonchus contortus* in Sweden. 2006. Tese (Doutorado) - **Faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal**, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2006. Disponível em: <<https://pub.epsilon.slu.se/id/eprint/1145/contents>>.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4. ed. [s.l.] **Japan International Cooperation Agency**, 1998.

VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v. 4, n. 12, p. 9, mar. 2008. Disponível em: <<https://docs.ufpr.br/~freitasjaf/artigosovinos/panoramaovinos.pdf>>.

WANYANGU, S. W.; MUGAMBI, J. M.; BAIN, R. K.; DUNCAN, J. L.; MURRAY, M.; STEAR, M. J. Response to artificial and subsequent natural infection with *Haemonchus contortus* in red Maasai and Dorper ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 69, n. 3-4, p. 275–282, maio, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01129-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01129-6)>.

APÊNDICE A – Tabelas de médias e desvios padrão das variáveis em estudo

Tabela 1 - Médias (\pm desvio padrão) de amostras de ovos por grama de fezes (OPG) e volume globular (VG) nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).

	n	Amostra	D0	D7	D14	D21	D28
ODO	4	VG	33,25 \pm 5,12	33,25 \pm 5,91	32,75 \pm 3,11	32,50 \pm 3,77	39,25 \pm 4,60
		OPG	350 \pm 574,46	62,50 \pm 125	75 \pm 103,08	25 \pm 43,30	587,50 \pm 432,11
OTX	8	VG	30,87 \pm 2,17	31 \pm 2,21	31,13 \pm 1,36	31,5 \pm 1,66	34,88 \pm 1,76
		OPG	256,25 \pm 372,67	211,11 \pm 265,39	212,50 \pm 238,16	375 \pm 325	737,5 \pm 289,13
OSI	12	VG	34,25 \pm 4,25	32,83 \pm 2,99	32,67 \pm 3,84	33,17 \pm 3,16	37,33 \pm 2,59
		OPG	70,83 \pm 65,57	112,50 \pm 117,48	112,50 \pm 117,48	325 \pm 246,22	862,50 \pm 631,84

Tabela 2 - Médias (\pm desvio padrão) das amostras de ovos por grama de fezes (OPG) e volume globular (VG) nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA; OSI_AB e OSI_BB).

	n	Amostra	D0	D7	D14	D21	D28
OSI_AA	4	VG	37,25 \pm 2,49	35,25 \pm 0,83	36 \pm 2,55	36,75 \pm 1,48	39,75 \pm 1,48
		OPG	50 \pm 61,24	50 \pm 61,24	112,50 \pm 167,24	175 \pm 75	475 \pm 294,75
OSI_AB	4	VG	32,25 \pm 2,16	32,50 \pm 0,5	31,50 \pm 3,64	32,25 \pm 1,48	36,75 \pm 2,28
		OPG	50 \pm 61,24	100 \pm 86,6	87,50 \pm 54,49	500 \pm 266,93	787,50 \pm 533,12
OSI_BB	4	VG	30,25 \pm 3,56	30,75 \pm 3,96	30,50 \pm 2,69	30,50 \pm 2,18	35,50 \pm 1,8
		OPG	112,50 \pm 41,46	187,50 \pm 143,07	137,50 \pm 96,01	300 \pm 226,38	1325 \pm 675,92

Tabela 3 - Contagem de parasitas (machos adultos (M), fêmeas adultas (F) e total), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO) e com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA, OSI_AB e OSI_BB).

Raças	Contagem de parasitas			Haplótipos	Contagem de parasitas		
	M	F	Total		M	F	Total
ODO	52,50 \pm 31,91	30 \pm 20	82,50 \pm 48,15	OSI_AA	45 \pm 16,58	62,50 \pm 21,65	105 \pm 36,40
OTX	61,25 \pm 33,70	60 \pm 23,45	121,25 \pm 38,87	OSI_AB	47,50 \pm 25,86	42,50 \pm 40,85	90 \pm 53,38
OSI	45,83 \pm 23,33	53,33 \pm 30,46	98,33 \pm 43,56	OSI_BB	45 \pm 25,98	55 \pm 21,79	100 \pm 37,42

Tabela 4 - Média (\pm desvio padrão) dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).

		D0	D7	D14	D21	D28
Isótipo						
ODO	IgG	0,41 \pm 0,21	0,28 \pm 0,11	0,5 \pm 0,36	0,35 \pm 0,11	0,41 \pm 0,24
	IgM	0,64 \pm 0,49	0,68 \pm 0,29	0,7 \pm 0,48	0,7 \pm 0,25	1,38 \pm 0,52
	IgA	0,32 \pm 0,19	0,009 \pm 0,03	0,06 \pm 0,11	0,14 \pm 0,09	0,01 \pm 0,01
OTX	IgG	0,65 \pm 0,38	0,38 \pm 0,21	0,46 \pm 0,17	0,36 \pm 0,13	0,40 \pm 0,26
	IgM	0,58 \pm 0,55	0,81 \pm 0,63	0,45 \pm 0,29	0,43 \pm 0,15	0,99 \pm 0,26
	IgA	0,59 \pm 0,11	0,08 \pm 0,11	0,10 \pm 0,16	0,22 \pm 0,11	0,04 \pm 0,05
OSI	IgG	1,38 \pm 1,43	0,67 \pm 0,71	1,2 \pm 1,24	0,61 \pm 0,61	0,78 \pm 0,87
	IgM	0,63 \pm 0,41	0,86 \pm 0,38	0,53 \pm 0,35	0,60 \pm 0,22	1,34 \pm 0,37
	IgA	0,19 \pm 0,23	0,19 \pm 0,19	0,13 \pm 0,17	0,40 \pm 0,25	0,11 \pm 0,12

Tabela 5 - Média (\pm desvio padrão) dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).

		D0	D7	D14	D21	D28
Isótipo						
ODO	IgG	-0,21 \pm 0,03	-0,18 \pm 0,02	-0,07 \pm 0,10	-0,12 \pm 0,14	-0,20 \pm 0,03
	IgM	-0,23 \pm 0,09	-0,11 \pm 0,0025	-0,20 \pm 0,09	-0,15 \pm 0,15	-0,25 \pm 0,04
	IgA	-0,01 \pm 0,10	0,04 \pm 0,04	-0,01 \pm 0,06	0,0047 \pm 0,18	-0,10 \pm 0,10
OTX	IgG	-0,22 \pm 0,01	-0,19 \pm 0,03	-0,14 \pm 0,12	-0,18 \pm 0,02	-0,18 \pm 0,05
	IgM	-0,27 \pm 0,06	-0,12 \pm 0,02	-0,29 \pm 0,12	-0,25 \pm 0,10	-0,26 \pm 0,04
	IgA	-0,09 \pm 0,04	-0,03 \pm 0,14	0,05 \pm 0,11	0,01 \pm 0,10	-0,01 \pm 0,23
OSI	IgG	-0,20 \pm 0,020	-0,10 \pm 0,27	0,06 \pm 0,31	-0,19 \pm 0,09	-0,18 \pm 0,04
	IgM	-0,27 \pm 0,03	-0,11 \pm 0,04	-0,18 \pm 0,21	-0,29 \pm 0,08	-0,25 \pm 0,05
	IgA	0,00017 \pm 0,1	0,38 \pm 0,78	0,25 \pm 0,37	0,02 \pm 0,15	-0,04 \pm 0,10

Tabela 6 - Média (\pm desvio padrão) dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com as raças Santa Inês (OSI), Texel (OTX) e White Dorper (ODO).

		D0	D7	D14	D21	D28
Isótipo						
ODO	IgG	0,44 \pm 0,33	0,12 \pm 0,24	0,53 \pm 0,41	0,25 \pm 0,28	0,29 \pm 0,22
	IgM	0,32 \pm 0,44	0,06 \pm 0,23	0,33 \pm 0,41	0,02 \pm 0,22	0,76 \pm 0,44
	IgA	2,04 \pm 1,37	0,76 \pm 0,55	1,49 \pm 0,99	0,98 \pm 0,51	1,86 \pm 0,59
OTX	IgG	0,17 \pm 0,08	0,08 \pm 0,10	0,46 \pm 0,28	0,33 \pm 0,23	0,27 \pm 0,23
	IgM	-0,17 \pm 0,06	-0,18 \pm 0,04	0,03 \pm 0,22	-0,18 \pm 0,13	0,24 \pm 0,39
	IgA	0,94 \pm 0,76	0,72 \pm 0,36	1,25 \pm 0,65	1,06 \pm 0,44	1,81 \pm 1,23
OSI	IgG	0,81 \pm 0,56	0,12 \pm 0,21	0,83 \pm 0,86	0,48 \pm 0,54	0,46 \pm 0,71
	IgM	0,24 \pm 0,32	-0,11 \pm 0,15	0,34 \pm 0,52	-0,01 \pm 0,29	0,26 \pm 0,57
	IgA	2,76 \pm 1,11	0,83 \pm 0,47	2,05 \pm 1,41	1,32 \pm 0,69	1,95 \pm 1,27

Tabela 7 - Média (\pm desvio padrão) dos níveis de anticorpos plasmáticos anti-ES24 nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA; OSI_AB e OSI_BB).

		D0	D7	D14	D21	D28
Isótipo						
OSI_AA	IgG	1,68 \pm 1,78	0,81 \pm 0,67	1,22 \pm 0,95	0,56 \pm 0,49	0,83 \pm 0,77
	IgM	1,07 \pm 0,26	0,99 \pm 0,19	0,93 \pm 0,11	0,357 \pm 0,09	1,66 \pm 0,23
	IgA	0,41 \pm 0,26	0,28 \pm 0,28	0,15 \pm 0,20	0,42 \pm 0,32	0,10 \pm 0,12
OSI_AB	IgG	0,76 \pm 0,48	0,33 \pm 0,16	0,60 \pm 0,23	0,35 \pm 0,05	0,35 \pm 0,12
	IgM	0,61 \pm 0,19	0,97 \pm 0,35	0,50 \pm 0,25	0,74 \pm 0,27	1,42 \pm 0,25
	IgA	0,09 \pm 0,08	0,15 \pm 0,11	0,12 \pm 0,17	0,36 \pm 0,17	0,09 \pm 0,12
OSI_BB	IgG	1,70 \pm 1,47	0,86 \pm 0,94	1,78 \pm 1,72	0,93 \pm 0,83	1,17 \pm 1,16
	IgM	0,20 \pm 0,10	0,63 \pm 0,44	0,17 \pm 0,06	0,49 \pm 0,19	0,92 \pm 0,10
	IgA	0,07 \pm 0,08	0,13 \pm 0,05	0,11 \pm 0,09	0,42 \pm 0,24	0,15 \pm 0,10

Tabela 8 - Média (\pm desvio padrão) dos níveis de anticorpos de mucosa oral anti-ES24 nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA; OSI_AB e OSI_BB).

		D0	D7	D14	D21	D28
Isótipo						
OSI_AA	IgG	-0,21 \pm 0,004	-0,17 \pm 0,02	0,18 \pm 0,31	-0,16 \pm 0,08	-0,20 \pm 0,01
	IgM	-0,28 \pm 0,02	-0,10 \pm 0,02	0,02 \pm 0,23	-0,23 \pm 0,07	-0,24 \pm 0,04
	IgA	-0,04 \pm 0,07	0,14 \pm 0,14	0,42 \pm 0,52	-0,01 \pm 0,10	-0,09 \pm 0,09
OSI_AB	IgG	-0,19 \pm 0,03	-0,18 \pm 0,03	-0,11 \pm 0,10	-0,23 \pm 0,03	-0,18 \pm 0,03
	IgM	-0,27 \pm 0,03	-0,12 \pm 0,01	-0,27 \pm 0,11	-0,34 \pm 0,05	-0,24 \pm 0,07
	IgA	0,06 \pm 0,13	0,21 \pm 0,23	0,14 \pm 0,18	-0,02 \pm 0,06	0,01 \pm 0,10
OSI_BB	IgG	-0,20 \pm 0,02	0,05 \pm 0,43	0,11 \pm 0,37	-0,18 \pm 0,13	-0,16 \pm 0,06
	IgM	-0,28 \pm 0,04	-0,10 \pm 0,05	-0,29 \pm 0,07	-0,30 \pm 0,07	-0,27 \pm 0,03
	IgA	-0,02 \pm 0,07	0,77 \pm 1,23	0,19 \pm 0,24	0,08 \pm 0,21	-0,05 \pm 0,09

Tabela 9 - Média (\pm desvio padrão) dos níveis de anticorpos de mucosa nasal anti-ES24 nos diferentes intervalos do experimento (D0, D7, D14, D21 e D28), de acordo com os haplótipos da β -globina em Santa Inês (OSI_AA; OSI_AB e OSI_BB).

		D0	D7	D14	D21	D28
Isótipo						
OSI_AA	IgG	0,65 \pm 0,43	0,06 \pm 0,13	0,46 \pm 0,39	0,13 \pm 0,13	0,10 \pm 0,17
	IgM	0,36 \pm 0,15	0,005 \pm 0,14	0,39 \pm 0,43	0,10 \pm 0,29	0,20 \pm 0,44
	IgA	2,45 \pm 0,82	0,67 \pm 0,43	1,28 \pm 1,35	0,65 \pm 0,23	0,68 \pm 0,48
OSI_AB	IgG	0,72 \pm 0,57	0,08 \pm 0,14	0,76 \pm 0,52	0,52 \pm 0,28	0,37 \pm 0,21
	IgM	0,16 \pm 0,40	-0,16 \pm 0,12	0,28 \pm 0,45	0,04 \pm 0,34	0,46 \pm 0,78
	IgA	2,46 \pm 1,51	0,76 \pm 0,42	2,32 \pm 1,15	1,76 \pm 0,67	2,51 \pm 0,76
OSI_BB	IgG	1,05 \pm 0,57	0,23 \pm 0,28	1,26 \pm 1,21	0,79 \pm 0,75	0,91 \pm 1,05
	IgM	0,19 \pm 0,33	-0,17 \pm 0,09	0,35 \pm 0,64	-0,17 \pm 0,05	0,13 \pm 0,33
	IgA	3,36 \pm 0,47	1,05 \pm 0,46	2,54 \pm 1,40	1,54 \pm 0,48	2,65 \pm 1,25

APÊNDICE B – Resumo 16ª Jornada Científica – Embrapa São Carlos – 23 de agosto de 2024 – Premiado como melhor trabalho apresentado em vídeo-poster.

Quantificação local e sistêmica de diferentes isótipos de imunoglobulinas específicas anti-ES24 do *Haemonchus contortus*.

Emanuelle Martins de Campos¹; Glaucia Roberta Melito²; Hornblenda Joaquina Silva Bello³; Estevão Camillo²; Amanda Freitas²; Ana Carolina de Souza Chagas⁴; Alessandro Pelegrine Minho⁴; Simone Cristina Méo Niciura⁴; Sérgio Novita Esteves⁴; Cintia Hiromi Okino⁵

¹Aluna de graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP; emanuelle@estudante.ufscar.br.

²Aluno (a) de graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Central Paulista, São Carlos, SP. Bolsista PIBIC/CNPq, São Carlos, SP;

³Pós-doutoranda Embrapa Pecuária Sudeste, SP.

⁴Pesquisador (a) da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

⁵Analista da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

Haemonchus contortus é um dos parasitas mais prevalentes e patogênicos em ovinos, causando perdas significativas na produção. Em estudo recente utilizando cordeiros da raça Morada Nova infectados experimentalmente com *H. contortus*, foi verificado que níveis mais elevados de anticorpos plasmáticos anti-ES24 do isótipo IgM foram associados com fenótipo de resistência à infecção por esse parasita. As imunoglobulinas IgM são altamente efetivas na neutralização e aglutinação de patógenos, e são capazes de ativar a via clássica do complemento com avidéz 1000 vezes superior à imunoglobulina IgG. Ainda, a resposta imune local (mucosa), ponto de interação direta entre parasita-hospedeiro, desempenha um papel crucial na defesa contra infecções parasitárias. No entanto, existem poucos estudos que quantificam essa resposta em mucosas. Nesse sentido, este trabalho objetivou desenvolver e caracterizar a resposta imune humoral de mucosa (secreção nasal e oral) em ovinos infectados, através da quantificação de anticorpos específicos contra o antígeno secretório-excretório (ES24), uma proteína secretória-excretória produzida pelos estágios hematófagos do *H. contortus*. Diferentes concentrações de amostras e de anticorpos secundários foram testadas para otimização dos testes de ELISA indireto. Cordeiros das raças White Dorper, Texel e Santa Inês foram infectados experimentalmente com 4000 L₃ *H. contortus*/cordeiro via oral aproximadamente aos 190 dias de idade. Os animais foram monitorados semanalmente (D0 a D28) para mensuração de anticorpos específicos anti-ES24 do *H. contortus* dos isótipos IgG, IgM e IgA em suabes nasais, suabes orais e plasma através do método de ELISA indireto. Em relação à mensuração de anticorpos de mucosa, maiores níveis de todos isótipos de imunoglobulinas foram observados em secreção nasal comparado à secreção oral. Cordeiros Santa Inês apresentaram níveis superiores de todos os isótipos de imunoglobulinas em secreção nasal quando comparados aos cordeiros Texel, enquanto níveis semelhantes foram observados em White Dorper. Os níveis de anticorpos na secreção oral foram baixos e semelhantes entre as diferentes raças. Em relação aos anticorpos plasmáticos, mensurados em plasma, cordeiros Santa Inês apresentaram maiores níveis de IgG e IgA comparado a Texel e White Dorper,

enquanto os níveis de IgM foram semelhantes aos observados em White Dorper, e menores em Texel. O ensaio aqui desenvolvido para monitoramento de anticorpos de mucosa via suabe nasal constitui um método de colheita não invasivo e eficiente no monitoramento de anticorpos específicos contra *H. contortus*. Cordeiros da raça Santa Inês, considerados mais resistentes à hemoncose, apresentaram resposta humoral específica mais robusta, tanto sistêmica como local.

Apoio financeiro: Embrapa

Área: Ciências da Saúde

Palavras-chave: anticorpos, ovinos, cordeiros, IgM, isótipos, antígeno excretório-secretório.

Número Cadastro SisGen: A43C096

Comitê de Ética e bem-estar animal: 02/2022