

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**QUANTIFICAÇÃO DE mRNA DE GENES RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNE
EM BOVINOS INFECTADOS COM ENDOPARASITOS DO GÊNERO**

Haemonchus spp

ADRIANA MÉRCIA GUARATINI IBELLI

SÃO CARLOS – SP

2008

ADRIANA MÉRCIA GUARATINI IBELLI

(Bióloga)

**QUANTIFICAÇÃO DE mRNA DE GENES RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNE
EM BOVINOS INFECTADOS COM ENDOPARASITOS DO GÊNERO**

Haemonchus spp

ORIENTADORA:

LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP

2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

l125qm

Ibelli, Adriana Mércia Guaratini.

Quantificação de mRNA de genes relacionados à resposta imune em bovinos infectados com endoparasitos do gênero *Haemonchus* spp / Adriana Mércia Guaratini Ibelli. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

111 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Bovino - genética. 2. Imunogenética. 3. Expressão gênica. 4. Nelore. 5. *Haemonchus* spp. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

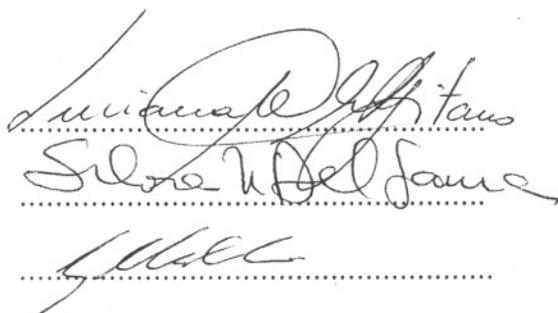
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**QUANTIFICAÇÃO DE mRNA DE GENES RELACIONADOS A
RESPOSTA IMUNE EM BOVINOS INFECTADOS COM
ENDOPARASITOS DO GÊNERO *Haemonchus spp***

Dissertação de Mestrado de Adriana Mércia Guaratini Ibelli

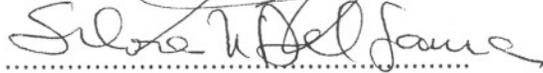
Banca Examinadora

Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano



.....

Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama



.....

Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho



.....

**À Deus,
aos meus pais Ana Maria e Adilson,
ao meu irmão Adilson**

Dedico

***“A coisa mais bela que o homem
pode experimentar é o mistério.
É esta a emoção fundamental que está
na raiz de toda a ciência e arte.”***

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Luciana Correia de Almeida pela orientação, confiança, apoio, amizade, paciência e pelos ensinamentos.

A Dr^a Márcia Cristina de Sena Oliveira pela sempre disposição em auxiliar no projeto e nas questões sobre parasitologia e imunologia.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho por abrir as portas do Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ, USP.

Ao Prof. Dr. Alessandro F. Talamini Amarante pela disponibilidade e ensinamentos em parasitologia.

Ao Dr. Ivo Bianchin pelo fornecimento das larvas L3 de *Haemonchus* spp utilizadas no projeto e ao Dr. John Furlong por seu empenho em intermediar essa doação, além das sempre bem vindas sugestões

Aos Drs. Rogério Taveira Barbosa e Rui Machado pelos cuidados veterinários durante os experimentos de campo.

A Dra Nelsy Verani e a técnica Amábile pela disponibilidade em utilizar o laboratório histologia para inclusão das amostras em parafina.

A CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado durante o período de março de 2006 a fevereiro de 2008.

À Universidade Federal de São Carlos, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução por permitir esta valiosa experiência.

Às secretárias do PPGGEv Regiane e Greissi pela atenção em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Animal (Embrapa – Pecuária Sudeste):

João José de Simoni Gouveia pela amizade, companheirismo e risadas desde o início do mestrado; Gisele Batista Veneroni e Sarah Laguna Meirelles pelo companheirismo, amizade, confidências e risadas; Gustavo Gasparin e Marcelo Miyata por terem feito primeiro encher caixas, depois me receberem de braços abertos e, principalmente, pela amizade; Liliane Cristina Nakata pelos ensinamentos e pela amizade; Rogério Andréo pela ajuda e amizade e às iniciandas Juliana e Adelita. A Rodrigo Giglioti pela amizade e pelas conversas sobre os endoparasitos. Tenho que agradecer por todos os momentos que passamos juntos, desde os desesperos laboratoriais até as animadas pizzadas e churrascos. Jamais me esquecerei de tudo que passamos juntos!!!

A Dr^a Simone Cristina Méo Niciura pelas sugestões, amizade e pela sempre disponibilidade em me ajudar.

A Dr^a Andrea R. Bueno Ribeiro pelo carinho, amizade, ajudas e por me permitir o aprendizado em uma nova área.

A Fábio Carvalho pelas discussões e auxílios sobre estatística.

Ao técnico Gilberto Agostinho pela disposição em ajudar.

Aos funcionários da Embrapa – Pecuária Sudeste pela colaboração.

A Dr^a Lilian Giotto Zaros pela acolhida e auxílios em Piracicaba.

A Dr^a Helena Javiel Alves pela ajuda, disponibilidade, caronas e almoços em Piracicaba.

A Kerli Ninov pelo convite para ficar em sua casa e pela acolhida. E também a Priscila, Ana Paula, Naiane e Ismerê pela acolhida.

A Patrícia Martinez Levada, Rodrigo Duarte Gonçalves, Ricardo José Dunder e Pablo Garcia Corredatto pela amizade sempre e pelas conversas científicas.

A Viviane e Antônio pela amizade desde os mais remotos tempos.

A Alberto pelo amor, compreensão, incentivo e, paciência nas horas mais difíceis.

A meus pais Adilson e Ana Maria e meu irmão Adilson pela paciência, amor, carinho e incentivo inesgotável.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURA	12
LISTA DE TABELAS	15
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E JUSTIFICATIVA	20
2.1. Importância das infecções parasitárias na agropecuária	20
2.2. Biologia, Diagnóstico e Controle do Parasito <i>Haemonchus</i> spp	23
2.3. Diferenças entre raças de bovinos	29
2.4. Resposta Imune e Interação Parasito-Hospedeiro.....	30
2.5. Polarização Th1/Th2	33
2.6. Citocinas	34
2.7. Quantificação de citocinas	44
2.8. PCR em tempo real.....	45
3. HIPÓTESE	50
4. OBJETIVOS	51
5. MATERIAL E MÉTODOS	52
5.1. Animais	52
5.2. Obtenção das larvas	52
5.3. Infecção dos bovinos	53
5.4. Obtenção dos tecidos	53
5.5. Preparo das amostras para histologia.....	54
5.6. Análise histológica	54
5.7. Extração de RNA	55
5.8. Quantificação do RNA.....	55
5.9. Síntese de cDNA.....	56
5.10. Escolha dos primers.....	56
5.11. Eficiência da amplificação	58
5.12. PCR em tempo real.....	58
5.13. Seleção do gene constitutivo	59
5.14. Análise estatística para PCR tempo real.....	60
5.15. Análise estatística das histologias.....	60

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1. Extração e Quantificação do RNA.....	61
6.2. Obtenção da eficiência da amplificação	63
6.3. Verificação da especificidade dos primers	65
6.4. Seleção do gene constitutivo	68
6.5. Análise histológica	74
6.6. Quantificação relativa de genes relacionados ao sistema imune de bovinos endoparasitados com <i>Haemonchus</i> spp	79
7. PERSPECTIVAS.....	88
8. CONCLUSÃO	89
9. REFERÊNCIAS.....	90

RESUMO

A pecuária brasileira apresenta grande impacto para o setor agrícola nacional, possuindo o maior rebanho bovino comercial do mundo. Em contrapartida, a produtividade é baixa e as doenças causadas por endoparasitoses do gênero *Haemonchus* são um dos principais limitantes na produção. Sabe-se que esses parasitos são responsáveis por uma série de respostas imunológicas no hospedeiro. A polarização de citocinas Th1/Th2 tem sido amplamente estudada visando entender melhor as infecções causadas por parasitos gastrintestinais. Entretanto, ainda são escassos os estudos que procuram entender a resposta imunológica de bovinos endoparasitados com *Haemonchus* spp. Os objetivos deste trabalho foram verificar diferenças na abundância de RNA mensageiro de genes relacionados à resposta imune de bezerros da raça Nelore (*Bos indicus*) submetidos à primeira infecção com *Haemonchus* spp, relacionando-as às respostas locais de infiltrados celulares. Os genes foram quantificados por PCR em tempo real e a quantificação relativa foi feita pelo programa computacional *Relative Expression Software Tool*. Os resultados mostraram um aumento significativo das interleucinas IL-4 ($p \leq 0,05$) e IL-13 ($p \leq 0,05$) nos linfonodos do grupo de animais desafiados. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) de abundância de mRNA para os genes analisados no tecido abomasal. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) para contagens de mastócitos e eosinófilos no tecido abomasal entre os grupos analisados. Assim, pode-se concluir que, para o curto período de infecção, houve um aumento da polarização Th2 em linfonodo, mas não em abomaso.

Palavras-chaves: *Bos indicus*, Nelore, *Haemonchus* spp, PCR em tempo real, resposta imune

ABSTRACT

Brazilian livestock production presents great impact for the national agriculture, possessing the largest bovine commercial herd of the world. However, the productivity is low and gastrointestinal diseases caused by *Haemonchus* spp are one of the major constraints to the production. It is known that those parasites are responsible for many immunological responses in the host. Cytokine polarization Th1/Th2 has been studied to understand the infections caused by nematodes. However, the studies that try to understand immune response of cattle with *Haemonchus* spp are still scarce. The goal of this work was to verify differences in the mRNA abundance of genes involved in immune response of calves of Nelore breed (*Bos indicus*) submitted to the first infection with *Haemonchus* spp, relating these differences to patterns of cellular infiltrate. Genes were evaluated by real time PCR and relative quantification was made by the software *Relative Expression Software Tool*. Results showed up-regulation of the interleukins IL-4 ($p \leq 0.05$) and IL-13 ($p \leq 0.05$) in the lymph node of challenged animals. No significant differences ($p > 0.05$) were found in mRNA abundance for the genes analyzed in abomasum. There were no significant differences for mast cells and eosinophil counts in abomasal tissue among analyzed groups. From the results, it can be concluded that for the short infection time, there was increased polarization of Th2 in lymph node, but it was not seen in abomasal tissue.

Keywords: *Bos indicus*, Nelore breed, *Haemonchus* spp, real time PCR, immune response.

LISTA DE FIGURA

- Figura 1.** *Haemonchus spp.* (a) Bolsa copuladora do macho; (b) Papilas cervicais; (c) Lábio vulvar da fêmea; (d) Vermes adultos; (e) larva infectante. Foto: Rodrigo Giglioti.24
- Figura 2.** Ciclo de vida do *Haemonchus spp.* (a) Vermes adultos parasitam abomaso de bovino; (b) Ovos são expelidos para o meio e as larvas se desenvolvem até o terceiro estágio; (c) Bovinos se alimentam das pastagens contaminadas e o ciclo se reinicia. Adaptado de UCDNEMA (2007) e VIRGINA TEC (2008)25
- Figura 3.** Polarização Th1-Th2. Adaptado de LIEW, 200234
- Figura 4.** Fórmula desenvolvida por Pfaffl (2001) para quantificação relativa48
- Figura 5.** Modelo matemático desenvolvido por Pfaffl (2002).....60
- Figura 6.** Gel Agarose 1% evidenciando a integridade das amostras de RNA extraídas a partir de linfonodo abomasal, indicando a presença das bandas de RNA ribossômico 28 S, 18 S e 5 S61
- Figura 7.** Gel de agarose 1% evidenciando a integridade das amostras extraídas a partir de tecido abomasal, indicando a presença das bandas de RNA ribossômico 28S, 18S e 5 S61
- Figura 8.** Gráfico obtido a partir da diluição seriada do cDNA para o gene HPRT1, assim como sua equação de regressão64
- Figura 9.** Gráfico obtido a partir da diluição seriada do cDNA para o gene IFN- γ , assim como sua equação de regressão64

Figura 10. Confirmação do tamanho dos fragmentos dos produtos de RT-PCR por gel de agarose. No primeiro poço encontra-se o padrão de tamanho PhiX 174 Hae III. Na parte A encontram-se os genes IL-4 (450 pb), RPL-19 (410 pb), TNF- α (279 pb), MCP-1 (278 pb), IFN- γ (261 pb) e IL-13 (234 pb). Na parte B, encontram-se os genes Lisozima (240 pb), Pepsinogênio (210 pb), IL-8 203 pb, HPRT-1 (154 pb), IL-2 (151 pb), IL-12 (143 pb) e GAPDH (121 pb).....65

Figura 11. Curva de dissociação para o gene MCP-1 gerada pelo aparelho LightCycler (Roche).....66

Figura 12. Resultado do teste Genorm para estabilidade do gene controle em linfonodo.....72

Figura 13. Resultado do teste Genorm para estabilidade do gene controle em abomaso72

Figura 14. Média do número de eosinófilos e mastócitos/ mm² da mucosa do abomaso de bezerros da raça Nelore desafiados e não desafiados com larvas de *Haemonchus* spp.76

Figura 15. Quantificação relativa das amostras de linfonodos do grupo desafiado sobre o grupo controle. Os valores de p são: IL-2(p=0,5); IL-4(p=0,03), IL-8 (p=0,79), IL-12 (p=0,23), IL-13 (p=0,017), MCP-1 (p=0,28), TNF- α (p=0,056), IFN- γ (p=0,57). As caixas representam o intervalo interquartil, ou 50% das observações, expressas como n-vezes a diferença entre os grupos em relação ao gene referência. As linhas pontilhadas representam a mediana de expressão gênica. As barras representam as observações máxima e mínima. *Significativo a 5%.80

Figura 16. Quantificação relativa das amostras de abomaso do grupo desafiado sobre o grupo controle. Os valores de p são: IL-2 (p=0,71); IL-8 (p=0,85), IL-13 (p=0,33), Lisozima (p=0,96), MCP-1 (p=0,27), Pepsinogênio (p=0,86), TNF- α (p=0,38) e IFN- γ (p=0,84). As caixas representam o intervalo interquartil, ou 50% das observações, expressas como n-vezes a diferença entre os grupos em relação ao

gene referência. As linhas pontilhadas representam a mediana de expressão gênica.
As barras representam as observações máxima e mínima.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da estrutura genética e distribuição em grupos experimentais	53
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados nas reações em cadeia da polimerase em tempo real	57
Tabela 3. Valores de coeficiente angular da reta (Slope) para cálculo da eficiência de amplificação (E) para os primers utilizados neste trabalho, extraído de Zaros (2006).	58
Tabela 4. Condições nas reações em cadeia da polimerase em tempo real	59
Tabela 5. Média das razões, razão máxima e mínima e rendimento máximo e mínimo (μg) obtidas da extração das amostras de RNA	62
Tabela 6. Temperaturas de melting dos genes analisados por PCR em tempo real	67
Tabela 7. Estatística descritiva dos resultados de qPCR para linfonodo por gene e entre grupos experimentais de bezerros da raça Nelore desafiados e não desafiados com larvas de <i>Haemonchus</i> spp.	69
Tabela 8. Estatística descritiva dos resultados de qPCR para abomaso entre grupos experimentais de bezerros da raça Nelore desafiados e não desafiados com larvas de <i>Haemonchus</i> spp.	69
Tabela 9. Médias de Ct, desvio padrão e erro padrão para os três genes constitutivos em abomaso de bezerros da raça Nelore desafiados e não desafiados com larvas de <i>Haemonchus</i> spp.	70

Tabela 10. Médias de Ct, desvio padrão e erro padrão para os três genes constitutivos em linfonodo de bezerros da raça Nelore desafiados e não desafiados com larvas de *Haemonchus* spp.70

Tabela 11. Análise descritiva da contagem de eosinófilos e mastócitos.....75

Tabela 12. Peso dos animais ao nascimento (kg), Peso final na data da coleta dos tecidos (kg) e hematócrito obtido no dia em que foi realizada a infecção.76

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – células apresentadoras de antígeno
- CCL2 ou MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos
- CD11/CD18 – proteína de superfície celular para reconhecimento de receptor de células T
- cDNA – DNA complementar
- Células NK – células *natural killer*
- Ct – ciclo limiar
- GAPDH – gliceraldeído fosfato desidrogenase
- IFN- γ – Interferon gama
- IgA – Imunoglobulina A
- IgE – Imunoglobulina E
- IgG – Imunoglobulina G
- IgG1 – subclasse 1 de Imunoglobulina G
- IL- 2 – interleucina 2
- IL- 4 - interleucina 4
- IL- 5 – interleucina 5
- IL- 8 ou CXCL8 – interleucina 8
- IL-10 – interleucina 10
- IL-12 – interleucina 12
- IL-13 – interleucina 13
- L3 – terceiro estágio larval
- L4 – quarto estágio larval
- LPS – Lipopolissacarídeos
- MHC – complexo de histocompatibilidade principal
- mRNA – RNA mensageiro
- OPG – ovos por gramas de fezes
- pb – pares de bases
- qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa
- rpm – rotações por minuto
- T. colubriformis* – *Trichostrongylus colubriformis*
- T. muris* - *Trichuris muris*
- T. spirallis* – *Trichinella spiralis*

TCR1 – receptor 1 de células T

TE – Tris-EDTA

Th1 – Células T auxiliadora tipo 1

Th2 – Células T auxiliadora tipo 2

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

$\gamma\delta$ – células gama delta

1. INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira apresenta grande impacto para o setor agrícola nacional, possuindo o maior rebanho mundial de bovinos. Em contrapartida, sabe-se que a produtividade é baixa e que as doenças causadas por endoparasitoses do gênero *Haemonchus* spp são um dos fatores limitantes, causando sintomas como diarreia, edemas e hemorragias, principalmente em animais mais jovens e que ainda não adquiriram resistência. Isto faz com que haja redução na produção de leite, carne, morte de animais, bem como, gasto excessivo com a utilização de anti-helmínticos, que nem sempre são eficazes.

Atualmente, novos métodos têm sido desenvolvidos auxiliando na investigação destas doenças. O estudo do sistema imune do hospedeiro, aliado à utilização de ferramentas genéticas e moleculares, é uma das alternativas mais eficazes que permite o entendimento das infecções e dos mecanismos de resistência e suscetibilidade. Conhecendo estes processos, será possível o desenvolvimento de terapias mais eficazes, vacinas e controle de endoparasitos, resultando no aumento da produção animal, diminuição de gastos e seleção de animais mais resistentes.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E JUSTIFICATIVA

A pecuária brasileira apresenta extrema importância para o setor agrícola nacional. Possui o maior rebanho comercial mundial de bovinos (MAPA, 2008) com aproximadamente 210 milhões de cabeças contrastando com 33 milhões de suínos, 11 milhões de ovinos e 15 milhões de caprinos (IBGE, 2007). Os bovinos distribuem-se aproximadamente 20 % na região Norte do país, 13 % na Nordeste, 19% na região Sudeste, 13 % na região Sul e 35 % na região Centro-Oeste, sendo que os estados Mato Grosso, São Paulo e Mato Grosso do Sul são os principais estados em número de animais abatidos (IBGE, 2007).

O Brasil é também o maior exportador de carne mundial, seguido por Austrália, Índia, Nova Zelândia e Estados Unidos da América (ABIEC, 2007; IBGE,2007). Somente de janeiro a dezembro de 2007, cerca de 2 milhões de toneladas de carne industrializada e *in natura* e 120 mil toneladas de miúdos foram exportados para mais de 180 países, movimentando, aproximadamente, 4,5 milhões de dólares. Entre os maiores importadores encontram-se Rússia, Egito, China, Reino Unido e Estados Unidos da América (ABIEC, 2008a), com cerca de 20% de aumento em relação ao ano de 2006. No entanto, ainda é o segundo país em produção de carne bovina (ABIEC, 2008b).

Entretanto, apesar da grande importância que a bovinocultura exerce tanto na economia nacional quanto internacional, sua produtividade ainda não atingiu níveis máximos devido a vários fatores, entre eles as diversas patologias causadas por parasitos.

2.1.Importância das infecções parasitárias na agropecuária

As infecções parasitárias causadas por nematódeos gastrintestinais são amplamente distribuídas por todo o mundo, afetando diretamente a indústria de bovinos, caprinos e ovinos (MEEUSEN et al, 2005). São consideradas uma das causas principais de perda na produção animal em muitos países, acarretando diminuição do ganho de peso, na conversão alimentar e diminuição na produção de leite, entre outros (CORWIN, 1997; PERRY;RANDOLPH, 1999; ZARLENGA et al, 2001, BIANCHIN et al, 2007).

Nos países desenvolvidos, as principais conseqüências destas

infecções são gastos com grandes quantidades de anti-helmínticos e diferentes formas de utilização de anti-helmínticos como estratégias de controle, que asseguram que raças com altos índices produtivos, mas de baixa resistência sejam utilizadas (PERRY;RANDOLPH, 1999). Nos Estados Unidos, por exemplo, os parasitos acarretam para a indústria gastos com insumos e perda na produtividade de cerca de 2 bilhões de dólares por ano (SONSTERGARD;GASBARRE, 2001). Foi estimado que os produtores gastam cerca de um a 200 dólares por animal, por ano, com média de gastos de 5 a 20 dólares (GASBARRE et al, 2001). Na Nova Zelândia foi estimada uma perda de cerca de 120 milhões de dólares apenas com gado de leite, o que indica indica grandes prejuízos econômicos (CORWIN, 1997).

Nos países em desenvolvimento, os impactos das infecções parasitárias divergem dos países desenvolvidos, pois o principal resultado é a perda potencial da produtividade. Nesses países, observa-se uma relação parasito-hospedeiro muito antiga, de maneira que os animais são adaptados a múltiplas infecções, o que faz com que os rebanhos apresentem reduzida suscetibilidade aos parasitos e infecções endêmicas. Nestas regiões também podem ser encontradas altas cargas parasitárias de hemoparasitos e seus vetores, que não estão presentes na maioria dos climas temperados, em especial na Europa (PERRY;RANDOLPH, 1999). As endoparasitoses, ainda causam anorexia parasitária nos seus hospedeiros e geralmente contribue para a diminuição do índice de crescimento dos animais, que é percebido em características como ganho de peso e peso ao nascimento dos bezerros (BIANCHIN et al, 1993).

No Brasil, a produtividade dos rebanhos é considerada baixa devido a vários fatores que interferem no desenvolvimento pleno da pecuária, sendo que as parasitoses causadas por helmintos apresentam-se como uma das principais limitações (MACRAE, 1993; ARAÚJO et al, 2004). Elas causam perdas econômicas na produção animal, devido à diminuição na produção e gastos com medidas profiláticas. Acredita-se que cerca de 68 milhões de dólares sejam perdidos somente na região Centro-Oeste apenas devido a infecções causadas por parasitos gastrintestinais (SOUTELLO et al, 2002). As estimativas são de aproximadamente R\$ 187.277.488 de gastos com anti-helmínticos no ano de 2006 (SINDAN, 2007). Bianchin (1996) observou que a mortalidade dos animais não é o principal problema destas infecções, já que em boas condições alimentares apenas 2 % dos bovinos foram afetados. Por isso, há a preocupação com as condições ruins das pastagens,

principalmente em épocas de seca. Outra preocupação é a presença de infecções sub-clínicas, em que os sintomas não são observados apesar da ocorrência de parasitose (ARAÚJO et al, 2004). Além desses fatores, há a questão das raças com baixa suscetibilidade geralmente apresentarem menores performances produtivas, enquanto que as raças de animais com melhores índices produtivos, quase sempre criadas nos países desenvolvidos, raramente se sobressaem em condições ambientais onde há grande desafio de parasitos durante todo ano (PERRY; RANDOLPH, 1999).

Na maioria dos Estados brasileiros os nematódeos gastrintestinais com maior prevalência em bovinos são tricostrongilídeos dos gêneros *Haemonchus* e *Cooperia* (ARAÚJO et al, 1998; BIANCHIN et al, 2007). Araújo et al (2004), por exemplo, encontraram maiores quantidades de *Cooperia* spp e *Haemonchus* spp em coproculturas de bezerros, enquanto que nas de vacas, a maior quantidade de larvas foi de *Haemonchus* spp e *Trichostrongylus* spp. Bianchin (1996) observou maiores prevalências de *Cooperia* (75,8 %) e de *Haemonchus* spp (15 %) em bezerros Nelore no estado do Mato Grosso do Sul. No interior do Estado de São Paulo, foram realizadas OPG e contagem de larvas, obtendo predominância destes dois gêneros de parasitos e sendo encontrados também, exemplares de *Bunostomum phlebotomun*, *Trichostrongylus axei* e *Oesophagostomum radiatus* (NICOLAU et al, 2002). Bricarello et al (2007) também encontraram maior prevalência destes dois endoparasitos em um estudo realizado com bovinos da raça Nelore no Estado do Paraná. Observaram ainda uma correlação positiva entre o aumento do número de helmintos dos dois gêneros, isto é, conforme há o aumento de um dos gêneros, o outro é aumentado, indicando que a seleção da resistência para uma espécie, também selecionará a outra. Em todos os estudos, a presença de larvas foi observada durante todos os meses do ano, indicando que a infecção do rebanho pode ocorrer em qualquer época.

Dentre as espécies de nematódeos identificadas, as infecções causadas por espécies do gênero *Haemonchus* são consideradas as mais patogênicas e que debilitam mais os jovens ruminantes que ainda não adquiriram resistência (BALIC et al, 2002).

2.2. Biologia, Diagnóstico e Controle do Parasito *Haemonchus* spp

2.2.1. Biologia

A família Trichostrongylidae é composta por nematódeos delgados, com cavidade bucal reduzida ou ausente, medindo menos de 4 cm. Parasitam o abomaso e intestino delgado de ruminantes, bem como, algumas espécies de eqüídeos, suínos e aves. Dentro desta família, gêneros como *Haemonchus* spp, *Cooperia* spp, *Trichostrongylus* spp e *Ostertagia* spp estão incluídos (UENO; GONÇALVES, 1998; URQUHART et al, 1998).

No Brasil a presença de três espécies do gênero *Haemonchus* foram caracterizadas: *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* e *Haemonchus similis* podendo infectar ovinos, caprinos e bovinos. Muito se discute quanto a especificidade do hospedeiro à infecção, pois por muito tempo acreditou-se que *Haemonchus contortus* e *Haemonchus placei* eram a mesma espécie já que há grande semelhança entre vários caracteres morfológicos (GIBBONS, 1979 *apud* AMARANTE et al, 1997). Atualmente, vários estudos indicam que estas são realmente duas espécies diferentes e que apresentam hospedeiros específicos: ovinos para *Haemonchus contortus* e bovinos para *Haemonchus placei*. Hoberg et al (2004) em um estudo filogenético com as mais de 10 espécies de *Haemonchus* spp existentes encontrou que *H. placei* e *H. contortus* apresentam diferentes características morfológicas, sendo que *H. placei* apresenta várias sinapomorfias em relação a *H. contortus*. Também observaram que *H. contortus* é parasito exclusivo de Caprinae, enquanto *H. placei* e *H. similis* são exclusivos de Bovinae. Achi et al (2003) e Amarante et al (1997) observaram em trabalhos com infecção cruzada com estas três espécies de parasito que *H. contortus* é prevalente em ovinos, enquanto que em bovino o mais prevalente foi *Haemonchus placei* e que quando há infecção cruzada por um dos hospedeiros, os parasitos são rapidamente eliminados (AMARANTE et al, 2004).

A prevalência destas espécies e a intensidade de parasitos em ruminantes de interesse econômico estão relacionadas às condições climáticas e meteorológicas que favorecem o desenvolvimento e a sobrevivência dos nematódeos nas pastagens. O clima é um dos fatores mais importantes na disseminação destas espécies, pois nas condições adequadas, que coincidem com temperatura e umidade elevadas, há maior facilidade de infecção pelo hospedeiro. A

umidade ideal para o desenvolvimento de ovos e larvas é de 100 % e a temperatura ótima está compreendida entre 22 °C e 26 °C (FREITAS, 1980).

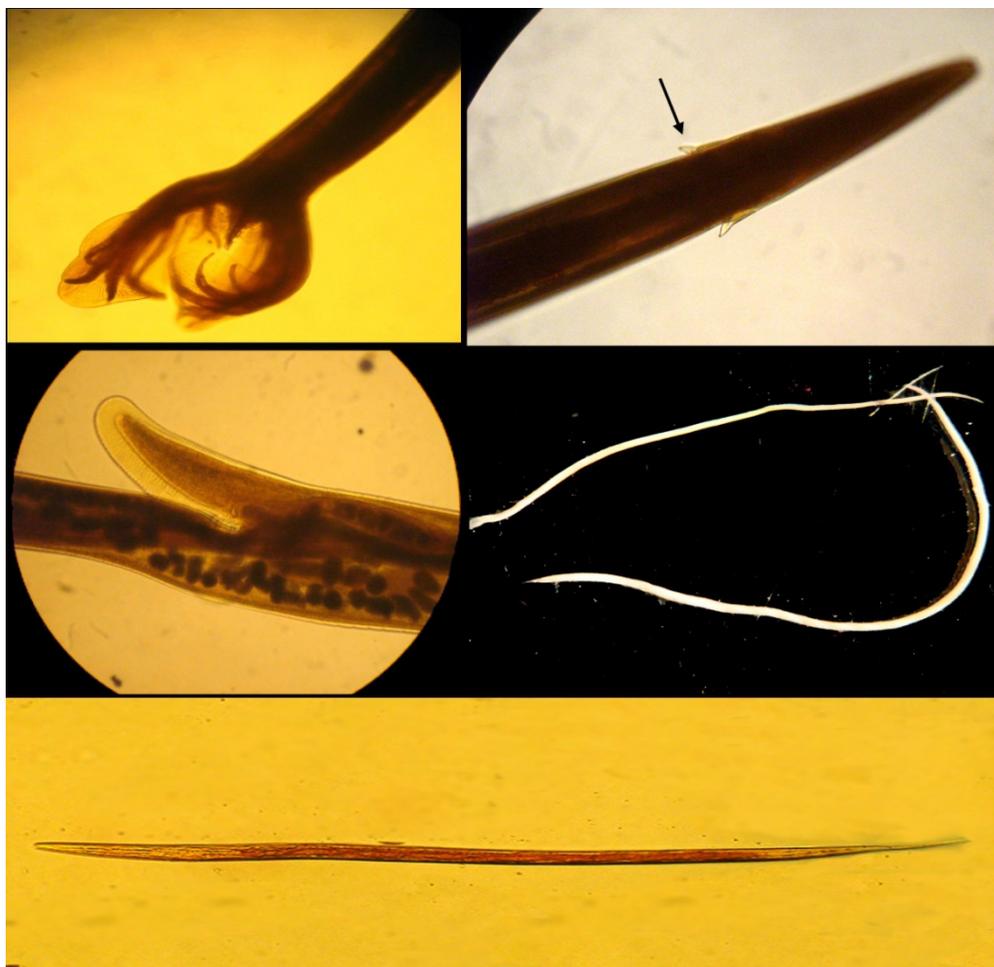


Figura 1. *Haemonchus spp.* (a) Bolsa copuladora do macho; (b) Papilas cervicais; (c) Lábio vulvar da fêmea; (d) Vermes adultos; (e) larva infectante. Foto: Rodrigo Giglioti.

Os parasitos do gênero *Haemonchus spp* (Figura 1) apresentam ciclo de vida rápido que se completa em três semanas. Contaminam os ruminantes que ingerem pastagens com ovos dos vermes, os quais por sua vez, se alojam na mucosa do abomaso alimentando-se de sangue do hospedeiro (WHITE, 2001). Os vermes adultos vivem no interior do tubo digestivo dos hospedeiros, poem ovos em grandes quantidades que na fase de mórula são eliminados para o meio.

Apresentam quatro estádios larvais antes de tornarem-se adultos (FREITAS, 1980; FORTES, 1997). Os estágios larvais infectantes são L3, estágio em que a larva penetra na cavidade gástrica do abomaso, onde após 1 a 2 dias atinge o estágio L4, se desenvolvendo em um adulto imaturo 2 a 3 dias depois

(Figura 2). A larva infectante, quando ingerida pelo hospedeiro, emerge da cutícula protetora na luz do tubo digestivo entrando na fase tecidual, na qual se alimenta dos tecidos do hospedeiro, penetrando especialmente nas glândulas gástricas da mucosa (FREITAS, 1980).

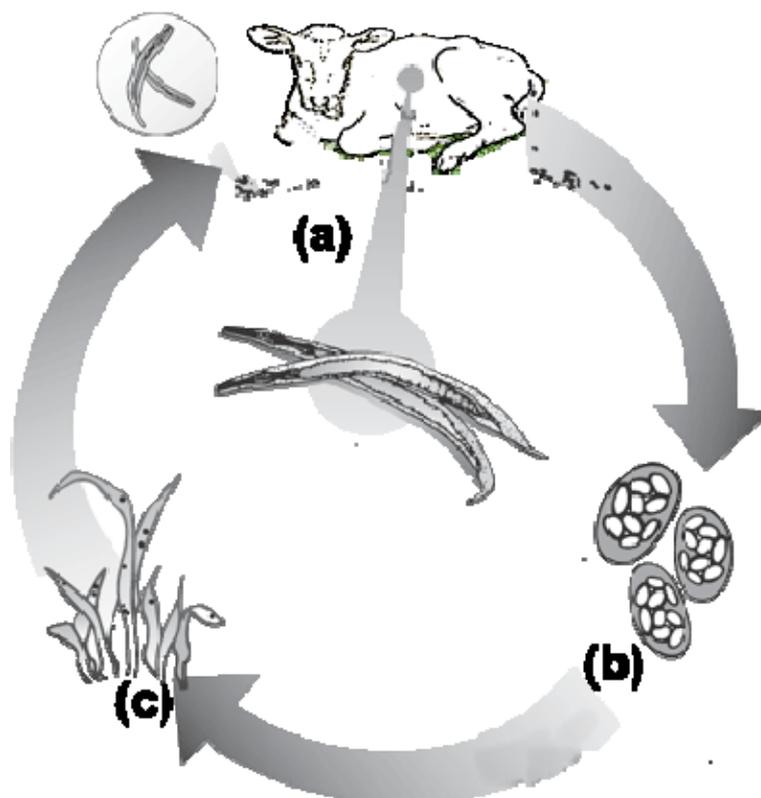


Figura 2. Ciclo de vida do *Haemonchus* spp. (a) Vermes adultos parasitam abomaso de bovino; (b) Ovos são expelidos para o meio e as larvas se desenvolvem até o terceiro estágio; (c) Bovinos se alimentam das pastagens contaminadas e o ciclo se reinicia. Adaptado de UCDNEMA (2007) e VIRGINA TEC (2008)

São espécies essencialmente hematófagas e, conseqüentemente, o principal efeito produzido por elas é anemia do tipo hemorrágico, já que o hospedeiro não apresenta recursos para recuperar o sangue espoliado pelos parasitos, podendo também produzir gastrite. Foi estimado que em uma infecção maciça, um ovino poderia perder cerca de 140 mL de sangue por dia e nos casos mais graves, a contagem de eritrócitos poderia cair de 10 milhões para 2,5 milhões por mililitro de sangue, enquanto o teor de hemoglobina poderia cair de 60 % para 10 % (FREITAS, 1980).

O nível de infecção causado por *Haemonchus* spp pode ser baixo, crônico ou severo, dependendo da capacidade do animal desenvolver imunidade após repetidas exposições aos nematódeos, sendo necessária uma infecção múltipla do parasito para o desenvolvimento da resistência, que ocorre entre quatro e sete semanas após a infecção (MEEUSEN et al, 2005).

No quadro clínico, pode ser observado além da anemia, em consequência de seus hábitos alimentares e da inoculação de uma substância anticoagulante que provoca grandes perdas de sangue, edema submandibular, emagrecimento devido a diarréias, podendo levar o animal a morte devido à formação de áreas hemorrágicas e edema generalizado no estômago. São observados ainda diminuição de hematócrito, redução de peso, de gordura corpórea e retenção de sódio em bezerros infectados com *Haemonchus* spp. Esta retenção de água e redução de gordura corpórea indica um maior gasto energético do hospedeiro, devido a diversos fatores como por exemplo, estímulo de resposta imune pelos endoparasitos (POMPEU et al, 1997). Estes sintomas fazem com que haja decréscimo progressivo de produção de carne e leite (PLOEGER; KLOOSTERMAN, 1993; FORTES, 1997).

2.2.2. Diagnóstico

Um dos métodos mais utilizado para diagnosticar os nematódeos gastrintestinais é a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) que relaciona diretamente o número de parasitos, sua fecundidade, assim como identificação morfológica (STEAR et al, 1997). Em alguns casos, a estrutura e tamanho do ovo podem ser diagnósticos, entretanto, na maioria dos casos, a similaridade entre ovos de diferentes espécies apresenta-se muito alta, necessitando de métodos alternativos para sua diferenciação. Outro método utilizado para identificação de nematódeos em ruminantes envolve o cultivo *in vitro* de larvas infectantes no 3º estágio, acompanhado pela identificação morfológica. Esse método envolve mais de vinte caracteres a serem analisados, além de análise computacional e assimilação de dados para se obter o resultado final (GASBARRE et al, 1996).

Atualmente, técnicas genéticas também estão sendo utilizadas no diagnóstico de endoparasitoses. CHRISTENSEN et al (1994) identificaram e clonaram fragmentos de DNA repetitivo gênero-específico de nematódeos gastrintestinais, possibilitando um método sensível, específico e que distingue os

diversos tipos de ovos presentes no hospedeiro. ZARLENGA et al (2001) desenvolveram uma técnica de PCR multiplex para distinguir um grupo destes nematódeos, a partir de DNA de ovos presentes nas fezes, facilitando o diagnóstico.

2.2.3. Controle

Historicamente, o controle de parasitos gastrintestinais era feito pela aplicação de programas complexos que mantinham os animais suscetíveis estabulados e minimizavam a exposição destes em pastagens infectadas. O desenvolvimento de drogas anti-helmínticas de amplo espectro e alta eficácia revolucionou a natureza dos programas de controle parasitário, pois o controle depende geralmente de repetidas aplicações de anti-helmínticos como ivermectinas, benzimidazoles e imidazoles em uma proporção cada vez maior (ZARLENGA et al, 2001). Entretanto, a utilização muitas vezes indiscriminada de vermífugos fez com que a maioria dos parasitos se tornassem resistentes aos medicamentos (STAFFORD;COLLES, 1999; MOTTA et al, 2003). Esta resistência aparece como uma variante das espécies de parasitos e dos regimes adotados no controle de endoparasitos. Esta tem sido uma preocupação constante pois os nematodeos gastrintestinais, em especial *Haemonchus* e *Teladorsagia*, têm desenvolvido resistência contra todos os maiores grupos de anti-helmínticos utilizados atualmente (JABBAR et al, 2006). Relatos descrevendo o desenvolvimento da resistência a anti-helmínticos são observados em praticamente todo o mundo desde 1950, quando pela primeira vez foi observada a falha de fenontiazina no controle de *Haemonchus* (JABBAR et al, 2006). Anziani et al (2004) relatam a resistência de bovinos infectados com nematódeos a ivermectinas, benzimidazoles. Mattos et al (2004) verificaram a presença de *Haemonchus contortus* em caprinos após aplicações orais sucessivas de ivermectina constatando a ineficácia do medicamento. Mason e McKay (2006) observaram resistência de *Cooperia* em bezerros tratados com ivermectina e eprinomectina, além de constatar também resistência de *Trichostrongylus* e *Ostertagia* quando tratados separadamente com diferentes anti-helmínticos. Soutello et al (2007) observaram no Estado de São Paulo resistência de *Cooperia* spp e *Haemonchus* spp, após o tratamento de bovinos infectados naturalmente realizado lavamisole fosfato, ivermectina, sulfóxido de albendazol e moxidectina de acordo com a recomendação dos fabricantes.

A resistência que vem sendo observada se deve a vários fatores como

utilização de doses sub-ótimas, que permitem a sobrevivência de indivíduos resistentes; a frequência do tratamento, pois tem-se observado que em locais onde há maior número de tratamentos, há maiores problemas relacionados à resistência. Por essas razões, tratamentos profiláticos não são aconselhados. Repetidos tratamentos com o mesmo anti-helmíntico, tratamento de espécies diferentes com a mesma dose e introdução de parasitos resistentes provenientes de outras regiões também levam a resistência dos nematóides (JABBAR et al, 2006).

O aumento na utilização de drogas resultou em um outro problema, que é o acúmulo de produtos químicos existentes na carne, que podem trazer problemas à saúde humana (SONSTERGARD;GASBARRE, 2001). Conseqüentemente há uma tendência de desenvolver sistemas alternativos de produção, que são conhecidos como sustentáveis e limitam o uso de produtos químicos no rebanho. Para estes produtores é importante que se identifique os animais com maior número de parasitos, bem como aqueles que apresentam as espécies mais patogênicas, como por exemplo, *Haemonchus* spp, *Cooperia* spp e *Ostertagia* spp, para que auxilie o desenvolvimento de programas de controle e redução no número de tratamento com drogas desnecessárias (ZARLENGA et al, 2001).

A utilização de fungos nematófagos como controle biológico tem apresentado resultados satisfatórios. Embora ainda não seja viável comercialmente (LARSEN et al, 1997), num futuro próximo, pode vir a ser uma das alternativas para a diminuição do uso de drogas anti-helmínticas (MAINGI et al, 2006). MELO et al (2003) confirmaram a atividade predatória do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra nematóides do gênero *Haemonchus* spp, após atravessar o trato gastrointestinal de caprinos, observando uma redução média de 79,24% no número de larvas após a administração fúngica. Em contrapartida, ainda há uma baixa infectividade e alta taxa de mortalidade dos fungos, o que dificulta a obtenção de resultados favoráveis para a utilização desta técnica em grande escala (JABBAR et al, 2006).

Seleção genética tradicional é muito efetiva na seleção de traços econômicos de alta herdabilidade, como no caso de muitos caracteres de produção por estes apresentarem abundante variação genética na maioria das populações. Em contrapartida, a seleção é limitada quando os caracteres de interesse apresentam média a baixa herdabilidade como, por exemplo, resistência a doenças,

reprodução e longevidade produtiva (SONSTERGARD; GASBARRE, 2001; MORRIS, 2006). Métodos efetivos de controle de parasitos podem ser desenvolvidos por meio da análise de imunidade. Estas respostas modificam-se de acordo com a morfologia, fisiologia, número de re-infecções e estádios infectantes do parasito. As metodologias que utilizam manipulação genômica oferecem novas alternativas para a compreensão e a modulação da relação parasito-hospedeiro (SIEFKER; RICKARD, 1998; SONSTERGARD; GASBARRE, 2001).

Além disso estudos relacionados com estratégias de manejo de pastagens associadas a tratamentos com anti-helmínticos, com o controle da relação parasito – nutrição do hospedeiro, desenvolvimento de testes com possíveis vacinas e utilização de plantas como anti-helmínticos têm sido realizados buscando desenvolver novas soluções para o problema das helmintoses. Mas para isso ainda é necessário mais conhecimento da biologia, da epidemiologia dos parasitos e principalmente das suas interações com os hospedeiros em um determinado ambiente e sistema produtivo para que seja estabelecido um sistema de controle parasitário efetivo (BARGER, 1999). A falta dessas informações implica em inadequados tratamentos anti-helmínticos, relacionados ao rápido desenvolvimento de resistência, aumento de casos clínicos e mais perdas produtivas (MOTA et al, 2003).

2.3. Diferenças entre raças de bovinos

A resposta dos bovinos às infecções por diferentes tipos de parasitos é feita por muitos mecanismos. A variação genética entre e dentro de raças tem sido amplamente estudada visando entender quais são os genes e mecanismos envolvidos na resistência ou suscetibilidade das raças (BISHOP et al, 2003; MORRIS, 2006).

As raças de origem zebuínas são geralmente consideradas mais resistentes a doenças, a altas temperaturas e a outros fatores estressantes presentes nas regiões tropicais quando comparadas com às de origem taurina (KUMAR et al, 2005). Essa resistência está associada a estabilidade endêmica destas raças, já que o gado zebuíno tem uma relação muito antiga com um grande número de parasitos. Em contrapartida as raças européias apresentam esta relação mais recente (MATTIOLI et al, 2000), pois foram introduzidos tardiamente nas

regiões tropicais.

A resistência genética a doenças causadas por diferentes agentes etiológicos como mastite, ectoparasitoses, ceratoconjuntivites, doenças respiratórias, tuberculose, brucelose, febre-aftosa e helmintoses já foram relatadas e comprovadas em diversos estudos (GLASS et al, 2005; MORRIS, 2006). Glass et al (2005), por exemplo, observaram que animais da raça Sahiwal resistentes a teileriose têm habilidade de produzir maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias do que os animais da raça Holandesa, o que indica que esses últimos apresentam uma maior dificuldade de reduzir parasitemia e os sintomas da doença. Gasbarre et al (2001) também concluíram a partir de vários estudos que a quantidade de OPG nas fezes dos animais depende diretamente da genética do hospedeiro.

Os genes que conferem a resistência ou suscetibilidade à infecção por endoparasitos estão relacionados aos diferentes tipos de resposta imune (MATTIOLI et al, 2000; SONSTEGARD; GASBARRE, 2001). Desta maneira, a identificação de genes envolvidos nessa variação, assim como o esclarecimento de sua função na infecção deve ser explorada com o objetivo de caracterizar os diferentes tipos de resposta e poder, por exemplo, implantar novos métodos de controle (GLASS et al, 2005).

2.4. Resposta Imune e Interação Parasito-Hospedeiro

Como já foi dito anteriormente, os mecanismos de resistência a parasitos gastrintestinais ainda não são totalmente compreendidos (GILL et al, 1993), mas se sabe que os mecanismos imunes ativados contra diferentes helmintos são únicos e adaptados aos diversos estádios dos ciclos de vida, o que indica que estudos detalhados para identificar antígenos do parasito e respostas imunológicas celulares e moleculares a eles associados ainda são necessários (ELSE; FINKELMAN, 1998).

O sistema imune está envolvido primeiramente na defesa do hospedeiro contra invasão de patógenos, evitando reações próprias, isto é, contra epítomos do próprio organismo. Células T têm sido caracterizadas como as principais condutoras destas respostas, mas diferentes caminhos são utilizados, como a imunidade inata e imunidade por células B, que também são imprescindíveis para a

defesa do hospedeiro. Em contrapartida, os parasitos apresentam mecanismos para evadir-se da imunidade protetora, reduzindo sua imunogenicidade e inibindo a resposta imune do hospedeiro (GASBARRE et al, 2001; ABBAS et al, 2003).

Nos estádios larvais infectantes de *Haemonchus* deve ocorrer acúmulo de leucócitos que podem gerar a rejeição do parasito no epitélio gastrintestinal. Essas células desencadeiam a liberação de potentes mediadores que ligam o sítio de IgE ao antígeno, promovendo a expulsão. Uma vantagem da rápida expulsão mediada por células epiteliais é que não há resposta inflamatória nos tecidos infectados do animal. Quando a intensidade da infecção decresce, assim como o número de leucócitos, ocorre uma fase crítica para expulsão larval. Ocorre que algumas L3 se mantêm no tecido, sendo capazes de gerar resposta inflamatória caracterizada pelo aparecimento de eosinófilos e citocinas Th2 (MEEUSEN et al, 2005). É nesta fase, que grande parte dos hospedeiros torna-se resistente a reinfecções. Estudos mostraram que os bovinos desenvolveram resposta imune protetora à infecção com os endoparasitos do gênero *Cooperia*, principalmente após reinfecções (GASBARRE et al, 2001).

A presença e o tipo de infiltrado celular no local da infecção podem ser indicadores dos mecanismos envolvidos na defesa. Em ovinos, mastócitos e eosinófilos estão envolvidos na resposta imune e rejeição a parasitos da espécie *Haemonchus contortus*. Eosinófilos são recrutados no tecido abomasal de ovelhas durante a infecção primária (BALIC et al, 2000; BALIC et al, 2002), onde invadem especificamente o tecido larval (BALIC et al, 2006). Atualmente, têm-se sugerido que esta ativação de eosinófilos, que auxilia na morte do parasito, é realizada por citocinas (BALIC, 2006). AMARANTE et al. (2005) encontraram uma relação inversamente proporcional entre células inflamatórias e proporção de IgA e a carga parasitária encontrada, sugerindo que deve haver um mecanismo específico na variação da resistência entre diferentes raças e espécies que são hospedeiros de *Haemonchus*. Gill et al (2000) também concluíram que ovinos resistentes a *Haemonchus contortus* apresentam altas contagens de eosinófilos e mastócitos na mucosa abomasal.

Bricarello et al (2007) estudando bovinos Nelore resistentes e sensíveis à infecção por *H. placei* relacionaram altos níveis de IgE, baixa quantidade de ovos por gramas de fezes e altas contagens de eosinófilos no sangue com resistência a

endoparasitos gastrintestinais.

Em estudos com outro parasito gastrintestinal, YATSUDA e VIEIRA-BRESSAN (2000) observaram aumento no total de anticorpos IgG e IgG1 contra larvas do estágio L3 em *Cooperia punctata*, evidenciando a presença de resposta imune humoral contra antígenos L3. Foi demonstrado posteriormente que a memória da resposta imune humoral em *Cooperia oncophora* pode ser gerada a partir do primeiro contato com doses do estágio larval L3, promovendo a produção de altos níveis de anticorpos específicos a *Cooperia* no soro e na mucosa intestinal do hospedeiro. Além disso, foi possível observar que tanto o desafio com doses baixas (30.000 larvas) quanto com doses altas (100.000 larvas) há indução desta resposta imune, tanto no soro quanto na mucosa de superfície (KANOBANA et al, 2003).

KANOBANA et al (2002) também verificaram que a maioria dos segmentos do intestino delgado que apresentavam evidente infecção parasitária por *Cooperia oncophora* era encontrada nos primeiros seis metros do intestino. A geração de imunidade em hospedeiros com respostas intermediárias induziu a migração de parasitos adultos para a parte distal do intestino. A presença de linfócitos específicos como TCR1, por exemplo, não foi observada. Entretanto, houve aumento significativo de eosinófilos na região de mucosa e diminuição nas contagens de OPG. Aumento de IgA e IgG1 foi maior nesses animais do que nos mais sensíveis, sendo que IgA foi maior na superfície de mucosa, enquanto IgG1 foi mais abundante no soro. Assim, IgA e eosinófilos atuam de forma clara contra adultos de *C. oncophora* reduzindo a fecundidade, carga parasitária e promovendo expulsão dos endoparasitos.

Além dessas repostas à infecção por endoparasitos e com a elucidação de mecanismos genéticos relacionados com a variação da resistência em diferentes espécies, acredita-se que citocinas Th1 e Th2 exerçam um importante papel nos efeitos imunorregulatórios em resposta a infecções helmínticas (MEEUSEN et al, 2005; HUSE et al, 2006).

2.5. Polarização Th1/Th2

As células T virgens são as primeiras células circulantes da imunidade adaptativa, ou seja, são as que encontram os antígenos e, nos órgãos linfóides, se tornam ativadas. Nesta etapa, as células são guiadas de maneira a iniciar uma resposta mediada por ativação de macrófagos ou por anticorpos (JANEWAY et al, 2007).

Os mecanismos exatos que fazem esta diferenciação ainda não foram totalmente evidenciados, mas se acredita que a polarização de células T CD4⁺ em tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) apresentem importante função (CONSTANT e BOTTOMLY, 1997; LIEW, 2002; JANEWAY et al, 2007) .

A hipótese de diferenciação das células T CD4⁺ em Th1 e Th2 foi sugerida por Mosmann no final dos anos 80 que observou em ratos dois subtipos de células que diferiam devido ao padrão de secreção de citocinas e outras funções. Desde então, muitos estudos foram e estão sendo realizados, evidenciando este padrão de diferenciação para diversas espécies (KIDD, 2003).

Os dois subtipos de células T derivam de uma célula T CD4 pluripotente virgem. Após alguns dias em contato com as células apresentadoras de antígeno (APCs) ocorre o processo de polarização, em que as células virgens saem de um estado transitório de pré-ativação (Th0) para Th1 ou Th2. A polarização Th1 relaciona-se com a secreção primeiramente de IFN- γ , IL-12 seguido por IL-2 , IL-3. Em contrapartida, células Th2 são caracterizadas principalmente pela secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (KONNAI et al, 2003; HUSE et al, 2006; JANEWAY et al, 2007). A Figura 3 demonstra o perfil de polarização Th1 e Th2.

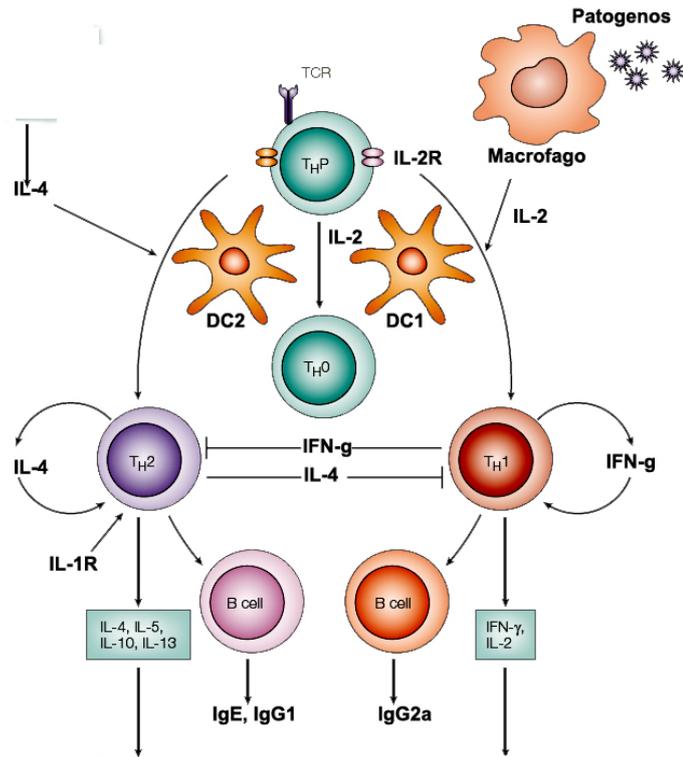


Figura 3. Polarização Th1-Th2. Adaptado de LIEW, 2002

A ativação de células Th1 ou Th2 é determinada pelo tipo de patógeno ou antígeno que entra em contato com as células. Acredita-se que patógenos intracelulares, como bactérias, vírus e protozoários direcionem uma resposta por células Th1, enquanto que helmintos e parasitos extracelulares são caracterizados por uma resposta Th2 (LIEW, 2002; HUSE et al, 2006). Entretanto, variações a este padrão já foram observados em algumas espécies. Em murinos este padrão é característico, enquanto que em outras espécies, como em bovinos, não está totalmente confirmado (BROWN et al, 1998).

2.6. Citocinas

As citocinas são proteínas regulatórias que apresentam um papel central no sistema imune através da modulação das respostas imunes, como ativação de linfócitos, apoptose, proliferação e diferenciação celular (JANEWAY et al, 2007). Apresentam baixo peso molecular, sendo secretadas por diferentes tipos celulares, mais proeminente por linfócitos, células apresentadoras de antígenos,

monócitos, células endoteliais e fibroblastos (GIULLIETI et al, 2001). Medeiam a imunidade inata sendo produzidas principalmente pelos macrófagos, como por exemplo fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1); reações inflamatórias agudas aos microrganismos, pelas quimiocinas, como o recrutamento de linfócitos para os sítios de inflamação e pela ação de interleucina 12 (IL-12). Estimulam a produção de interferon gama (IFN- γ). Também ativam macrófagos e interleucina 10 (IL-10). Atuam também na imunidade adquirida, como a interleucina 2 (IL-2), o principal fator de crescimento de células T, interleucina 4 (IL-4), que estimula produção de imunoglobulina E (IgE), interleucina 5 (IL-5), que ativa eosinófilos, entre outros que são descobertos cotidianamente (ABBAS et al, 2003; JANEWAY et al, 2007).

2.6.1. Interleucina-2 (IL-2)

É uma citocina da família das hematopietinas e caracterizada como um citocina Th1. Sua função é induzir proliferação e ativação de células T CD4⁺, assim como de células T CD8, células NK e secreção de IFN- γ , que aumenta a expressão de células do MHC de classe I na superfície das células alvo (DYBKAER et al, 2007; JANEWAY et al, 2007). O gene localiza-se no cromossomo 6 de bovinos com 3149 pares de bases (Genbank: NC_007304).

IL-2 está presente em altas quantidades em infecções causadas por parasitos intracelulares, conferindo proteção aos hospedeiros, como no caso de *Theileria parva* (HONDA et al, 1998). Entretanto, em infecções com parasitos gastrintestinais, há uma variação no padrão de expressão desta citocina .

CANALS et al (1997) encontraram altos níveis de IL-2 em linfonodos de bezerros livres de infecção com *Ostertagia ostertagi*, enquanto nos animais infectados houve um decréscimo de cerca de 10 vezes na expressão deste gene, o que sugere um decréscimo de resposta Th1. ZAROS (2006) encontrou níveis de expressão de IL-2 mais altos em intestinos de grupos de bovinos sensíveis a infecções por parasitos gastrintestinais quando comparado ao grupo de animais considerado resistente, indicando relação com a sensibilidade a infecções por endoparasitos, mas não encontrou diferenças em linfonodos e abomasos analisados. CLAEREBOUET et al (2005) não observaram diferenças na presença de IL-2 em linfonodos, nem em mucosa do abomaso entre grupos de bezerros

infectados e não infectados com *Ostertagia ostertagi*. Como se pode perceber há muitas diferenças encontradas em diversos estudos no padrão de expressão de IL-2, o que concorda com os dados de Brown et al (1998) que não há um perfil definido na expressão de citocinas de bovinos.

2.6.2. Interleucina 4 (IL-4)

IL-4 é também uma citocina da família das hematopoetinas. É produzida por células T e mastócitos e têm como principais funções ativação de células B, mudança para IgE e é uma das primeiras a induzir diferenciação em células Th2 (TORRES et al, 2004; JANEWAY et al, 2007). Seu gene está localizado no cromossomo 7, contendo 4 éxons e um transcrito de 570 pares de bases (ENSEMBL: ENSBTAT00000021215).

Respostas protetoras a endoparasitos gastrintestinais têm sido associadas ao aumento na produção de citocinas Th2, sendo que IL-4 apresenta papel de destaque em infecções causadas por parasitos gastrintestinais em muitas espécies (ELSE e FINKELMAN, 1998; GRENCIS, 2001; MEEUSEN et al, 2005).

IL-4 tem a capacidade de conferir resistência e proteção a infecções causadas por endoparasitos, como *Trichuris muris*, *H. polygirus*, *Haemonchus*, *Nippostrongylus*, *Teladorsagia circumcincta* (ELSE;FINKELMAN, 1998; ERB et al, 2002; CLAREABOUT et al, 2005; CRAIG et al, 2007). Em ratos nocauteados para IL-4, há observação de sensibilidade a infecções com *T. muris* (ELSE;FINKELMAN, 1998). CRAIG et al (2007) encontraram altos níveis de expressão de mRNA de IL-4 em ovinos infectados por *Teladorsagia circumcincta* e resultados semelhantes foram encontrados na comparação de bovinos infectados e não infectados por *Ostertagia ostertagi* (CLAREABOUT et al, 2005). Acredita-se que esta proteção esteja relacionada à ativação de vários fatores de transdução de sinal e ativação como Stat 6, através da ligação ao receptor de IL-4. Isto traz mudanças no epitélio e movimentos de contração do intestino, acompanhado de aumento no número de mastócitos na região da infecção (FINKELMAN et al, 2006).

Outra função atribuída à IL-4 é a expulsão dos parasitos (GARSIDE et al 2000; LAWRENCE, 2003). GARSIDE et al (2000) encontraram que nematódeos parasitos de ratos *Trichinella spirallis* são expulsos por respostas Th2,

especificamente por IL-4, regulando também outras enteropatias. GILL et al (2000) observaram o aumento da produção de interleucina 5 (IL-5) nos linfonodos gastrintestinais estimulando a expulsão do parasito, além de secreção de IL-4 que estimula a produção de IgE e eosinofilia e posterior expulsão de parasitos (ABBAS et al, 2003).

Além disso, IL-4 é superexpressa em apenas algumas fases específicas da infecção, e principalmente nas primeiras fases da infecção. Em ratos infectados por *Haemonchus contortus* foi observado que há indução de produção de IL-4, IL-5 e IL-13 no terceiro dia pós-infecção. Já em ovinos primariamente infectados houve aumento de IL-5 e IL-13 no terceiro dia após a infecção, enquanto que IL-4 teve maior expressão no quinto dia após a infecção (BALIC, 1999 *apud* MEEUSEN et al, 2005). CRAIG et al (2007) verificou que IL-4 é superexpressa apenas no grupo de ovinos previamente imunizados com *T. circumcincta*, enquanto que em animais *naïves* submetidos à primeira infecção não houve alteração nos níveis desta interleucina.

2.6.3. Interleucina 12 (IL-12)

A interleucina 12 é produzida por macrófagos e células dendríticas e tem função de ativar células NK e induzir polarização Th1 (JANEWAY et al, 2007). O gene encontra-se no cromossomo 1 de bovinos, com 6700 pares de bases (Genbank: NC_007299).

O aumento de IL-12 é verificado em infecções causadas por vírus e bactérias conferindo proteção e morte do microorganismo (JANEWAY et al, 2007). Em infecções causadas por helmintos, a presença de IL-12 está relacionada à suscetibilidade pelos hospedeiros, a não expulsão dos parasitos e conseqüente desenvolvimento de infecção crônica (GARSIDE et al, 2000; GRENCIS, 2001). Esse fato foi demonstrado em cobaias resistentes à *T. muris*, nas quais a administração de IL-12 promoveu o desenvolvimento de infecção crônica (GRENCIS, 2001). O estabelecimento desta cronicidade pode ser explicado porque na presença de IL-12 (citocina Th1) há a inibição do perfil de citocinas Th2, como descrito por Hewitson et al (2007), que observaram polarização de Th1 após administração de IL-12, mas não imunidade protetora em infecções por *S. mansoni* e *Entamoeba histolytica*

(PFAFF et al, 2003). Em bezerros infectados por *Ostertagia ostertagi* foi relatado uma diminuição da expressão de IL-12 em linfonodos abomasais, enquanto que para mucosa do abomaso não houve diferenças na expressão de IL-12 (CLAREABOUT et al, 2005). Zaros (2006) encontrou baixa expressão de IL-12 em bovinos sensíveis infectados com helmintos gastrintestinais. Entretanto em linfonodos abomasais de ovinos infectados com *Haemonchus contortus* essa interleucina não teve expressão variável, não sendo possível correlacionar esses resultados com desenvolvimento e fecundidade de helmintos no hospedeiro (LACROUX et al, 2006).

Estudos também mostram uma segunda atividade em que IL-12 poderia promover a polarização Th2. Esta é uma atividade chamada de independente de IFN- γ (MOUNTFORD;PEARLMAN, 1998). Cobaias infectadas com *Trichinella spiralis* foram capazes de expelir os parasitos após 15 dias de infecção. A administração de IL-12 aumentou a resposta de quimiocinas, interleucinas e seus receptores, possibilitando essa resposta à infecção (HELMBY;GRENCIS, 2003).

2.6.4. Interleucina 13 (IL-13)

A IL-13 é pertencente a família das hematopietinas, que é produzida por células T e tem função de auxiliar no desenvolvimento de células B, polarizar resposta Th2 e inibir a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos e células Th1 (JANEWAY et al, 2007). O gene localiza-se no cromossomo 7 de bovinos, apresenta cerca de 2000 pares de bases e está adjacente a interleucina 4 (GenBank: NC_007305).

IL-13 foi a primeira interleucina conhecida com efeitos em células B e monócitos, aumentando a expressão de Th2 e IgE e inibindo citocinas inflamatórias (WYNN, 2003). Compartilha muitas funções com IL-4 e, apesar da proximidade física e funcional, em camundongos há apenas 30% de homologia entre as seqüências gênicas. Entretanto existe um alto nível de conservação na seqüência terciária destas moléculas (BANCROFT et al, 1998). Entre as funções semelhantes à IL-4 estão a proteção a lipopolissacarídeo em ratos, aumento da expressão de marcadores de superfície de MHC de classe II em monócitos e macrófagos, além das funções básicas já citadas. Contudo, não é um fator de crescimento de células

T, embora influencie o desenvolvimento dessas células. Estudos com ratos nocauteados para o gene da IL-13 mostraram que apresenta funções como neutralização de anticorpos e funções efetoras únicas que a diferenciam de IL-4 (BANCROFT et al, 1998; WYNN, 2003).

Apresenta um papel dominante na resistência a infecções por nematódeos gastrintestinais em diferentes espécies (ELSE e FINKELMAN, 1998; GARSIDE et al, 2000; WYNN, 2003; CLAREABOUT et al, 2005). Em experimentos com camundongos nocaute para IL-13, infectados por *T. muris*, foi observada inabilidade de expelir os parasitos, mesmo na presença de outras citocinas Th2 (BRANCROFT et al, 1998). Finkelman et al (2006) observaram que ratos parasitados com *Nippostrongylus brasiliensis* foram incapazes de diminuir produção de ovos por grama de fezes e expulsar parasitos na ausência de IL-13. Isto é possível pois IL-13 é capaz atuar em células intestinais aumentando a quantidade e qualidade de muco intestinal, o que possibilita a expulsão.

Muitos estudos com bovinos e ovinos também evidenciam a importância desta citocina em infecções por helmintos. Pernthaler et al (2005) observaram aumento na expressão dos genes de IL-5, IL-13 e TNF- α em células provenientes de linfonodos intestinais de ovelhas durante a infecção por *Trichostrongylus colubriformis*. Em ovinos infectados com *Haemonchus contortus* há aumento na expressão na mucosa do abomaso em grupos de animais infectados (LACROUX et al, 2006). CRAIG et al (2007) observaram aumento significativo de expressão de IL-13 em ovinos infectados com *Teladorsagia circumcincta* após 5 dias da primeira infecção, o que não ocorreu para o tempo de 10 dias pós-infecção, indicando um efeito temporal de IL-13, imprescindível no início da infecção. Clarebout et al (2005) e Zaros (2006) observaram em bovinos infectados com diferentes helmintos aumento na expressão de IL-13, principalmente em animais resistentes, tanto em linfonodos abomasais quanto na mucosa do abomaso, indicando relação com a resistência a endoparasitoses.

2.6.5. Interferon gama (IFN- γ)

Pertencente a família dos interferons, é produzido por células T e NK, atuando sobre ativação de macrófagos, promovendo aumento de expressão de moléculas de MHC, dos componentes de processamento de antígenos, mudança de classe de imunoglobulinas e supressão de Th2 (JANEWAY et al, 2007). O gene está no cromossomo 5 de bovinos, com aproximadamente 4800 pares de bases (GenBank: NC_007303).

A presença de IFN- γ é caracterizada por conferir resistência a infecções contra vírus e bactérias (KIDD, 2003; JANEWAY et al, 2007). Já em infecções por helmintos *T. muris* e *T. spiralis* linhagens suscetíveis de ratos e camundongos apresentam alta expressão de IFN- γ (ELSE e FINKELMAN; 1998; GRENCIS, 2001).

Em contrapartida ao paradigma Th1/Th2, foi observado aumento na expressão de IFN- γ e citocinas Th2. Meeusen et al (2005) identificaram diferença no padrão de expressão gênica quando compararam os níveis de diversas interleucinas nos diferentes períodos analisados. No terceiro dia pós-infecção foi possível identificar aumento de IFN- γ e IL-5, enquanto que no quinto dia, houve altos níveis de IL-4. Nakamura et al (2002) administraram IFN- γ em bovinos infectados com *Strongyloides pappulosos* e obtiveram diminuição na contagem de OPG e aumento na expulsão de helmintos. Canals et al (1997) observaram aumento de expressão de IFN- γ em bovinos primariamente infectados com *Ostertagia ostertagi*. Clarebout et al (2005) também obtiveram decréscimo nos níveis de citocinas Th1, inclusive IFN- γ em linfonodos de animais não infectados por este mesmo parasito, enquanto que em mucosa do abomaso, observou superexpressão de IFN- γ , IL-4 e IL-13.

A variação no perfil de expressão de IFN- γ frente a diferentes infecções por helmintos tem sido explicada por duas hipóteses: primeiro pela resposta Th1/Th2 não ser conservada em bovinos (CANALS et al, 1997), segundo, porque se acredita que quando uma resposta Th2 é muito forte, ela pode causar danos ao hospedeiro, de forma que o aumento na concentração de IFN- γ atuaria equilibrando assim reações adversas ao hospedeiro (WALDVOGEL et al, 2004).

2.6.6. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

Classificado na família dos fatores de necrose tumoral, o TNF- α é produzido por macrófagos, células NK e células T e atua na inflamação local e ativação endotelial. O gene está localizado no cromossomo 23 de bovinos, possui 1800 pares de bases (GenBank: NC_007324).

TNF- α é considerada uma citocina essencial na coordenação de infecções gastrintestinais, pois exerce muitos efeitos protetores na mucosa, estimulando proliferação de células intestinais e exercendo uma atividade citotóxica ao helminto (RIFKIN et al, 2000). Riffkin et al (2000) observaram aumento na produção desta citocina e de seu receptor em experimentos contendo extrato de *T. columbriformes*.

Outra função atribuída a TNF- α é a indução de resposta Th2 em infecções causadas por helmintos. Em ratos deficientes para TNF- α infectados com *T. muris* e *T. spiralis* foi observado uma redução na expressão de IL-4 e IL-13. Embora esta baixa expressão acarretasse uma alteração no microambiente intestinal, diminuindo a sobrevivência dos parasitos, e parte da resposta protetora fosse mantida, os animais perdiam habilidade de expelir parasitos. Isto sugere que TNF- α possa regular a atividade de IL-4 e IL-13 nestes tipos de patologias (GARSIDE et al, 2000; LAWRENCE, 2003). Babu et al (2003) encontraram também que em infecções com filária, havia primeiro um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, em especial, TNF- α e, somente depois, havia aumento de IL-4 e IL-13.

É possível também que TNF- α seja responsável por mediar efeitos patológicos causados por infecções gastrintestinais por meio da produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Esta substância pode melhorar os sintomas da enteropatia, conferindo mais uma vez proteção ao hospedeiro (GARSIDE et al, 2000; JANEWAY et al, 2007).

Além das interleucinas, quimiocinas também têm sido caracterizadas e observadas em infecções por helmintos gastrintestinais (MEEUSEN et al, 2005). As quimiocinas são pequenas proteínas quimiotáticas que apresentam função na migração e ativação de células linfocitárias e fagocitárias (JANEWAY et al, 2007). Em humanos quatro quimiocinas que atuam na regulação e migração de linfócitos já

são conhecidas. Em ovinos, a primeira a ser caracterizada foi a MCP-1 α (MEEUSEN et al, 2005). Dunphy et al (2001) observaram aumento desta quimiocina nas mucosas gastrintestinais, em resposta a infecções helmínticas por *Haemonchus contortus*. Em bovinos, poucos são os dados disponíveis sobre as quimiocinas.

2.6.7. Interleucina 8 (CXCL8 ou IL-8)

CXCL8 recebe esta denominação por apresentar dois resíduos de cisteínas (C) intercalados por um outro aminoácido qualquer (X). Atua como fator quimiotático de neutrófilos, basófilos e células T, não atuando sobre eosinófilos e mastócitos (ROT e ANDRIAN, 2004; JANEWAY et al, 2007). Seu gene localiza-se no cromossomo 6 de bovinos e apresenta cerca de 3000 pares de bases (GenBank: NC_007304).

A IL-8 é o principal fator de ativação da migração de neutrófilos, incluindo migração endotelial, aumento na expressão de marcadores CD11/CD18 e ICAM-1 que têm a capacidade de degradar peptídeos bacterianos e promover a morte de outros patógenos intracelulares (CASSWELL et al, 1999). Também é muito característico na ativação da hipersensibilidade tardia em infecções por carrapatos por exemplo, em que a reação aparece horas ou até dias após entrar em contato com antígeno (JANEWAY et al, 2007). Entretanto, em bovinos infectados com parasitos gastrintestinais poucos são os trabalhos realizados com IL-8.

Molina (2005) investigou o perfil de IFN- γ , IL-6 e IL-8 em búfalos e bovinos infectados com *Fasciola gigantica* 16 semanas após o contato com parasito, observando assim o padrão de uma infecção crônica. Seus resultados mostram que houve aumento da expressão de IL-8 e IL-6 em búfalos, enquanto que para bovinos houve superexpressão apenas de IL-6. Estes dados são semelhantes aos de Zaros (2006) que também não encontrou diferenças na expressão de IL-8 em bovinos infectados por helmintos gastrintestinais.

2.6.8. Quimiocina CC ligante 2 ou Proteína de atração de monócitos 1 (MCP-1)

Inicialmente foi denominada de proteína de atração de monócitos, mas hoje já se sabe que ela é um fator quimiotático de células NK e dendríticas de

humanos, células T de memória e basófilos (DESCHOLLMEESTER et al, 2003; JANEWAY et al, 2007). Seu gene está localizado no cromossomo 19 de bovino.

Poucos são ainda os estudos realizados com CCL2, mas estudos com *T. spiralis* em camundongos demonstram que é responsável por induzir sintomas patológicos aumentando a inflamação, enquanto que cobaias deficientes para MCP-1 têm estes sintomas amenizados (LAWRENCE, 2003). Em bovinos infectados naturalmente com diferentes helmintos gastrintestinais não foi detectada diferença de expressão entre linfonodo e tecido abomasal de grupos resistentes e sensíveis, mas foi observada uma expressão elevada no tecido intestinal dos animais do grupo sensível (ZAROS, 2006). No entanto, em infecções por *T. muris* altos níveis de CCL2 foram relacionados com resistência a endoparasitoses, também com a habilidade de expelir helmintos e de induzir polarização Th2. Animais deficientes para CCL2 eram totalmente incapazes de expelir *T. muris*, expressavam baixas concentrações de IL-4 e decréscimo no recrutamento de macrófagos (DESCHOLLMEESTER et al, 2003). Em ovinos infectados e não infectados foram encontrados baixos níveis gerais desta citocina em tecido abomasal, mas foi possível detectar aumento da expressão nos tecidos infectados, indicando um importante papel no recrutamento de leucócitos e em resposta à infecção (DUNPHY et al, 2001).

2.6.9. Outras moléculas

As superfícies mucosas são vulneráveis a infecções e por isso apresentam vários mecanismos imunes inatos e adaptativos específicos. Apresentam placas de Peyer, células M importantes para o reconhecimento do antígeno e sua posterior morte ou expulsão (JANEWAY et al, 2007). Além disso, deve haver um sistema integrado de tecidos linfóides, não linfóides, moléculas efetoras, anticorpos, citocinas, macrófagos, células apresentadoras de antígenos que seja capaz de reconhecer exatamente antígenos dos microrganismos presentes normalmente no trato gastrintestinal (NEURATH et al, 2002). Dentre estas moléculas destacam-se as mucinas.

As mucinas são grandes glicoproteínas poliméricas que podem ser classificadas de acordo com sua localização, sua estrutura e formas de secreção, componentes da imunidade inata do hospedeiro. São produzidas pelas células

globulares no intestino e cólon e por células de muco no estômago (MONCADA et al, 2003). São responsáveis por manter o delicado balanço entre a baixa expressão de genes que causam reações inflamatórias e a capacidade de responder a patógenos eficientemente (DIDIÉRLAURENT et al, 2002). Assim, acredita-se que elas possam de alguma forma ativar a imunidade adaptativa. Dentre as mais conhecidas estão lisozimas, defensinas, fatores trefoin e receptores *Toll like* (DIDIÉRLAURENT et al, 2002; MONCADA et al, 2003).

2.7. Quantificação de citocinas

Existem diversas metodologias que são utilizadas para permitir o entendimento dos mecanismos da resposta imune como, por exemplo, ELISA, citometria de fluxo e colorações intracelulares (KONNAI et al, 2003). Estas são técnicas muito utilizadas principalmente para diagnóstico e mesmo na descoberta de perfil de expressão de anticorpos, entre outras proteínas. Em contrapartida, em estudos que têm como objetivo caracterizar o perfil de citocinas, por exemplo, estas técnicas não são tão sensíveis quando a quantidade de material biológico disponível para análise é limitado. Isto faz com que citocinas presentes em baixas concentrações não sejam detectadas (BLASCKHE et al, 2000; KONNAI et al, 2003).

Com o avanço das descobertas na genética e ao mesmo tempo com as novas técnicas desenvolvidas, muitos métodos permitem a análise de expressão de citocinas, não apenas na análise de proteínas, mas mensurando os níveis de mRNA (RNA mensageiro). Isto é possível por técnicas como *Northern blot*, hibridização *in situ*, arranjos de cDNA, RT – PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), QC-PCR (*quantitative-competitive-polymerase chain reaction*) e PCR em tempo real, que é a técnica mais utilizada atualmente, pois é considerada simples e rápida (LEUTENEGGER et al, 1999; GIULLIETTI et al, 2001; STORDEUR et al, 2002; KONNAI et al, 2003).

2.8. PCR em tempo real

A técnica de PCR (Reação em cadeia da Polimerase) em tempo real é uma derivação das descobertas de Karry Mullis na década de 80, que tem como principais características a detecção e quantificação de fluorescência emitida durante cada ciclo de uma reação de PCR e a sensibilidade de detectar poucas cópias de DNA presentes em uma dada amostra (VALASEK;REPA, 2005).

É umas das principais técnicas utilizadas em estudos de genômica funcional, possibilitando o melhor entendimento de doenças, mecanismos imunes e de processos metabólicos dos organismos em geral. É muito utilizada em diagnóstico, podendo diferenciar diversos tipos de câncer, identificar e detectar bactérias, fungos, identificar mutações e até mesmo validando outras técnicas, como os microarranjos (COUSSENS et al, 2002; BUSTIN, 2002; BUSTIN, 2005a; VALASEK et al, 2005; NOLAN et al, 2006). A importância desta técnica pode ser avaliada pelo aumento de artigos indexados na base pubmed desde 1993 até 2005, que varia de poucos a mais de 4000 artigos. Este aumento pode ser observado em muitas áreas da ciência em que tem sido utilizada, como na medicina, odontologia, microbiologia, imunologia, veterinária, entre outros (VALASEK,2005; KUBISTA et al, 2006).

PCR em tempo real baseia-se na utilização de um corante específico que permite a detecção de fluorescência e a amplificação em apenas uma etapa. Conforme a amplificação é iniciada, há o aumento do sinal de fluorescência, pela excitação dos fluoróforos, no momento em que se intercalam nas fitas de DNA que estão sendo produzidas em um determinado momento. Quando é observado este primeiro acúmulo de fluorescência, é definido um ciclo limiar (Ct), que é considerado o ciclo da PCR em que começou a amplificação. Assim, quanto mais moléculas alvo estiverem presentes inicialmente, mais rápida será a amplificação e, conseqüentemente, mais baixo será o ciclo limiar. Essa correlação entre fluorescência emitida e quantidade de produto amplificado permite a quantificação acurada das moléculas alvos que estão sendo produzidas, com alta sensibilidade e especificidade das reações de PCR. Além disso, como os resultados são obtidos concomitantemente com a reação de PCR, problemas decorrentes de contaminações são evitados, já que não são necessárias manipulações posteriores ao término da reação (GIULIETTI et al, 2001; KUBISTA et al, 2006; NOLAN et al;

2006).

A técnica tem sido amplamente utilizada não apenas por ser muito sensível, mas por possuir características em que ela se destaca. A qPCR não requer utilização de radioatividade, ou seja, seus corantes são menos perigosos; há pouca probabilidade de contaminação cruzada, devido a não manipulação pós-reação; rápida, ou seja, em poucas horas podem ser feitas muitas reações; possuir habilidade de detectar poucas fitas de DNA ou cDNA na reação, problema que resolve a preocupação da quantidade inicial de tecido, sangue ou outro tipo de amostra obtida; alta reprodutibilidade dos dados; apresenta alta especificidade; os equipamentos existentes são relativamente fáceis de se utilizar e confiáveis (VALASEK et al, 2005; PFAFFL, 2007a).

Entretanto, como em todas as outras técnicas, há limitações. Tem sido possível observar que muitos fatores podem influir nos resultados das quantificações (BUSTIN, 2000; BUSTIN, 2002; KONTANIS et al; 2006; NOLAN, 2006; KUBISTA et al, 2006; PFAFFL, 2007b; HENDRICK-BALK et al, 2007). Estes não estão relacionados à falha dos equipamentos, mas à variações que ocorrem devido a erros de manipulação e normalização dos dados (BUSTIN, 2002; BUSTIN e NOLAN, 2004). A qualidade do RNA e a quantificação correta são imprescindíveis para que o experimento seja bem sucedido, de forma que são necessários cuidados para que não haja degradação do RNA, e também, que estes sejam quantificados em um mesmo equipamento, pois é relatado que amostras-padrão de RNA quantificadas em diferentes equipamentos podem apresentar diferentes valores de concentração (NOLAN et al, 2006). As quantidades iniciais de RNA utilizadas na síntese dos cDNAs devem ser padronizadas entre as amostras do experimento, garantindo quantidades padronizadas de cDNA na reação de PCR (BUSTIN; NOLAN, 2004). Os desenhos dos *primers* e padronização das reações devem ser também realizados cautelosamente, pois a formação de dímeros de *primers*, por exemplo, pode influir na reação e quantificação das amostras.

Além disso, é necessário uma acurada normalização dos dados, que deve ser feita por quantificação de genes controle, ou seja, genes que são constitutivamente expressos. Já foi relatado que muitos genes como GAPDH, β -actina e ubiquitinas que são considerados constitutivos, podem apresentar expressão variável quando submetidos a determinados tratamentos e até mesmo entre diferentes tecidos (DHEDA et al, 2004; GOOSSENS et al, 2005). A utilização

de genes inapropriados levam a aquisição de dados irrelevantes, já que podem não revelar o que acontece biologicamente, invalidando muitas vezes a pesquisa realizada (NOLAN et al, 2006). Por este motivo, é necessário que mais de um gene controle seja testado e que o mais estável, ou seja, com menor variação seja, escolhido para ser o gene controle do experimento (VANDENSOMPELE et al, 2002; NOLAN et al, 2006; PFAFFL, 2007a).

2.8.1. Quantificação da expressão gênica

Existem basicamente duas estratégias de quantificação que podem ser escolhidas em estudos com RT-PCR em tempo real: a quantificação absoluta e a quantificação relativa. A escolha por um dos dois tipos depende do objetivo da pesquisa, da quantidade de mRNA obtido, grau de precisão e seqüência alvo a ser analisada (PFAFFL, 2001; PFAFFL, 2007b).

A quantificação absoluta é amplamente utilizada para identificar e quantificar células tumorais, partículas infecciosas como vírus e bactérias em fluidos corporais e, também, para quantificar mudanças nos níveis de mRNA. Baseia-se na construção de uma curva padrão, em que uma amostra de concentração e número de cópias conhecidas é submetida a uma série de diluições. Após a reação em um aparelho de PCR em tempo real, os valores de Ct são obtidos e então, pode ser feita a relação entre os Cts, a concentração e o número de cópias presentes. As curvas podem ser construídas a partir de plasmídeos linearizados, DNA ou RNA recombinante ou mesmo de produtos de PCR diluídos. Todas as reações de PCR que forem feitas são comparadas com esta curva, obtendo-se então a quantidade de amostra presente. A acurácia deste método depende da acurácia da construção destas curvas (BUSTIN;NOLAN, 2004; BUSTIN et al, 2005 b; PFAFFL, 2007a).

A quantificação relativa é comumente utilizada para mensurar diferenças de níveis de expressão de mRNA, como em experimentos que investigam mudanças fisiológicas no organismo. Neste método a curva de calibração não é necessária. São utilizados genes controles, que são constitutivamente expressos no organismo, de forma que os genes de interesse, são comparados com os genes controles. Geralmente o nível de expressão é determinado pelas diferenças entre os Cts mensurados (BUSTIN et al, 2005b; PFAFFL, 2007b;). Diversos modelos matemáticos, assim como softwares para quantificação relativa, têm sido desenvolvidos atualmente, já que ainda há muitas incertezas sobre qual a melhor

maneira de analisar os dados obtidos em cada experimento (PFAFFL, 2001; LIVAK et al, 2001; VANDENSOMPELE et al, 2002). Dentre eles, destaca-se o de Pfaffl (2001). Os cálculos deste modelo são baseados na média dos ciclo (Ct) de um grupo tratamento e de um grupo controle, de forma que a expressão do gene alvo é normalizada pelo gene referência, considerando a eficiência da amplificação do gene de interesse (E), como mostrados na Figura 4 (PFAFFL, 2001):

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{Ct alvo (Média controle - Média tratamento)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (Média controle - Média tratamento)}}$$

Figura 4. Fórmula desenvolvida por Pfaffl (2001) para quantificação relativa

A partir dele foi criado o software REST (*Relative Expression Software Tool*) que é utilizado para estimar níveis de significância nos estudos de expressão gênica, a partir da mensuração das razões de expressão por testes de aleatorização dos dados (CORBETT RESEARCH;PFAFFL, 2005). Estes são baseadas em testes não-paramétricos, ou seja, não assumem qualquer tipo de distribuição de dados, o que é vantajoso para experimentos com pequeno número amostral (PFAFFL, 2007a). O software permite ainda a escolha do melhor gene referência e até mesmo a utilização de múltiplos genes constitutivos (CORBETT RESEARCH;PFAFFL, 2005), assim como a utilização das eficiências obtidas para cada gene (PFAFFL, 2007a). Este software apresenta vantagens de ter alta acurácia, apresentar os dados de uma forma clara e ser gratuito.

2.8.2. RT-PCR em tempo real em bovinos

Os estudos de expressão gênica em bovinos têm aumentado muito nos últimos anos. Isto se deve aos muitos avanços obtidos na biologia molecular que rapidamente têm sido englobados às ciências veterinárias e agropecuária, permitindo imenso progresso no diagnóstico molecular, estudos de fisiologia animal, patologias, estratégias de cruzamentos, imunologia entre outros (PFAFFL, 2007b).

A PCR em tempo real é muito utilizada como diagnóstico de algumas doenças em bovinos como detecção de prions (PFAFFL, 2007b) e vírus da diarreia bovina (YOUNG et al, 2006).

Sua utilização estende-se a caracterizar o perfil de expressão de tecidos específicos, bem como, sua utilização como método de normalização. ONTSUKA et al (2004) observaram lactase no trato gastrintestinal e concluíram que há presença de mRNA da lactase no intestino, mas está ausente em piloro, esôfago e rumen. Bower et al (2007) desenvolveram um método de quantificação que permite acurada normalização da expressão gênica em blastocistos pré-implantados, sem que um gene controle interno seja necessário; o que é muito importante pois como a quantidade de RNA é pequena nestas células, há dificuldade em quantificar um gene constitutivo estável.

O perfil de citocinas também têm sido investigado pela utilização PCR em tempo real para diversas doenças. Konnai et al (2003) tentou caracterizar o perfil de expressão de citocina em linfócitos polimorfonucleares de animais infectados com vírus da leucemia bovina. Concluíram que está técnica é muito sensível, encontrando o aumento de IFN- γ e IL-12. Coussens et al (2004) observaram a redução na expressão dos genes IFN- γ , IL-1 e IL-6 e aumento de IL-10 em bovinos infectados com *Mycobacterium avium paratuberculosis* e sugeriram que há mecanismos capazes de impedir a resposta pró-inflamatória em resposta a este microrganismo. Além destas, pesquisas tentam caracterizar o perfil de citocinas para diferentes infecções como por *Fasciola* spp (MOLINA, 2005), *R. (Boophilus) microplus* (NAKATA, 2006), *E.coli*, *S. aureus* (LEE et al, 2006), *Ostertagia* spp (VAN ZEVEREN , 2007), entre outros, evidenciam a aplicabilidade e reprodutibilidade desta técnica nos estudos de imunologia molecular (HOPKINS, 2002). Estudos visando entender a resposta imune de hospedeiros infectados com as diferentes espécies de *Haemonchus* também têm sido feito utilizando a técnica de qPCR (CLAREABOUT et al, 2005; ZAROS, 2006; LACROUX et al, 2006).

Dessa maneira, sabe-se que as endoparasitoses causadas por *Haemonchus* spp afetam a produtividade da pecuária brasileira, assim como, acarretam grandes perdas econômicas anualmente no Brasil. O conhecimento dos mecanismos imunes dos bovinos pode então auxiliar o desenvolvimento de novos métodos de controle, que será imprescindível para que, no futuro, as perdas referentes à essa parasitose sejam minimizadas.

3. HIPÓTESE

A infecção por endoparasitos induz respostas no hospedeiro mediadas pela modulação dos genes do hospedeiro. Acredita-se, portanto, que há diferenças na expressão de genes do sistema imunológico em bovinos submetidos e não ao estresse parasitário causado por endoparasitos do gênero *Haemonchus* spp, e que a análise dessas alterações pode contribuir para a identificação dos mecanismos de resistência dos hospedeiros

4. OBJETIVOS

Avaliar o nível de mRNA dos genes IL-2, IL-4, IL-8, IL-12, IL-13, IFN- γ , MCP-1 e TNF- α em linfonodo abomasal e abomaso;

Avaliar o nível de mRNA de lisozima e pepsinogênio e verificar sua relação com a histologia em abomaso de bovinos da raça Nelore infectados com endoparasitos do gênero *Haemonchus* spp.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Para o experimento foram utilizados dez bezerros machos da raça Nelore provenientes da Fazenda Experimental Canchim, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos – SP).

Os animais foram produzidos a partir de dez vacas e três touros e nasceram entre os meses de novembro e dezembro de 2005.

A fim de mantê-los livres de infecções parasitárias, os bezerros foram separados de suas mães após o nascimento, recebendo dois litros de colostro congelado nas primeiras 12 horas de vida,. A partir deste momento, passaram a ser alimentados com dois litros de leite por dia, além de feno de alfafa, concentrado e água *ad libidum*.

5.2. Obtenção das larvas

As larvas foram fornecidas pelo Dr. Ivo Bianchin, da EMBRAPA – Gado de Corte. A técnica utilizada para obtenção das larvas está de acordo com a de Roberts e O'Sullivan (UENO e GONÇALVES, 1998). Cerca de 20 a 30 gramas de fezes foram coletadas diretamente a partir da ampola retal do animal. Após, foram misturadas com serragem na proporção de 2:1 em um frasco e adicionado água para formar uma massa. Este homogeneizado ocupou cerca de $\frac{3}{4}$ da capacidade do recipiente e foi tampado, de forma a permitir a aeração do cultivo.

O material foi levado à estufa, sendo mantido por 7 dias. Neste período os ovos dos nematódeos já se transformaram em larvas infectantes. Para a coleta das larvas, o recipiente contendo o cultivo foi completado com água, tampado com uma placa de petri e invertido bruscamente. Posteriormente, foi colocado cerca de 5 a 10 mL de água na placa de petri. Decorridos 3 a 4 horas, o líquido contido na placa foi coletado, colocado num tubo de ensaio e deixado por mais 2 a 3 horas em geladeira. O sobrenadante foi retirado e prosseguiu-se a identificação das larvas.

5.3. Infecção dos bovinos

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais com cinco animais cada: um grupo controle mantido sem infecção, e um grupo desafio experimental, submetido à infecção. Em cada grupo foi colocado pelo menos um descendente de um dos três touros, de forma que a disposição foi a mostrada na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Descrição da estrutura genética e distribuição em grupos experimentais

Animal do Experimento	Grupo Experimental	Paternidade
1	Desafio	Touro 1
2	Desafio	Touro 2
3	Desafio	Touro 2
4	Desafio	Touro 1
5	Desafio	Touro 3
6	Controle	Touro 3
7	Controle	Touro 1
8	Controle	Touro 2
9	Controle	Touro 1
10	Controle	Touro 3

Após a desmama, os animais do grupo desafio com idade entre 4 e 5 meses e livres de infecção por parasitos gastrintestinais, foram infectados artificialmente via oral. Para essa finalidade, foram administradas para cada bezerro cerca de 15.000 larvas do parasito gastrintestinal do gênero *Haemonchus* spp no estágio L3.

5.4. Obtenção dos tecidos

No sétimo dia após a infecção dos animais do grupo desafio experimental foi realizada a eutanásia dos dez bezerros com pentobarbital sódico na dose de 60 mg/Kg de peso e cloridrato de xilasina a 2% na dose de 1 mL/100 Kg de peso. Foram coletados tecidos de abomaso e linfonodo abomasal para análises histológicas e de quantificação de RNA mensageiro.

Os tecidos para as análises histológicas foram transferidos para recipientes contendo formalina 10 %, enquanto aqueles utilizados na análise de

expressão gênica foram armazenados em freezer a – 80°C.

5.5. Preparo das amostras para histologia

Os tecidos foram fixados em formalina 10 % por 36 horas, lavados em água corrente por 24 horas e, então, armazenados em etanol 70%. A seguir, foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de álcool, seguindo o protocolo abaixo:

- 1-) 1 hora em etanol 70 %
- 2-) 1 hora em etanol 90 %
- 3-) 1 hora em etanol 95 %
- 4-) 1 hora em etanol 100 %, frasco 1
- 5-) 1 hora em etanol 100 %, frasco 2
- 6-) 1 hora em etanol 100 %, frasco 3
- 7-) 1 hora em etanol 100 %: xilol

Após a desidratação, foi realizada a diafanização, para que o álcool presente no material fosse substituído por xilol, como abaixo descrito:

- 1-) 1 hora em xilol, frasco 1
- 2-) 1 hora em xilol, frasco 2
- 3-) 1 hora em xilol, frasco 3

A inclusão em parafina foi feita através da passagem dos tecidos em três banhos de parafina a 60 °C por 1 hora cada um. O material foi então colocado em uma caixa devidamente identificada com parafina líquida.

Nessa etapa os tecidos foram enviados para o Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP para a confecção das lâminas coradas com azul de toluidina e hematoxilina-eosina.

5.6. Análise histológica

Foram realizadas contagens de mastócitos e eosinófilos nas lâminas provenientes de tecido abomasal, usando um microscópio óptico, no Laboratório de Parasitologia, do Instituto de Biociências de Botucatu, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini Amarante. Em uma das lentes do microscópio foi colocada uma lente graduada, dividindo assim a lâmina em campos com 0,0225

mm², quando observada na objetiva de 100x. Foram contados 30 campos aleatórios da superfície mucosa do abomaso (AMARANTE et al, 2005).

Também foi realizada contagem de glóbulos leucócitos das lâminas coradas hematoxilina-eosina em microscópio de imunofluorescência. Da mesma forma, foram observados 30 campos por lâmina de cada animal (AMARANTE et al, 2005).

5.7. Extração de RNA

A extração de RNA total dos tecidos foi feita utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Os tecidos mantidos em freezer – 80 ° C foram macerados em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo, devidamente tratados para uso com RNA. Para cada 50 a 100 mg de tecido adicionou-se 1 mL do reagente TRIzol®, que foi misturado pela utilização do vórtex e então incubado por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C). A seguir, acrescentou-se 200 µL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente com as mãos por 15 segundos e incubando a temperatura ambiente por mais 5 minutos. Centrifugou-se a 11.000 rpm (rotações por min) a 4 ° C por 15 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi removida para um tubo de polipropileno limpo, adicionando-se 500 µL de isopropanol. O tubo foi agitado vigorosamente com as mãos e, então, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Passados os 10 minutos, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm a 4 ° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1 mL de etanol 75% e homogeneizado em vórtex. Esse foi centrifugado a 9.000 rpm, por 5 minutos a 4 ° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco por 15 minutos a temperatura ambiente, ressuspendido em água e aquecido a 55 ° C por 10 minutos e, então, quantificado.

5.8. Quantificação do RNA

A concentração de RNA nas amostras foi avaliada por espectrofotometria e se utilizou uma alíquota de amostra de RNA dissolvida em TE (Tris-EDTA) na proporção de 1:100 (5µl de RNA: 495 µl de TE). O grau de pureza do RNA foi estimado pela razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280 nm, que deve ser igual ou superior a 1,8 para uma amostra de RNA pura (SAMBROOK et al.,

2001). Uma densidade óptica igual à 1,0 corresponde a 40 µg de RNA (fita simples) por mL. Desta forma a concentração de RNA na amostra pode ser calculada através da seguinte relação:

$$\text{Concentração de RNA (ng/}\mu\text{L)} = \text{OD}_{260} \times \text{Fator de diluição (100)} \times 40$$

A integridade do RNA extraído foi avaliada por comparação de intensidade luminosa das bandas em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio (20 µg/mL). A corrida eletroforética foi de aproximadamente 90 minutos a 60 V com tampão TBE 1X (Tris-HCl, ácido bórico, EDTA). Para a visualização das bandas foi utilizado, um transluminador (UVP) e a fotodocumentação com câmera KODAK Easy Share V530.

5.9. Síntese de cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita a partir de RNA total utilizando o *Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen).

Para cada 5 µg de RNA total foi colocado 1 µL de dNTP mix (10 mM), 1 µL de um *primer* oligo dT (0,5 µg/µL) e água completando o volume para 10 µL, sendo incubado a 65 °C por 5 minutos e após, esfriado em gelo por 1 minuto. Foi preparada uma mistura contendo 2 µL de *buffer* 10X, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de ditriteitol DTT (0,1 M) e 1 µL de *RNase out* (40 U/µL), Estes 9 µL foram adicionados à reação anterior e incubados por 2 minutos a 42 °C. Após, foi adicionado 1 µL da enzima transcriptase reversa *SuperScript II RT* (Invitrogen) a cada tubo e incubado por 50 minutos a 42 °C e posteriormente inativada a 70 °C por 15 minutos. Finalizando a reação, foi adicionado 1 µL da enzima *RNase H*, por 20 minutos a 37 °C, para remoção do RNA molde da molécula cDNA:RNA.

5.10. Escolha dos primers

Os genes de interesse foram escolhidos após busca na literatura, assim como a escolha dos *primers* utilizados neste trabalho (Tabela 2).

Os primers foram desenvolvidos com base em seqüências específicas de bovinos disponíveis no GenBank e cada primer é complementar a dois éxons adjacentes, com a finalidade de evitar a amplificação a partir de DNA. A seqüência

dos *primers*, bem como o tamanho do produto e referências encontra-se na Tabela 1. A confirmação da especificidade dos produtos dos primers foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de qRT-PCR e por análise das curvas de dissociação da qPCR, que permite a diferenciação dos produtos inespecíficos dos esperados. A reação de amplificação e a análise das curvas de dissociação foram realizadas em um equipamento LightCycler™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Tabela 2. *Primers* utilizados nas reações em cadeia da polimerase em tempo real

Gene	Seqüência dos <i>Primers</i> (5' - 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
GAPDH	F- GCGTGAACCACGAGAAGTATAA R- CCCTCCACGATGCCAAAGT	121	Zaros, 2007
HPRT-1	F – TGCTGAGGATTTGGAGAA R – CAACAGGTCCGCAAAGAACT	154	Goossens, 2005
IL-2	F- TCCAAGCAAAAACCTGAACC R- CAGCGTTTACTGTTGCATCATC	151	Zaros, 2007
IL-4	F- TGCATTGTTAGCGTCTCCTG R- AGGTCTTTCAGCGTACTTGT	450	Zaros, 2007
IL-8	F- TGGGCCACACTGTGAAAAT R- TCATGGATCTTGCTTCTCAGC	203	Zaros, 2007
IL-12p35	F- GAGGCCTGTTTACCACTGGA R- CTCATAGATACTTCTAAGGCACAG	143	Zaros, 2007
IL-13	F- GGTGGCCTCACCTCCCCAAG R- GATGACACTGCAGTTGGAGATGCTG	234	Zaros, 2007
IFN-γ	F- AGCCAAATTGTCTCCTTCTACTTC R- CTGACTTCTCTTCCGCTTTCT	261	Coussens, 2002
Lisozima	F- CTCCTTTCTGTGCTGTCC R- TGCCATCATTACCACCACCAT	240	Zaros, 2006
MCP-1	F- CAAGTCGCCTGCTGCCTATAC R- AGAGGGCAGTTAGGAAAGC	278	Zaros, 2007
Pepsinogênio	F- CGTTCAACCCTCAAGACTC R- CGAAGGGAGCGTAGTACAGG	210	Zaros, 2006
RPL-19	F- GAAATCGCCAATGCCAAC R- GAGCCTTGTCTGCCTTCA	410	Zaros, 2007
TNF-α	F- TAACAAGCCGGTAGCCACG R- TCTTGATGGCAGACAGGATG	279	Zaros, 2007

5.11. Eficiência da amplificação

Com exceção dos genes IFN- γ e HPRT-1, adotou-se os dados de eficiência da reação obtidos Zaros (2006) conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de coeficiente angular da reta (Slope) para cálculo da eficiência de amplificação (E) para os primers utilizados neste trabalho, extraído de Zaros (2006).

Gene	Slope	E
GAPDH	-3,7	2,04
IL-2	-3,77	1,8
IL-4	-3,53	1,9
IL-8	-3,34	1,9
IL-12p35	-3,77	1,8
IL-13	-2,92	2,1
Lisozima	-3,69	1,87
MCP-1	-3,08	2,1
Pepsinogênio	-3,22	2,0
RPL-19	-3,24	2,0
TNF-α	-2,81	2,2

Para os genes IFN- γ e HPRT-1 foi feita uma curva de diluição em série de cDNA e produzido um gráfico do ciclo limite (Ct) versus log₁₀ do número relativo de cópias do coeficiente de diluição. Para determinar a eficiência da amplificação, a fórmula descrita por Pfaffl (2001) foi utilizada:

Eficiência (E) = $10^{(-1/\text{slope})}$, em que slope é o coeficiente angular da reta da regressão linear.

5.12. PCR em tempo real

Foram escolhidos genes (Tabela 4) relacionados com a resistência e suscetibilidade do hospedeiro ao parasito para realização de RT-PCR quantitativa dos tecidos coletados dos animais: abomaso e linfonodo abomasal.

As análises foram feitas em equipamento “*LightCycler PCRSystem*”, no Laboratório de Biotecnologia Animal (USP/ESALQ, Piracicaba, SP). As reações de qPCR em tempo real foram realizadas de acordo com as seguinte condições: 0,2

mM de dNTP, 0,1 a 0,2 μ M de cada *primer*, 2 a 3,75 mM de $MgCl_2$, 1,5 U Taq Platinum DNA polimerase, 0,25 μ g BSA, 0,04 μ L de Sybr Green, 2 μ L de tampão 1X (50mM de KCl, 10mM Tris-HCl pH 9,0), 0,5 μ L de Dimetil Sulfoxido (DMSO) e água ultra-pura para biologia molecular para completar o volume de 19 μ L, Em cada capilar foi adicionado 19 μ L desta mistura e 1 μ L(12,5 ng) de cDNA.

Os capilares foram colocados no aparelho “*LightCycler PCRSystem*” e realizadas as reações seguindo as condições específicas para cada gene (Tabela 4).

Tabela 4. Condições nas reações em cadeia da polimerase em tempo real

Genes	Concentração dos <i>primers</i> (μ M)	$MgCl_2$ (mM)	Condições da Reação de PCR ($^{\circ}$ C/seg)	
			Anelamento	Extensão
GAPDH	0,1	3	59/7	72/5
HPRT-1	0,1625	3	58/10	72/13
IL-2	0,1	3	57/ 7	72/6
IL-4	0,1	3,75	56/ 6	72/17
IL-8	0,125	3	53/ 5	72/ 9
IL-12p35	0,1	3	58/ 7	72/7
IL-13	0,125	2,5	60/7	72/9
IFN-γ	0,2	2,5	55/10	72/14
Lisozima	0,1	2	60/7	72/9
MCP-1	0,125	2,5	56/ 5	72/12
Pepsinogênio	0,125	2,5	60/7	72/9
RPL-19	0,125	3,75	60/ 7	72/16
TNF-α	0,1	2,5	57/7	72/12

5.13. Seleção do gene constitutivo

Foram testados três genes constitutivos, sendo eles: GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), HPRT-1 (hipoxantina fosforribosil transferase) e RPL-19 (proteína ribossomal 19). Após a obtenção dos valores de Ct de cada gene para cada grupo experimental, foi feita a análise estatística descritiva (Excel), para obtenção de médias, desvio padrão e erro padrão. Um teste não paramétrico foi feito utilizando o programa *Randomisation test* com o objetivo de verificar diferenças na expressão gênica entre os grupos. O programa *Genorm* de normalização também foi utilizado para verificar qual o gene constitutivo com menor

variação na quantificação relativa e pelo programa de normalização *Genorm*.

5.14. Análise estatística para PCR tempo real

Para análise dos resultados obtidos pela técnica de qPCR em tempo real foi escolhido o método de quantificação relativa, descrito por Pfaffl (2002). Para isto foi utilizado o *software* REST 2005 BETA v.1.9.12 (*Relative Expression Software Tool*), específico para tal método.

O modelo matemático utilizado para obtenção das expressões relativas baseia-se nas eficiências obtidas nas PCRs e nas variações obtidas entre as amostras do grupo controle e desafio experimental. A expressão é dada pela razão entre as diferenças de média do grupo controle e desafio dos genes alvo e do gene referência utilizado, como na Figura 5 (Pfaffl, 2002):

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{Ct alvo (Média controle - Média tratamento)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (Média controle - Média tratamento)}}$$

Figura 5. Modelo matemático desenvolvido por Pfaffl (2002)

Os dados de razão de expressão são submetidos a um teste não paramétrico de aleatorização para obtenção dos níveis de significância (Pfaffl, 2002).

5.15. Análise estatística das histologias

Após a contagem das células eosinófilos, mastócitos e leucócitos globulares foi realizada análise descritiva pelo programa SAS, obtendo desvio padrão (DV), coeficiente de variação (CV), média, mediana, valor máximo, valor mínimo e erro padrão.

O teste não paramétrico *Randomisation test* foi realizado para obtenção de possíveis diferenças entre as médias dos grupos infectados e não infectados.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Extração e Quantificação do RNA

A extração de RNA total foi realizada a partir de abomaso e linfonodo abomasal e a confirmação da integridade das amostras foi feita em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. As Figura 6 e Figura 7 mostram as frações 28S, 18S e 5S do RNA ribossômico, indicando que o RNA não está degradado.

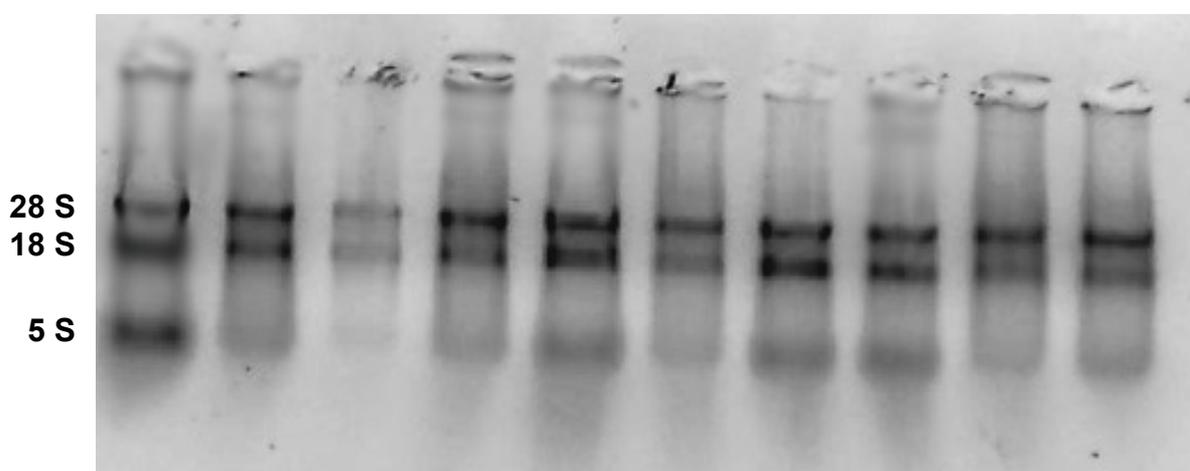


Figura 6. Gel Agarose 1% evidenciando a integridade das amostras de RNA extraídas a partir de linfonodo abomasal, indicando a presença das bandas de RNA ribossômico 28 S, 18 S e 5 S

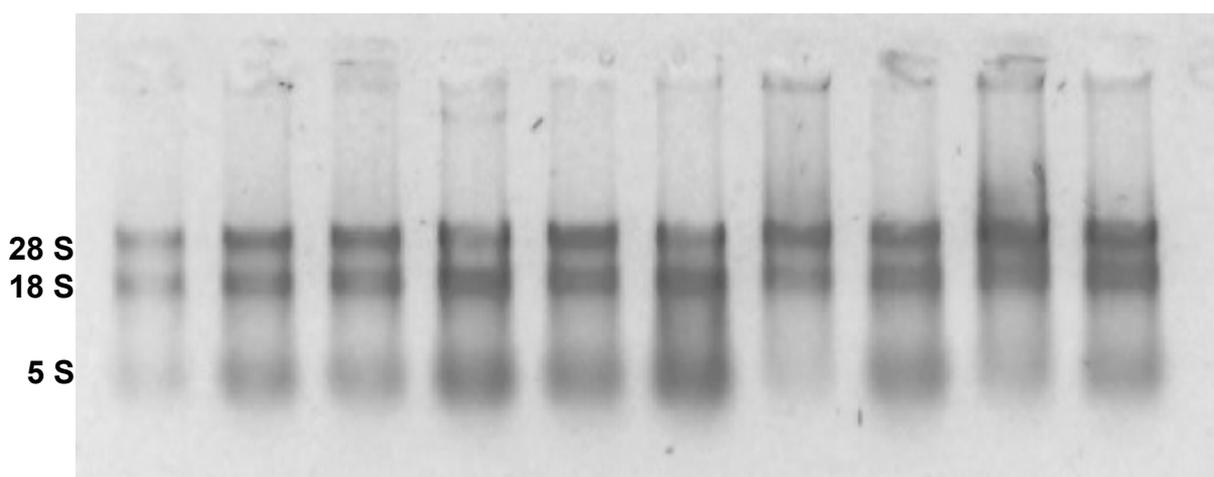


Figura 7. Gel de agarose 1% evidenciando a integridade das amostras extraídas a partir de tecido abomasal, indicando a presença das bandas de RNA ribossômico 28S, 18S e 5 S

Além da avaliação em gel de agarose, foi feita a quantificação em

espectrofotômetro com o objetivo de verificar a concentração e pureza do RNA. Neste trabalho, para os RNAs extraídos a partir de linfonodo abomasal, a média das razões foi de 1,86, sendo que a menor razão foi 1,8 e a maior 1,98. Para as amostras obtidas a partir de tecido abomasal, a média das razões foi 2, sendo a menor razão 1,9 e a maior 2,06, indicando alta qualidade e pureza dos RNAs obtidos. O rendimento de RNA a partir de 100 mg de tecido teve média de 71,9 µg em extrações a partir de linfonodo e 66,8 µg em extrações a partir de abomaso (Tabela 5).

Tabela 5. Média das razões, razão máxima e mínima e rendimento máximo e mínimo (µg) obtidas da extração das amostras de RNA

	Linfonodo	Abomaso
Média das Razões	1,86	2
Razão máxima	1,98	2,06
Razão mínima	1,8	1,9
Rendimento máximo(µg)	110	125
Rendimento mínimo (µg)	32	31

O cuidado na aquisição das amostras, a purificação correta do RNA, bem como uma boa qualidade do RNA são considerados muito importantes nos estudos de PCR em tempo real e de expressão gênica, já que muitos dos problemas que podem afetar a reprodutibilidade do experimento podem começar nestas etapas (BUSTIN;NOLAN, 2004). Dentre os principais problemas estão a degradação do RNA, contaminação com inibidores (como por exemplo, presença de hemoglobina), a contaminação com DNA e proteínas e quantificação imprecisa do RNA (NOLAN et al, 2006). Por isso, é necessária a visualização em gel de agarose, para confirmação da integridade e a quantificação do RNA sempre em um mesmo aparelho, a fim de evitar variações na quantificação devido a diferentes instrumentos. Quanto menor a variação nestas etapas, menor será a variação nas etapas posteriores, como síntese de cDNA, por exemplo, o que garante que as diferenças obtidas nas quantificações de mRNA e por PCR em tempo real sejam devido aos diferentes tratamentos, e não a variações na quantidade inicial de amostra.

6.2. Obtenção da eficiência da amplificação

As eficiências de amplificação para os genes HPRT1 e IFN- γ foram estimadas de acordo com Pfaffl (2001) pois não haviam sido descritas anteriormente no laboratório.

Foi feita uma curva de diluição em série, a partir de uma mesma amostra de cDNA, resultando em diferentes concentrações iniciais de cDNA. Os dados de Cts foram obtidos e um gráfico com estes dados *versus* o log da concentração do número de cópias foi produzido. Para os dois genes estudados, foi possível observar uma relação direta entre a concentração do cDNA e os valores de Cts (Figura 8 e Figura 9).

Além disso, foi feita análise de regressão com o objetivo de obter a eficiência da PCR para cada um dos genes, através da obtenção do coeficiente angular da reta (slope). Para o gene HPRT1 a eficiência foi 2,09, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,95, enquanto que a eficiência do gene IFN- γ a eficiência foi 1,89 e coeficiente de determinação (R^2) de 0,97.

O cálculo da eficiência de amplificação é muito importante para a produção de dados acurados, já que as reações de PCR podem não ter eficiência de 100% (ou 2) como se espera. Na maioria dos casos da literatura, os valores obtidos para eficiência foram de 90% a 100%. Assim, utilizando-se um valor de eficiência mais próximo do real possibilita que as análises finais sejam mais confiáveis (Pfaffl,2001)

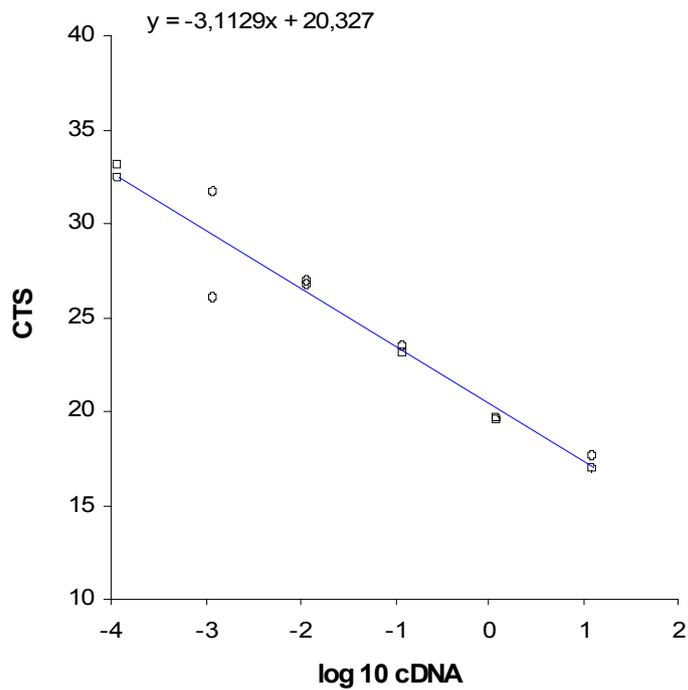


Figura 8. Gráfico obtido a partir da diluição seriada do cDNA para o gene HPRT1, assim como sua equação de regressão

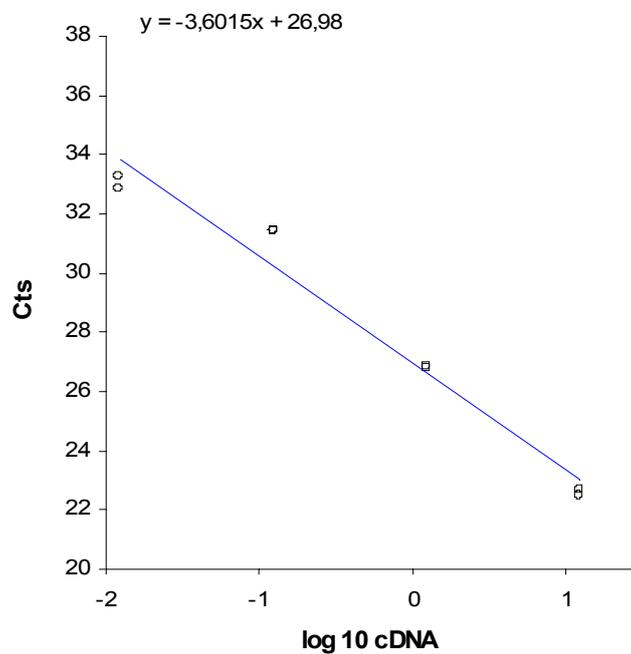


Figura 9. Gráfico obtido a partir da diluição seriada do cDNA para o gene IFN- γ , assim como sua equação de regressão

6.3. Verificação da especificidade dos primers

A confirmação da especificidade dos *primers* foi comprovada através de gel de agarose 2%, em que pode-se observar a presença de uma única banda para cada gene e do tamanho correto (Figura 10).

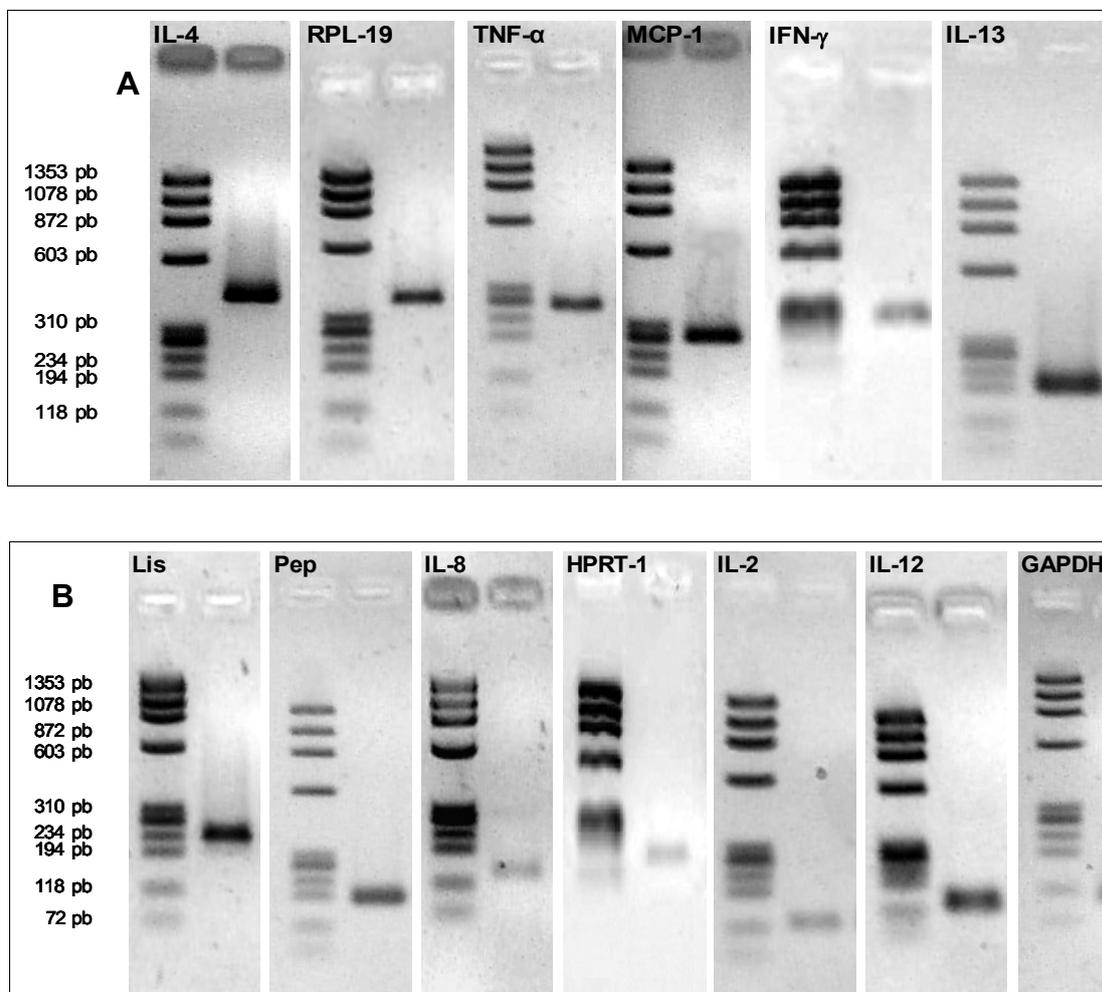


Figura 10. Confirmação do tamanho dos fragmentos dos produtos de RT-PCR por gel de agarose. No primeiro poço encontra-se o padrão de tamanho PhiX 174 Hae III. Na parte A encontram-se os genes IL-4 (450 pb), RPL-19 (410 pb), TNF- α (279 pb), MCP-1 (278 pb), IFN- γ (261 pb) e IL-13 (234 pb). Na parte B, encontram-se os genes Lisozima (240 pb), Pepsinogênio (210 pb), IL-8 (203 pb), HPRT-1 (154 pb), IL-2 (151 pb), IL-12 (143 pb) e GAPDH (121 pb).

Além disso, a especificidade foi confirmada através da análise das curvas de desnaturação obtidas a partir das corridas de PCR em tempo real. A curva é dependente de características como a seqüência de DNA, tamanho do fragmento, conteúdo GC, entre outros, sendo específica para cada seqüência.

A temperatura de *melting* ou de dissociação é o ponto em que 50% das

fitas de DNA estão fita simples. É determinada pelo pico da curva, que é produzido pela dissociação das fitas de DNA e conseqüente diminuição da fluorescência emitida pelo corante. Esta análise permite diferenciação confiável dos produtos de PCR similar à detecção dos tamanhos por gel de agarose, mensurando uma característica fundamental e específica de uma determinada região do DNA. Portanto pode ser utilizado para confirmar, juntamente com a análise do gel de agarose, a especificidade do produto amplificado (RIRIE, 1997; RANDEGGER, 2001).

A escolha de mais de um método para confirmação da especificidade do amplificado é interessante, pois pequenas alterações na temperatura de *melting* (T_m) podem ocorrer devido a variações na quantidade inicial de amostra e concentração do corante, dificultando a distinção de genes com T_m muito parecidos (RIRIE, 1997; RANDEGGER, 2001). Abaixo está um exemplo de uma curva de *melting* (Figura 11) gerada neste experimento.

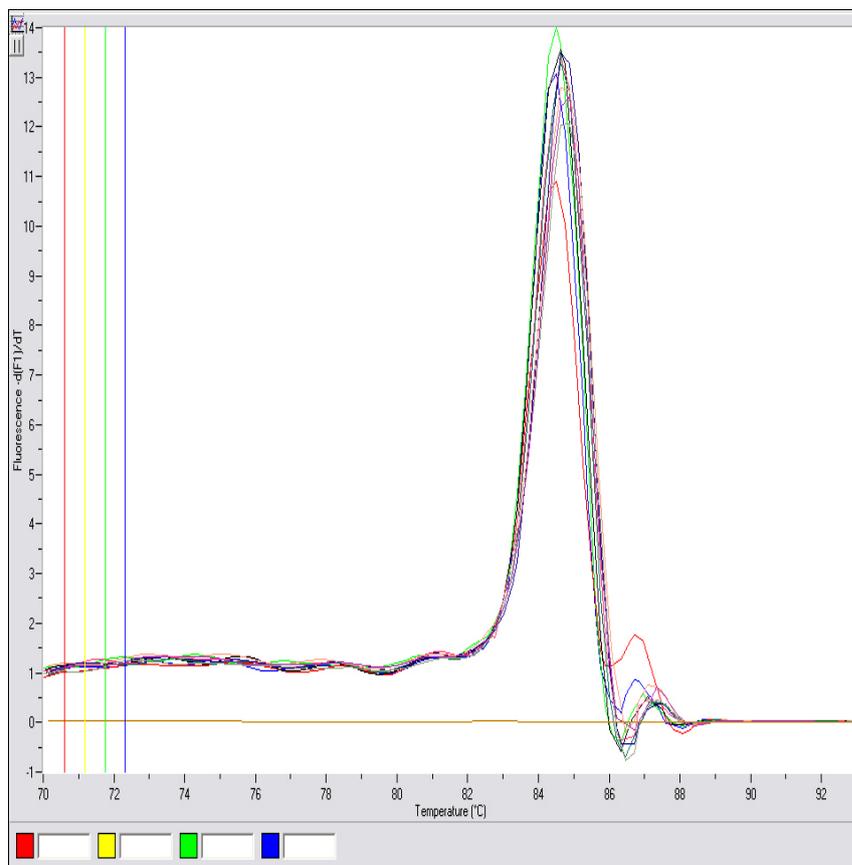


Figura 11. Curva de dissociação para o gene MCP-1 gerada pelo aparelho LightCycler (Roche)

As temperaturas de *melting* foram obtidas para todos os genes analisados, testando-se o intervalo de 70 °C a 95 °C, com acréscimos de 0,1 °C por segundo. Na Tabela 6 encontram-se as temperaturas de desnaturação para os genes utilizados neste trabalho. Essas temperaturas estão em acordo com as obtidas por Zaros (2006), o que indica que os produtos obtidos nesse experimentos eram os esperados.

Tabela 6. Temperaturas de melting dos genes analisados por PCR em tempo real

Gene	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
GAPDH	86
HPRT1	85,9
IL-2	81,5
IL-4	85,9
IL-8	82,5
IL-12	82,55
IL-13	87,2
IFN-γ	83,8
Lisozima	84
MCP-1	85,2
Pepsinogênio	88,1
RPL-19	87,5
TNF-α	86

6.4. Seleção do gene constitutivo

A quantificação de mRNA visando comparar dois ou mais grupos experimentais com o objetivo de entender parte do controle da expressão gênica é amplamente utilizada. Entretanto, para que esta comparação entre grupos seja possível, é necessária a normalização dos dados, através do uso de genes controle (conhecidos também como *housekeeping* e/ou referência) (HENDRIKS-BALK et al, 2007).

Os *housekeeping* genes são considerados expressos constitutivamente, independente dos tratamentos ou condições a que eles são submetidos, pois fazem parte da maquinaria básica das células. É um método seguro, simples e amplamente utilizado pois controla muitas variáveis como variação na quantidade inicial de material, qualidade do RNA e diferenças na síntese de cDNA dependente de alterações na quantidade do RNA (THELLIN, 1999; RADONIC, 2004; HENDRIKS-BALK et al, 2007). Dentre os mais conhecidos e escolhidos em diferentes estudos estão: GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase), HPRT1 (hipoxantina fosforribosiltransferase), β -microglobulina, β -actina, rRNA 18S (DHEDA, 2004; RADONIC, 2004; GOOSSENS, 2005; DE JONGE, 2007).

Neste estudo foram testados três genes controles: GAPDH, RPL-19, HPRT1.

Assim, no presente trabalho, a análise descritiva para estes genes em linfonodos mostrou que entre os grupos tratamento e controle, o gene GAPDH foi o que apresentou a maior variação de Cts, assim como maior desvio e erro padrão (Tabela 7). O mesmo padrão de amplitude na variação foi apresentado quando se analisou para o tecido abomasal (Tabela 8).

Tabela 7. Estatística descritiva dos resultados de qPCR para linfonodo por gene e entre grupos experimentais de bezerros da raça Nelore desafiados e não desafiados com larvas de *Haemonchus* spp.

Gene	Grupo	n	Média Ct	SD	SE	Ct Máx	Ct Mín
RPL-19	Desafio	5	20,49	1,59	0,71	22,66	18,4
	Controle	5	20,93	0,87	0,67	22,26	20
GAPDH	Desafio	5	21,51	1,05	0,47	22,67	20,11
	Controle	5	24,29	2,32	1,04	27,19	21,76
HPRT1	Desafio	5	17,45	0,79	0,35	18,66	16
	Controle	5	18,58	1,05	0,47	19,7	17,18

Tabela 8. Estatística descritiva dos resultados de qPCR para abomaso entre grupos experimentais de bezerros da raça Nelore desafiados e não desafiados com larvas de *Haemonchus* spp.

Gene	Grupo	n	Média	SD	SE	Ct Máx	Ct mín
RPL-19	Desafio	5	18,48	3,05	1,36	22	16
	Controle	5	19	1,51	0,67	22,02	18,1
GAPDH	Desafio	5	24,69	6,94	3,10	36	20
	Controle	5	26,57	5,37	2,40	33,2	21,1
HPRT1	Desafio	5	18,73	3,23	1,44	23	15,5
	Controle	5	19,88	1,74	0,78	22	17,5

Um teste não paramétrico foi realizado e, apesar das variações encontradas, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos. Quando foi feita análise comparando os três genes, independente dos grupos experimentais, GAPDH foi o que apresentou maior variação entre os três genes analisados, para ambos os tecidos (Tabela 9 e Tabela 10). Pelo programa *Genorm* também foi mostrado que esse era o gene menos estável entre os testados.

GAPDH é um gene relacionado ao metabolismo basal celular e tem sido tradicionalmente utilizado como controle endógeno. Em contrapartida, há resultados que mostram que poder haver variações de 7 a 23 cópias dependendo do tipo celular ou tecido que está sendo estudado (GARCIA-CRESPO et al, 2005). Esses dados estão de acordo com a literatura recente sobre *housekeeping* genes, que alerta para cuidados na utilização de GAPDH. Radonic et al (2004) encontraram

diferenças na expressão de GAPDH em grupos de células submetidas e não-submetidas a ação de agentes mitogênicos. Dedha et al (2004) rejeitaram o uso desse gene pois foi um dos mais variáveis em culturas de células de sangue total e de PBMC. Resultados semelhantes foram obtidos por Zaros (2006) que concluiu não ser este um gene adequado em linfonodo, intestino e abomaso de bovinos resistentes e sensíveis a infecção por endoparasitos. Também verificou que o tecido abomasal apresentou maiores desvio e erro padrão, como encontrado neste trabalho. Rhoads et al (2003) observaram que GAPDH e ciclofilina, em análises de expressão gênica de fígado de animais com alterações na alimentação e mudanças de quantidade de insulina, apresentam regulação diferencial entre tratamentos, evidenciando mais uma vez que este pode não ser um gene controle adequado.

Tabela 9. Médias de Ct, desvio padrão e erro padrão para os três genes constitutivos em abomaso de bezerros da raça Nelore desafiados e não desafiados com larvas de *Haemonchus* spp.

Gene	n	Média Ct	SD	SE
RPL-19	10	19,0	2,34	0,74
GAPDH	10	25,6	5,93	1,87
HPRT1	10	19,3	2,51	0,79

Tabela 10. Médias de Ct, desvio padrão e erro padrão para os três genes constitutivos em linfonodo de bezerros da raça Nelore desafiados e não desafiados com larvas de *Haemonchus* spp.

Gene	n	Média Ct	SD	SE
RPL-19	10	20,7	1,23	0,39
GAPDH	10	22,904	2,24	0,71
HPRT1	10	17,9	1,14	0,36

O gene HPRT1 produz a enzima hipoxantina fosforribosiltransferase que apresenta função na renovação de purinas na célula. Sendo um dos mais utilizados em algumas espécies como controle (LEE et al, 2002; RADONIC et al, 2004; GOOSSENS et al, 2005), como em humanos, apresenta grande diferença na expressão entre tecidos, podendo ser até não detectável (RADONIC et al, 2004).

Muitos estudos consideram este gene estável, como em Mamo et al (2007) que encontraram que HPRT1 era o melhor gene para estudos com cultura de

oócitos e embriões de camundongos e NYGAARD et al (2007) que tiveram resultados semelhantes selecionando genes constitutivos para diversos tecidos de *Sus scrofa*. Mas como GAPDH, a sua utilização é criticada.

Neste experimento, o gene HPRT1 apresentou valores de desvio e erro padrão menores que GAPDH tanto na comparação entre os grupos experimentais (Tabela 7 e Tabela 8), como na análise global para os dois tecidos analisado (Tabela 9 e Tabela 10). Da mesma forma observada para os outros genes, os valores máximos e mínimos de Ct em abomaso denotaram uma amplificação um pouco mais tardia do que em linfonodo.

Apesar da menor variação de Ct, ao realizar o teste não paramétrico, houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$) em linfonodo, invalidando a utilização deste gene como controle interno do experimento. Já o teste *Genorm* indicou este gene como sendo estável. Isto pode ser explicado, pois este programa compara os genes constitutivos através de médias geométricas dos Cts, não considerando se há ou não diferenças entre os grupos. Além disso, este teste é muito sensível na utilização de mais de 4 genes a serem testados, enquanto que neste foram testados apenas três genes.

LEE et al (2002), RADONIC et al (2004), BOGAERT et al (2006), HUGGETT et al (2005) testando vários genes constitutivos encontraram resultados semelhantes aos deste trabalho. A influência de tratamento sobre a expressão de HPRT1 foi observada em diferentes espécies e condições experimentais analisadas para este gene, evidenciando mais uma vez a necessidade da pesquisa pelo gene mais estável e sempre testando o maior número de genes possível.

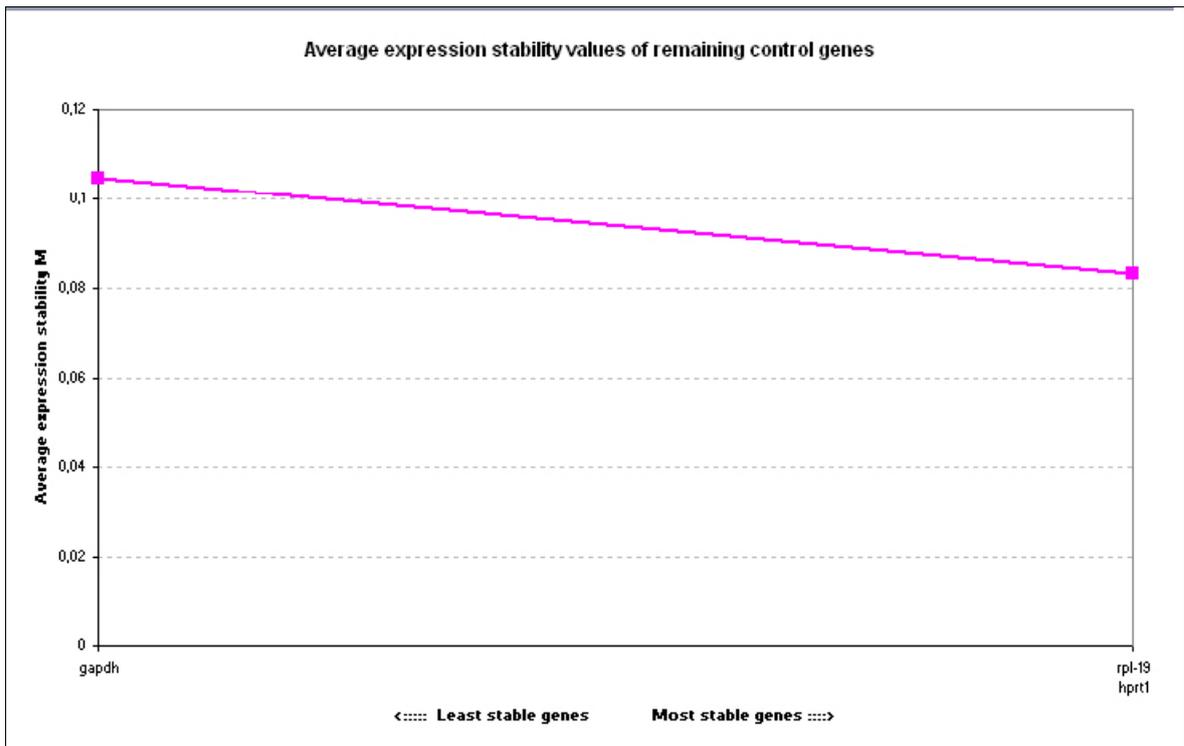


Figura 12. Resultado do teste Genorm para estabilidade do gene controle em linfonodo

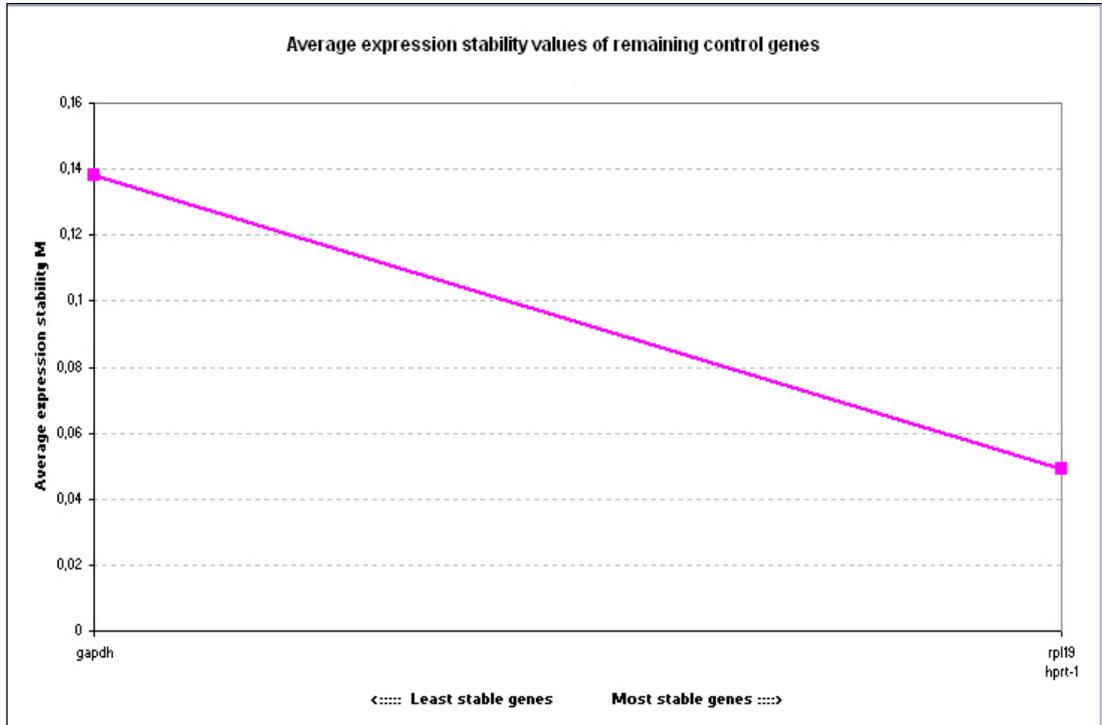


Figura 13. Resultado do teste Genorm para estabilidade do gene controle em abomaso

O gene RPL-19, que codifica a proteína ribossomal L19, faz parte do

grupo de novos candidatos a genes controle em estudos de expressão gênica. Este grupo é composto por outros genes de proteínas ribossomais, decarboxilases e partículas de transdução de sinal, fatores de alongamento que têm expressão constitutivas em muitos tecidos diferentes, em diferentes espécies (AL-BADER e AL-SARRAF, 2005; DE JONGE et al, 2007; KOUADJO et al, 2007).

Nos resultados da análise descritiva pode-se observar que o gene RPL-19 apresentou em geral os menores valores de desvio e erro padrão para abomaso e valores semelhantes ao gene HPRT-1 para linfonodo, tanto na comparação entre grupos, como entre genes.

Os resultados do programa *Genorm* também indicaram este gene como mais estável (Figura 12 e Figura 13). Por fim, o teste não paramétrico realizado mostrou que não houve diferenças entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) tanto para abomaso como para linfonodo.

Os dados obtidos para o gene RPL-19 estão de acordo com vários outros na literatura. Al-bader e Al-Sarraf (2005) encontraram que RPL-19 estava entre os genes mais estáveis em estudos com desenvolvimento fetal em ratos. Kouadjo et al (2007) e Nygaard et al (2007) concluíram em estudos com camundongos e *Sus scrofa*, respectivamente, que outros genes da família RPL (RPL4 e RPL38) foram os genes controle com maior estabilidade para todos os tecidos. De Jonge et al (2007) também caracterizaram mais de 7 novos genes da família RPL como constitutivos. Portanto, o gene RPL-19 foi o escolhido como gene controle nas quantificações relativas deste trabalho.

6.5. Análise histológica

Os padrões de resposta Th2 observados durante infecções gastrintestinais são acompanhados por uma série de outras modificações na abundância de eosinófilos, mastócitos, leucócitos globulares, IgE, IgA, aumento de células γ - δ , entre outras (GASBARRE, 1997; ELSE; FINKELMAN, 1998; KANOBANA et al, 2002; ELSE, 2005).

A principal função dos eosinófilos em infecções parasitárias é a defesa contra amplo número de helmintos através da degranulação, que pode matar o parasito (BEHM e OVINGTON, 2000). Eosinofilia é sempre acompanhada de altos níveis de IL-5 que auxiliam a proteção, podendo ou não promover a expulsão dos parasitos (ELSE, 1998; LAWRENCE, 2002) e ocorrendo tanto no sangue quanto no tecido infectado (BRICARELLO et al, 2004). Evidência de morte ou danos ao tecido larval têm sido associados com a capacidade dos eosinófilos de degenerar o tecido larval, embora mecanismos imunes não relacionados com eosinofilia já tenham sido relacionados à expulsão das larvas (BALIC et al, 2006).

Mastócitos são células efetoras cruciais na expulsão de nematódeos *Strongyloides* spp e *T. spiralis*. Ligados a IgE e a outras moléculas, como prostaglandinas e leucotrienos auxiliam no aumento de motilidade gastrintestinal, hipersecreção de muco, permeabilidade vascular e recrutamento e ativação de leucócitos, assim como na indução de resposta Th2 (LAWRENCE, 2002). Também têm sido associados como intermediários essenciais na regulação da tolerância das células T (LU, 2006).

Além de eosinófilos e mastócitos, os leucócitos globulares (LG) são células associadas à proteção e à resistência a infecções causadas por helmintos gastrintestinais. Essas são células derivadas dos mastócitos e seu aumento é observado após prolongada exposição ao parasitos adultos, sugerindo que expansão, tanto destas células quanto de mastócitos, é essencial na infecção (BALIC et al, 2000). Stear (1995) *apud* Amarante et al (2005) encontrou aumento de leucócitos globulares, assim como mastócitos e eosinófilos em desafios com antígenos larvais de *O. circumcincta*, indicando possível importância dessas células já nos estágios larvais da infecção.

Na data da coleta dos tecidos foi possível observar que os animais do grupo infectado apresentaram abomaso bastante hemorrágico. Apesar disso,

nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos desafio e controle para as contagens de eosinófilos ($p= 0,30$) e mastócitos ($p=0,32$) na mucosa do abomaso (Figura 14). Nenhum leucócito globular foi observado nas lâminas obtidas para o experimento, tanto no grupo controle como no grupo desafio experimental. Pode-se observar pelos coeficientes de variação apresentados na Tabela 11 uma grande variabilidade nos dados encontrados dentro dos grupos. Inclusive, um animal do grupo controle apresentou altas contagens de eosinófilos e foi excluído das análises estatísticas. Acredita-se que essa alta contagem de eosinófilos seja um padrão característico desse animal, pois nada de anormal foi observado durante seu desenvolvimento, não foi medicado, não teve nenhuma doença ou infecção e apresentava valores normais de hematócrito. Além disso, era o animal mais pesado ao final do experimento (Tabela 12).

Tabela 11. Análise descritiva da contagem de eosinófilos e mastócitos

	Grupos	n	Média	Mediana	Erro padrão	Desvio Padrão	CV	Mín	Máx
Mastócito	Desafio	5	17,2	14,8	4,8	10,7	62,1	7,4	31,1
	Contrle	4	10,3	8,9	4,5	9,0	87,5	1,3	22,2
Eosinófilo	Desafio	5	28,4	31,1	9,3	20,9	73,5	8,9	59,1
	Controle	3	30,3	10,2	24	42,6	137	2,6	80

Tabela 12. Peso dos animais ao nascimento (kg), Peso final na data da coleta dos tecidos (kg) e hematócrito obtido no dia em que foi realizada a infecção.

Animal	Grupo	Peso ao Nascer	Peso final	Hematócrito
1	Desafio	30	121,5	31%
2	Desafio	28	119	35%
3	Desafio	32	112	34%
4	Desafio	33	100	36%
5	Desafio	-	90	30%
6	Controle	30	143	33%
7	Controle	30	-	-
8	Controle	28	106	36%
9	Controle	37	95	31%
10	Controle	-	80	35%

A variabilidade dos dados encontrada na contagens destas células corrobora os dados encontrados na quantificação do mRNA das citocinas para abomaso indicando que possa haver variação genética dentro dos grupos analisados.

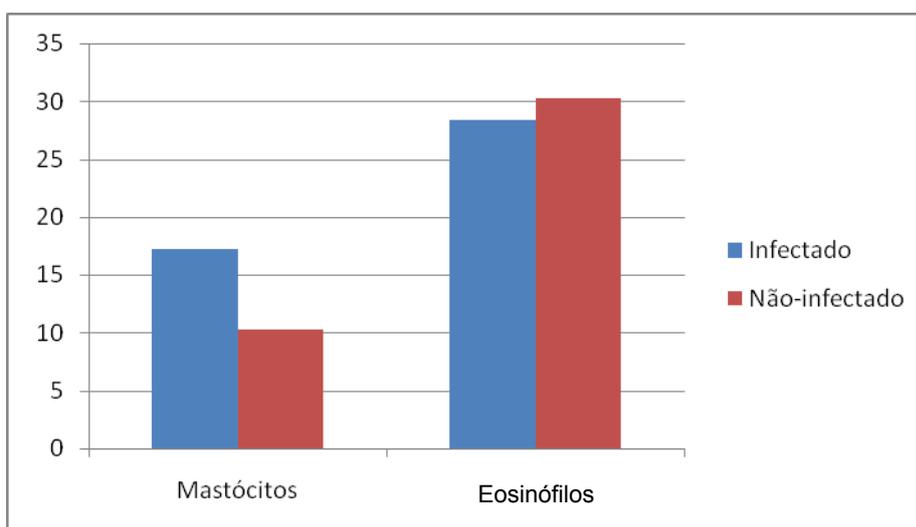


Figura 14. Média do número de eosinófilos e mastócitos/ mm² da mucosa do abomaso de bezerras da raça Nelore desafiados e não desafiados com larvas de *Haemonchus* spp.

Além disso, o tempo de infecção, idade do hospedeiro, carga parasitária, infecção natural ou não, como já foi explicado acima, são importantes

para o estabelecimento da imunidade. Em infecções helmínticas por *Ostertagia* spp sabe-se que o tempo do processo inflamatório apropriado para o acúmulo de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos ocorrer é de um a dois dias após a transferência de vermes adultos para o abomaso e que altas contagens são observadas após oito dias (SCOTT et al, 1998; SIMPSON, 2000). No presente trabalho, a infecção foi feita com larvas e os abomasos foram obtidos após sete dias de infecção, tempo insuficiente para encontrar vermes adultos.

Em infecções com *Haemonchus contortus*, ovinos de duas raças apresentaram baixas contagens de eosinófilos, mastócitos e leucócitos globulares no início da infecção. No entanto, no 30 ° dia pós infecção, alto acúmulo destas células foi observado. Já em animais re-infectados, após o quarto dia pós infecção o número de eosinófilos e mastócitos era muito alto, não havendo diferenças significativas entre raças com diferentes resistências (TEREFE et al, 2007). Perez et al (2001) estudando cabras detectaram eosinofilia, mastocitose e aumento de leucócito globular entre três e sete semanas pós infecção. Observaram ainda formação de granulomas e morte das larvas na mucosa após a sétima semana. Além desses, Bricarello et al (2004), Bricarello et al (2005) e Scott et al (1998) também encontraram resultados semelhantes na contagem de células e relacionaram tanto à resposta imune protetora quanto à resistência. Nos trabalhos até então discutidos houve um tempo grande de observação da infecção, o que permite encontrar os vermes adultos no local da infecção, importante para o acúmulo de infiltrados celulares. O grande diferencial em relação aos outros trabalhos anteriores é que os resultados aqui obtidos representam o perfil de resposta frente ao primeiro contato de animais zebuínos com *Haemonchus* spp.

Entretanto, Balic et al (2000) observaram aumento de mastócitos já no quinto dia após a infecção com *Haemonchus contortus*, mas não observou aumento de leucócitos globulares, provavelmente por não ter transcorrido o tempo necessário para os mastócitos transformarem-se em leucócitos globulares. Lacroux et al (2006) também estudando ovinos infectados com *Haemonchus contortus* obtiveram aumento significativo de eosinófilos após o 7 ° dia de infecção, de mastócitos após o 15 ° e de leucócitos globulares após o 28 ° dia, diferentemente do que foi encontrado neste trabalho. Assim, tanto após a infecção com 10.000 larvas utilizadas por Lacroux et al (2006), quanto com 50.000, utilizadas por Balic et al (2000) de *Haemonchus contortus* foi possível obter uma rápida indução da resposta imune.

Já, no presente experimento, esse padrão não foi observado após a infecção por 15.000 larvas L3 de *Haemonchus* spp. Desta maneira, apesar do número de larvas aqui utilizados ser semelhante ao de outros trabalhos, deve-se considerar que ovinos são muito mais sensíveis à infecção por parasitos deste gênero do que bovinos, o que explica as diferenças encontradas quanto ao aumento de células durante os períodos em que a infecção foi analisada.

Como já foi reportado, os parasitos mais patogênicos e com mecanismos mais difíceis de estabelecer resposta protetora estão localizados no abomaso (GASBARRE, 1997), de forma que para este tempo de infecção não foi possível observar diferenças nas quantidades de infiltrados celulares entre os grupos infectado e não-infectado.

6.6. Quantificação relativa de genes relacionados ao sistema imune de bovinos endoparasitados com *Haemonchus* spp

Infecções causadas por helmintos são estudadas em várias espécies, como em ovinos, caprinos, humanos, ratos, camundongos entre outros e têm apresentado geralmente um perfil de resposta Th2, ou seja, um aumento na expressão de interleucinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 em animais desafiados e/ou resistentes. São infecções que se caracterizam por não acarretarem uma resposta imune severa e na maioria das vezes, tornarem-se crônicas. A redução no número de parasitos adultos inicia-se após prolongada exposição ao parasito e, ao mesmo tempo, há um aumento significativo no número de eosinófilos, glóbulos leucócitos e mastócitos nos sítios da infecção (CANALS et al, 1997; GRENCIS et al, 2001; BRICARELLO et al, 2004).

Nesse trabalho, os valores de Ct foram obtidos para os genes IL-2, IL-4, IL-8, IL-12p35, IL-13, IFN- γ , MCP-1, TNF- α , lisozima e pepsinogênio. A quantificação relativa foi realizada de acordo com Pfaffl et al (2002) para os dados obtidos a partir dos linfonodos e tecido abomasal, sendo gerados gráficos da razão entre os grupos desafiados sobre os não desafiados.

6.6.1. Quantificação de mRNA em linfonodos

Pode-se observar de acordo com a Figura 15 que houve aumento significativo da quantificação relativa das amostras de linfonodos para IL-4 ($p=0,03$) e IL-13 ($p=0,017$).

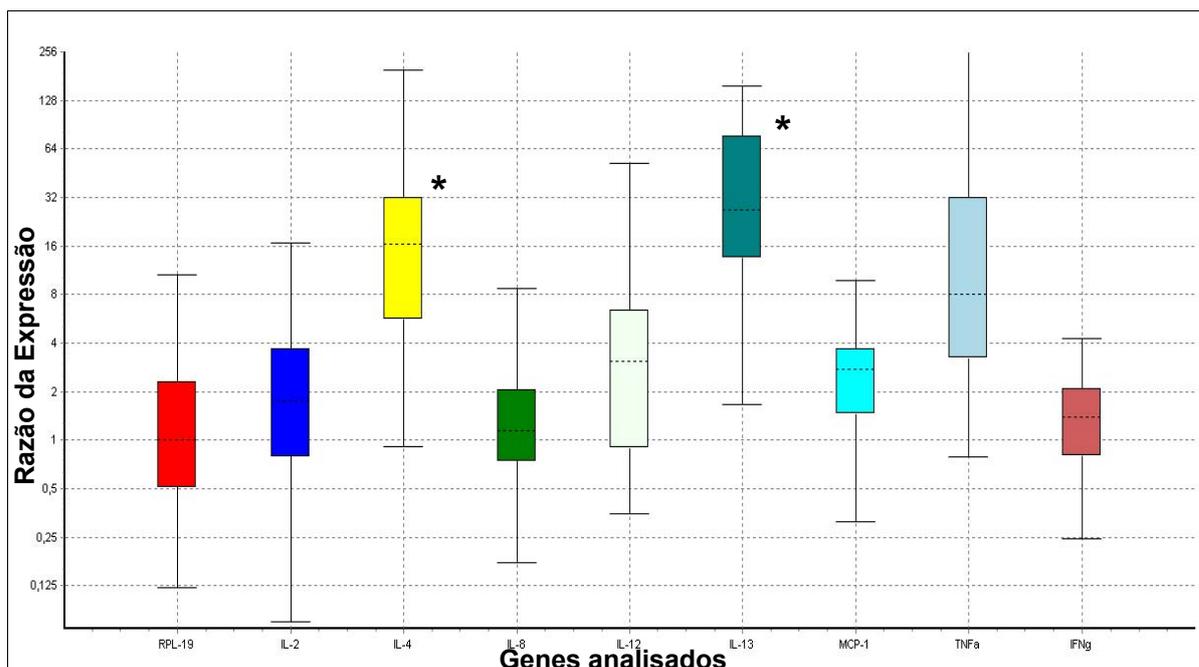


Figura 15. Quantificação relativa das amostras de linfonodos do grupo desafiado sobre o grupo controle. Os valores de p são: IL-2($p=0,5$); IL-4($p=0,03$), IL-8 ($p=0,79$), IL-12 ($p=0,23$), IL-13 ($p=0,017$), MCP-1 ($p=0,28$), TNF- α ($p=0,056$), IFN- γ ($p=0,57$). As caixas representam o intervalo interquartil, ou 50% das observações, expressas como n-vezes a diferença entre os grupos em relação ao gene referência. As linhas pontilhadas representam a mediana de expressão gênica. As barras representam as observações máxima e mínima. *Significativo a 5%.

Sabe-se que após o contato com o antígeno, células imunes, como por exemplo, as células dendríticas, são ativadas e levam o antígeno dos sítios de infecção nos tecidos para os linfonodos, iniciando a resposta imune adaptativa, através da indução de células humorais ou células T (JANEWAY et al, 2007). A ativação de citocinas é imprescindível para a correta polarização da resposta imune.

IL-4 é considerada a citocina responsável por iniciar a resposta imune às infecções helmínticas. Clareabout et al (2005) observou aumento na expressão de IL-4 e IL-10 em linfonodos de bezerros infectados com *Ostertagia ostertagi*, após três semanas de infecção. Canals et al (1997) também verificou que esta interleucina teve aumento significativo, sendo duas vezes mais abundante no grupo infectado já no quarto dia pós infecção, aumentando gradativamente até o 28º dia de infecção. No presente trabalho foi encontrada super expressão média de 16 vezes de IL-4 no grupo desafiado em relação ao outro grupo.

IL-13 apresenta funções importantes na infecção promovendo inflamação alérgica, eosinofilia tecidual, aumento de mastócitos, produção de IgE,

remodelamento tecidual, entre outros. Os resultados obtidos mostram que a indução de IL-13 foi severa, sendo cerca de 30 vezes maior no grupo infectado. Bancroft et al (1999), estudando ratos nocaute para IL-13 infectados com *T. muris*, observou suscetibilidade à infecção, assim como diminuição da resposta de outras citocinas Th2 e inibindo a expulsão dos parasitos. Aumento de IL-13 também foi observado em ovinos imunizados e infectados primariamente com *Haemonchus contortus* (LACROUX et al, 2006).

Estas duas citocinas têm sido muito estudadas pois são as primeiras a serem aumentadas em respostas a parasitos extracelulares, conferindo polarização Th2 e funções intimamente ligadas. Tanto IL-4 quanto IL-13 exercem algumas funções redundantes, o que dificulta saber qual o real papel de cada uma na infecção. Atuam conferindo resposta protetora, resistência e expulsão dos parasitos (ELSE;FINKELMAN, 1998).

Vários estudos reportam a necessidade de IL-4 na resposta protetora e resistência à infecções helmínticas (GRENCIS, 2001; MACDONALD et al, 2002). Estudos com ratos e camundongos nocaute para IL-4 e para seu receptor, infectados com *T. muris*, indicaram aumento da suscetibilidade a infecção. A administração de IL-4 em infecções com *H. polygyrus* mostraram também diminuição na fecundidade e no número dos helmintos (ELSE;FINKELMAN, 1998, FALLON et al, 2002; LAWRENCE, 2003).

Além das funções compartilhadas com IL-4, a IL-13 tem papel exclusivo no estabelecimento de infecções crônicas em animais deficientes infectados por *T. muris*. Ainda atua na expulsão de parasitos, aumentando permeabilidade da mucosa, hiperplasia de leucócitos globulares, contração muscular conferindo proteção e mecanismos de resistência a infecção, sendo essencial na infecção por helmintos gastrintestinais (WYNN, 2003).

TNF- α é um fator de necrose tumoral associado geralmente à resposta imune em infecções causadas por vírus e bactérias e resposta Th1 (JANEWAY et al, 2007). Entretanto, em vários trabalhos observa-se que ele apresenta um importante papel em infecções gastrintestinais podendo promover polarização Th2 (GARSIDE et al, 2000; BABU et al, 2003). Na Figura 15 pode-se observar que TNF- α foi 8 vezes mais expressa no grupo desafiado com o parasito *Haemonchus* spp, entretanto essa diferença não foi significativa ($p = 0,056$). A presença de TNF- α é importante no auxílio da expulsão de parasitos realizada por IL-13. Em animais infectados

deficientes para o fator de necrose, há uma diminuição na eficiência de expulsão (ARTIS et al, 1999). Hayes et al (2007) concluíram que a presença de TNF- α atua aumentando tanto citocinas Th1 (IFN- γ) quanto Th2 (IL-13). Nessa última, confere melhor proteção e resistência às infecções por helmintos, mas não é essencial para que isso ocorra.

Assim, tentando estabelecer um panorama geral da resposta imune de bezerros Nelore submetidos à primeira infecção com parasitos do gênero *Haemonchus* spp, ficou claro que IL-4 e IL-13 são as principais citocinas que iniciam a resposta imune nos linfonodos de bovinos. Estes resultados estão de acordo com vários estudos realizados com diferentes espécies de helmintos e com diferentes hospedeiros (GASBARRE, 1997; BANCROFT et al, 1999; LACROUX et al, 2006; ZAROS, 2006; CRAIG et al, 2007). O aumento da expressão dos genes de IL-4 e IL-13 neste trabalho, indicam que uma resposta humoral teria sido iniciada, o que é característico de infecções por helmintos.

A tendência aumento de TNF- α no linfonodo no início da infecção pode estar relacionada com sua função de aumentar a eficiência de IL-13 na expulsão dos parasitos. Babu et al (2003) encontraram aumento na expressão de TNF- α em resposta a infecções por L3 de filária e concluíram que sua função está relacionada ao surgimento de infecções agudas, assim como, a indução a resistência do hospedeiro. Além disso, picos de expressão muito altos de expressão de uma citocina, podem não ser benéficos para o hospedeiro, de forma que podem indicar falta de controle da resposta imune (RHODES; GRAHAM, 2002). Então, citocinas antagônicas são expressas de forma a neutralizar este desbalanço e conferir proteção ao hospedeiro e resolução da infecção (RHODES; GRAHAM, 2002). TNF- α pode também ter essa função de minimizar possíveis danos devidos a alta expressão de IL-4 e IL-13 observadas neste trabalho, ou mesmo simplesmente guiar os sítios de inflamação (SIMPSON, 2000).

Após a polarização nos tecidos linfáticos secundários, a resposta é iniciada no tecido abomasal contra os patógenos propriamente dito.

6.6.2. Quantificação de mRNA em abomaso

Para abomaso, os resultados obtidos na Figura 16 mostram que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) na abundância de mRNA entre os grupos desafio experimental e controle, não sendo possível estabelecer quais são as principais citocinas que iniciam resposta imune local à primeira infecção com parasitos do gênero *Haemonchus* spp. Estes resultados não eram esperados, pois em outros estudos com parasitos de abomaso foi detectado aumento significativo no tamanho do abomaso já no início da infecção. Assim, como houve alterações morfológicas, acreditava-se que variações nos níveis das citocinas já poderiam ser detectadas (GASBARRE, 1997). Também, foi observado que no terceiro estágio larval, ou seja, no início da infecção, é detectada ampla proliferação de linfócitos (GASBARRE, 1997), que está diretamente relacionada com expressão de IL-2 e IL-13 (JANEWAY et al, 2007).

Na Figura 16 pode-se observar que, para a grande maioria dos genes analisados, houve maior variação para abomaso do que em linfonodo. Isto pode ocorrer devido a variação genética entre os indivíduos no processo de montar a resposta imune iniciada nos linfonodos, já que apesar da raça Nelore ser considerada resistente, a variação dentro de populações foi relatada em diversas raças e espécies (STEAR et al, 1999; SUBAUSTE, 2006; LI et al, 2007). Além disso, o período de infecção de sete dias pode não ter sido suficiente para que a resposta imune local fosse estabelecida. Diante dessa ampla variação, seja ela genética ou devido ao pouco tempo de infecção, aliada ao baixo número amostral, a detecção de pequenas alterações na expressão de mRNA entre os tratamentos pode ter sido prejudicada.

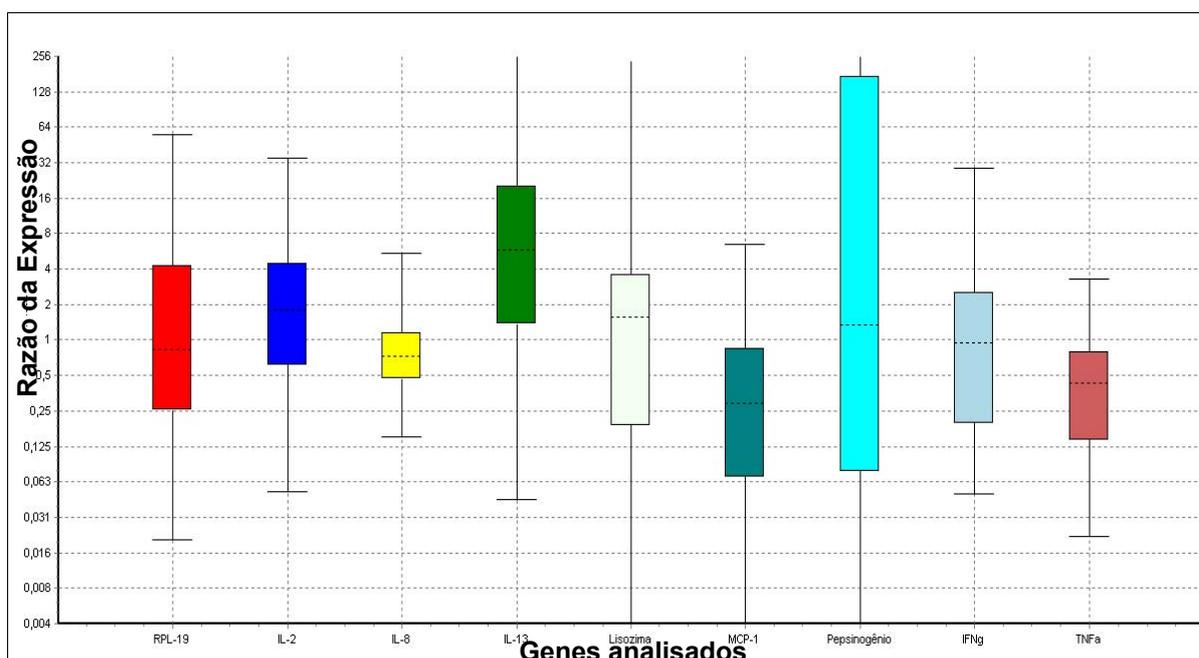


Figura 16. Quantificação relativa das amostras de abomaso do grupo desafiado sobre o grupo controle. Os valores de p são: IL-2 ($p=0,71$); IL-8 ($p=0,85$), IL-13 ($p=0,33$), Lisozima ($p=0,96$), MCP-1 ($p=0,27$), Pepsinogênio ($p=0,86$), TNF- α ($p=0,38$) e IFN- γ ($p=0,84$). As caixas representam o intervalo interquartil, ou 50% das observações, expressas como n-vezes a diferença entre os grupos em relação ao gene referência. As linhas pontilhadas representam a mediana de expressão gênica. As barras representam as observações máxima e mínima.

Zaros (2006) estudando grupos de bovinos Nelore resistentes e sensíveis à infecção natural por nematódeos gastrintestinais encontrou aumento na expressão de IL-4 e IL-13 na mucosa do abomaso do grupo resistente. Este aumento é geralmente decorrente de infecções crônicas, já que os animais sempre foram expostos aos parasitos. Balic et al (2006) também encontrou aumento na expressão de IL-4 na mucosa de ovinos infectados com *Haemonchus contortus* após 9 e 22 semanas de infecção. Canals et al (1997) estudando bovinos infectados com *Ostertagia ostertagi* observou aumento na expressão dos genes IL-4 e IFN- γ na mucosa de animais com mais de três semanas de infecção.

Neste experimento, as amostras do grupo infectado apresentaram amplificação de IL-4 entre 29 e 37 ciclos. Já no grupo controle, em três dos cinco animais não foi detectado e nos outros dois, a amplificação foi muito baixa ($Ct > 37$ ciclos). É possível que o pouco período de infecção não tenha sido suficiente para aumentar os níveis desta interleucina. Em um estudo com ovinos IFN- γ , IL-5 e IL-13

aumentaram no terceiro dia após a infecção com *Haemonchus contortus*. Já IL-4 teve foi detectável apenas no quinto dia pós infecção (MEEUSEN et al, 2005).

IL-13 foi detectada mas não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Provavelmente, os níveis de expressão deste gene ainda estivessem subindo na data da coleta. Isso pode ser uma evidencia que IL-13 seja expressa antes de IL-4, como já foi relatado por Meeusen et al (2005) que observou picos de IL-13 no terceiro dia pós infecção. No entanto, em infecções com *Ostertagia ostertagi* não houve diferenças na expressão de IL-13 na mucosa do abomaso entre animais infectados e não infectados após três semanas da última infecção (CLAREBOUT et al, 2005). Também não foram observadas diferenças na expressão de IL-13 em bovinos resistentes da raça Angus infectados com *Ostertagia* e *Cooperia* quando comparado a animais sensíveis sete dias após a infecção (LI et al, 2007).

Interleucinas como IL-2 e IL-12, caracterizadas como Th1 e com grande importância em infecções por bactérias e vírus, não apresentaram diferenças entre os grupos estudados (JANKOVIC, 2001). Em abomaso, a amplificação foi muito tardia com Cts maiores que 40 ciclos, o que indica que estas interleucinas não devam ser importantes para iniciar a resposta imune primária a infecções por *Haemonchus*. Bovinos da raça Angus infectados com endoparasitos também não apresentaram diferenças na expressão destas duas citocinas (LI et al, 2007). Clarebout et al (2005) encontraram decréscimo na expressão destas duas citocinas em linfonodos mas não em abomaso bovinos infectados com *Ostertagia ostertagi*.

Zaros (2006) não encontrou diferenças na expressão de IL-2 e IL-12 de bovinos Nelore resistentes, nem em linfonodos, nem em abomaso após infecções por helmintos. Em infecções de ovinos com *Haemonchus contortus* IL-12 também não teve expressão alterada (LACROUX et al, 2006). Entretanto, tanto IL-12 quanto IL-2 já foram relacionadas à suscetibilidade às infecções gastrintestinais (MOUNTFORD;PEARLMAN, 1998) e também promovendo inflamação intestinal (SUGIMOTO et al, 2007).

Assim como IL-2 e IL-12, IFN- γ confere resistência a infecções por vírus e bactérias. Já em infecções por helmintos, sua expressão é maior em animais sensíveis, podendo dizer então que ele atua conferindo suscetibilidade a esse tipo de infecção (GRENCIS, 2001). O aumento de IFN- γ já foi observado em infecções causadas por diferentes tipos de parasitos gastrintestinais, sendo associado com

diminuição de OPG e também neutralizando a resposta Th2 (CANALS et al, 1997; NAKAMURA et al, 2002; MEEUSEN et al, 2005). No entanto, Gill (2000), Clarebout et al (2005), Zaros (2006), Craig et al (2007) associaram o aumento desta citocina à suscetibilidade à infecção, enquanto Craig et al (2007) não observaram alterações na expressão, corroborando os dados aqui apresentados.

As quimiocinas têm sido foco crescente de pesquisas. IL-8 (CXCL8) está entre as mais estudadas e relacionada geralmente com uma resposta de hipersensibilidade tardia e ativação de neutrófilos (CASSWELL, 1999). Em infecções com parasitos gastrintestinais está relacionado à imunidade de bovinos infectados com *Fasciola gigantica* e com filaria, conferindo proteção e resistência (BABU et al, 2003; MOLINA, 2005). Infecções com *Haemonchus*, *Cooperia* e *Ostertagia* não estão associadas à alterações nos níveis de IL-8 (Zaros, 2006; LI et al, 2007), como pode também ser observado no presente estudo.

MCP-1 ainda é uma quimiocina pouco estudada e parece ter quantidades similares em todos os tecidos. Entretanto, super-expressão já foi associada com respostas a infecções helmínticas e a diferentes alérgenos e deve estar relacionada ao recrutamento de leucócitos no trato gastrintestinal (DUNPHY et al, 2001). No experimento aqui relatado, não houve diferenças significativas entre os grupos desafiados e não desafiados.

Infecções helmínticas causam alterações morfológicas e fisiológicas no abomaso, como aumento de células produtoras de muco, danos epiteliais, elevação nas concentrações de gastrinas e pepsinogênio, tendo importância tanto nas fases larvais quanto no verme adulto (SIMPSON, 2000; MULCAHY, 2004). A quantificação relativa de lisozima e pepsinogênio, neste experimento, demonstrou uma ampla variabilidade entre e dentro dos grupos. Isso está de acordo com Simpson (2000) que demonstrou que a secreção de mucinas e pepsinogênio começa a aumentar após 2 a 4 dias da infecção de ovinos com *Haemonchus*, 5 a 6 dias de infecção com *Teladorsagia circumcincta* e 16 dias após bovinos serem infectados com *Ostertagia ostertagi*, um parasito semelhante à *Haemonchus* spp que vive em regiões temperadas.

Como se pode observar, há variação de resultados encontrados entre este e outros estudos. Isso pode ser devido tanto à impossibilidade de estabelecer claramente uma polarização Th2 em abomaso no período investigado, como também, pela diferença entre os delineamentos experimentais, grupos genéticos e

tipos de infecção. Esse último é muito importante pois se sabe que diferentes citocinas são expressas em diferentes tipos, tempos e fases da infecção (LAWRENCE, 2003; JANEWAY et al, 2007). No caso deste trabalho, o interesse era verificar a resposta à primeira infecção, sendo que no período de 7 dias foi possível detectar polarização de citocinas nos linfonodos, mas provavelmente foi tempo insuficiente para se entender o que ocorre em abomaso.

Desta maneira, concordando com os dados das contagens de eosinófilos e mastócitos em abomaso, a quantificação relativa desse tecido foi altamente variável e não resultou em um padrão característico da infecção no tempo analisado.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que foi possível evidenciar a super expressão de duas citocinas Th2 em linfonodo, o que indica polarização Th2. No entanto, para abomaso esse padrão não foi observado, devido provavelmente ao pouco tempo de infecção que os animais foram submetidos. Dessa maneira, é interessante que novos estudos sejam realizados com bovinos infectados com *Haemonchus* spp, abrangendo maior número de animais, análises em diferentes tempos de infecção e a quantificação de novos genes com o objetivo de evidenciar melhor o mecanismo da resposta imune de bovinos.

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste experimento, conclui-se que IL-4 e IL-13 iniciam a resposta imune em linfonodos de bovinos infectados com helmintos do gênero *Haemonchus* spp após os primeiros sete dias, evidenciando uma possível polarização inicial Th2. Em abomaso, esse padrão não foi observado claramente durante esse período, assim como, não foi possível detectar aumento significativo de mastócitos e eosinófilos entre os grupos, que seriam característicos nesse tipo de infecção, sugerindo que essa resposta seja mais tardia.

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 4 ed : Rio de Janeiro : Revinter, 544 p, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Exportações mundiais de carne bovina**. Disponível em <<http://www.abiec.com.br/estatisticas/93.pdf>> .Acesso em 10 de dezembro de 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Total das exportações brasileiras de carne bovina** . Disponível em <http://www.abiec.com.br/tabela.asp?id_perodo=5> .Acesso em 02 de janeiro de 2008a.

ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne). **Produção mundial de carne Bovina** . Disponível em <<http://www.abiec.com.br/estatisticas/94.pdf>> .Acesso em 02 de janeiro de 2008b.

ACHI, Y.L.; ZINSSTAG, J.; YAO, K.; YEO, N.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Host specificity of *Haemonchus* spp for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 151–158, 2003.

AL-BADER, M.D.; AL-SARRAF, H.A. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat – validation by semi-quantitative RT-PCR. **Development Brain Research**, v. 158, p. 38 – 45, 2005.

AMARANTE, A.F.T., BAGNOLA JR., J., AMARANTE, M.R.V., BARBOSA, M.A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 73, p. 89–104, 1997.

AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; HUNTLEY, J.F.; MAZZOLIN, L.P.; GOMES, J.C. Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three

breeds of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 99 – 107, 2005.

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, p. 91–106, 2004.

ANZIANI, O.S.; SUAREZ, V.; GUGLIELMONE, A.A.; WARNKE, O. GRANDE, H.; COLES, G.C. Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 303–306, 2004.

ARAÚJO, J.V; GUIMARÃES, M.P.; CAMPOS, A.K.; SÁ, N.C.; SARTI, P.; ASSIS, R.C.L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 457 – 463, 2004.

ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrintestinal nematode parasites in southeastern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, p. 117 – 122, 1998.

ARTIS, D.; HUMPHREYS, N.E.; BANCROFT, A.J.; ROTHWELL, N.J.; POTTEN, C.S; GRENCIS, R.K. Tumor Necrosis Factor - α is a critical component of interleukin 13-mediated protective T Helper Cell Type 2 Responses during Helminth Infection. **J. Exp. Med.**, v. 190, n. 7, p. 953 – 962, 1999.

BABU, S.; NUTMAN, T.B. Proinflammatory Cytokines Dominate the Early Immune Response to Filarial Parasites. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 6723 – 6732, 2003.

BALIC, A., BOWLES, V.M., MEEUSEN, E.N. Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.75, p. 109 – 120, 2000.

BALIC, A., BOWLES, V.M., MEEUSEN, E.N. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Parasite Immunology**, v. 24, p. 39 – 46, 2002.

BALIC, A., CUNNINGHAM C.P., MEEUSEN, E.N. Eosinophil and nematode interactions with *Haemonchus contortus* Larvae in the ovine gastrointestinal tract. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 107 – 115, 2006.

BANCROFT, A.J.; MCKENZIE, A.N.J.; GRENCIS, R.K. A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection. **The Journal of Immunology**, v. 160, n.7, p. 3453 – 3461, 1998.

BEHM, C.A.; OVINGTON, K.S. The role of eosinophils in parasitic helminth Infections: Insights from Genetically Modified Mice. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, 2000.

BARGER, I.A. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 41 – 47, 1999.

BIANCHIN, I.; CATTO, J.B.; KICHEL, A.N.; TORRES, R.A.A.; HONER, M.R. The effect of the control of endo- and ectoparasites on weight gains in crossbred cattle (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*) in the central region of Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 39, p. 287 – 296, 2007.

BIANCHIN, I. Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados e o controle estratégico no Brasil.. In: Terezinha padilha. (org.). **Controle dos Nematódeos Gastrintestinais em Ruminantes**. Coronel Pacheco-MG:Embrapa-CNPGL, v. , 1996, p. 113-156.

BIANCHIN, I.; HONER, M. R.; NUNES, S.G.; NASCIMENTO, Y.A.; CURVO, J.B.E.; COSTA, F.P. **Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados e o controle estratégico no Brasil**. EMBRAPA, 1993, 120 p., Circular técnica 24.

BISHOP, S.C.; STEAR, M.J. Modeling of host genetics and resistance to infectious diseases: understanding and controlling nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 147–166, 2003.

BLASCHKE, V.; REICHA, K.; BLASCHKEB, S.; ZIPPRICHA, S.; NEUMANN, C. Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology. **Journal of Immunological Methods**, v. 246, p. 79–90, 2000.

BOGAERT, L.; VAN POUCKE, M.; DE BAER, C.; PEELMAN, L.; GASTHUYS, F.; Martens, A. Selection of a set of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in normal equine skin and in equine sarcoids. **BMC Biotechnology**, v. 6, 24, 2006, DOI:10.1186/1472-6750-6-24.

BOLLIGER, F.P. **Produção da pecuária municipal**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 05 de março de 2006. (Coord.).

BOWER, N.V.; MOSER, R.J.; HILL, J.R.; LEHNERT, S.A. Universal reference method for real-time PCR gene expression analysis of preimplantation embryos. **BioTechniques**, v. 42, p. 199 – 206, 2007.

BRICARELLO, P.A.; ZAROS, L.G.; COUTINHO, L.L.; ROCHA, R.A.; KOOYMAN, F.N.J.; VRIES, E.; GONÇALVES, J.R.S; LIMA, L.G.; PIRES, A.V.; AMARANTE, A.F.T. Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 30, p. 272- 278, 2007.

BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T.; ROCHA, R.A.; CABRAL FILHO, S.L.; HUNTLEY, J.F.; HOUDIJK, J.G.M.; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 99 – 109, 2005.

BRICARELLO, P.A.; GENNARI, S.M.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; VAZ,

C.M.S.L.; GONÇALVES DE GONÇALVES, I.; ECHEVARRIA, F.A.M. Worm burden and immunologica responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following infection with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 75 – 83, 2004.

BROWN, W.C.; RICE-FICHT, A.C.; MARK ESTES, D. Bovine type 1 and type 2 responses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 63, p. 45 – 55, 1998.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse trascription polymerase chain reaction assays.**Journal of Molecular Endocrinology**, v.25, p. 169 -193, 2000.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23–39, 2002.

BUSTIN, S.A. Real-Time Reverse Transcription PCR. **Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics**, p. 1131 – 1335, 2005a.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective.**Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, p. 597–601, 2005b.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, p. 155 – 166, 2004.

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

CASWELL, J.L.; MIDDLETON, D.M.; GORDON, J.R. Production and functional characterization of recombinant bovine interleukin-8 as a specific neutrophil activator

and chemoattractant. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, p. 327 – 340, 1999.

CHRISTENSEN, C.M., ZARLENGA, D.S., GASBARRE, L.C., *Ostertagi, Haemonchus, Cooperia, Oesophagostomum*: construction and characterization of genus-specific DNA probes to differentiate important parasites of cattle. **Experimental Parasitology**, v. 78, p. 93 – 100, 1994.

CLAEREBOUT, E.; VERCAUTEREN, I.; GELDHOF, P.; OLBRECHTS, A; ZARLENGA, D.S; GODDEERIS, B.M.; Cytokine response in immunized and non-immunized calves after *Ostertagia ostertagi* infection. **Parasite Immunology**, v.27, p. 325 – 331, 2005.

CORBETT RESEARCH LTD; PFAFFL, M.W. **Manual REST 2005**. 2005

CORWIN, R.W. Economics of gastrointestinal parasitism of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 451 – 460, 1997.

CONSTANT, S.L.; BOTTOMLY K. induction of th1 and th2cd4 t cell responses: the alternative approach. **Annual Review Immunology**. v. 15, p. 297 – 322, 1997.

COUSSENS, P.M.; NOBIS, W. Bioinformatics and high throughput approach to create genomic resources for the study of bovine immunobiology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.86, p. 229 – 244, 2002.

CRAIG, N. M.; MILLER, H.R.P; SMITH, W.D.;KNIGHT, P.A. Cytokine expression in naïve and previously infected lambs after challenge with *Teladorsagia circumcincta*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 20, n.1-2, p. 47 – 54, 2007.

DE JONGE, H.J.M.;FEHRMANN, R.S.N.; BONT, E.S.J.M.; HOFSTRA, R.M.W.; GERBENS, F.; KAMPS, W.A.; VRIES, E.G.E.; VAN DER ZEE, A.G.J.; TE MEERMAN, G.J.;TER ELST,A. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. **PLoS ONE**, n. 9, e898, p. 1 – 5, 2007.

DESCHOOLMEESTER, M.L.; LITTLE, M.C.; ROLLINS, B.J.; ELSE, K.J. Absence of CC Chemokine Ligand 2 Results in an Altered Th1/Th2 Cytokine Balance and Failure to Expel *Trichuris muris* Infection. **The Journal of Immunology**, v.170, p. 4693 – 4700, 2003.

DHEDA, K.; HUGGETT, J.F.; BUSTIN, S.A.; JOHNSON, M.A.; ROOK, G.; ZUMLA, A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **BioTechniques**, v. 37, 112 – 119, 2004.

DIDIERLAURENT, A.; SIRARD, J.C.; KRAEHENBUHL, J.P.; NEUTRA MR. How the gut senses its content. **Cell Microbiology**, v.4, n.2, 2002.

DUNPHY, J.; HORVATH, A.; BARCHAM, G.; BALIC, A.; BISCHOF, R; MEEUSEN, E. Isolation, characterization and expression of mRNAs encoding the ovine CC chemokines, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 α and -2. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, p. 153 – 164, 2001.

DYBKAER, K.; IQBAL, J.; ZHOU, G.; GENG, H.; XIAO, L.; SCHMITZ, A.; D' AMORE, F.; CHAN, W.C. Genome wide transcriptional analysis of resting and IL2 activated human natural killer cells: gene expression signatures indicative of novel molecular signaling pathways. **BMC Genomics**, v. 8, 2007, DOI:10.1186/1471-2164-8-230.

ELSE, K.J. Have gastrointestinal nematodes outwitted the immune system? **Parasite Immunology**, v. 27, p. 407 – 415, 2005.

ELSE, K.L.; FINKELMAN, F.D. Intestinal nematodes parasites, cytokines and effector mechanisms. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1145 – 1158, 1998.

ERB, K.J.; TRUJILLO, C.; FUGATE, M.; MOLL, H. Infection with the helminth *Nippostrongylus brasiliensis* does not interfere with efficient elimination of *Mycobacterium bovis* bcg from the lungs of mice. **Clinical and diagnostic Laboratory Immunology**, p. 727–730, 2002.

FALLON, P.G.; JOLIN, H.E.; SMITH, P.; EMSON, C.L.; TOWNSEND, M.J.; FALLON, R.; SMITH, P.; MCKENZIE, A.N.J. IL-4 induces characteristic th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. **Immunity**, v. 17, p. 7–17, 2002.

FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; MORRIS, S.C.; GILDEA, L.; STRAIT, R.; MADDEN, K.B.; SCHOPF, L.; URBAN JR, J.F. Interleukin-4- and interleukin- 13- mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 139–155, 2006.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3 ed., São Paulo: Cone, 1997.

FREITAS, M.G. **Helmintologia Veterinária**. 4 ed., Belo Horizonte: Gráfica Rabelo Ltda, 1980.

GARCIA-CRESPO, D.; JUSTE, R.A.; HURTADO, A. Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of *PrP* gene expression and genetic susceptibility to scrapie. **BMC Veterinary Research**, v. 1, n.3, 2005, DOI:10.1186/1746-6148-1-3.

GARSDIE, P.; KENNEDY, M. W.; WAKELIN, D.; LAWRENCE, C. E. Immunopathology of intestinal helminth infection. **Parasite Immunology**, v. 22, p. 605 – 612, 2000.

GASBARRE, L.C. Effects os gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 327 – 343, 1997.

GASBARRE, L.C., LEIGHTON, E.A., BRYANT, D. Reliability of a single fecal egg per gram determination as a measure of individual and herd values for *Trichostrongyle* nematodes of cattle. **American Journal of Veterinary Research**. v. 57, p. 168–171, 1996.

GASBARRE, L.C., LEIGHTON, E.A., SONSTEGARD, T. Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrintestinal nematodes. **Veterinary**

Parasitology, v. 98, p. 51 – 64, 2001.

GENETICS HOME REFERENCE. Disponível em
[.<http://ghr.nlm.nih.gov/gene=hprt1>](http://ghr.nlm.nih.gov/gene=hprt1). Acesso em 01 de janeiro de 2008.

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

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

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKS, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386 – 401, 2001.

GLASS, E.J.; PRESTON, P.M.; SPRINGBETT, A.; CRAIGMILE, S; KIRVAR, E.; WILKIE, G.; DUNCAN-BROWN, C.G. *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly differently levels of acute phase proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 337 – 347, 2005.

GOOSSENS, K.; VAN POUCKE, M.; VAN SOOM, A.; VANDESOMPELE, J.; VAN ZEVEREN, A; PEELMAN, L.C. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. **BMC Developmental Biology**, v.5, n. 27, 2005, DOI:10.1186/1471-213X-5-27.

GRENCIS, R.K. Cytokine regulation of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection—from host to parasite. **Veterinary Parasitology**, v.100, p. 45–50, 2001.

HAYES, K.S.; BANCROFT, A.J.; GRENCIS, R.K. The role of TNF- α in *Trichuris*

muris infection II: global enhancement of ongoing Th1 or Th2 responses. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 583–594, 2007.

HELMBY, K.S.; BANCROFT, A.J.; GRENCIS, R.K. IFN- γ -independent effects of IL-12 during intestinal nematode infection. **Journal of Immunology**, v.171, p. 3691 – 3696, 2003.

HENDRIKS-BALK, M.C.; MICHEL, M.C.; ALEWIJNSE, A.E. Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data. **Basic Research Cardiology**, v. 102, n. 3, p. 195 – 197, 2007.

HEWITSON, J.P.; HAMBLIN, P.A.; MOUNTFORD, A.P. In the absence of CD154, administration of interleukin-12 restores Th1 responses but not protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infection and immunity**, p. 3539–3547, 2007.

HOBERG, E.; LICHTENFELS, J.; GIBBONS, L. Phylogeny for species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): considerations of their evolutionary history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 1085-1102, 2004.

HONDA, Y.; WAITHAKA, M.; TARACHA, E.L.; DUCHATEAU, L.; MUSOKE, A.J.; MCKEEVER, D.J. Delivery of the *Theileria parva* p67 antigen to cattle using recombinant vaccinia virus: IL-2 enhances protection. **Vaccine**, v. 16, n. 13, p. 1276 – 1282, 1998.

HOPKINS, J. Molecular immunology – gene regulation and signal transduction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, p. 245 – 249, 2002.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes Immunology**, v.6, n. 4, p. 279 – 284, 2005.

HUSE, M.; LILLEMEIER, M.F.; KUHNS, M.S.; CHEN, D.S.; DAVIS, M.M. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. **Nature Immunology**, v. 07,

p. 247 – 255, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores IBGE 2007**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/default.shtm> .Acesso em 27 de dezembro de 2007.

JABBAR, A; IQBAL, Z.; KERBOEUF, D.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M.; AFAQ, M. Anthelmintic resistance: The state of play revisited. **Life Sciences**, v. 79, p. 2413 – 2431, 2006.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, W.; SHOLOMCHIMK, M.J. **Imunobiologia**: o sistema imune na saúde e na doença. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2007.

JANKOVIC, D.; LIU, Z.; GAUSE W.C. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. **TRENDS in Immunology** , v. 22, n. 8, 2001.

KANOBANA, K., PLOEGER, H.W., VERVELDE, L. Immune expulsion of the trichostrongylid *Cooperia oncophora* is associated with increased eosinophilia and mucosal IgA. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1389–1398, 2002.

KANOBANA, K.; KOETS, A .; KOOYMAN, F.N.J.; BAKKER, N.; PLOEGER, H.W.; VERVELDE, L. B cells and antibody response in calves primary-infected or re-infected with *Cooperia oncophora*: influence of priming dose and host responder types. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1487.–.1502, 2003

KIDD, P. Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, 2003.

KONNAI, S.; TATSUFUNNI, U., OHASHI, K., ONUMA, M. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. **Veterinary Microbiology**. v. 94. p. 283 – 294, 2003.

KONTANIS, E.J.; REED, F.A. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. **Journal Forensic Science**, v. 1, n. 4, p. 795 – 804, 2006.

KOUADJO, K.E.; NISHIDA, Y.; CADRIN-GIRARD, J.F.; YOSHIOKA, M.; ST-AMAND, J. Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. **BMC Genomics**, v. 8, 127, 2007, DOI:10.1186/1471-2164-8-127.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, 95–125, 2006.

KUMAR, N.; MITRA, A; GANGULY, I.; SINGH, R.; DEB, S.M.; SRIVASTAVA, S.K.; SHARMA, A. Lack of association of brucellosis resistance with (GT)₁₃ microsatellite allele at 30UTR of NRAMP1 gene in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus x Bos taurus*) cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 111, p. 139–143, 2005.

LACROUX, C.; NGUYEN, T.H.C.; ANDREOLETTI, O.; PREVOT, F.; GRISEZ, C.; BERGEAUD, J.P.; GRUNER, L.; BRUNEL, J.C.; FRANCOIS, D.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. **Veterinary Research**, v. 37, p. 607 – 622, 2006.

LARSEN, M., NANSEN, P., GRONVOLD, J., WOLSTRUP, J., HENRIKSEN, S.A., Biological control of gastrointestinal nematodes—facts, future, or fiction? **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 479 – 492, 1997.

LAWRENCE, C.E. Is there a common mechanism of gastrointestinal nematode expulsion? **Parasite Immunology**, v. 25, p. 271–281, 2003.

LEE, J.W.; BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; HUANGA, M.J.; ZHAO, X. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary

infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. **Veterinary Research**, v. 37, p. 219 – 229, 2006.

LEUTENEGGER, C.M.; MISLIN, C.N.; Sigrist, B.; Ehrenguber, M.U.; HOFMANN-LEHMANN, M.; LUTZ, H. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, p. 2291 – 305, 1999.

LI, R.W.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSELL, C.P.; GASBARRE, L.C. Local inflammation as a possible mechanism of resistance to gastrointestinal nematodes in Angus heifers. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 100–107, 2007.

LIEW, F.Y. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 55 – 60, 2002.

LIVAK, K.J.; FLOOD, S.J.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Application**, v. 4, p. 357 – 362, 1995.

MACDONALD, A.S; ARAUJO, M.I.;PEARCE, E.J. Immunology of parasitic helminth infections. **Infection and Immunity**, p. 427– 433, 2002.

MACRAE J.C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 52, p.121 – 130, 1993.

MAINGI, N.; KRECEK, R.C.; VAN BILJON, N. Control of gastrointestinal nematodes in goats on pastures in South Africa using nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* and selective anthelmintic treatments. **Veterinary Parasitology**. v.138, p.329 – 336, 2006.

MAMO, S.; GAL, A.B.; BODO,S.; DINNYES, A. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. **BMC**

Developmental Biology, v. 7, n.14, 2007, DOI:10.1186/1471-213X-7-14.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA).

Agronegócio Brasileiro: Uma Oportunidade de Investimentos. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em 20 de janeiro de 2008.

MASON, P.C., MCKAY, C.H. Field studies investigating anthelmintic resistance in young cattle on five farms in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 54, n. 6, p. 318 – 322, 2006.

MATTIOLI, R.F.; PANDEY, V.S.; MURRAY, M.; FITZPATRICK, J.L. Immunogenetic influences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) and trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. **Acta Tropica**, v. 75, p. 263–277, 2000.

MATTOS, M.J.T., OLIVEIRA, C.M.B, GOUVEA, A.S., ANDRADE, C.B.; *Haemonchus* resistente à lactona macrocíclica e caprino naturalmente parasitados. **Ciência Rural**, v. 34, p. 879 – 883, 2004.

MEEUSEN, E.N.T.; BALIC, A.; BOWLES, V. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 121–125, 2005.

MELO, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L; ARAÚJO, J.V.; MELO, A.C.F.L. Atividade predatória do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra o nematóide *Haemonchus contortus*, após passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos. **Ciência Rural**, v.33, p. 169 – 171, 2003

MOLINA, E.C. Serum interferon-gamma and interleukins-6 and -8 during infection with *Fasciola gigantica* in cattle and buffaloes. **Journal of Veterinary Science**, v. 6, n.2, p. 135 – 139, 2005.

MONCADA, D.M.; KAMMANAKIMINTI, S.J.; CHADEE, K. Mucin and toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. **Trends in Parasitology**, v.19,

n.7, p. 305 – 311, 2003.

MORRIS, C.A. A review of genetic resistance to disease in *Bos taurus* cattle. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 481- 491, 2006.

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. ; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, p. 93 – 100, 2003.

MOUNTFORD, A.P.; PEARLMAN, E.. Interleukin-12 and the host response to parasitic helminths; the paradoxical effect on protective immunity and immunopathology. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 509–517, 1998;

MULCAHY, G.; O'NEILLB, S.; DONNELLYC, S.; DALTONA, J.P. Helminths at mucosal barriers—interaction with the immune system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 853 – 868, 2004.

NAKAMURA, Y.; SYOUJI, T.; ONODERA, T.; KAWASHIMA, K.; INUMARU, S.; YOKOMIZO, Y. Effects of recombinant bovine interferon g on *Strongyloides papillosus* infection in calves. **Journal of Helminthology**, v.76, p. 59 – 64, 2002.

NAKATA, L.C. Níveis de citocinas em bovinos (*Bos indicus*) desafiados com o carrapato *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887). São Carlos:Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, UFSCar, 2006.

NEURATH, M.F.; FINOTTO, S.; GLIMCHER, L.H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. **Nature Medicine**, v. 8; n. 6; p. 567 – 573, 2002.

NICOLAU,C.V.J; AMARANTE, A.F.T.; ROCHA,G.P.; GODOY, W.A.C. Relação entre desempenho e infecções por nematódeos gastrintestinais em bovinos Nelore em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n. 4 Belo Horizonte, 2002.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-

PCR. **Nature Protocols**, v. 1, n.3, p. 1559 – 1582, 2006.

NYGAARD, A.B.; JORGENSEN, C.B.; CIRERA, S.; FREDHOLM, M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. **BMC Molecular Biology**, v.8, 2007, DOI:10.1186/1471-2199-8-67.

ONTSOUKA, E.C.; KORCZAK, B.; HAMMON, H.M.; BLUM, J.W. Real-Time PCR Quantification of Bovine Lactase mRNA: Localization in the Gastrointestinal Tract of Milk-Fed Calves. **Journal of Dairy Science**, v.87, p. 4230 – 4237, 2004.

PÉREZ, J.; GARCIA, P.M.; HERNANDEZ, S.; MARTINEZ-MORENO, A; MULAS, J.M.; CAMARA, S. Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Research**, v. 32, p. 463 – 473, 2001.

PERNTHANER, A.; COLE, S.A.; MORRISON, L.; HEIN, W.R. Increased Expression of Interleukin-5 (IL-5), IL-13, and Tumor Necrosis Factor Alpha Genes in Intestinal Lymph Cells of Sheep Selected for Enhanced Resistance to Nematóides during Infection with *Trichostrongylus colubriformis*. **Infection and Immunity**, p. 2175 – 2183, 2005.

PERRY, B.D.; RANDOLPH, T.F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p.145 – 168, 1999.

PFAFF, A.W.; KIRCH, A.K.; HOFFMANN, W.H.; BANLA, M.; SCHULZ-KEY, H.L; GEIGER, S.M.; SOBOSLAY, P.T. Regulatory effects of IL-12 and IL-18 on *Onchocerca volvulus*- and *Entamoeba histolytica* -specific cellular reactivity and cytokine profiles. **Parasite Immunology**, v. 25, p. 325–332, 2003.

PFAFFL, M. **Livestock Transcriptomics: quantitative mRNA analytics in molecular endocrinology and physiology**. Disponível em <<http://www.gene-quantification.de/habilitation-pfafl-livestock-transcriptomics.pdf>> .Acesso em 6 de novembro de 2007a.

PFAFFL, M. Relative quantification. Disponível em: <<http://www.gene-quantification.de/pfafl-rel-quan-book-ch3.pdf>> . Acesso em 07 de novembro de 2007b.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p. 2002 – 2007, 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n.9, p. 1 -10, 2002.

PLOEGER, H. AND A. KLOOSTERMAN, Gastrintestinal infections and weight gain in dairy replacement stock: first-year calves. **Veterinary Parasitology**, v. 46, p. 223 – 241, 1993.

POMPEU, J.; VIEIRA-BRESSAN M.C.R.; ABDALLA, L.A.; GENNARI, S.M. Body water metabolism, water and nitrogen balance in calves harboring different infection levels of *Haemonchus placei*. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 6, n. 2, p. 123-132, 1997.

RADONIC, A; THULKE, S.; MACKAY,I.M.; LANDT,O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 856 – 862, 2004.

RANDEGGER, C.C.;HACHLER, H.A. Real-Time PCR and Melting Curve Analysis for Reliable and Rapid Detection of SHV Extended-Spectrum b-Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1730–1736, 2001.

RHOADS, R.P., MCMANAMAN, C., INGVARTSEN, K.L., BOISCLAIR, Y.R. The housekeeping genes GAPDH and cyclophilin are regulated by metabolic state in the liver of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n.11, p. 3423 – 3429, 2003.

RHODES, S. G.; GRAHAM, S.P. Is ‘timing’ important for cytokine

polarization? **TRENDS in Immunology**, v.23, n. 5, p. 246 – 249, 2002.

RIFFKIN, M.C.; SEOW, H.F.; WOOD, P. R.; BROWN, L.E.; JACKSON, D.C.; SCHEERLINCK, J.P. *Trichostrongylus colubriformis* extract upregulates TNF- α receptor expression and enhances TNF- α sensitivity of L929 cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 575 – 579, 2000.

RIRIE, K.; RASMUSSEN, R.P.; WITTEWER, C.T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 245, p. 154 –160, 1997.

ROT, A.; VON ANDRIA, U.H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. **Annual Review Immunology**, v. 22, p. 891 – 928, 2004.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2700 p., 2001.

SCOTT, I., HODGKINSON, S. M., KHALAF, S., LAWTON, D. E.B., COLLETT, M. G., REYNOLDS, G. W., POMROY, W. E.; SIMPSON, H.V. Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: abomasal morphology. **International Journal for Parasitology** , v. 28, p. 1383 – 1392, 1998.

SIEFKER, C., RICKARD, L.G., Demonstration of shared carbohydrate epitopes in intestinal proteins of some bovine gastrointestinal nematodes. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 524 – 528, 1998.

SIMPSON, H.V. Pathophysiology of Abomasal Parasitism: Is the Host or Parasite Responsible? **The Veterinary Journal**, v. 160, p. 177–191, 2000.

SINDAN, Sindicato Nacional da indústria de produtos para saúde animal. Disponível em : <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>> . Acesso 15 de dezembro de 2007.

SONSTEGARD, T.S.; GASBARRE, L.C. Genomic tools to improve parasite resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 387 – 403, 2001

SOUTELLO, R.G.; SENO, M.C.; AMARANTE, A.F. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern Sao Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, p. 360 – 364, 2007.

SOUTELLO, R.V.G.; CONDI, G.K.; PAES, F.; FONZAR, J.F. Influência do parasitismo e da suplementação protéica no desenvolvimento ponderal de novilhos mestiços Angus- Nelore e da raça Guzerá. **Ciências Agrárias e da Saúde**, v.2, p. 21 – 27, 2002.

STAFFORD, K.; COLLES, G.C. Nematode control practices and anthelmintic resistance in diary calves in the southwest of England. **Veterinary Record**, v. 144, p. 659 – 661, 1999.

STEAR, M.J., BAIRDEN, K., BISHOP, S.C., DUNCAN, J.L., GETTINBY, G., HOLMES, P.H., MCKELLAR, Q.A., PARK, M., STRAIN, S., MURRAY, M. How hosts control worms. **Nature**, v. 389, p. 27, 1997.

STORDEUR, P.; POULIN, L.F.; CRACIUN, L.; ZHOU, L.; SCHANDENE, L.; DE LAVAREILLE, A.; GORIELY, S.; GOLDMAN, M. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. **Journal of Immunological Methods**, v. 259, p. 55 – 64, 2002.

SUBAUSTE, C.S. Primary immunodeficiencies and susceptibility to parasitic infections. **Parasite Immunology**, v.28, p. 567–575, 2006.

SUGIMOTO, K.; OGAWA, A.; SHIMOMURA, Y.; NAGAHAMA, K.; MIZOGUCHI, A.; BHAN, A.K. Inducible IL-12-Producing B Cells Regulate Th2-Mediated Intestinal Inflammation. **Gastroenterology**, v.133, p. 124 – 136, 2007.

TEREFE, G.; LACROUX, C.; ANDREOLETTI, O.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; BERGEAUD, J.P.; PENICAUD, J.; ROUILLON, V.; GRUNER, V.; BRUNEL, J.C.; FRANCOIS, D.; BOUIX, J.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Immune response to

Haemonchus contortus infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 415–424, 2007.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 291–295, 1999.

TORRES, K. L. C.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J. Endogenous IL-4 and IFN- are Essential for Expression of Th2, but not Th1 Cytokine Message During the Early Differentiation of Human CD4 T Helper Cells. **Human Immunology**, v. 65, p. 1328 – 1335, 2004.

UCDNEMA. *Haemonchus contortus*. Disponível em <http://ucdnema.ucdavis.edu/imagemap/nemmap/Ent156html/E156haemB>> Acesso em 28 de dezembro de 2007.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4 ed. Japan Internacional Cooperation Agency, 1998.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J. DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. 2 ed. Guanabara Koogan. 1998.

VALASEK, M.A; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, p. 151–159, 2005.

VAN ZEVEREN, A.M.; VISSER, A; HOORENS, P.R.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E.; GELDHOF, P. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Ostertagia ostertagi* by the coefficient of variation and geNorm approach. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.153, n. 2, p. 224 - 227, 2007.

VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002.

VIRGINIA TEC (Virginia Polytech Institute and State University). **Control of Internal Parasites in Sheep**. Disponível em <<http://www.ext.vt.edu/pubs/sheep/410-027/figure1.gif>> . Acesso em 02 de janeiro de 2008.

WALDVOGEL, A S.; LEPAGE, M.S.; ZAKHER, A; REICHEL, M.P.; EICHER, R.; HEUSSLER, V.T. Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, p. 53 – 63, 2004.

WHITE, G.P., MEEUSEN, E.T.N., NEWTON, S.E. A single-chain variable region immunoglobulin library from the abomasal lymph node of sheep infected with the gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 78, p. 117 – 129, 2001.

WYNN, T.A. IL-13 EFFECTOR FUNCTIONS. **Annual Review Immunology**, v. 21, p. 425 – 456, 2003.

YATSUDA, A.P.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. Dynamics of the humoral immune response of calves infected and re-infected with *Cooperia punctata*. **Veterinary Parasitology**, v. 87, p. 287–300, 2000.

YOUNG, N.J.; THOMAS, C.J.; COLLINS, M.E.; BROWNLIE, J. Real-time RT-PCR detection of Bovine Viral Diarrhoea virus in whole blood using an external RNA reference. **Journal of Virological Methods**, v. 38, n. 1-2, p. 218 – 222, 2006.

ZARLENGA, D.S, BARRY CHUTE, M., GASBARRE, L.C., BOYD, P. A multiplex PCR assay for differentiating economically important gastrointestinal nematodes of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p. 199 – 209, 2001.

ZAROS, L.G. Descoberta e estudo de genes envolvidos na resposta imune a endoparasitas gastrintestinais em bovinos. Piracicaba: Departamento de Zootecnia, ESALQ/USP, 2006.

ZAROS, L.G.; BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T.; COUTINHO, L.L.
Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR
methodology. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 575 – 579, 2007.