

## **AValiação de Indicadores da Resposta Imune Ovina na Infecção Experimental com *Haemonchus contortus*, Sob Tratamento com Extrato Aquoso de *Poincianella pyramidalis***

### **Thaís Brito de Oliveira**

Instituto de Ciências da Saúde (ICS)– Universidade Federal da Bahia (UFBA).

### **Tatiane Santana Sales**

Instituto de Ciências da Saúde (ICS)– Universidade Federal da Bahia (UFBA).

### **Alessandro Bitencourt**

Instituto de Ciências da Saúde (ICS)– Universidade Federal da Bahia (UFBA).

### **Aloisio Bitencourt**

Instituto de Ciências da Saúde (ICS)– Universidade Federal da Bahia (UFBA).

### **José Tadeu Rayna**

Instituto de Ciências da Saúde (ICS)– Universidade Federal da Bahia (UFBA).

### **Antônio Pedro Froes**

Instituto de Ciências da Saúde (ICS)– Universidade Federal da Bahia (UFBA).

### **Soraya Castro Trindade**

Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

### **Vera Costa Vale**

Universidade Estadual da Bahia (UNEB).

### **Thiago Campanharo Bahiense**

Instituto de Ciências da Saúde (ICS)– Universidade Federal da Bahia (UFBA).

### **Roberto Meyer**

Instituto de Ciências da Saúde (ICS)– Universidade Federal da Bahia (UFBA).

## **RESUMO**

*Haemonchus contortus* é um nematoide gastrointestinal de ruminantes, principalmente de ovinos e caprinos, de grande importância mundial que causa diversas perdas econômicas. Este helminto tem apresentado resistência anti-helmíntica, o que vem dificultando o tratamento dos pequenos ruminantes pelos seus criadores. Por isso novas alternativas estão sendo testadas a fim de combater o parasita, a exemplo do extrato aquoso da planta *Poinciana pyramidalis*. Foram utilizados onze animais, divididos em três grupos: GI (sem infecção); Grupo II (infectados) e GIII (infectados e tratados). Para a infecção experimental utilizou-se aproximadamente 20.000 larvas L3. Durante 90 dias amostras de fezes foram colhidas para análise parasitológica, e de sangue para análise da resposta imunológica através da dosagem do anticorpo sérico IgG e da citocina Interferon gama. A administração do extrato da planta ocorreu no GIII no tempo 45 dias. Obteve-se no tempo 60 dias em relação aos resultados parasitológicos uma redução carga parasitária de 79% no Grupo III e uma eficácia do extrato de 85%; em relação à resposta imune ocorreu uma baixa produção de interferon gama. A produção de anticorpos séricos IgG foi levemente estimulado após a administração do extrato. Os resultados indicam que esta planta possui um moderado efeito relacionado aos ovos encontrados nas fezes, assim como um leve potencial imunomodulador. Faz-se necessário, novos estudos para verificar novos parâmetros imunológicos relacionados à infecção e a administração deste extrato em estudo.

Palavras chave: Ovinos, *Haemonchus contortus*, *Poinciana pyramidalis*, IgG.

## **INTRODUÇÃO**

A ovinocultura é uma das atividades mais antigas do mundo, tendo maior representatividade na Ásia, África e Oceania. No Brasil, este setor da economia corresponde a uma importante fonte de sustento familiar, principalmente na região nordeste, com destaque à produção de carne, leite e pele (Pereira et al., 2008).

Infelizmente, a ocorrência de parasitoses gastrointestinais é um fator de grande impacto à ovinocultura, pelo atraso no crescimento do animal, na redução da produção e qualidade da carne e de lã (Oliveira et al., 2011). Dentre os principais parasitos destacam-se: *Trichostrongylus* sp., *Cooperia* sp.,

Ostertagia (Teladorsagia) spp. Nematodirus sp. e Haemonchus contortus (Ramos, et al, 2004; Gadza, 2006; Macedo, 2007; Molento et al., 2013).

O nematoide gastrointestinal de ruminantes de pequeno a grande porte (caprinos, ovinos e bovinos), *H. contortus*, é bastante prevalente em todo o mundo e altamente patogênico, capaz provocar doenças agudas com alto índice de mortalidade (Kamaraj et al., 2011). A patologia provocada por este agente é denominada hemoncose, que vem sendo tratada com medicamentos denominados anti-helmínticos (Macedo et al, 2006; Souza et al., 2008).

Entretanto, o uso indiscriminado dos anti-parasitários tem levado ao desenvolvimento de cepas resistentes. A este processo denominamos resistência anti-helmíntica, o qual é influenciado diretamente por elementos como o ambiente, variações genéticas do hospedeiro e também do parasita, além da capacidade de seu sistema imune em responder a uma infecção (Molento, et al., 2013).

Alguns padrões da resposta imune estão diretamente relacionados à genética do hospedeiro tanto na susceptibilidade ou resistência parasitária relacionados com o parasitismo. Quando o organismo é infectado, a população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> é estimulada a produzir subpopulações de células que podem assumir o perfil Th1 ou Th2 a depender do tipo de antígeno e das citocinas envolvidas no processo de sinalização (Abbas, Lichtman & Pillai, 2011). Entretanto, de acordo com os estudos de Milonovic et al. (2010) existe também o perfil Th17 envolvido na resposta imune.

Organismos multicelulares como helmintos são parasitas extracelulares capazes de induzir resposta de perfil Th2, com predomínio da citocina IL-4. É importante salientar que além da IL-4 outras citocinas estão envolvidas na resposta Th2, a exemplo da IL-5, IL-10 e IL-13 que atuam como mediadores da resposta imune e inflamatória para produção de anticorpos das classes IgG, IgA e principalmente IgE, bem como na ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, componentes fundamentais na defesa contra helmintos (Abbas, Lichtman & Pober, 2005; Abbas, Lichtman & Pillai, 2011).

Para evitar a resistência dos parasitos aos anti-helmínticos comerciais, faz-se necessário tanto um trabalho de capacitação dos produtores no que se refere ao uso adequado destes produtos, quanto de pesquisas bioprospectivas para obtenção de biomoléculas. Diversos trabalhos têm sido desenvolvi-

dos com base no etnoconhecimento e na biodiversidade em busca de princípios ativos capazes de estimular o sistema imune auxiliando no controle e combate de parasitas (AMARANTE, 2004; SHAKYA, 2011, MILLER & HOROV, 2009).

Neste contexto, muitas plantas do semiárido nordestino vêm sendo utilizadas com objetivo de reduzir as cargas parasitárias de *H. contortus* em seus hospedeiros. Diante disso, o presente trabalho avaliou a ação anti-helmíntica e imunomoduladora do extrato bruto de *Poincianella pyramidalis* na resposta imune dos ovinos infectados com *H. contortus*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Antígenos de *Haemonchus contortus***

Utilizou-se o método modificado de Borges-dos-Santos e Cols (2010). Foram coletados, no abatedouro, vermes adultos machos e fêmeas do abomaso de ovinos e transferidos para um recipiente com soro fisiológico. Em seguida, foram lavados sucessivas vezes com tampão salina fosfato (TSF) pH 7,4, para retirada das impurezas e acondicionados em tubos cônicos de 15mL contendo cento e cinquenta parasitos de ambos sexos também em TSF com pH 7,4. Os parasitos de todos os tubos cônicos foram lisados por meio de cinco ciclos de 30 segundos com intervalos entre cada ciclo de 30s com frequência de 60 hertz por meio do aparelho Ultrasonic Processor. Em cada lise, o tubo cônico foi mantido em uma "cama de gelo".

Quando todos os parasitas de todos os tubos foram lisados, ocorreu a centrifugação à 8°C por 30 minutos a 1200G para separação do pellet e sobrenadante. O sobrenadante foi armazenado em tubos tipo ependorff estéreis e mantido no freezer a -20°C. Foi realizada a técnica de Lowry e Cols. (1951) para obtenção da dosagem de proteína de cada amostra, sendo encontrada a concentração de 5,34mg/mL.

### **Culturas de larvas L3 *Haemonchus contortus***

Para a cultura de larvas infectantes L3 de *Haemonchus contortus* foram coletados nos abatedouros, vermes adultos (principalmente fêmeas) do abomaso de ovinos. Estes foram transportados em solução fisiológica (0,09%) até o Laboratório de Parasitologia (ICS-UFBA). Em seguida, as fêmeas deste

parasito foram separadas dos machos, e colocadas em um recipiente onde foi adicionada solução fisiológica 0,09% aquecida (morna) em torno de mais ou menos 60°C, para que as mesmas fizessem a ovopostura (Borges, 2007). Além disso, as fêmeas foram dissecadas com auxílio de um bisturi para uma maior obtenção de ovos.

Após esta etapa, foi realizada a técnica da coprocultura (Roberts & O'sullivan, 1950) utilizando as fezes autoclavadas de ovinos como substrato (sem a presença de estruturas infectantes de qualquer parasito), solução fisiológica (a mesma da ovoposição) e fêmeas dissecadas, criando assim uma situação favorável para obtenção das larvas infectantes L3 (BORGES, 2007).

Para cada coprocultura, foram utilizada 4g de fezes estéreis. Foram adicionados também uma porção de maravalha, as fêmeas dissecadas e a solução fisiológica da ovoposição para umidificar o meio, controlando o excesso hídrico. Depois, a mistura foi transferida para um copo de vidro, permanecendo por 10 dias em temperatura ambiental (Ueno & Golçanves, 1995).

### **Extrato aquoso de *Poincinella pyramidalis***

O extrato aquoso de *P. pyramidalis* foi produzido no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, seguindo-se o protocolo de Bahia e colaboradores (2005). Foram utilizados 200g de folhas coletadas do município de Jaguarari (10° 15' 36" S, 40° 11' 45" W), situado a 400 km da cidade de Salvador, Bahia. O material foi seco em estufa ventilada, macerado em moinho do tipo Willey, submetido à extração através de infusão em água por 24 horas, liofilizado e acondicionado em placas de petri. Ao final do processo obteve-se 48g de extrato.

### **Infecção**

Foram utilizados 11 ovinos sem raça definida, de ambos os sexos (sendo quatro machos e onze fêmeas), com idade entre cinco e dez meses. Os ovinos foram mantidos em regime de confinamento em baias de piso ripado suspenso (Figura 1B) na Unidade Experimental (Figura 1A) de Salinas da Margarida da Universidade Federal da Bahia (12°52'16"S e 38°45'52"O), com alimentação balanceada à base de ração industrial, farelo de trigo, sal mineral, sorgo e feno e água ad libitum. Suplementação com vitamina B12 foi administrada no período anterior a infecção experimental, para fortalecer os animais.



**Figura 1.** A- Unidade Experimental do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Salinas das Margaridas- BA. B- Baía de piso ripado suspenso onde estavam confinados os animais. Fonte: Arquivo do autor.

Para mensuração da carga parasitária dos animais e identificação dos parasitos, fezes foram colhidas e avaliadas através da técnica Gordon & Whitlock (1939) e coprocultura. Em seguida todos os ovinos foram vermifugados com doramectina tendo sua carga parasitária mensurada novamente em três dias consecutivos (Borges, 2007). Vinte dias após a primeira vermifugação foram administrados albendazole e levamisole, respectivamente, respeitando um intervalo de 15 dias para aplicação de cada um. Um novo exame parasitológico das fezes foi realizado para confirmar a redução da carga parasitária igual à zero. Todos os antiparasitários aplicados nos animais seguiram as normas dos fabricantes obedecendo à relação dose versus peso vivo.

O total de onze ovinos foi dividido em três grupos contendo:

**I. Grupo I (Controle Negativo):** três animais não infectados com o *Haemonchus contortus*.

**II. Grupo II (Controle Positivo):** quatro animais infectados por via oral com as larvas infectantes L3 do *H. contortus* sem tratamento com extrato aquoso de *P. pyramidalis*.

**III. Grupo III (Infectado e tratado):** quatro animais infectados por via oral com as larvas infectantes L3 do *H. contortus* e com tratamento do extrato aquoso da *P. pyramidalis*.

A infecção dos ovinos com *H. contortus* nos Grupos II e III foi realizada inoculando pela via oral uma suspensão de água destilada contendo aproximadamente 20.000 larvas L3 oriundas da coprocultura

GILL et al., 2000) com auxílio de seringas de 20ml. O volume a ser inoculado teve como base o número de larvas contidas em 1ml da suspensão, com isso foi inoculado um total de 220ml por animal.

Com a certificação da alta carga parasitária, foi administrado em três dias consecutivos no tempo 45 dias o extrato da planta *P. pyramidalis* (10mg/Kg PV) diluído em água destilada, por via oral com auxílio de uma seringa de 20mL, tendo como parâmetro a relação dose versus peso vivo (Nunes, 2012).

### **Coleta de amostras**

Amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos ovinos com auxílio de luvas estéreis nos tempos 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias e armazenadas em caixas isotérmicas com gelo químico para o envio e análise no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências em Saúde (ICS/UFBA).

Para contagem de ovos de *H. contortus* utilizou-se a técnica de Gordon & Whitlock (1939) modificada por Whitlock (1948) cuja unidade é o OPG (ovos por grama de fezes). Para tanto, 2g de fezes diluídas em 58 ml de solução saturada de sal mantida em repouso por 30 minutos para flutuação dos ovos. Após este período amostras da mistura eram transferidas à Câmara de Macmaster para leitura em microscópio óptico, na objetiva de 10x e confirmado na objetiva de 40x.

Para confirmação da espécie dos parasitos utilizou-se a técnica descrita por Roberts & O'Sullivan (1950). Foi feito um sistema com cerca de 4g de fezes de ovinos adicionadas a uma porção de maravalha, o qual foi mantido ao longo de dez dias em temperatura ambiente controlando-se a umidade, para evitar a contaminação fúngica da amostra, e assim obter as larvas do nematódeo (UENO & GOLÇALVES, 1995).

A confirmação foi a partir dos caracteres morfológicos dos nematódeos com os indicados na chave taxonômica de Thomas & Probert (1993) para esta espécie.

Amostras de sangue dos ovinos foram colhidas nos tempos 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias por punção da veia jugular utilizando tubos á vácuo (Vacutainer) com heparina, para realização da cultura celular, e

tubo sem anticoagulante para obtenção do soro, o qual era centrifugado por dez minutos a 479 g para obtenção dos soros, que posteriormente eram acondicionados em tubos tipo eppendorfs e armazenados no freezer a -20°C, até o momento da análise.

Para confirmação da eficácia da infecção experimental os ovinos foram eutanasiados no 90º dia pós-infecção, de acordo com o protocolo do comitê de ética e bem estar animal da UFBA, com 5ml de acepromazina a 1% e 2,5ml de quetamina por via intravenosa, seguido de uma solução de eutanásia (250g de sulfato de magnésio diluído em 500ml de soro fisiológico e três ampolas de 30ml de cloreto de potássio a 19% para cada 50 Kg/peso vivo. O conteúdo do abomaso foi colhido utilizando peneira de nylon com malha fina e mantido em recipiente plástico estéril contendo formol a 10%. Os espécimes de *H. contortus* foram quantificados e classificados quanto ao sexo. Depois desta coleta, o abomaso foi colocado junto com o resto da carcaça para incineração como medida profilática, evitando contaminação ambiental.

### **Avaliação da Resposta Imune**

O título de anticorpos séricos da classe IgG específicos contra *H. contortus* foi avaliado através do teste de ELISA Indireto (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando placas de poliestireno fundo chato de 96 poços de alta ligação (Costar). A placa foi sensibilizada com 0,125µg de antígeno diluído em 100µl de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6 por poço, e incubadas durante 12 horas (overnight) em câmara úmida a 4°C.

Após o período de incubação as placas foram lavadas duas vezes com Tampão Salina Fosfato contendo 0,05% de Tween 20® (TSF-T). Em seguida acrescentou-se 200ul de solução de bloqueio (TSF-T contendo 5% de leite Molico® desnatado) por poço e incubada em câmara úmida a 37°C durante 2 horas. As placas foram uma vez lavadas com TSF-T e em seguida foram adicionados 50ul de soro de ovino diluído 1:100 em TSF-T contendo leite Molico® desnatado a 1% e novamente incubadas em câmara úmida a 37°C durante 1 hora.

Ao final do período de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com TSF-T. Adicionou-se 50ul, em cada poço, de soro de coelho anti-IgG de ovelha conjugado com peroxidase (SouthernBiotech, Alabama, Estados Unidos) diluído na proporção 1:10.000 em TSF-T contendo 1% de leite Molico® desnatado e incubado em câmara úmida a 37°C em estufa durante 45 minutos.

As placas foram novamente lavadas por cinco vezes com TSF-T, seguido da adição de 50ul de solução reveladora TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) por poço, mantidas em temperatura ambiente abrigada



de luz durante 15 minutos. Para interromper a revelação adicionou-se 25µl de ácido sulfúrico 2N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por poço. A leitura foi realizada na faixa de 450 a 655nm de comprimento de onda em leitor automático de microplacas (iMark Microplate Reader S/N 10978).

O cultivo celular para a dosagem de interferon-gama (INF-gama) foi realizado utilizando como modelo o protocolo de Meyer e colaboradores (2005). Em uma placa de cultivo (Costar) de 24 poços foi colocado 1mL de sangue heparanizado de cada animal dos grupos, seguindo um modelo contendo controle negativo, controle positivo e o antígeno do parasita. Para o controle positivo foram utilizados 5µg do mitógeno Pokeweed (*Phytolacca americana* ou PWM); como controle negativo utilizou-se apenas o sangue heparanizado e para o antígeno foram usadas diferentes concentrações, entretanto, foi utilizada a concentração de 10µg.

As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> à 5%. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação das placas, armazenado em tubos tipo eppendorfs estéreis, identificados e armazenados em freezer a - 20°C.

A avaliação da produção de INF- gama foi realizada através da técnica ELISA sandwich utilizando o kit comercial (Kit Ovine INF- gama, Mabtech). Uma placa estéril de fundo chato de 96 poços (Costar) foi sensibilizada utilizando 2µg/mL do anticorpo de captura do kit comercial (Kit Ovine INF- gama, Mabtech) diluídos em TSF (pH 7,4). Aplicou-se 100µl em cada poço e incubou-se 12 horas, overnight, em câmara úmida a 4°C.

Em seguida as placas foram lavadas por duas vezes com TSF-T, bloqueadas com 200µl da solução de TSF a 0,05% de Tween 20 e 0,01% de Albumina Bovina Sérica (BSA) permanecendo por uma hora em câmara úmida a temperatura ambiente.

Foram adicionados 100µl por poço das amostras dos sobrenadantes obtidos da cultura, e dos padrões do kit, incubando a temperatura ambiente por duas horas. Para a curva padrão foi feita uma diluição seriada com 2µL (500pg/mL) do padrão em 2mL de TSF no tubo de ensaio, obtendo cinco diluições diferentes: 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62,5pg/mL, 31,75pg/mL e 15,875pg/mL. Uma curva padrão foi feita para cada placa.

Seguido o período de incubação realizou-se cinco lavagens com TSF-T a 0,05%. Em seguida colocou-se 100µl do anticorpo de detecção, (0,1µg/mL) diluído em TSF-T a 0,01% de BSA, deixando por mais uma hora incubar a temperatura ambiente. Após o tempo, as placas foram lavadas cinco vezes com TSF-T 0,05%. Em seguida, colocou-se 100µL por poço de estreptavidina diluída na concentração de 1:1000 de TSF com Tween 20 0,05% e BSA 0,1%, ficando a temperatura ambiente por mais uma hora.

As placas foram lavadas cinco vezes com TSF-T 0,05% e em seguida foram adicionados 100µl por poço de solução reveladora TMB; as mesmas foram mantidas no escuro de 10 a 20 minutos. Adicionou-se 50µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para interromper a reação. A leitura foi realizada em leitor automático de microplacas (iMark Microplate Reader S/N 10978), com filtro de 450 a 655nm de comprimento de onda. Os valores da densidade óptica foram tabulados e transformados em gráficos.

### **Eficácia**

Para avaliar a eficácia da planta foi aplicada a seguinte fórmula recomendada pela Portaria nº48 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (1997):

#### **O Teste de Eficácia (TE) = (GC – GT) / GC X100**

Onde GC representa a média do número de helmintos do Grupo Controle; GT, a média do número de helmintos do Grupo Tratado.

### **Análises estatísticas**

Os resultados obtidos nos testes experimentais foram tabulados e os gráficos construídos utilizando o programa Microsoft Excel 2007®. Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) seguidas pelo teste-t de Tukey ou Dunnet. Todos os dados foram expressos pela média dos grupos considerando o valor de p < 0,05 como estatisticamente significativo utilizando o programa estatístico SPSS versão 14.0.

### **Aspectos éticos**

O trabalho foi realização de acordo com os parâmetros éticos para experimentação em animais do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal da Bahia (UFBA), aprovado sob o registro 02312012.

## RESULTADOS

### Infecção por *Haemonchus contortus*

Observou-se que a partir de sete dias após a infecção experimental com as larvas L3 de *H. contortus* nos animais dos Grupos II e III, já era possível encontrar ovos presentes nas fezes. Neste ponto de colheita, houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os Grupos I, II e III. Houve diferença estatisticamente significativa entre os mesmos grupos em 15 e 60 dias pós- infecção ( $p < 0,05$ ), neste tempos ocorreram aumento da carga parasitária entre os grupos infectados (GII e GIII) (Tabela 1).

Nos pontos de coleta 7, 15, 30, e 45 dias foi possível observar uma diferença na contagem do OPG do grupo infectado e tratado em relação ao grupo somente infectado. Entretanto, no tempo 90 dias, houve uma inversão deste fato, ocorrendo aumento da carga parasitária de *H. contortus*. Após tratamento com extrato de *P. pyramidalis* no ponto 45, houve redução de 79% da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais do Grupo III aos 60 dias de infecção conforme a tabela 1; já no Grupo II, o que não recebeu tratamento, o número de ovos elevou 12,5%.

**Tabela 1.** Valores da média do número de ovos de *H. contortus* com base na contagem de ovos por grama de fezes dos ovinos (OPG) ao longo do período experimental de 90 dias dos animais do Grupo I, II e III.

Tempos de colheita ( dias)		0	7	15*	30	45	60*	90
Grupo I*	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo II**	0	175	125	350	525	600	467	
Grupo III***	0	1150	525	625	425	88	280	

\*Grupo I (controle) \*\*Grupo II (Infectados) \*\*\* Grupo III (infectados e tratados).

\* Diferença estatística  $p \leq 0,05$ .

No Grupo I, os ovinos não foram inoculados com as larvas do helminto e a carga parasitária manteve-se zerada.

No Grupo II, o animal 298 apresentou carga parasitária igual a 1000 ovos nos pontos 45 e 60 dias demonstrando uma infecção moderada (tabela 2). No ponto 90 dias, ocorreu uma redução na carga parasitária na maioria dos animais com exceção do animal 263. Esses ovinos apresentaram sinais característicos de hemonose, como emagrecimento aparente e quadro de diarreia (Figura 2). Houve diferença estatisticamente significante com  $p < 0,05$  quando comparados os tempos 0 e 60 dias.

**Tabela 2.** Contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) ao longo do período experimental de 90 dias dos animais do Grupo II, apenas infectados com as larvas L3 de *H. contortus* sem tratamento do extrato aquoso de *P. pyramidalis*.

Animais	Tempos de colheita (dias)						
	0*	7	15	30	45	60*	90
263	0	0	0	200	300	300	534
267	0	0	100	500	500	300	284
269	0	700	100	300	300	800	467
298	0	0	300	400	1000	1000	584

\* Diferença estatística  $p \leq 0,05$

Um ovino do Grupo III (nº 256) apresentou valor de OPG referente a 3000 ovos, sete dias após a infecção. Esta carga parasitária é considerada bastante elevada caracterizando uma infecção aguda e divergente dos demais animais do grupo, nos quais os valores do OPG permaneceram abaixo de 1000 ovos. No tempo 15 dias este mesmo indivíduo apresentou uma redução significativa no número de ovos, mantendo uma infecção leve ao longo do experimento (Tabela 3).

Após administração do extrato aquoso em três dias consecutivos no tempo 45 dias, a redução da carga parasitária dos animais 280 e 288 chegaram a 79% e 100%, respectivamente, e no restante se manteve constante (Tabela 3). No ponto 90 dias todos os valores dos OPGs voltaram a aumentar.

O Teste de Eficácia do extrato aquoso de *P. pyramidales* em relação a sua ação anti-helmíntica foi realizado com base nos resultados obtidos a partir da contagem dos vermes adultos, coletados no abomaso dos ovinos após sua eutanásia (Tabela 4). O valor da eficácia calculado foi igual a 85%, sugerindo que o extrato da *P. pyramidalis*, nas condições experimentais aplicadas neste estudo, possui efeito moderado.

As coproculturas realizadas em todos os tempos experimentais, permitiram confirmar que os ovos encontrados nas fezes dos ovinos nas análises parasitológicas eram de *H. contortus*.



**Figura 2.** Ovinos do Grupo II infectados com *H. contortus* apresentando sinais clínicos de hemocose, como emagrecimento. Fonte: Próprio autor.

**Tabela 3.** Contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) ao longo do período experimental de 90 dias dos animais do Grupo III infectados experimentalmente com larvas L3 de *H. contortus* e tratados com extrato aquoso de *P. pyramidales*.

Animais	Tempos de colheita (dias)						
	0	7	15	30	45	60	90
256	0	700	400	500	100	100	350
280	0	100	600	1200	700	150	170
288	0	700	300	800	800	0	100
291	0	800	800	0	100	100	500

**Tabela 4.** Contagem de vermes adultos de *H. contortus* coletados no abomaso após a eutanásia dos animais dos Grupos I (não infectado experimentalmente), Grupo II (infectado com *H. contortus*) e Grupo III (infectado com *H. contortus* e tratado com extrato aquoso de *P. pyramidales*).

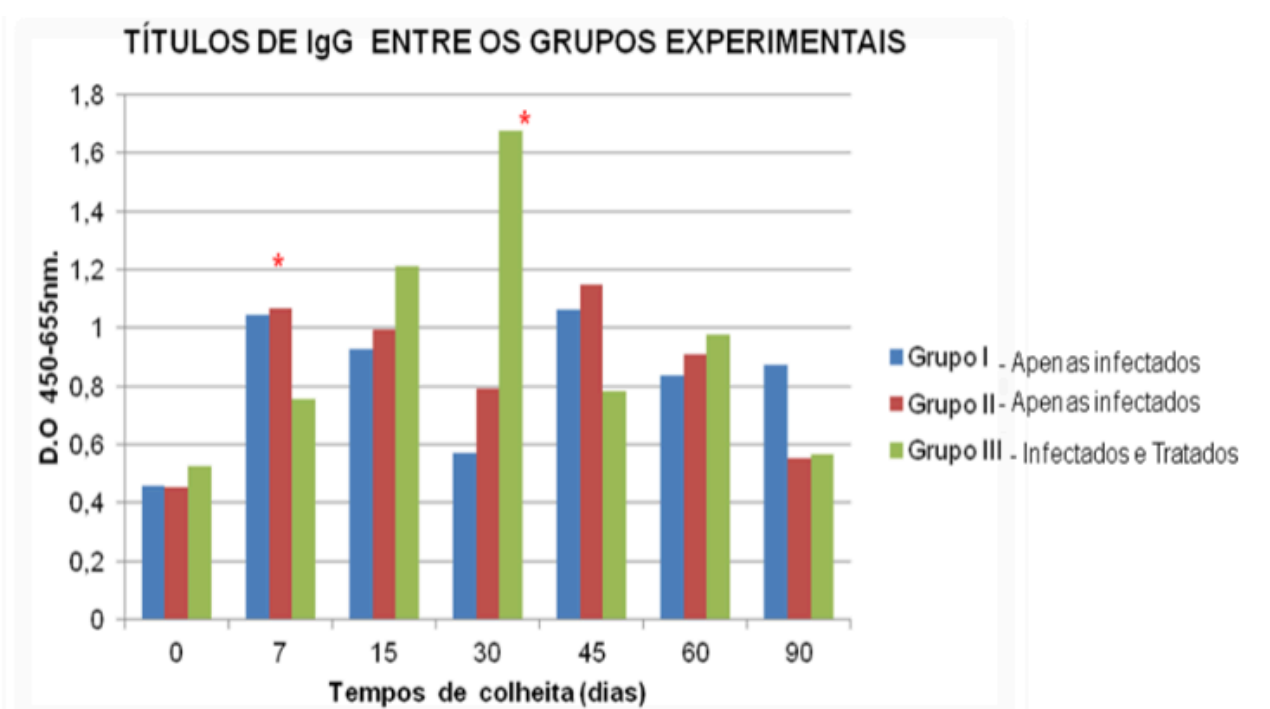
GRUPO		Número de vermes			
		Machos	Fêmeas	Indiferenciados	Total
Grupo I	254	0	0	0	0
	265	0	0	0	0
	268	0	0	0	0
				Média	0
Grupo II	263	31	34	2	67
	267	6	20	---	26
	269	24	72	5	101
	298	37	5	1	43
			Média	60	
Grupo III	256	1	31	0	32
	280	1	1	---	2
	288	0	0	0	0
	291	0	0	0	0
			Média	9	

### Quantificação de título de anticorpos

A quantificação dos títulos de anticorpos de classe IgG específicos contra *H. contortus* foi realizada nos tempos 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90.

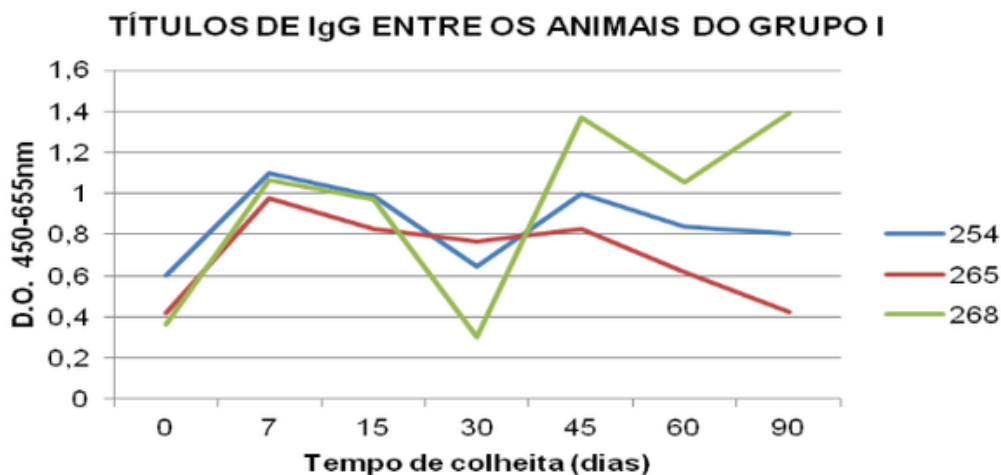
Os níveis de anticorpos da classe IgG dos Grupos I, II e III podem ser observados ao longo do período experimental na Figura 3. Com base nas leituras da densidade óptica presente nesta figura, foi possível inferir que no tempo zero os Grupos I e II apresentaram a mesma titulação diferindo do Grupo III.

Houve diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos nos tempos de sete e trinta dias após infecção.



**Figura 3.** Cinética do título de anticorpos da classe IgG específicos contra *H. contortus* dos Grupos I, II e III, apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655nm, distribuídas ao longo do período experimental. \* Diferença de  $p \leq 0,05$ .

Ao analisar os títulos de IgG entre os animais do Grupo I (Figura 4) tem-se uma elevação que se inicia no ponto zero dias até o ponto sete dias mas que em seguida começa declinar até o ponto 30 dias. Pela análise de variância (Tukey) nota-se diferença estatística ao cruzar os dados entre os tempos zero e sete dias e zero e 15 dias ambos com  $p \leq 0,05$ . A partir de 30 dias pós-infecção, o animal nº 268 aumentou o nível de anticorpo enquanto que o ovino nº 265 declinou até o ponto 90 dias.



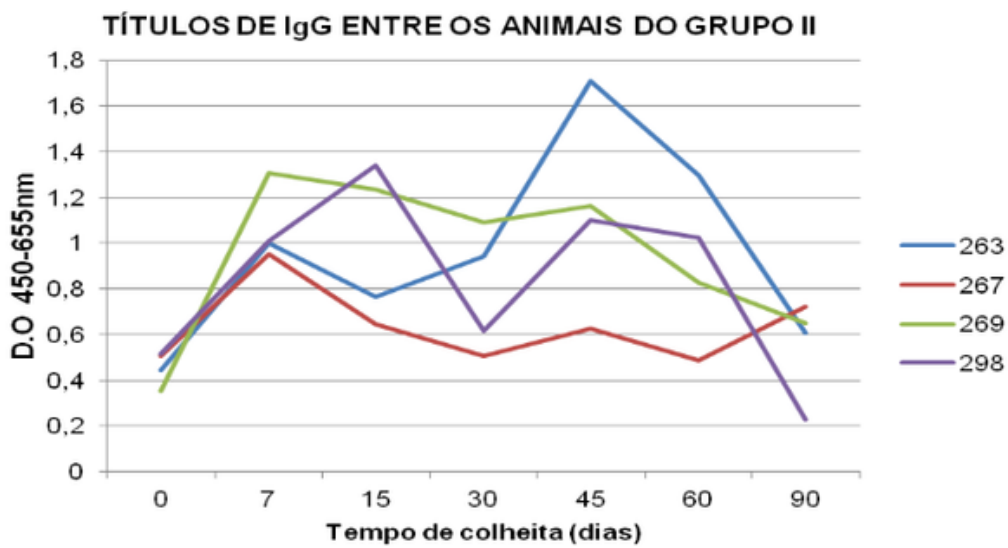
**Figura 4.** Título de anticorpos da classe IgG específicos contra *H. contortus* do Grupo I não infectado experimentalmente com larvas L3, apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655nm, ao longo do período experimental.

De acordo com a Figura 5, os títulos de IgG dos animais do Grupo II, apenas infectados com *H. contortus*, apresentaram um aumento na produção de anticorpos a partir do tempo zero dias seguido de uma redução no tempo sete dias, com exceção apenas do ovino nº 298. Essa diminuição se prologa até o ponto 30 dias seguida de um leve aumento dos anticorpo no momento de 45 dias, decaindo novamente no ponto 60 e 90 dias, exceto o animal nº267. Em relação a análise de variância (Tukey) houve diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado os tempos zero e 45 dias.

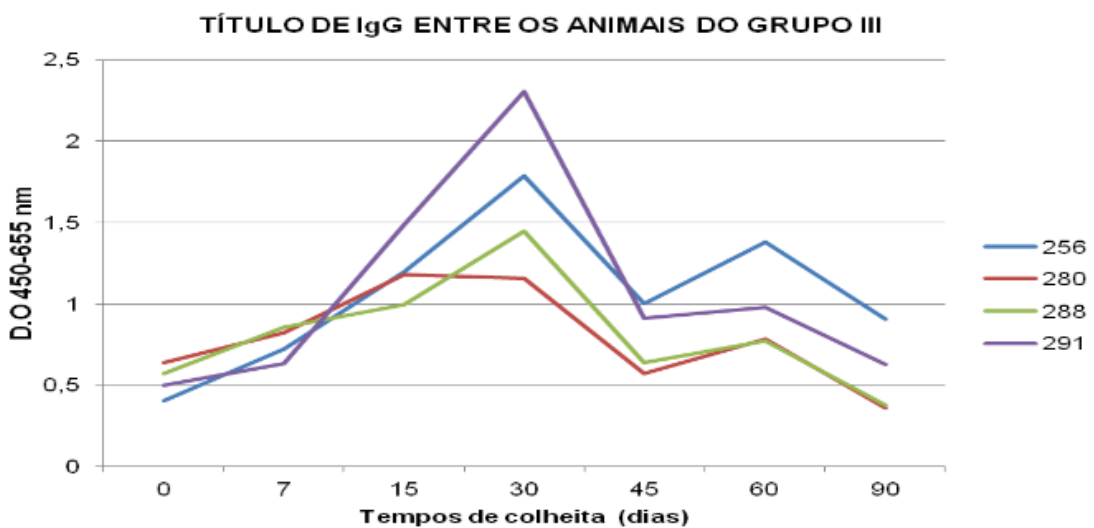
Os animais do Grupo III, infectados com *Haemonchus contortus* e tratados com o extrato de *Poincinella pyramidalis*, apresentaram um aumento nos títulos dos anticorpos IgG com 30 dias decaindo em seguida até 45 dias (Figura 6). No período de 60 dias ocorre uma leve elevação na produção de IgG reduzindo ao tempo 90 dias.

Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado todos os tempos com  $p \leq 0,05$ , sendo os pares que variaram pelo teste de Tukey: 0dias X 15dias ( $p=0,002$ ); 0 dias X 30 dias ( $p=0,000$ ), 7 dias X 30 dias ( $p=0,000$ ); 15 dias X 90 dias ( $p=0,002$ ); 30 dias X 45dias ( $p=0,000$ ); 30 dias X 60dias ( $p=0,001$ ); 30 dias X 60 dias ( $p=0,000$ ).





**Figura 5.** Título de anticorpos da classe IgG específicos contra *H. contortus* do Grupo II, apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450- 655nm, ao longo do período experimental.



**Figura 6.** Título de anticorpos da classe IgG específicos contra *H. contortus* do Grupo III tratado com extrato de *P. pyramidalis*, apresentando a média da leitura de densidade óptica na faixa de 450-655 nm, ao longo do período experimental.

## **Interferon-gama (IFN-gama)**

A partir dos sobrenadantes das culturas de células observou-se que houve baixa produção de IFN-gama em todos os Grupos nos tempos amostrados. Os níveis de IFN-gama das culturas estimuladas com antígeno de *H. contortus* foram semelhantes ao controle negativo da cultura.

## **DISCUSSÃO**

Antes de iniciar o processo de infecção todos os animais foram vermifugados três vezes para a certificação de que sua carga parasitária estaria zerada; garantindo que todo e qualquer ovo ou larva encontrados nos ovinos durante e após a infecção experimental seria de *H. contortus*. Além disso, houve um cuidado especial na limpeza do capril, através de controle químico e físico (lança chamas) tendo em vista evitar a infecção dos animais por quaisquer parasitos, especialmente do grupo controle negativo (Grupo I), que não seriam inoculados com o nematódeo.

O protocolo de infecção aplicado de acordo com a metodologia descrita por Gill et al. (2000) referente a quantidade de larvas e a de Borges (2007) relacionada ao cultivo da mesma obtiveram sucesso. A infecção experimental com *H. contortus* foi possível verificar após trinta dias de inoculação a partir dos resultados parasitológicos de OPG. A carga parasitária de acordo com a classificação de Ueno (1995) se caracteriza como uma infecção moderada. Como afirma Amarante (2004), Gill et al. (2000) a carga parasitária é um fator importante para a confirmação da infecção.

Os animais do Grupo I, os quais não receberam experimentalmente as larvas de *H. contortus*, sob as condições experimentais se mantiveram sem a presença de ovos deste parasita. Mostrando que as condições de higienização e cuidado animal foram satisfatórios.

A aplicação do extrato aquoso de *P. pyramidalis* foi considerada moderadamente eficaz segundo o Teste de Eficiência e nas condições aplicadas neste estudo com uma taxa de 85% de acordo com Associação Mundial de Medicina Veterinária (Wood et al., 1995). Este resultado confronta os achados de Cala et al. (2012), que não encontraram eficácia com a utilização do *Melia azedarach* em relação a carga parasitária assim como no estudos de Chagas (2008) com *Azadiractha indica*.

Após tratamento com o extrato da planta no tempo 45 dias, houve uma redução de 79% da carga parasitária dos animais do grupo tratado (GIII), enquanto alguns animais deste grupo se mantiveram constante e outro reduziu 100% no tempo 60 dias. Esta taxa de redução foi semelhante ao encontrado no trabalho realizado com caprinos infectados naturalmente com *H. contortus* por Borges-dos-Santos (2007) e Nunes (2012).

De acordo com Nunes (2012), a dose de 10mg/Kg foi capaz de inibir 100% da eclosão de ovos enquanto as larvas infectantes se tornaram resistentes. Isto seria uma explicação para a manutenção das larvas imaturas sexualmente quanto os vermes adultos no grupo dos animais tratados. Pode-se observar na contagem dos vermes adultos.

A redução da carga parasitária do grupo II, apenas infectados com *H. contortus*, no ponto 90 dias pode ser explicada primeiramente, pela existência de condições não favoráveis, que levam as larvas do nematódeo a entrarem no estado de hipobiose, reduzindo a eliminação de ovos no ambiente através das fezes. Segundo fator, esta relacionada a resistência dos animais frente a infecção associada com uma forte ação imunológica contra estes helmintos, estas hipóteses concordam com Amarante (2004) e Miller & Horohov (2012). Entretanto os animais do grupo II apresentaram sinais característicos de hemoncose, como emagrecimento aparente e quadro de diarreia (Miller & Horohov, 2012).

A carga parasitária encontrada nos indivíduos do Grupo III, infectados com larvas L3 de *H. contortus* e tratados com extrato de *P. pyramidalis*, mostrou-se mais elevada quando comparada a do Grupo II (figura 2). Este fato pode sugerir uma condição de susceptibilidade a infecções parasitárias, resultante da variabilidade genética dos ovinos deste grupo (Melo & Bevilaqua, 2005; Macknnon et al., 2010). Além da susceptibilidade, alguns ovinos por serem sem raça definida apresentaram condições de resistentes quanto de resilientes relacionadas com a carga parasitária (Melo & Bevilaqua, 2005; Angulo- Cubillán et al., 2007; Shakya et al., 2011).

Essa variação dos ovos encontrados nas fezes dos animais infectados e tratados provavelmente está relacionado a genética tanto do hospedeiro quanto do parasita (Amarante, 2004; Buzzulini et al. 2007; Chevrotière et al., 2012), associada com elevado potencial biótico do parasita (Pereira et al., 2008). A-

Além desses fatores, deve ser considerada a capacidade de resiliência dos ovinos que permite que os parasitas permaneçam no organismo (Amarante, 2004) e o estado hipobiótico que permite que não ocorra a maturação no estágio adulto, podendo ficar por longos períodos devido ao baixo metabolismo (Urquhart et al., 1998). Como afirma Silva, Bevilaqua & Rodrigues (2003), o ambiente exerce grande influência sobre a composição e a regulação da população parasitária.

De acordo com a tabela 4, observou-se que alguns vermes estavam indiferenciados sexualmente, sugerindo a transformação dos estágios larvares para o estado de hipobiótico (Urquhart et al., 1998). Este fato foi mais recorrente nos animais do grupo III. Um fator importante que deve-se destacar é a relação da contagem de ovos por grama de fezes e a quantidade de vermes adultos, uma vez que os animais que liberaram mais ovos apresentaram um número menor de vermes adultos. Isto se confirma o caso de animais do experimento do grupo II em relação ao grupo III apresentarem menores valores de ovos quando se tem uma população menor de parasitas adultos, havendo o evento da competição intraespecífica por espaço ou recursos (HOPPE, 2010).

A partir dos resultados imunológicos obtidos neste estudo, é visível a produção de anticorpos contra o parasita que desde os tempos zero e sete dias após a infecção, houve uma rápida resposta imune humoral com a produção de elevados títulos de IgG referente a todos os grupos. Este fato demonstra que os animais de raças e idades diferentes induzem respostas imunológicas diferentes em relação ao *H. contortus* (Miller et al., 2006).

O Grupo I apresentou títulos de IgG, causadas por infecções parasitárias anteriores. Os animais do Grupo II mostraram uma variação nos títulos de anticorpos frente ao desafio com o parasita em estudo. Este fato demonstra a questão da variabilidade genética associada a imunidade dos animais e a carga parasitária que respondem de forma diferente sob condições ambientais semelhantes, fato observado por Amarante (2004), Alba-Hurtado e Muñoz- Guzmán (2013).

Nos Grupos I e II a cinética de IgG foi semelhante até o tempo sete dias, com ligeira redução no tempo 15 dias, porém o segundo grupo apresentou títulos mais elevados devido a infecção experimental. Já o Grupo III exibiu uma produção de IgG com aumento contínuo até 30 dias pós-infecção, quando atingiu o maior título, este fato pode ser associado ao ciclo do parasita. Entretanto a partir do tempo 45 dias houve uma considerável redução da carga parasitária e um leve aumento da mesma no tem-

tempo 60 dias. Mostrando uma leve ação imunomoduladora semelhante aos estudos de Borges-dos-Santos (2007) e Nunes (2012).

A baixa produção de interferon gama (figura 11) assim como ao encontrado nos estudos de Gill et al. (2000); Shakya, Miller e Horov (2009) demonstra que a infecção por *H. contortus* não ocorreu o desvio para a resposta de perfil Th1. Este fato confirma uma infecção helmíntica de perfil Th2.

Outros parâmetros imunológicos devem ser testados através da biologia molecular e por Western blotting a fim de se observar o perfil da infecção experimental por *H. contortus* e o efeito do extrato aquoso da *P. pyramidalis*.

## CONCLUSÃO

Nas condições deste estudo a planta *P. pyramidalis* obteve uma ação efetiva na resposta imune frente à infecção experimental com *H. contortus* e uma eficácia considerável comprovada pelo exame parasitológico. Este fato sugere a necessidade de novas investigações utilizando diferentes concentrações do extrato, número de doses e outras partes aéreas da planta, reavaliando outros aspectos com possível potencial imunomodulador e parasiticida.

## REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K. ; Lichtman, A. H. & Pober, J.S. Imunologia celular e molecular. 5a ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 580 p, 2005.
- Abbas, A. K. ; Lichtman, A. H. & Pillai, S. Imunologia celular e molecular. 7a ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 545 p., 2011.
- Alba-Hurtado, F. & Muñoz-Guzmán, M. A. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. *BioMed Research International*, p.1- 11, 2013.
- Angulo-Cubillán, F.J.; García-Coirodas, L.; Cuquerella, M.; De la Fuente, C.; Alunda, J.M. Haemonchus contortus-sheep relationship: a review. *Revista Científica*, v. XVII, n.6, p. 577-587, 2007.
- Amarante, A.F.T. Resistência genética a helmintos gastrointestinais. V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. 2004.
- Bahia, M, Batista, J, David, J.M., David, J.P. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.16, n.6b, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000800017>.
- Bahia, M, Batista, J, David, J.M., David, J.P. Estudo da variação do conteúdo de biflavonóides de *Caesalpinia pyramidalis* de diferentes regiões. *Anais da 30ª. Reunião Anual da SBQ*, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600015>
- Borges dos Santos, R., Lima, F.W. Biological effect of leaf aqueous extract of *Caesalpinia pyramidalis* in goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol*, 2010. doi: 10.1155/2012/510391.
- Borges, F. A. Ação reversora in vitro e in vivo do Verapamil sobre a resistência de *Haemonchus contortus* à ivermectina. Tese de Doutorado, Medicina Veterinária (Patologia Animal) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp- Jaboticabal, 2007.
- Buzzulini, C.; Sobrinho, A.G.S.; Costa, A.J; Santos, T. R.; Borges, F.A. & Soares V. E. Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação albendazole, levamisole e ivermectina à moxidectina em ovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.6, p.891-895, 2007.

Cala, A.C.; Chagas, A.C.S.; Oliveira, M.C.S.; Matos A.P.; Borges, L.M.F.; Sousa L.A.D.; Souza, F.A.; Oliveria, G.P. In vitro Anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichillia clausenii* against sheep gastrointestinal nematodes. *Experimental Parasitology*, v.130, p. 98–102, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.12.011>.

Chagas, A.C.S. Metodologias in vitro para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. In: Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, 25.; Seminário De Parasitologia Veterinária Dos Países Do Mercosul, 2., 2008, Curitiba. Programa e resumos. Curitiba: UFPR: Universidade Estadual de Londrina, 2008. 13 f. 1 CD-ROM. 2008.

Chevrotière, C.; Bambou, J.C.; Arquet, R.; Jacquet, P.; Mandonnet, N. Genetic analysis of the potential role of IgA and IgE responses against *Haemonchus contortus* in parasite resistance of Creole goats. *Veterinary Parasitology*, v.186, n3-4, p. 337-343, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.071>.

Gazda, T. L. Distribuição de Larvas de Nematódeos Gastrintestinais de Ovinos em Pastagens Tropicais e Temperadas. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia Animal, Curitiba, 82 p., 2006. doi: 10.5216/cab.v13i1.4025.

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. <https://doi.org/10.1046%2Fj.1365-2567.2000.00974.x>.

Gordon, H.M.C.L.; Whitlock, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *International Journal of Industrial Organization*, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

Hoppe, E.G.L. Infecção experimental de *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814) (Cervidae: Odocoileinae) com *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) (Nematoda: Trichostrongyloidea). Tese de Doutorado Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal- 2010.

Kamaraj, C.; Rahuman, A.A.; Elango, G.; Bagavan, A.; Zahir, A. A. Anthelmintic activity of botanical extracts against sheep gastrointestinal nematodes, *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*, v.109, p.37-45, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2218-y>.

Lowry, O.H.; Rosebrough N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 193. P. 265-275, 1951.

Macedo F.R. Efeitos da Folha de Nim Indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) no Controle de Helmintos em Ovinos Infectados Naturalmente. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2007.

Melo, A.C. F. L.; Bevilaqua, C. M.L. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 100, p. 141-146, 2005.

Meyer, R.; Regis, L.; Vale, V.; Paule, B.; Carminati, R.; Bahia, R.; Moura-Costa, L.; Schaer, R.; Nascimento, I.; Freire, S.A. A produção in vitro de IFN-gama por células de sangue de cabra após estimulação com antígenos somática e pseudotuberculosis secretaram *Corynebacterium*. *Veterinária e Imunopatologia*, v.107, n. 3-4, p. 249-254, 2005.

Miller, J.E.; Bishop, S.C.; Cockett, N.E.; McGraw, R.A. Segregation of natural and experimental gastrointestinal nematode infection in F2 progeny of susceptible Suffolk and resistant Gulf Coast Native sheep and its usefulness in assessment of genetic variation. *Veterinary Parasitology*, v.140, p.83–89, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.043>.

Milovanovic, M.; Drozdenko, G.; Weise, C.; Babina, M.; Worm, M. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *Journal of Investigative Dermatology*, v.130, p. 2621–2628, 2010. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.175>.

Molento, M.B.; Veríssimo, C.J.; Amarante, A.T.; Van Wyk, J.A.; Chagas, A.C.S.; Araújo, J.V.; Borges, F.A. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.80, n.2, p.253-263, 2013.

Nunes, G.D.L. Investigação das atividades biológicas do extrato aquoso de *Poincianella pyramidalis* no controle da hemonose ovina. Tese de mestrado, Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária- UFBA- BA- 2012.

Oliveira, R.V.; Aragão, I.M.A.; Matos, R.S.; Sallum, W.B. Manual de criação de caprinos e ovinos / coordenação de Paulo Sandoval. Brasília : Codevasf, p.142, 2011.

Pereira, R.H.M.A.; Ahid, S.M.M.; Bezerra, A.C.D.S.; Soares, H.S.S.; Fonseca, Z.A.A.S. Diagnóstico da resistência dos nematoides gastrintestinais a anti-helmínticos em rebanhos caprino e ovino do RN. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.1, p-16-19, 2008.

Ramos, C.I.; Bellato, V.; Souza, A.P.; Avila, V.S.; Coutinho, G.C.; Dalagnol, C.A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural*, v.34, n.6, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000600034>.

Roberts F.H.S. & O´ Sullivan J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 1,p.99-102, 1950.

Shakya, K.P.; Miller, J.E.; Horohov, D.W. 2009. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Veterinary Parasitology*, v.163, p.57– 66, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.052>.

Silva, W.W.; Bevilaqua, C.M.L.; Rodrigues, M. L. A. Variação sazonal de nematoides gastrintestinais em caprinos traçadores no semi-árido Paraibano- Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.12, n. 2, p.71-75, 2003.

- Nunes, G.D.L. Investigação das atividades biológicas do extrato aquoso de *Poincianella pyramidalis* no controle da hemoncosose ovina. Tese de mestrado, Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária- UFBA- BA- 2012.
- Oliveira, R.V; Aragão, I.M.A; Matos, R.S.; Sallum, W.B. Manual de cria o de caprinos e ovinos / coordena o de Paulo Sandoval. Brasília : Codevasf, p.142, 2011.
- Pereira, R.H.M.A.; Ahid, S.M.M.; Bezerra, A.C.D.S.; Soares, H.S.S.; Fonseca, Z.A.A.S. Diagnóstico da resistência dos nematoides gastrointestinais a anti-helmínticos em rebanhos caprino e ovino do RN. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.1, p-16-19, 2008.
- Nunes, G.D.L. Investiga o das atividades biológicas do extrato aquoso de *Poincianella pyramidalis* no controle da hemoncosose ovina. Tese de mestrado, Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária- UFBA- BA- 2012.
- Oliveira, R.V; Aragão, I.M.A; Matos, R.S.; Sallum, W.B. Manual de cria o de caprinos e ovinos / coordena o de Paulo Sandoval. Brasília : Codevasf, p.142, 2011.
- Pereira, R.H.M.A.; Ahid, S.M.M.; Bezerra, A.C.D.S.; Soares, H.S.S.; Fonseca, Z.A.A.S. Diagnóstico da resistência dos nematoides gastrointestinais a anti-helmínticos em rebanhos caprino e ovino do RN. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.1, p-16-19, 2008.
- Ramos, C.I.; Bellato, V.; Souza, A.P.; Avila, V.S.; Coutinho, G.C.; Dalagnol, C.A . Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural*, v.34, n.6, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000600034>.
- Roberts F.H.S. & O ´ Sullivan J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 1,p.99-102, 1950.
- Shakya, K.P.; Miller J.E.; Horohov, D.W. 2009.A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Veterinary Parasitology*, v.163, p.57- 66, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.052>.
- Silva, W.W.; Bevilaqua, C.M.L.; Rodrigues, M. L. A. Varia o sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no semi- rido Paraibano- Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.12, n. 2, p.71-75, 2003.
- Souza, M.M.C.; Bevilaqua, C.M.L.; Morais, S. M.; Costa, C.T.C; Silva, A.R.A.; Braz-Filho, R. Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.80, n.2, p. 271-277, 2008.
- Ueno, H. Cultivo quantitativo de larvas de nematódeos gastrintestinais de ruminantes com tentativa para pr diagn stico. Ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, p.138, 1995.
- Urquhart, G.M; Armour, J.; Duncan, J. L.; Dunn, A.M; Jennings, F.W. Parasitologia Veterinária. IN:Helmintologia veterin ria, 2 ed., p.3-8,1998.
- Whitlock H.V. Some modifications of the McMaster eggs counting technique and apparatus. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v.21, p.177-180, 1948.
- Wood, I.B.; Amaral, N.K.; Bairden , K.; Duncan, J.L.; Kassai, T.; Malone, J.B.; Pankavich, J.A.; Reinecke, R.K.; Slocombe, O. ; Taylor, S.M.; Vercruyse, J. World Association for the Advancement of Veterinary (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, v. 58, p.181-213,1995. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00806-2](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00806-2).