

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* em ovinos infectados por nematódeos gastrintestinais

Tiago Gallina

Pelotas, 2011

TIAGO GALLINA

Efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* em ovinos infectados por nematódeos gastrintestinais

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação da Prof^a. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

G168e Gallina, Tiago

Efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* em ovinos infectados por nematódeos gastrintestinais / Tiago Gallina; orientador Maria Elisabeth Aires Berne. Pelotas, 2011.-109f.; il.-Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.Ovinos 2.Nematódeos gastrintestinais
3.Probióticos 4.Resposta imune I Berne, Maria
Elisabeth Aires (orientador) II .Título.

CDD 636.3089

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne (Orientador)

Prof. Dr. Leandro Quintana Nizoli (UFPel)

Dr. Luiz da Silva Vieira (EMBRAPA - CNPCO)

Prof^a Dra. Marta Lizandra do Rego Leal (UFSM)

Prof^a Dra. Sibeles Borsuk (UFPel)

Agradecimentos

À minha Mãe, pelo amor incondicional e por mostrar-se presente em todos os momentos da minha vida, assim como ter dado a oportunidade de ao longo do tempo encontrar pessoas que fizeram minha jornada mais prazerosa e produtiva.

A minha orientadora Maria Elisabeth A. Berne pelos anos de ensinamentos, pelo exemplo de pesquisadora competente, pela inesgotável paciência e pela confiança depositada em alguém que há sete anos chegou pedindo “apenas” um estágio de graduação e foi acolhido como membro de sua família.

À família Gallina que sempre me apoiou em todas as decisões, e aqueles que cuidaram uns dos outros durante os momentos de dificuldade, em especial, June e Diogo, amo vocês.

Ao meu pai, que esteve ao meu lado também como amigo, mostrando grande exemplo profissional, não medindo esforços para me ajudar nessa conquista.

A minha grande amiga Talita Bandeira Roos, por sua permanente e generosa ajuda em todos os passos da construção dessa tese, e ainda por me mostrar como é ser forte durante as adversidades.

Ao amigo Felipe Pappen, que esteve sempre disposto a fazer o melhor para que essa tese acontecesse, mostrando sempre profissionalismo e competência como pesquisador e Médico Veterinário. Assim como, o Sr. Ari Pappen e família, que literalmente abriram as portas de sua casa.

Aos colegas, amigos e estagiários do laboratório de Parasitologia, LRD e da Bela Vista, pelo ótimo convívio e também pelo auxílio prestado sempre que precisei. Em especial Aline, Antonieta, Sr. Beloni, Cauê, Emília, Fernando, Henrique, Jerônimo, Leonardo, Luciana, Marcos, Michele, Nara, Natália, Niltinho e D. Vera. Sem vocês tudo seria mais difícil.

Ao André Simch, meu amigo, colega, afilhado e parceiro de inúmeras jornadas, para as quais nunca recebi um não. Gracias meu “irmão”.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Veterinária e em Parasitologia que se dedicam para formação de melhores profissionais. Em especial, a Prof^a Gertrud pelo incentivo e confiança no início de minha formação como docente, compartilhando comigo seus ensinamentos e amizade.

Ao comitê de orientação, Prof. Fábio e Dra. Ana Schild que estiveram sempre dispostos a ajudar e abriram muitas portas para mim e para esta tese.

As pessoas que fizeram e as que ainda fazem parte da minha vida, vocês são parte dessa caminhada, obrigado pelo carinho e por acreditar que era possível. Em especial meu amigo Luiz Pfeifer, exemplo de profissional e ser humano.

A fundação coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Todos vocês são co-autores deste trabalho.

Muito obrigado!

*Dedico esta tese a minha
mãe, quem proporcionou
vida digna e a melhor
educação para os filhos.*

*"Olhos abertos, o longe é perto
e o que vale é o sonho"
Sérgio Napp*

RESUMO

GALLINA, Tiago. **Efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* em ovinos infectados por nematódeos gastrintestinais** 2011. 83f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

A nematodiose gastrintestinal é um dos principais fatores limitantes a produção de ovinos, destacando-se por sua patogenia e prevalência o *Haemonchus contortus*. As medidas de controle baseiam-se no uso de anti-helmínticos, aos quais os nematódeos apresentam graves problemas de resistência. Com o objetivo de avaliar o efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb) e *S. cerevisiae* (Sc) em ovinos infectados por nematódeos gastrintestinais, dois experimentos foram delineados. Experimento I- utilizaram-se quatro grupos de oito ovinos machos, da raça Texel, de quatro a cinco meses de idade. O grupo 1 recebeu Bc, o grupo 2 Sb, o grupo 3 Sc, todos na concentração de 1×10^6 UFC gr^{-1} por dia e o grupo 4 Controle C, sem probiótico. Os probióticos foram administrados individualmente, por via oral, uma vez ao dia, durante 56 dias do experimento. Sete dias após o início da administração dos probióticos, os animais foram infectados por via oral com *H. contortus*. Amostras de sangue foram colhidas semanalmente, para avaliações hematológicas, bioquímica e imunológica. Os níveis de expressão gênica através das citocinas pró-inflamatórias foram verificados por RT-PCR. No 49º dia após a infecção todos os animais foram eutanasiados para recuperação dos parasitos e avaliação histológica do abomaso. O Experimento II- foi composto por dois grupos de 20 cordeiros machos, da raça Ideal, de quatro a cinco meses de idade; grupo I os cordeiros receberam 1×10^6 UFC gr^{-1} de Sc e o grupo controle somente ração. Os grupos foram mantidos individualizados em piquetes naturalmente contaminados por nematódeos gastrintestinais, durante um ano. Foram medidos os aspectos referentes à carga parasitária, volume globular, ganho de peso e condição corporal. Dentre os resultados obtidos no Experimento I, demonstrou-se que a carga parasitária e contagem de eosinófilos na mucosa abomasal mostraram diferenças significativas entre o grupo Sc e demais grupos ($p < 0,05$). Os níveis de expressão da citocina IL-4 tiveram um aumento superior a 15x nos animais suplementados com Sc e Sb em relação ao grupo controle. No experimento II, houve redução significativa do número de *H. contortus* recuperados, semelhante ao experimento I ($p < 0,01$). Os resultados demonstram que o probiótico a base de *S. cerevisiae* interfere na resposta imune e reduz a carga parasitária em ovinos, constituindo uma alternativa para ser associada a outros métodos de controle dos nematódeos, nesta espécie animal.

Palavras-chave: Ovinos. Nematódeos gastrintestinais. Probióticos. Resposta imune.

ABSTRACT

GALLINA, Tiago. **Evaluation of the effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae* in sheep infected by gastrointestinal nematodes.** 2011. 83f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

The gastrointestinal parasitic infections caused by nematodes is one of most detrimental causes that impaired the sheep production, whereas the *Haemonchus contortus* have a role due to its pathogeny and prevalence. The methods of control are based on the use of anthelmintics, which can lead the resistance of nematodes. The objectives of these studies were to evaluate the effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb) and *S. cerevisiae* (Sc) probiotics in lambs infected with gastrointestinal nematodes. In the Experiment 1; thirty two Texel breed lambs, aging 4 to 5 months, were randomized allocated into 4 experimental groups; Group 1 (n=8) that received Bc, 2) Group 2 (n=8), that received Sb, Group 3 (n=8); that received Sc. All groups treated with probiotics received the concentration of 1×10^6 CFU gr⁻¹. The Group 4 did not receive any treatment. The animals were fed with probiotics individually once a Day during 56 days. Seven days after the beginning of the experiment, the animals were infected with *H. contortus*. Blood samples were collected weekly in order to evaluate hematological, biochemical and immunological parameters. The gene expression of pro-inflammatory cytokines were evaluated by RT PCR. On Day 49, after the infection, all animals were killed in order to recover the parasites and to evaluate histologically The abomasum. In Experiment 2, twenty Ideal breed lambs, with 4 to 5 months old, were fed with 1×10^6 UFC gr⁻¹ of Sc and kept in two paddocks naturally contaminated with nematodes during one year. The worm burden, packed cell volume, gain of weigh and body condition score were measured. In the Experiment 1 the Sc group differ from the others groups (P < 0.05) on the worm burden and eosinophil counting on the abomasal mucosa. The levels of IL-4 showed an increase of 15 times in the animals treated with Sc and Sb. In the experiment 2, there was a significant reduction on the number of *H. contortus* recovered from abomasum (P < 0.01) compared with the control group. These results suggest that the treatment with *Saccharomyces cerevisiae* probiotic interferes with the immune response and reduces the worm burden of nematodes, being an alternative to improve the methods of control of nematodes.

Keywords: Sheep. Gastrointestinal nematodes. Probiotics. Immune response.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** Contagem média de ovos por grama de fezes (OPG) de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e Controle.(C) 40
- Figura 2** Número médio de ovos e comprimento médio de fêmeas de *Haemonchus contortus* recuperadas de ovinos experimentalmente infectados e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb) e *S. cerevisiae* (Sc). C= Controle. 40
- Figura 3** Média de leucócitos totais de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos e dia 0 = infecção experimental. 41
- Figura 4** Média de eosinófilos periféricos de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos e dia 0 = infecção experimental. . 41
- Figura 5** Taxas médias de hemoglobina de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos e dia 0 = infecção experimental. 42
- Figura 6** Médias das proteínas plasmáticas totais de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C).Dia -7= adição dos probióticos e dia 0 = infecção experimental. 42

- Figura 7** Média de volume globular de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos e dia 0 = infecção experimental. 43
- Figura 8** Média da carga parasitária e de eosinófilos da mucosa abomasal de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C).. 44
- Figura 9** Eosinófilos presentes na mucosa gástrica de ovinos no 49º dia após a infecção experimental com *Haemonchus contortus*. Hematoxilina-eosina, 40x. A- grupo *Saccharomyces cerevisiae* e B- grupo controle. 44
- Figura 10** Peso médio de ovinos experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos a dieta e dia 0 = infecção experimental. 45

Capítulo 2

- Figura 1** Figura 1: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do mRNA de leucócitos periféricos de ovinos experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus* 56
- Figura 2** Figura 2: Modulação na expressão de citocinas produzidas por leucócitos periféricos estimulados com *Haemonchus contortus*. Dia 0, sem estímulo e dia 49, após a infecção, nos ovinos suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). 58

Capítulo 3

- Figura 1** Carga parasitária do abomaso de ovinos suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* e grupo controle, mantidos com infecção natural por nematódeos gastrintestinais no período de um ano. Hc-*Haemonchus contortus*. O- *Ostertagia* sp. T –*Trichostrongylus* sp. 65
- Figura 2** Médias do volume globular de ovinos suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e o grupo controle, mantidos com infecção natural por nematódeos gastrintestinais no período de um ano. 65
- Figura 3** Médias do escore corporal de ovinos suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e o grupo controle, mantidos com infecção natural por nematódeos gastrintestinais no período de um ano. 66
- Figura 4** Peso médio dos ovinos suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e do grupo controle, mantidos com infecção natural por nematódeos gastrintestinais no período de um ano. 66

LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1	Principais microrganismos descritos com efeito probiótico.	26
-----------------	--	----

Capítulo 2

Tabela 1	Médias de <i>Haemonchus contortus</i> e eosinófilos da mucosa abomasal (\pm DP) nos grupos de ovinos suplementados durante 49 dias com diferentes probióticos e seus respectivos valores de p.	57
-----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpos
Bc	<i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi
dNTP	<i>desoxynucleoside triphosphates</i>
g	Força g
GPDH	gliceraldeído fosfato dehidrogenase
HcSo	Antígeno somático de <i>Haemonchus contortus</i>
IFN- Y	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
kDa	Kilo Dalton
MS	Matéria seca
NK	<i>natural killers</i>
OPG	Ovos por grama de fezes
pb	Pares de base
PB	Proteína bruta
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rpm	Rotações por minuto
Sb	<i>Saccharomyces boulardii</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SFB	Soro fetal bovino
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC/g	Unidade formadora de colônia/grama
vv	volume/volume de meio

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO GERAL	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
Nematódeos gastrintestinais	19
Probióticos.....	26
Resposta imune	30
CAPÍTULO 1	35
Efeito dos probióticos <i>Bacillus cereus</i> var. <i>Toyoi</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> em ovinos infectados com <i>Haemonchus contortus</i>	35
CAPÍTULO 2	52
Efeito dos probióticos <i>Bacillus cereus</i> var. <i>Toyoi</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> na modulação da resposta imune de ovinos infectados com <i>Haemonchus contortus</i>	52
CAPÍTULO 3	63
Influência da suplementação do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais	63
CONCLUSÕES GERAIS.....	73
REFERÊNCIAS GERAIS	74

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui 16,8 milhões de ovinos, sendo que a região nordeste concentra a maior população, constituída quase que exclusivamente de animais deslanados e no Rio Grande do Sul está o maior efetivo de ovinos lanados, com 77% localizados na metade sul deste estado (IBGE, 2009). O mercado ovino é promissor, pois há uma tendência de aumento da ovinocultura nacional e sua efetiva participação no produto interno bruto do agronegócio brasileiro.

Conforme FAO (2007), a demanda de carne nos países em desenvolvimento vem sendo impulsionada pelo crescimento demográfico, pela urbanização e pelas variações das preferências e dos hábitos alimentares dos consumidores. Dessa forma, estima-se um crescimento anual de 2,1% na produção de carne ovina até 2014, registrando-se essa elevação principalmente em países em desenvolvimento. Fatores como a diversidade étnica e a valorização de produtos cárneos desossados fortalecerão o comércio de carne no período de projeção.

Assim, ao analisar o Brasil como um país com destacada extensão territorial e clima favorável para exploração pecuária, é possível caracterizá-lo com potencial significativo para tornar-se um importante produtor mundial de ovinos. Contudo, apesar da ovinocultura brasileira encontrar-se em expansão, ainda tem muito a evoluir. O aumento do consumo de carne ovina e o controle sanitário são os principais desafios a serem ultrapassados para acelerar o crescimento da ovinocultura.

Dentre os principais problemas que acometem ovinos e que limitam consideravelmente o aproveitamento econômico destes animais estão as parasitoses gastrintestinais (MACRAE, 1993; AMARANTE et al., 1997; MOLENTO; PRICHARD, 1999), que têm como principal medida de controle o uso de anti-helmínticos. Entretanto, a resistência dos parasitos aos anti-helmínticos em uso é um problema grave que se defronta a ovinocultura mundial. Frente a isto, vários estudos têm sido desenvolvidos na busca de alternativas sustentáveis para reduzir o uso de anti-helmínticos no controle dos nematódeos gastrintestinais, como o emprego de cobre (GONÇALVES; ECHEVARRIA, 2004), suplementação com tanino condensado (MINHO; ABDALLA; GENARI, 2005), controle biológico com fungos (LARSEN, 2000; MOTA; CAMPOS; ARAÚJO, 2003), seleção de animais geneticamente resistentes (GRAY et al., 1987; AMARANTE et al., 2004),

fitoterápicos (IQBAL et al., 2003; MACEDO et al., 2010) e desenvolvimento de vacinas (NEWTON; MEEUSEN, 2003).

Por isso, o desenvolvimento de estratégias alternativas para o controle do parasita é essencial para a pecuária moderna. Além disso, o aumento da demanda do consumidor por produtos de origem animal "limpo e verde", livre de resíduos químicos e promotores de crescimento é uma poderosa força motriz para a investigação, desenvolvimento e adaptação de métodos alternativos de controle (WALLER et al., 2004).

Nesse contexto, surgiram nas últimas décadas os estudos com probióticos, que têm como característica promover a saúde dos animais e assim constituir uma resposta mais efetiva a diferentes patógenos. Os efeitos benéficos dos microrganismos probióticos têm sido observados na resposta imune inata, celular e humoral, através de proliferação de linfócitos, produção de anticorpos, aumento da atividade fagocítica e indução na produção de citocinas (GOMES; MALCAT, 2006; SAAD, 2006; ROOS et al., 2010).

Alguns dos microrganismos estudados com efeito probiótico são *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae*, que por sua resistência às variações de temperatura, podem ser fornecidos junto ao alimento e assim ser avaliados quanto aos benefícios de sua utilização em animais. A ação desses probióticos sobre a resposta imune de ovinos frente aos nematódeos gastrintestinais, bem como sua interferência na ação patogênica destes sobre a mucosa gastroentérica não são conhecidos. Portanto, este estudo foi delineado com o intuito de verificar tais aspectos, partindo da hipótese de que os probióticos *B. cereus* var. Toyoi e *S. boulardii* e *S. cerevisiae* possam ter efeito modulador da resposta imune em ovinos, sendo capazes de mobilizar defesas celulares e humorais minimizando os efeitos patogênicos dos nematódeos gastrintestinais.

Objetivos gerais

- Avaliar o efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* na ação patogênica e na resposta imune de ovinos infectados por *Haemonchus contortus*;
- Analisar em condições de campo a validade da utilização de probiótico como medida auxiliar no controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

Objetivos específicos

Em ovinos experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus* e suplementados com os probióticos *B. cereus* var. Toyoi, *S. boulardii* e *S. cerevisiae*:

- Avaliar variáveis hematológicas e bioquímicas sanguíneas;
- Avaliar o desenvolvimento ponderal dos ovinos submetidos aos diferentes probióticos;
- Verificar o efeito dos probióticos sobre o nível de infecção e fecundidade das fêmeas de *H. contortus*;
- Avaliar, *in vitro*, a produção *ex vivo* de citocinas produzidas por leucócitos de animais suplementados com probióticos;
- Quantificar a resposta celular na mucosa abomasal de ovinos suplementados com probióticos.

Em ovinos mantidos com infecção natural por nematódeos gastrintestinais e suplementados com probiótico:

- Avaliar a infecção parasitária, parâmetros hematológicos e a necessidade de tratamentos anti-helmínticos dos ovinos suplementados com o probiótico de melhor desempenho no Experimento I;
- Comparar o desenvolvimento ponderal dos ovinos suplementados ou não com probiótico.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nematódeos gastrintestinais

Os nematódeos gastrintestinais de ruminantes, especificamente os da Família Trichostrongylidae são responsáveis pelas maiores perdas de produtividade e desempenho de ovinos e caprinos. As espécies mais frequentes nesses animais são *Haemonchus contortus*, *Ostertagia* sp., *Trichostrongylus axei*, *T. colubriformis*, *Cooperia curticei*, *Nematodirus* sp., *Strongyloides* sp., *Oesophagostomum* sp. e *Trichuris* sp. (AMARANTE, 2009).

A prevalência em maior ou menor intensidade de um ou mais gêneros depende de um conjunto de fatores como: temperatura, precipitação pluviométrica, solo, tipo e manejo de pastagem, espécie, raça, idade, estado fisiológico e nutricional e manejo dos animais (O'CONNOR; WALKDEN-BROWN; KAHN, 2006).

Dentre esses parasitos, *H. contortus* é o mais patogênico, e com características reprodutivas relevantes que determinam sua ampla disseminação em altos níveis de infecção (WALLER et al., 2004). As fêmeas são capazes de ovipor em média 5000 ovos e ingerir aproximadamente 50µL de sangue diariamente. Essa espécie habita o abomaso e causa lesões puntiformes no local de fixação, que em conjunto com a hematofagia levam o hospedeiro a um estado clínico de anemia, que é evidenciado no exame da mucosa da conjuntiva ocular (SOULSBY, 1965; FREITAS, 1976).

O ciclo biológico desse gênero pode ser descrito a partir do momento em que as fêmeas começam a oviposição no órgão de eleição e esses ovos saem com as fezes para o ambiente, iniciando-se a fase de embrionamento com a formação de uma larva no interior do ovo, que dependendo dos fatores temperatura e umidade eclodirá em cerca de 24 à 36 horas. No ambiente alimenta-se de bactérias, muda a cutícula e passa para uma larva de segundo estágio (L2), que continua alimentando-se e após cerca de sete dias passa para larva de terceiro estágio (L3), que retém a cutícula da L2 e agregará a esta uma nova cutícula externa, o que favorece a resistência no ambiente (FREITAS, 1976).

Esses estádios são chamados de pré-parasitários ou de vida livre, e constituem aproximadamente 95% da população desses nematódeos. As condições ideais para que esse ciclo ocorra são temperatura entre 18 a 25°C e 80 a 100% de

umidade (NARI; FIEL, 1993). Em condições adversas de baixas temperaturas o ciclo poderá levar algumas semanas ou meses, sendo que a L3 sobreviverá reduzindo seu metabolismo. A baixa umidade é um fator negativo importante para a sobrevivência dos estádios de vida livre (O'CONNOR; WALKDEN-BROWN; KAHN, 2006).

A fase parasitária tem início com a ingestão da L3 pelo hospedeiro, quando a larva perderá sua cutícula no rúmen ou retículo e no abomaso fará uma muda, penetrando na mucosa gástrica, sendo agora denominada de larva de quarto estágio (L4). Posteriormente, ela emergirá da mucosa e então a forma imatura (L5) estará livre na luz abomasal. Com os órgãos reprodutivos formados, acasalam-se e a fêmea fecundada poderá começar a oviposição. Este ciclo tem um período pré-patente de aproximadamente 21 dias (FREITAS, 1976).

Haemonchus spp. pode apresentar em seu ciclo parasitário o fenômeno hipobiose. Isto ocorre quando as condições ambientais de umidade e temperatura não são favoráveis aos parasitos, fazendo com que reduzam seu desenvolvimento, permanecendo as larvas (L4) encistadas até que as condições se tornem favoráveis. Isto é observado em condições adversas de temperatura, como em períodos prolongados de baixa temperatura e/ou umidade relativa (SILVA; BEVILAQUA; RODRIGUES, 2003).

Quando o parasitismo é severo, os sinais clínicos mais evidentes nos ovinos são perda progressiva de peso e anemia, com volume globular baixando para 10 a 12% e com mucosas gengivais e oculares pálidas. O ferro sérico e a albumina reduzem, e após 10 dias da infecção é possível encontrar animais com edema submandibular devido à hipoproteïnemia (HOLMES, 1987). Nos casos de hemoncose crônica os sinais nem sempre estão bem evidentes, embora exista uma redução no valor do volume globular e no ganho de peso, quando comparados com animais não infectados (BARGER; COX, 1984).

Os demais parasitos da família Trichostrongylidae e *Strongyloides* sp. e *Oesophagostomum* sp. compõem o principal grupo de nematódeos gastrintestinais patogênicos para ovinos e caprinos, porém não apresentam o caráter agudo como a infecção por *Haemonchus* sp. No entanto, em grandes infecções ou conjuntamente, podem levar o animal à expressiva perda produtiva ou morte, uma vez que desestabilizam a microbiota gastroentérica e provocam lesões no epitélio da mucosa com alteração na absorção (FOX, 1997).

Trichostrongylus spp. que tem ciclo biológico semelhante ao *Haemonchus* sp. e aos demais trichostrongilídeos, encontra-se entre as glândulas da mucosa gástrica e entérica (*T. axei* e *T. colubriformis*, respectivamente), causando reações inflamatórias capazes de desestabilizar a estrutura funcional da mucosa, sendo evidenciada a gastrite parasitária em altas infecções por *T. axei*. Nesses casos, os animais apresentam edema da mucosa gastroentérica e clinicamente encontram-se apáticos, desidratados, anoréxicos e com diarreia profusa (HOLMES, 1985). A consequência dessa enfermidade é a hipoproteinemia, perda de peso e até mesmo a morte (MCKELLAR et al., 1993).

Ostertagia spp. que também é um parasito do abomaso, provoca lesões na mucosa gástrica e pode causar atrofia das glândulas gástricas (FOX, 1997). Este parasito, assim como *Haemonchus* sp., também pode apresentar em seu ciclo o fenômeno hipobiose, que por muitas vezes é evidenciado após o inverno e é um sério problema na espécie bovina em regiões de períodos com baixas temperaturas (PARKINS et al., 1990).

Parasitos do gênero *Cooperia* infectam o intestino delgado e quando em infecções altas, provocam diminuição na ingestão de água e alimentos, podendo ocasionar diarreia. Há relatos que *C. pectinata* e *C. oncophora* têm potencial patogênico diferente, sendo a primeira responsável por perda de proteínas plasmáticas superiores à segunda (SOULSBY, 1965; FREITAS, 1976).

A infecção por *Strongyloides* spp. tem como consequência a irritação da mucosa do trato intestinal, provocando edema local e impedindo a absorção adequada de nutrientes. Além desse aspecto, lesões provocadas nos sítios de penetração desse nematódeo favorecem as infecções secundárias dérmicas, principalmente na região podal (ZIOMKO, 2000).

Nematodirus é um parasito do intestino delgado associado a reações inflamatórias importantes, que podem levar o animal à anorexia, diminuição na ingestão de água, diarreia e conseqüentemente perda de peso. Atribui-se a esse nematódeo surtos em regiões de clima temperado, e estes estão relacionados à eclosão simultânea dos ovos após épocas de intenso frio (DENWOOD et al., 2008). A resistência do parasito ao frio é devido aos estádios de L1 a L3 se desenvolverem dentro do ovo (FREITAS, 1976).

A patogenia por *Oesophagostomum* ocorre tanto pela irritação do intestino grosso, como também pelos nódulos que as larvas de quarto estágio provocam ao

se encistarem. Esses nódulos podem vir a ulcerar e provocar sérias infecções peritonias ou entéricas, porém são poucos os relatos desse tipo de lesão. Muitas vezes na esofagostomose pode-se evidenciar enterite catarral. Os nódulos podem caseificar e calcificar, e em infecções maciças podem causar interferência na motilidade intestinal (SOULSBY, 1965; FREITAS 1976).

As infecções por tricostrongilídeos são diagnosticadas pela presença de ovos dos parasitos nas fezes, através da técnica de Gordon & Whitlock (1939). Os ovos desses parasitos, dependendo da espécie, podem ser encontrados a partir de 18 dias pós-infecção e a identificação do gênero parasitário é possível através da obtenção e identificação das larvas de terceiro estágio pela técnica de coprocultura de Roberts & O'Sullivan (1950). A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) pelo método de Gordon & Whitlock (1939) permite calcular a carga parasitária aproximada em ovinos e caprinos (CABARET; GASNIER; JACQUIET, 1998; UENO; GONÇALVES, 1998).

Prevenção e controle

Existem vários métodos para controlar a infecção por nematódeos, alguns mais eficazes do que outros, mas não há disponibilidade de um método totalmente eficiente. No entanto, existem muitos métodos alternativos em desenvolvimento e avaliação.

O controle preventivo e curativo dos nematódeos de ovinos é conduzido através do uso regular de drogas anti-helmínticas (AMARANTE, 2009), principalmente, benzimidazóis, levamisole, lactonas macrocíclicas, as quais os parasitos desenvolveram resistência e em muitos casos há vários princípios ativos simultaneamente, tornando estas drogas ineficazes em diversos países (VIEIRA; BERNE; CAVALCANTE, 1992; GOPAL; POMROY; WEST, 1999; AMARANTE, 2009; ALMEIDA et al., 2010).

Dentre os nematódeos *H. contortus*, *Ostertagia* spp. e *Trichostrongylus* spp. são os que têm demonstrado crescente desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos (ALMEIDA et al., 2010). Vermífugos de uma mesma classe química têm demonstrado uma eficácia reduzida em curto período de uso, devido à resistência lateral (WOOSTER; WOODGATE; CHICK, 2001).

A resistência anti-helmíntica em *H. contortus* foi relatada como muito elevada em locais onde a hemoncose é endêmica e as práticas dos pecuaristas são tratamentos anti-helmínticos frequentes por longos períodos (AMARANTE, 2009).

Métodos de controle que possibilitem contribuir para o desenvolvimento da atividade pecuária sem a dependência exclusiva dos anti-helmínticos é uma necessidade urgente. Vários métodos vêm sendo utilizados e mostram resultados promissores.

O controle biológico é uma prática baseada no uso de microorganismos, como fungos e bactérias que possuem potencial nematicida. Espécies de fungos nematófagos, como *Duddingtonia flagrans* são capazes de apreender larvas de nematódeos gastrintestinais e têm resultados promissores em estudos com ovinos e caprinos (CHANDRAWATHANI et al., 2002; SANTURIO et al., 2009). Esporos desses fungos são fornecidos junto à dieta e passam pelo trato gastrintestinal e esporulam nas fezes. As projeções das hifas resultantes do crescimento do fungo formam laços capazes de prender e matar as larvas em desenvolvimento. Animais tratados com *D. flagrans* diminuíram a contaminação da pastagem, cujos dados foram verificados através da redução de L3 (LARSEN et al., 1998; FERNANDEZ et al., 1999). Portanto, a utilização de fungos nematófagos pode ser útil como método alternativo de controle de nematódeos parasitos. No entanto, existem questões relativas ao uso de anti-helmínticos (benzimidazóis, por exemplo), que são antifúngicos, que podem interferir na eficiência deste método (PENA, 2001).

Duddingtonia flagrans também tem se mostrado capaz de reduzir as L3 dos nematódeos e sobreviver na matéria fecal de animais que foram suplementados com cobre, que também é uma alternativa de controle da hemoncose (BURKE et al., 2005).

Em relação à utilização de dietas que tenham componentes capazes de reduzir a infecção parasitária, o uso de tanino condensado em pastejo de forrageiras ou adicionado na forma de suplemento, tem se mostrado uma alternativa viável no controle das helmintoses gastrintestinais. A inclusão de taninos condensados, que equivale a 5% da matéria seca da dieta em cabras, reduziu significativamente a contagem de ovos (OPG), mas não houve efeito na recuperação de parasitos (PAOLINI et al., 2003). Também Kahiya, Mukaratirwa, Thamsborg (2003) verificaram redução significativa do OPG e diminuição na carga parasitária em cabras alimentadas com folhas secas de *Acacia karoo* misturadas a uma ração basal,

quando comparado ao grupo controle. Os efeitos de taninos condensados na redução do OPG e percentual de eclosão dos ovos podem ser benéficos, reduzindo o nível de contaminação de larvas da pastagem, possibilitando a redução do nível de re-infecção, assim, diminuindo as perdas econômicas globais (MINHO; ABDALA; GENARI, 2005; IQBAL et al., 2007).

A nutrição desempenha papel fundamental na melhora da imunidade, e a partir deste conhecimento, estudos com suplementação de nutrientes, especialmente proteica na época do parto, tem sido relatada como fator benéfico, com redução de OPG e conseqüentemente diminuição da contaminação da pastagem (HOUDIJK et al., 2005). Efeitos positivos em relação a níveis mais elevados de proteína na dieta foram observados em cordeiros resilientes e resistentes a *H. contortus* (BRICARELLO et al., 2005). Da mesma forma, a suplementação de farinha de soja e de sorgo para cordeiros em sistema de pastoreio aumentou a resistência contra helmintos (TORRES-ACOSTA et al., 2004).

Estratégias de manejo, como o pastejo rotacionado são descritas como medidas capazes de reduzir a taxa de reinfecção dos ovinos. Este relato é baseado na hipótese de que ocorra mortalidade larval substancial durante o período compreendido entre os intervalos de pastejo. Entretanto, o tempo entre as rotações para fazer o melhor uso da forragem disponível (geralmente cerca de 28-30 dias para a maioria das forrageiras), coincide com período de tempo com maiores níveis de L3 disponíveis para a re-infecção. Estudo realizado com cordeiros mostrou que o pastejo rotacionado reduziu o desenvolvimento dos animais, devido à maior infecção por *H. contortus*, quando comparados aos animais em condições de pastejo sem rotação (LEVINE et al., 1975). O pastejo rotacionado de ovinos, sem a utilização de bovinos, não foi eficiente no controle da verminose em ovinos adultos. No entanto, a utilização do pastejo rotacionado e alternado de ovinos e bovinos adultos exerceu efeito benéfico significativo no controle da verminose ovina (FERNANDES et al., 2004).

Longos períodos de tempo entre rotações ou descanso de pastagem (60-90 dias), em alguns casos, podem ser suficientes para reduzir substancialmente a infectividade da pastagem. Introduzir na mesma área animais adultos, mais resistentes, com animais suscetíveis (jovens), pode também ser benéfico. No entanto, esta estratégia pode não ser suficientemente viável devido a razões de ordem prática (van WYK et al., 2006).

Nos últimos anos vários pesquisadores têm difundido estratégias de tratamento seletivo de animais infectados por *H. contortus*, baseados no sistema FAMACHA, que avalia a coloração da mucosa da conjuntiva ocular a qual é comparada com uma cartela de cores, traduzindo assim o grau de anemia devido à infecção por *H. contortus* (KAPLAN et al., 2004). Este método tem facilitado a rápida identificação de ovinos e caprinos infectados por *H. contortus* sem o auxílio de quaisquer procedimentos de laboratório, indicando os animais que devem ser tratados (VATTA et al., 2002;. van WYK et al., 2006). Este sistema tem possibilitado aos produtores reduzir as despesas com anti-helmínticos e, ao mesmo tempo, reduzir a indevida exposição dos parasitos a fármacos e assim retardar o surgimento de nematódeos resistentes a estas drogas.

Outra forma de controle das parasitoses gastrintestinais que vem sendo avaliada é a seleção de animais resistentes à infecção por nematódeos gastrintestinais. Estudos desenvolvidos em diferentes regiões indicam raças de ovinos que são mais resistentes ao *H. contortus* como: Scottish Blackface (ABBOTT; PARKINS; HOLMES, 1985), Saint Croix (GAMBLE; ZAJAC, 1992), Gulf Coast Native (BAHIRATHAN et al., 1996), Santa Inês (AMARANTE et al., 2004), Crioula Lanada (BRICARELLO et al., 2004), entre outras. Também é bastante conhecida a variabilidade na magnitude da resistência entre indivíduos de uma mesma raça, a qual pode ser atribuída à constituição genética do animal. Estudos com ovinos da raça Merino Australiano identificaram linhagens resistentes à infecção por *H. contortus* (GRAY et al., 1992). Ovinos Gulf Coast Native, mais resistentes à infecção por nematódeos gastrintestinais, quando cruzados com ovinos Suffolk e Rambouillet melhoraram as características das proles com relação à resistência ao parasito (AMARANTE et al., 1999^a; AMARANTE et al., 1999^b).

Outra forma de melhorar a resistência dos ovinos é a indução da resposta imune aos nematódeos gastrintestinais. Esse tema tem sido alvo de vários estudos, buscando selecionar antígenos capazes de induzir uma resposta imune, principalmente ao *H. contortus* (NEWTON; MEEUSEN, 2003).

Produtos de excreção e secreção de *H. contortus*, com pesos moleculares de 15 e 24kDa foram utilizados como vacinas e se mostraram capazes de induzir uma resposta imune capaz de reduzir em 70% o OPG e a carga parasitária de ovinos (SCHALLIG; Van LEEUWEN, 1997). O antígeno mais conhecido de *H. contortus*, o H-11, designado como antígeno oculto de intestino, é uma glicoproteína de

membrana do intestino extraída do nematódeo adulto, induzindo a um nível elevado de resposta imune, traduzido por uma redução de mais de 90% no OPG e mais de 75% na carga parasitária (NEWTON; MEEUSEN, 2003). No mesmo estudo, os autores descrevem o H-gal-GP como outro antígeno oculto que induz a uma resposta imune capaz de reduzir em 80% o OPG e em 60% a carga parasitária.

Entre outros antígenos naturais, o HC-SL3 (antígeno de superfície da L3), também foi capaz de induzir a proteção dos ovinos, resultando em redução de OPG e carga parasitária (JACOBS et al., 1999).

Probióticos

A população microbiana do trato digestório é um complexo de recursos naturais que pode ser utilizada para reduzir o impacto das bactérias patogênicas que afetam a eficiência da produção animal e a qualidade dos alimentos. Estratégias foram concebidas para reduzir as populações de bactérias patogênicas de origem alimentar em animais de produção. Muitas dessas estratégias dependem do aproveitamento competitivo natural entre as bactérias. Assim, os suplementos para animais são classificados como probióticos, prebióticos e cultivos de exclusão competitiva, sendo utilizados como estratégias de redução de patógenos, com diferentes graus de sucesso. Alguns produtos demonstraram ser eficazes sob condições de campo, enquanto outros, a eficácia se restringiu às condições experimentais (CALLAWAY et al., 2008).

Probiótico é o termo utilizado para designar preparações ou produtos que contenham determinados microrganismos viáveis, em quantidades adequadas, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro e que produzem efeitos benéficos em sua saúde (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001). Já o termo prebiótico é utilizado para designar ingredientes alimentares não digeríveis, que beneficiam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um número limitado de espécies bacterianas no trato digestório (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

A utilização de probióticos na produção animal está em franco desenvolvimento como promotor de crescimento em animais de produção, principalmente na União Européia onde está proibida a utilização de ionóforos desde janeiro de 2006 (MISSOTTEN et al., 2007). Os estudos sobre a utilização de bactérias probióticas vem se intensificando, revelando que sua administração aos

suínos constitui uma forma ecológica de se obter resultados semelhantes aos produzidos pela administração de antimicrobianos (DAVIS et al., 2007; CALLAWAY et al. 2008). Vários microrganismos são utilizados como probióticos, entre os quais, bactérias ácido-lácticas, bactérias não ácido-lácticas e leveduras (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004), conforme apresentados na tabela 1. Historicamente, algumas publicações mostraram que os microrganismos utilizados na alimentação animal com fim probiótico foram espécies de *Lactobacillus* (STERN; STORRS, 1975), posteriormente há relatos de utilização de *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Bacillus*, além de algumas espécies de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *S. boulardii* (GUILLOT, 1998; THOMKE; ELWINGER, 1998).

Tabela 1. Principais microrganismos descritos com efeito probiótico.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias ácido lácticas	Bactérias não ácido lácticas e Leveduras
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> cepa nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>		<i>Propionibacterium Freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. johnsonii</i>		<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>Thermophilus</i>	

Adaptado de Holzapfel et al. (2001).

Os microrganismos considerados probióticos para terem seu uso viabilizado na adição às dietas devem ser inócuos, manterem-se viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do suco gástrico, resistir à ação da bile e da secreção pancreática e intestinal, não transportar genes transmissores de resistência à antimicrobianos, assim como resistir aos fagos e ao oxigênio (SALMINEN; ISOLAURI; SALMINEN, 1996; HOLZAPFEL et al., 2001; SAAD, 2006; DOUGLAS; MARY; SANDERS, 2008).

Probióticos são úteis em medicina humana na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores e na inibição da carcinogênese (SAAD, 2006). Em medicina veterinária, além dessas aplicações, também podem ser usados como promotores de crescimento, constituindo-se em uma alternativa aos antimicrobianos, cujo uso indiscriminado pode selecionar cepas resistentes (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004; GOMES; MALCAT, 2006; DOUGLAS; MARY; SANDERS, 2008).

A maioria das informações sobre a influência dos probióticos na imunidade foi obtida com a utilização de lactobacilos ou bifidobactérias, que são utilizados na alimentação humana (SAAD, 2006) e que são difíceis de armazenar e administrar para animais (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004). *Bacillus cereus* var. Toyoi, pelo contrário, resiste às condições ambientais, o que facilita seu uso na elaboração, conservação e administração em rações para animais (GIL-TURNES et al., 1999).

Embora as pesquisas sobre o efeito de probióticos na imunidade de ruminantes sejam reduzidas, os relatos descrevendo os efeitos dos probióticos na imunidade de outras espécies são mais frequentes. Porém, os processos envolvidos ainda não estão bem esclarecidos, podendo envolver um ou vários componentes da resposta imune (ERICKSON; HUBBARD, 2000; CALLAWAY et al., 2008).

Entre os possíveis mecanismos de ação dos probióticos destacam-se: a competição com patógenos por receptores celulares (ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006), a indução de secreção de mucina e a modulação da resposta imunológica (MACK et al., 2003; PATURI et al., 2007; ROOS et al., 2010).

A administração oral de *L. casei* mostrou proteção contra patógenos intestinais, sendo essa atribuída à capacidade fagocítica dos macrófagos peritoniais e da atividade das enzimas envolvidas na fagocitose (PERDIGÓN; ALVAREZ, 1992).

Nas infecções por parasitos intestinais, os modos pelos quais os probióticos exercem seus efeitos benéficos não estão totalmente esclarecidos, mas um dos mecanismos provavelmente envolvidos é a estimulação da resposta imune não específica. De acordo com Gill (2003), probióticos administrados oralmente podem afetar negativamente o estabelecimento e o desenvolvimento de nematódeos por interferir na regulação da expressão gênica das mucinas e na composição e excreção de muco.

No caso de bactérias probióticas, além do envolvimento de processos imunológicos inespecíficos, mecanismos como os relacionados às mucinas, têm recebido bastante atenção pela possibilidade de estarem implicados no fenômeno de expulsão dos helmintos. As mucinas, constituídas por uma camada de glicoproteínas que recobre a superfície do epitélio intestinal, além de constituírem uma barreira física entre o epitélio e o conteúdo do lúmen intestinal, exercem ação protetora contra patógenos intestinais através de diversos mecanismos (OLIVEIRA-SEQUEIRA; AMARANTE; SEQUEIRA, 2000).

A expulsão de larvas de quarto estágio de *Ascaris suum* do jejuno de leitões suplementados com probiótico foi um dos efeitos positivos da administração de *Bifidobacterium lactis* (SOLANO-AGUILAR et al., 2004).

Uma das constatações obtidas no estudo de Martin et al. (2006) foi a de que camundongos infectados com *Trichinella* e suplementados com probióticos apresentaram parâmetros metabólicos semelhantes aos de animais não-infectados, indicando que os probióticos promoveram uma parcial normalização das atividades metabólicas em animais infectados. Esses resultados são uma evidência de que os probióticos podem exercer seus efeitos benéficos nas helmintoses intestinais, se não por aumentar a resistência dos hospedeiros (baixa carga parasitária), por contribuir para com a resiliência (manutenção da saúde e produtividade) dos animais infectados (OLIVEIRA-SEQUEIRA; AMARANTE; SEQUEIRA, 2000).

Apesar do interesse crescente pelo uso de probióticos para ovinos, os resultados são inconstantes. Alguns estudos têm demonstrado que a adição de probióticos à dieta promove benefícios diretos e indiretos ao hospedeiro e estes devem ser relacionados ao microrganismo específico. Segundo Lema, Williams, Rao (2001) cordeiros suplementados com probióticos (*L. acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. plantarum*) da primeira até a quinta semana de vida tiveram uma redução no índice de diarreia devido à redução de bactérias patogênicas no trato entérico. Ovinos suplementados com *Bacillus licheniformis* e *B. subtilis* apresentaram aumento de 130mL da produção de leite e reduziu a taxa de mortalidade em 5,3% (KRITAS et al., 2006).

As leveduras vivas (*S. cerevisiae*) auxiliam na manutenção do pH no rúmen via estímulo de bactérias utilizadoras de lactato e contribuem com constante suprimento de nutrientes para a população bacteriana no intestino (ROSE, 1997).

Resposta imune

Interação entre nematódeos parasitos e o sistema imune

O principal mecanismo de defesa do hospedeiro frente às infecções é a imunidade. Quando os agentes infecciosos penetram no corpo, o sistema imunológico reage através de uma série de atividades que mobilizando diferentes componentes (anticorpos, linfócitos, mastócitos, eosinófilos), que, em seguida, podem atacar e eliminar os invasores. O sistema imunológico se torna maduro com a idade e, portanto, os animais jovens são mais suscetíveis à infecção e se tornam mais resistentes com o avanço da idade. Além disso, os animais jovens geralmente abrigam os níveis de infecção mais pesados e sofrem as consequências mais graves (MILLER; HOROHOV, 2006).

Apesar dos efeitos patogênicos graves que os parasitos podem provocar, animais em boas condições de saúde podem não apresentar sinais de parasitismo. Quando isso ocorre, pode-se afirmar que a relação parasito-hospedeiro está em equilíbrio (OLIVEIRA-SEQUEIRA; AMARANTE; SEQUEIRA, 2000).

Os efeitos da infecção por nematódeos podem ser influenciados pelo estado nutricional do hospedeiro (KNOX; STEEL, 1996). Sabe-se que os animais bem alimentados podem suportar melhor a infecção do que os animais com uma dieta inadequada (COOP; KYRIAZAKIS, 1999). Além disso, os nematódeos interferem na capacidade do hospedeiro em utilizar os nutrientes de forma eficiente (MILLER; HOROHOV, 2006).

Uma característica consistente do parasitismo por nematódeos gastrintestinais é a ampla variação da carga parasitária em uma população animal, não apresentando uma distribuição normal, tendo um padrão de infecção caracterizado por uma minoria de indivíduos albergando a maioria dos parasitos, principalmente porque esses podem ser controlados por fatores genéticos e pela natureza da resposta imune do hospedeiro (CLAEREBOUET et al., 1996; HOUDIJK, 2008).

Tanto a imunidade humoral, quanto a celular fazem parte da resposta adaptativa de mamíferos e estão ativamente envolvidas nas infecções por nematódeos (MILLER; HOROHOV, 2006). Geralmente, linfócitos T e B, citocinas, células plasmáticas, imunoglobulinas, mastócitos, eosinófilos são conhecidos por participarem das reações imunológicas, sendo observada uma variabilidade na sua

produção e magnitude na ação sobre os diferentes parasitos em diferentes hospedeiros. A consequência final de uma invasão parasitária é o estabelecimento da infecção ou a expulsão do parasito em decorrência da resposta imune do hospedeiro (NAWA et al., 1994; MEEUSEN; BALIC, 2000; BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2002).

A superfície das mucosas é provida de uma, aparentemente fácil, porta de entrada de patógenos devido às suas funções fisiológicas críticas, como a digestão e absorção, sendo constituída por apenas uma única camada de células capazes de proporcionar proteção contra a entrada de parasitos junto aos alimentos. Porém, as membranas das mucosas possuem, no entanto, mecanismos à sua disposição para limitar essa invasão, alguns dos quais são mecânicos, tais como o movimento de fluidos e peristaltismo, atuando em conjunto com as defesas bioquímicas inatas (STANKIEWICZ et al., 1993). O baixo pH e as enzimas hidrolíticas do abomaso formam um ambiente hostil para a maior parte dos patógenos, mas a maioria dos nematódeos desenvolveu mecanismos para resistir nesse local, como por exemplo, *Haemonchus* e *Ostertagia* possuem cutícula espessa recobrando a superfície do parasito (TIZARD, 2000).

Toda superfície da mucosa gastrintestinal é protegida por uma camada de muco que recobre todo o epitélio, este muco é produzido pelas células caliciformes. Também existem células epiteliais localizadas nas criptas intestinais, como as células de Paneth, que são ativas e respondem pela produção de lisozimas antimicrobianas e citocinas pró-inflamatórias no lúmen (MÜLLER; AUTENRIETH; PESCHEL, 2005).

A resposta imune é dependente do padrão de expressão gênica de citocinas induzidas durante a infecção (SHER et al., 1992; URBAN et al., 1992). Observa-se, em modelos murinos, que existem duas subpopulações de células CD4+ Thelper baseada em dois padrões distintos de expressão gênica de citocinas, designados Th1 e Th2 (MOSSMANN; COFFMAN, 1989). Citocinas normalmente produzidas pelo subgrupo Th1 incluem IL-2, interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), e pelo subgrupo Th2 incluem IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL -13 (URBAN et al., 1992; ROMAGNANI, 1999). Embora, ambas subpopulações de células possam ser induzidas durante uma infecção, uma ou outra população domina determinada resposta. Parasitos intracelulares, na maioria das vezes, induzem uma resposta do

tipo Th1 e helmintos parasitos, uma resposta do tipo Th2 (MEUSSEN; BALIC; BOWLES, 2005).

Na resposta inata, a via alternativa de ativação do complemento parece ser dominante nas infecções por nematódeos. A ativação do complemento por qualquer um dos caminhos pode ter muitas consequências para as infecções por nematódeos, além de proporcionar um estímulo para o aumento e mobilização de células efectoras, como os eosinófilos, há geração de potentes mediadores quimiotáticos que induzem a degranulação de mastócitos, amplificando a resposta inata (VLIAGOFTIS; BEFUS, 2005).

Outros fatores envolvidos na imunidade inata contra helmintos, como as moléculas específicas CH-lectin e a presença de galectinas na resposta imune, sugerem um papel específico para este tipo de lectina, que podem modular respostas com perfil do tipo alérgico (YOUNG; MEEUSEN, 2004).

Resposta imune Celular

Os neutrófilos, assim como os macrófagos, são capazes de destruir antígenos e produzir uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, não estando normalmente associados à infecções por nematódeos, mas têm sido relacionados por produzir TNF- α quando incubados com produtos de secreção e excreção de larvas de *Onchocerca volvulus* (GILLETTE-FERGUSON et al., 2007). Os neutrófilos são recrutados no início de uma resposta imune, estando envolvidos principalmente na imunidade inata, envolvidos no papel de reconhecer os organismos patogênicos através de receptores da superfície celular, que podem ser encontrados em torno das larvas dos parasitos nas primeiras horas após a infecção (MEEUSEN; BALIC, 2000).

Embora os mastócitos e eosinófilos sejam importantes células efectoras contra infecções por nematódeos, a expulsão do nematódeo parece variar de acordo com as espécies de parasito envolvidas. Essas células contêm muitos grânulos preenchidos com histamina, heparina e proteases, e podem secretar citocinas como a IL-4 e IL-5, bem como leucotrienos e quimiocinas. A ativação clássica, resultando em degranulação de mastócitos, envolve a ligação da IgE através da ligação cruzada na fração Fc ϵ R (ARIZMENDI-PUGA; ENCISO; ORTEGA-PIERRES, 2006).

Sabe-se que mastócitos e eosinófilos são as células mais comuns para se infiltrarem no local de infecção pelo nematódeo. Sendo que os eosinófilos contêm

um significativo número de grânulos preenchidos por proteínas catiônicas que podem liberar uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e de mediadores lipídicos, tornando-as potentes células efetoras (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

Já as células dendríticas são importantes para instigar uma resposta imune através de contato direto célula a célula e da produção de citocinas. São capazes de expressar uma variedade de receptores que podem potencialmente interagir com nematódeos e com os seus produtos. Estes incluem *Toll-Like Receptors* (TLRs), os receptores manose (MR) e lectinas tipo C, entre outros (DE VEER; KEMP; MEEUSEN, 2007).

Resposta imune humoral

Embora a resposta mediada por eosinófilos IgE-dependente constitua um dos mecanismos mais importantes de resistência aos helmintos, os anticorpos das outras classes de imunoglobulinas também exercem um papel protetor. Os mecanismos envolvidos incluem a neutralização das proteases utilizadas pelas larvas para penetração nos tecidos e o bloqueio dos poros anal e oral dessas larvas através de imunocomplexos (JANEWAY et al., 2002).

Estudos conduzidos por Stear, Strain, Bishop (1999), relataram a inter-relação da resposta imune mediada por IgA e o desenvolvimento dos parasitos, que são menores nos animais resistentes, porém, sem interferência na carga parasitária.

A resposta Th2 está diretamente associada com a produção de IL-4, IL-5, e IL-13 induzindo a produção de IgE (MEUSEN; BALIC 2000). Essa resposta tem impacto no nível de infecção, uma vez que a expulsão de helmintos é acompanhada por mobilização de mastócitos na mucosa, eosinofilia tecidual, elevados níveis de IgE no soro e níveis elevados de IgG1 e IgG4 parasito-específicos (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996; MEEUSEN; BALIC, 2000; MEUSSEN; BALIC; BOWLES, 2005). A produção local de citocinas por estas células poderia ser responsável pelas diferenças na susceptibilidade ao parasitismo do nematódeo, se relacionada aos mastócitos e eosinófilos como célula protetora (TEPPER et al., 1990; MILLER; HOROHOV, 2006).

Cox, Liew (1992) indicaram que a IL-4 é uma citocina que desempenha papel importante na imunidade mediada por anticorpos dependentes de células Th2. Estudos realizados em camundongos, cujos genes de IL-4 ou IL-13 foram deletados,

demonstraram que estes animais são muito mais suscetíveis a *Trichuris muris* que camundongos normais (FINKELMAN et al., 1997).

Em geral, antígenos de helmintos parecem preferencialmente estimular respostas Th2, e as respostas Th1 devem ter pouco benefício protetor. Entretanto, podem ocorrer respostas Th1 e, como resultado, as células T citotóxicas podem atacar os helmintos que se encontram em estágios teciduais (LAWRENCE, 2003; MEUSSEN; BALIC; BOWLES, 2005).

Embora exista um consenso de que a maior parte da defesa imune eficaz contra nematódeos é a mobilização de potentes respostas do tipo Th2 (BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2002), pouco se sabe sobre como mediar essas respostas contra parasitos ou promover essa imunidade. O aumento no interesse em conhecer o padrão imune inato, com a descoberta dos receptores *Toll-like* (TLRs) e a sua capacidade de modular imunidade adaptativa, criou um novo paradigma quando a resposta adaptativa é dirigida pelo tipo de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), detectados pelo sistema imune inato (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; INGHAM et al., 2008).

A compreensão da resposta imune contra nematódeos é condição prévia para o desenvolvimento de pesquisas e de concepção de estratégias eficazes para seu controle. Existem vários modelos parasito-hospedeiro que são utilizados para definir os diversos componentes da resposta imune e a sua cinética. Devido às diferenças inerentes entre as espécies de parasitos, bem como do hospedeiro, esses sistemas de modelos não são capazes de replicar totalmente as respostas de todos os nematódeos. No entanto, podem facilitar significativamente a compreensão das diferentes respostas e manifestações imunológicas.

CAPÍTULO 1

Efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* em ovinos infectados com *Haemonchus contortus*

Tiago Gallina¹, Felipe G. Pappen¹, Talita B. Roos¹, Ana L. Schild¹, Fábio P. L. Leite², Magda V. Benavides³, Maria E. A. Berne²

1 Programa de Pós Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas - Brasil Faculdade de Veterinária, Campus Universitário s/n, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

2 Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil

3 Embrapa – Secretaria das Relações Internacionais, Brasil

Resumo

As nematodioses gastrintestinais constituem o principal problema sanitário na produção de pequenos ruminantes, destacando-se a infecção por *Haemonchus contortus*, responsável pelas maiores perdas econômicas devido à sua maior patogenicidade e por apresentar resistência à maioria dos anti-helmínticos utilizados para seu controle. Estratégias de controle que possibilitem diminuir a dependência dos anti-helmínticos, não deixando resíduos na carne e ou leite, são ferramentas necessárias para otimizar a produção de ovinos. Neste contexto, foram avaliados os efeitos dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* em ovinos experimentalmente infectados por *H. contortus*. Os parâmetros mensurados foram desenvolvimento ponderal, hemograma e proteínas séricas totais, carga parasitária e número de eosinófilos na mucosa abomasal. Os animais que receberam *S. cerevisiae* apresentaram menor carga parasitária e maior número de eosinófilos na mucosa gástrica, comparada aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Quanto aos outros parâmetros quantificados não foi evidenciada diferença significativa entre os tratamentos. Dentre os probióticos avaliados o *S. cerevisiae* mostrou potencial para ser utilizado como uma alternativa de controle à infecção por *H. contortus*, visto a redução expressiva da carga parasitária (41,92%).

Palavras-chave: Probióticos. *Haemonchus contortus*. Ovinos. Eosinófilos.

Introdução

A nematodiose gastrintestinal representa o mais grave problema sanitário da ovinocultura mundial, podendo inviabilizar economicamente essa atividade. Ovinos em todas as faixas etárias podem infectar-se por nematódeos, entretanto, os animais jovens são os mais suscetíveis (COLDITZ et al., 1996). A ação prejudicial dos parasitos não se traduz apenas pela mortalidade dos animais, mas também pela alta morbidade, que ocasiona perdas significativas na produção de carne e lã. Os ovinos

são especialmente suscetíveis às infecções por *Haemonchus contortus*, nematódeo mais patogênico e amplamente distribuído no mundo (WALLER et al., 2004). Nas últimas décadas, a eficácia das drogas anti-helmínticas tem sido reduzida com a expansão de populações de parasitos resistentes à praticamente todas às moléculas disponíveis, inclusive as de última geração (ECHEVARRIA et al., 1996; GETACHEW; DORCHIES; JACQUIET, 2007; ALMEIDA et al., 2010).

Embora o controle das parasitoses esteja fundamentado no uso de anti-helmínticos, medidas alternativas devem estar associadas para diminuir a dependência dos produtos químicos. A nutrição adequada tem grande relevância no contexto parasito/hospedeiro. A melhoria na dieta dos ovinos, particularmente protéica, tem sido efetiva no aumento da resistência à infecção por nematódeos (KHAN et al., 2003). Pesquisas demonstram que a suplementação protéica e equilíbrio da dieta promovem respostas no hospedeiro capazes de afetar o desenvolvimento dos parasitos, produção de ovos e manter os níveis hematológicos próximos ao fisiológico (STRAIN; STEAR, 2001; TORRES-ACOSTA et al., 2004).

Um dos mecanismos atribuídos a esse efeito é a melhora no aporte celular nos animais suplementados, condição que permite melhor resposta imunológica, através do estímulo ou produção de células, como os eosinófilos, que mediam a expulsão de nematódeos (BALIC; CUNNINGHAM; MEEUSEN, 2006). A eliminação da carga parasitária está associada a degranulação de várias células, como eosinófilos e mastócitos no órgão parasitado, e além da ação direta sobre o alvo, estimulam através de mediadores químicos reações que também interferem na fixação dos parasitos, como a mudança da viscosidade do muco, prejudicando a mobilidade das larvas, o que permite a sua expulsão (KEMP et al., 2009).

Ainda assim, é preciso estudar outras metodologias para que as populações no ambiente e no hospedeiro permitam uma produtividade do rebanho sem depender apenas dos produtos químicos. Dentre essas alternativas, têm-se os probióticos, constituídos por microrganismos vivos que, se administrados em quantidades adequadas, promovem benefícios à saúde do homem e dos animais através da proliferação de linfócitos, aumento na produção de anticorpos, aumento da atividade fagocítica e indução da produção de citocinas (GAGGIÀ; MATTARELLI; BIAVATI, 2010; ROOS et al., 2010).

De acordo com Gill (2003), probióticos administrados oralmente podem afetar negativamente o estabelecimento e o desenvolvimento de nematódeos por interferir

na regulação da expressão gênica das mucinas e na composição e excreção de muco. A expulsão de larvas de quarto estágio de *Ascaris suum* do jejuno de leitões suplementados com probiótico foi um dos efeitos positivos da administração de *Bifidobacterium lactis* (SOLANO-AGUILAR et al., 2004). Também, Martin et al. (2006) constataram que animais infectados com *Trichinella* e suplementados com probióticos apresentaram parâmetros metabólicos semelhantes aos de animais não-infectados, indicando que os probióticos promoveram um parcial equilíbrio das atividades metabólicas.

Alguns dos microrganismos, com efeito probiótico conhecido, são *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae*, que por sua resistência às variações de temperatura, podem ser fornecidos junto ao alimento e assim serem avaliados quanto aos benefícios de sua utilização em animais (COPPOLA; CONCEIÇÃO; GIL-TURNES, 2005; ROOS et al., 2010). A busca de medidas alternativas, que possibilitem a redução de uso de anti-helmínticos no controle das parasitoses intestinais de ovinos motivou este estudo, que teve como objetivo avaliar o efeito destes probióticos em ovinos experimentalmente infectados com *H. contortus*.

Materiais e métodos

Local de estudo e animais experimentais

A pesquisa foi conduzida na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Brasil. Durante todo período experimental os animais foram mantidos estabulados. As condições de pesquisa foram aprovadas pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (COCEPE Nº 5.05.02.123).

Trinta e dois cordeiros de quatro a cinco meses de idade, da raça Texel, foram alocados em quatro grupos de oito animais, de acordo com peso vivo. O período experimental foi de 64 dias, sendo os primeiros sete dias para adaptação dos animais ao ambiente e a dieta composta por 4% do peso vivo em matéria seca (50% ração com 16% de proteína bruta (PB) e 50% de feno com 14% de PB), sete dias para adaptação aos probióticos e mais 49 dias após a infecção experimental.

Os probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* foram produzidos no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP), do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. A dose diária de cada probiótico foi individualmente fornecida, sendo equivalente a 1×10^6 UFC gr⁻¹ de ração, e o grupo controle recebeu somente placebo constituído por água.

Infecção experimental com *H. contortus*

Para obtenção das larvas de terceiro estágio, 100 fêmeas de *H. contortus* obtidas de necropsia de ovinos foram maceradas e dispostas em recipiente com serragem por sete dias (27° C e 85% UR). Três ovinos adultos livres da infecção por nematódeos gastrintestinais, mantidos estabulados, foram infectados com 10000 L3, por animal. Após 28 dias, as fezes desses animais foram recolhidas durante três dias com bolsas coletoras. Coproculturas, pela técnica de Roberts & O'Sullivan (1950), foram realizadas para obtenção das larvas a partir deste material. No dia zero (0), ou seja, quinze dias após a estabulação dos 32 cordeiros, ± 5000 L₃ de *H. contortus* foram inoculadas por via oral em cada ovino dos quatro grupos.

Parâmetros hematológicos e de ganho de peso

Amostras de sangue foram colhidas de todos os animais nos dias -7, 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 para as avaliações hematológicas (volume globular, hemograma, hemoglobina), e proteína plasmática total. O sangue foi obtido através da venocentese da jugular, utilizando-se agulhas e aplicador para tubos de vidro com vácuo, sem e com citrato de sódio e EDTA como anticoagulante.

A medida do volume globular foi avaliada através do método do microhematócrito. Proteínas séricas totais foram avaliadas pelo método do biureto modificado, com leitura espectrofotométrica em 545nm e separação eletroforética em gel de agarose. A determinação do valor de hemoglobina foi verificada por *kit* comercial.

Todos animais foram pesados semanalmente para ajuste da dose dos probióticos.

Parâmetros parasitológicos

A contagem de ovos por grama de fezes (OPG), pela técnica de Gordon & Whitlock (1939), foi realizada semanalmente em todos animais a partir do 21º dia após a infecção para monitorar a mesma.

Recuperação dos parasitos

No 49º dia após a infecção experimental, todos os animais foram eutanasiados para recuperação dos nematódeos. O abomaso foi aberto pela curvatura maior e seu conteúdo, colocado em recipiente graduado, seguindo-se a lavagem do órgão. O produto dessa lavagem foi adicionado em cálice de sedimentação, realizando-se sucessivas lavagens, até obter um líquido claro. Ao sedimento foram adicionados 50% de formol a 10%. O produto conservado permitiu a contagem total dos parasitos e separação por sexo.

Mensuração de *H. contortus* e correlação com a fecundidade

Vinte fêmeas de *H. contortus* foram recolhidas ao acaso de cada um dos ovinos experimentais e seus comprimentos mensurados através de sistema de análise de imagens (Sistema Axio-vision 3.1).

A técnica de KLOOSTERMAN; ALBERS; VAN DEN BRINK (1978), foi adaptada para a quantificação do número total de ovos por fêmeas. Os espécimes foram colocados individualmente em tubos de ensaio contendo 0,2mL de solução de hipoclorito de sódio a 2%, seguindo-se agitação em vortex por 1min e posteriormente adição de 1,2mL de água destilada e 0,1mL de lugol. Após homogeneização, 0,5mL da solução foram colocados entre lâmina e lamínula e realizada a contagem do número total de ovos em microscópio com aumento de 50x. O valor final foi multiplicado por três, obtendo-se o número total de ovos por fêmea e este foi correlacionado com a média das medidas das fêmeas de cada animal.

Quantificação de eosinófilos na mucosa abomasal

Adaptado a partir da metodologia de Huntley et al. (1992) para contagem celular no tecido abomasal, amostras da área fúndica do abomaso foram seccionadas (2cm²), fixadas em formol a 10% por 24h e incluídas em parafina. Os cortes de 5µm foram corados com hematoxilina-eosina para posterior contagem de eosinófilos. A metodologia para obtenção do número de eosinófilos baseou-se na quantificação do total destas células obtidas em 15 microfotografias de campos aleatórios focalizados desde a camada muscular até a superfície da mucosa, em

aumento de 400X, correspondentes a uma área de 0,04mm² (Sistema Axio-Vision 3.1). Foi realizada a contagem individual de cada animal e os resultados expressos como média do número de eosinófilos/mm² de mucosa.

Análise estatística

O modelo estatístico utilizado incluiu os tratamentos como variáveis independentes e como variáveis dependentes: OPG (log 10 (+1)), peso, hemoglobina (Hb), proteínas plasmáticas totais, volume globular (vg), leucócitos totais, eosinófilos periféricos, tamanho médio das fêmeas, média de ovos/fêmea, carga parasitária e eosinófilos de mucosa. Para a análise das variáveis: peso, Hb, vg, leucócitos totais e eosinófilos periféricos foi utilizado o método procmixed para medidas repetidas (SAS, 1998). As medidas mensuradas uma só vez (tamanho médio das fêmeas, média de ovos/fêmea, carga parasitária e eosinófilos de mucosa) foram analisadas através de variância one-way Anova. Além disso, as médias gerais das variáveis: peso, Hb, proteínas plasmáticas totais, vg, leucócitos totais e eosinófilos periféricos foram também comparadas entre os grupos por Anova, incluindo o período e o tratamento como fatores de comparação. As diferenças entre os tratamentos foram verificadas pelo teste de Tukey e consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Resultados

Parâmetros parasitológicos

A partir do 28º dia foi verificada a presença de ovos em todos os ovinos dos grupos estudados, seguindo um aumento progressivo até o 49º dia, porém, não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos testados nas análises do OPG nos dias 28, 35, 42 e 49 ($p > 0,05$) (Fig. 1).

A média de *H. contortus* adultos recuperados no 49º dia nos grupos de ovinos que receberam os tratamentos com *B. cereus* var. Toyoi e *S. boulardii* não diferiram estatisticamente do grupo controle, no entanto, os animais suplementados com *S. cerevisiae* tiveram uma significativa redução de 41,92% na carga parasitária recuperada em relação ao grupo controle ($p = 0,028$).

A média do comprimento total das fêmeas e o número médio de ovos por fêmea foram semelhantes em todos os grupos experimentais ($p > 0.05$) (Fig. 2), permanecendo com valores próximos aos de referência para a espécie.

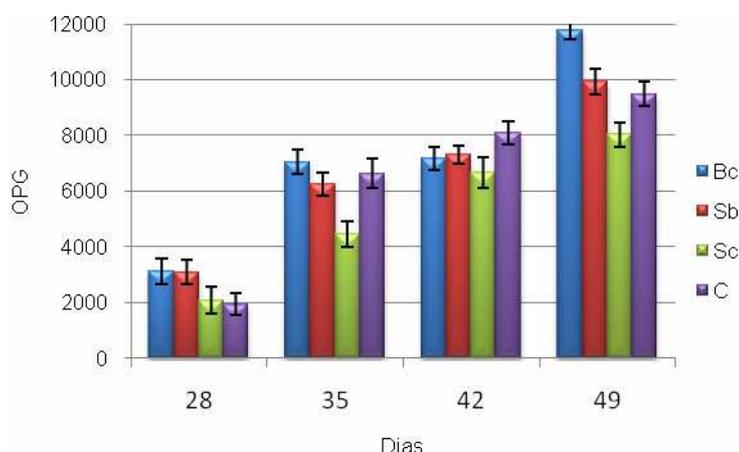


Figura 1. Contagem média de ovos por grama de fezes (OPG) de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C).

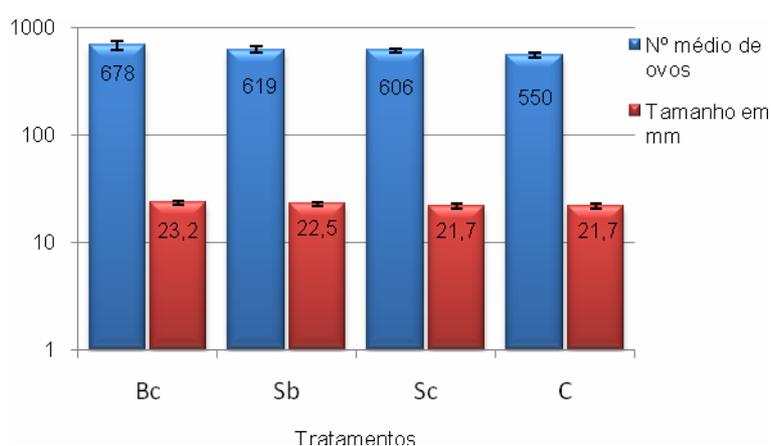


Figura 2. Número médio de ovos e comprimento médio de fêmeas de *Haemonchus contortus* recuperadas de ovinos experimentalmente infectados e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C).

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os valores hematológicos: leucócitos periféricos totais, eosinófilos periféricos totais, hemoglobina, proteínas plasmáticas totais e volume globular não diferiram quando avaliados entre os tratamentos e também durante o período do experimento (Fig. 3, 4, 5, 6 e 7). Embora não tenha sido possível detectar diferença significativa entre os tratamentos, houve uma redução numérica nos valores hematológicos no decorrer da infecção com *H. contortus*. A redução dos valores de volume globular e

hemoglobina foram inversamente proporcionais ao aumento dos valores de OPG (Fig. 1, 5 e 7).

Os valores de eosinófilos periféricos mantiveram-se dentro dos parâmetros fisiológicos, porém com discreto aumento no período inicial pós-infecção.

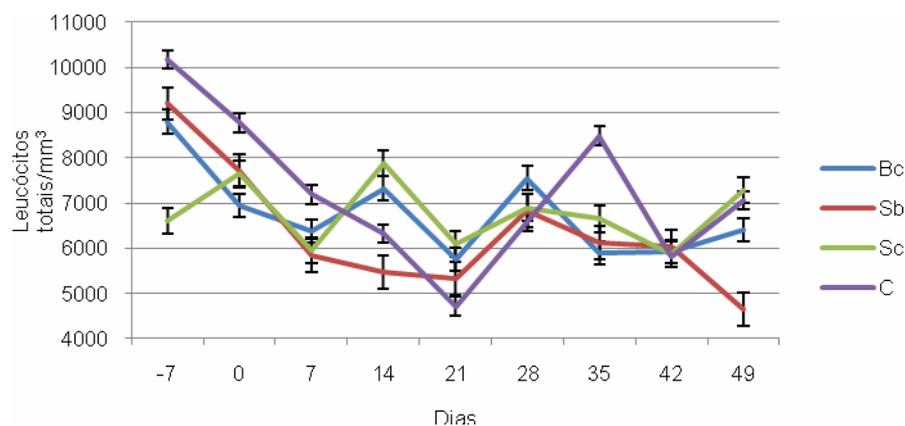


Figura 3. Número médio de leucócitos totais de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos e dia 0 = infecção experimental.

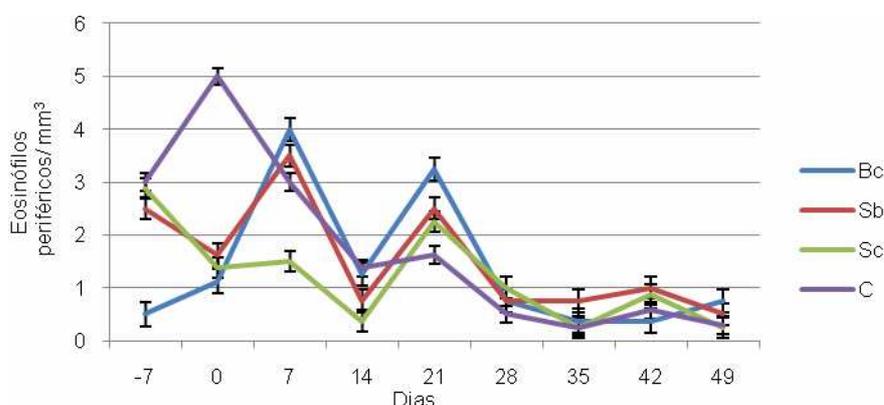


Figura 4. Número médio de eosinófilos periféricos de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos e dia 0 = infecção experimental.

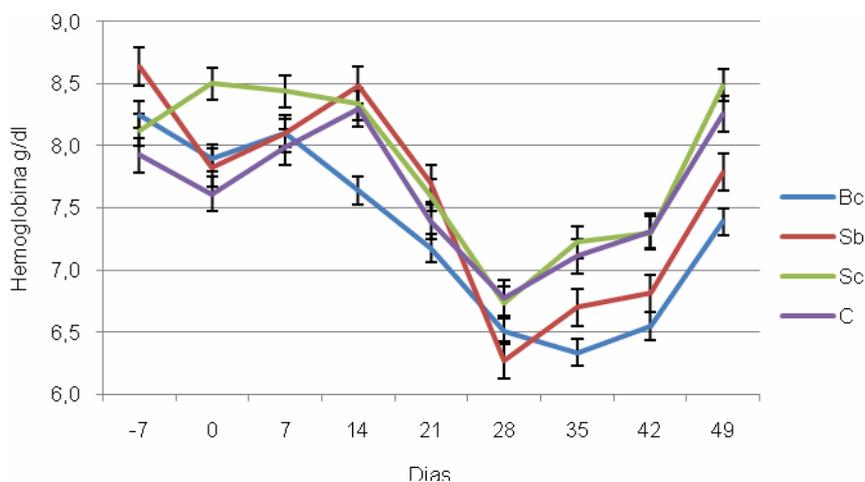


Figura 5. Taxas médias de hemoglobina de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos e dia 0 = infecção experimental.

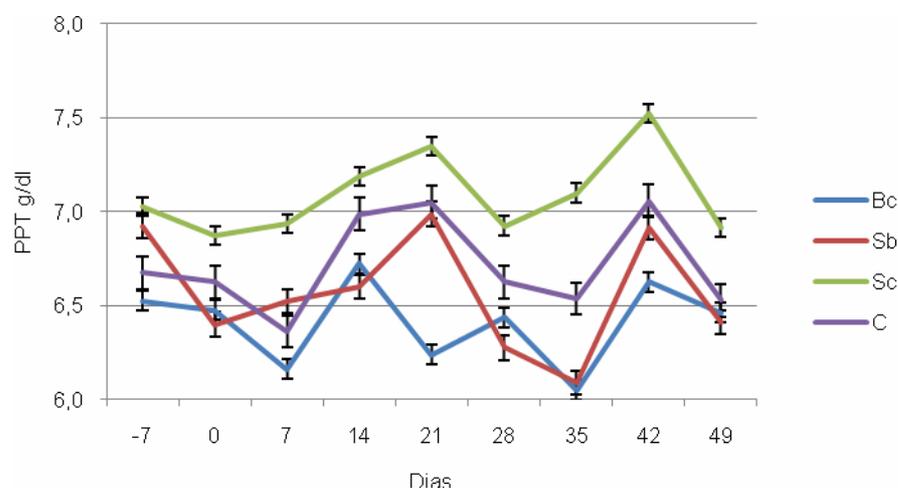


Figura 6. Médias das proteínas plasmáticas totais de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos e dia 0 = infecção experimental.

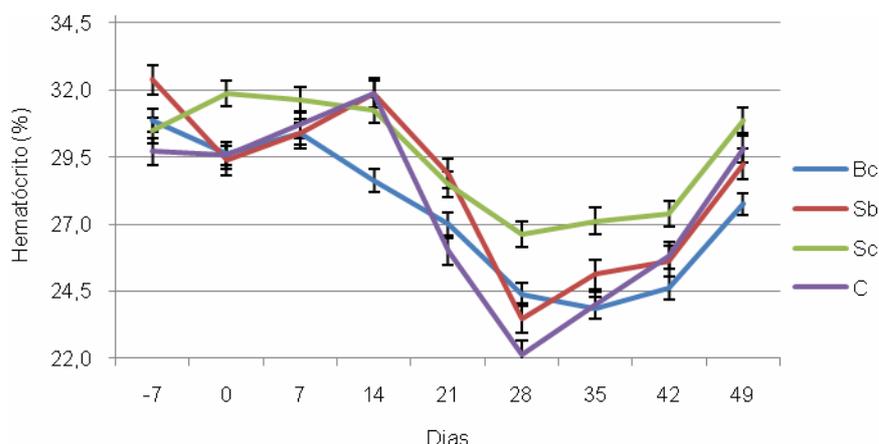


Figura 7. Média de volume globular em ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos e dia 0 = infecção experimental.

Eosinófilos abomasais

Ao exame macroscópico do abomaso no momento da necropsia foram observados sinais discretos de edema e/ou petéquias, sem relação com o nível de infecção e/ou tratamento.

O número de eosinófilos presentes na região fúndica da mucosa gástrica no 49º dia após a infecção experimental evidencia diferença altamente significativa ($p < 0,01$) quando comparados o grupo tratado com *S. cerevisiae* e os demais grupos, com aumento superior ao dobro destas células/mm² (1644 ± 139.3 , contra 668 ± 62.8 no grupo controle). Na análise da carga parasitária e presença de eosinófilos na mucosa do abomaso verifica-se que ovinos que receberam *S. cerevisiae* apresentaram o maior número médio de eosinófilos por mm² e o menor número médio de adulto de *H. contortus*. Nos demais grupos ocorreu o inverso, maior número de adultos de *H. contortus* e menor número de eosinófilos (Fig 8).

A distribuição dessas células compreendia desde a região da mucosa até a região muscular, sendo que sítios com grande número de eosinófilos foram encontrados nos abomasos do grupo tratado com *S. cerevisiae*, enquanto que nos demais grupos evidenciavam-se apenas menor número de células dispersas (Fig. 9).

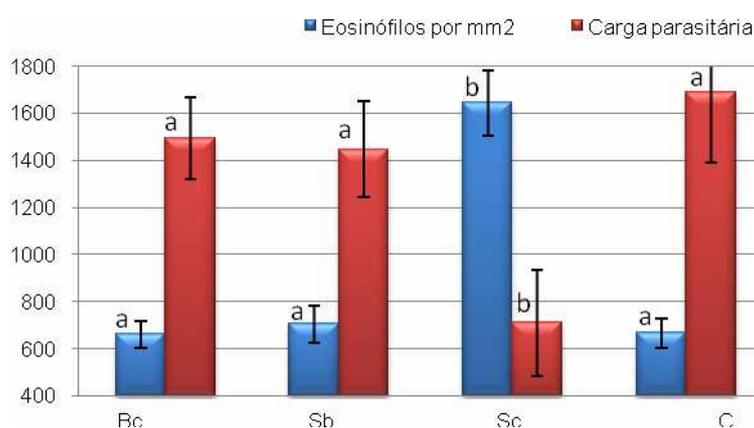


Figura 8. Média da carga parasitária e de eosinófilos da mucosa abomasal de ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Letras diferentes, nas colunas de cada variável dependente indicam valores com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

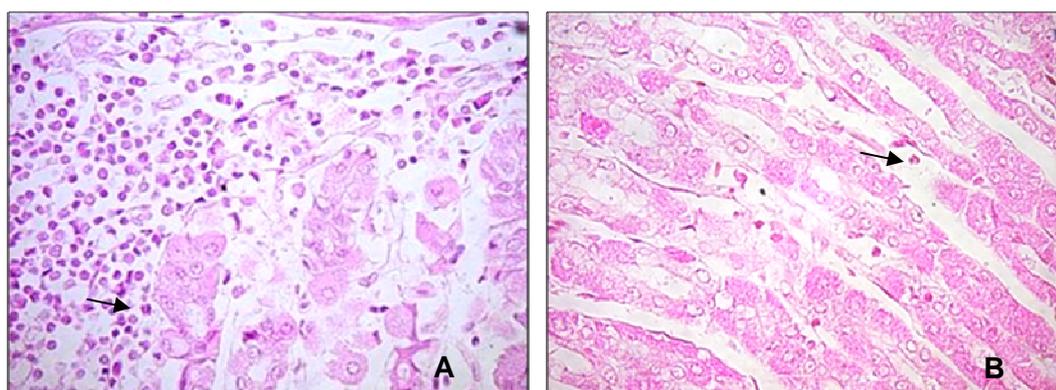


Figura 9. Eosinófilos presentes na mucosa gástrica de ovinos no 49º dia após a infecção experimental com *Haemonchus contortus*. Hematoxilina-eosina, 40x. A= grupo *Saccharomyces cerevisiae* e B= grupo controle.

Não houve correlação entre os valores de eosinófilos abomasais e periféricos entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

Os extremos de ganho de peso diário foram observados entre o grupo tratado com *S. boulardii* (0,128kg/dia) e os grupos controle e *S. cerevisiae* (0,114kg/dia). Porém, não houve diferença significativa entre o ganho de peso médio diário entre nenhum dos grupos de animais estudados ($p = 0,99$) (Fig. 10).

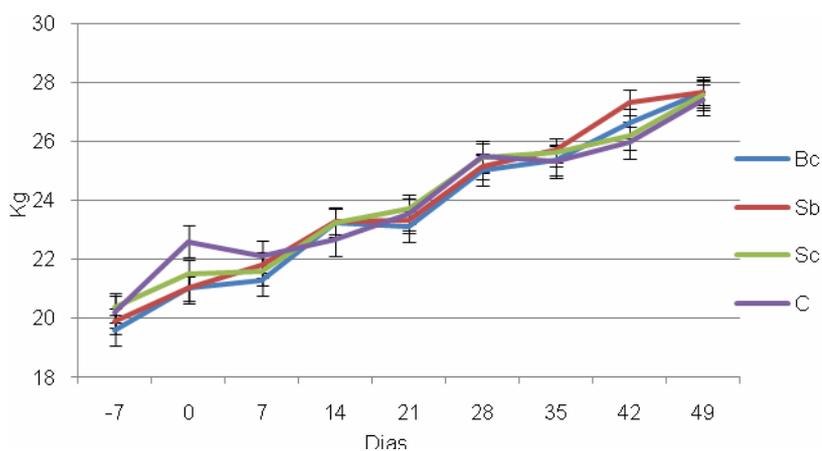


Figura 10 - Peso médio de ovinos experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus* e suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C). Dia -7= adição dos probióticos a dieta e dia 0 = infecção experimental.

Discussão

Embora exista interesse crescente pelo uso de probióticos adicionados à ração de ovinos, ainda são reduzidas as pesquisas avaliando bactérias e leveduras nesta espécie animal. No presente estudo foi possível observar que ovinos que receberam o probiótico *S. cerevisiae* apresentaram redução da carga parasitária, enquanto que os suplementados com *S. boulardii* e *B. cereus* var. Toyoi não demonstraram efeito positivo. Atribuiu-se a redução de *H. contortus* nos ovinos que receberam *S. cerevisiae* à presença significativamente maior de eosinófilos na mucosa abomasal.

A resposta tecidual local do abomaso com aporte significativamente maior de eosinófilos é um dos mecanismos de expulsão de helmintos bem descritos (MEEUSEN; BALIC; BOWLES, 2005; ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Estas células estão presentes já no início do estabelecimento da infecção; BALIC; BOWLES; MEEUSEN (2002) evidenciaram a presença de eosinófilos locais nos primeiros três dias após re-infecção, e concluíram que este fator é determinante para o início da expulsão dos nematódeos. Resultados semelhantes aos do presente estudo também foram observados por Gill et al. (2000), quando encontraram uma alta densidade de eosinófilos na mucosa abomasal em cordeiros no 28º dia após infecção com *H. contortus*.

Ainda que a carga parasitária dos animais que receberam *S. cerevisiae* tenha sido significativamente menor, este probiótico não interferiu no índice de fecundidade e no tamanho das fêmeas de *H. contortus*, indicando que as larvas infectantes que conseguiram se estabelecer seguiram seu desenvolvimento natural, portanto, é possível que este probiótico tenha sua ação na mobilização de eosinófilos que atuam dificultando apenas o estabelecimento das larvas. Esse fato fortalece a hipótese da inibição da infecção, como acontece em ovinos naturalmente resistentes, que através da pronunciada mobilização celular, principalmente através de maior aporte de eosinófilos e mastócitos teciduais têm a carga parasitária reduzida (SHAKYA; MILLER; HOROHOV, 2009).

Neste modelo experimental não foi possível caracterizar e enumerar a eosinofilia na fase primária pós-infecção, tampouco o momento da expulsão das L3 de *H. contortus*. Porém, fica claro que a eosinofilia na mucosa foi persistente até o 49º dia pós-infecção, conforme observado nas avaliações histológicas. Diferenças no incremento do número de leucócitos totais e aumento da eosinofilia sistêmica não ocorreram nos tratamentos avaliados, tampouco ao longo dos dias de tratamento ($p>0.05$). Assim como neste estudo, Rowe et al. (2008) sugeriram que não houve modulação característica para resposta celular, os autores também não identificaram correlação positiva com células leucocitárias periféricas e o parasitismo por *Haemonchus* sp. Os resultados do presente estudo sugerem que a resposta local modulada pela via Th2 com aumento dos eosinófilos parece ter sido a mais importante, o que confirma que a resposta imune que caracteriza proteção contra parasitos nematódeos é do tipo Th2, modulada por citocinas como a IL-4 e IL-5 promovem eosinofilia (GILL; WATSON; BRANDON, 1993; HARRISON et al., 2003).

Em todos os grupos foi observada uma queda nos valores de volume globular e hemoglobina no mesmo período em que a produção de ovos aumentava (28º dia), fato este atribuído à maior necessidade do parasito em consumir sangue para produção de ovos.

Durante todo período experimental os ovinos tiveram acesso à dieta balanceada e com teor protéico ajustado à sua fase de desenvolvimento, o que pode ter minimizado os efeitos do parasitismo nos valores bioquímicos e hematopoiéticos, condição também observada por Louvandini et al. (2002).

Os probióticos podem interferir na resposta frente à infecção por *H. contortus*, visto que melhoram a digestibilidade e equilíbrio do sistema digestório, promovendo

maior aporte de nutrientes, e assim oferecem uma melhor eficiência do aproveitamento protéico e metabólico pelos animais. Além disso, as leveduras vivas, *S. cerevisiae*, auxiliam na manutenção do pH no rúmen via estímulo de bactérias utilizadoras de lactato e contribuem com constante suprimento de nutrientes para a população bacteriana no intestino (ROSE, 1997). A levedura é capaz de estimular a resposta imune enquanto viável no trato digestório e parte da parede celular dos microrganismos inviáveis promove efeitos benéficos através do estímulo da resposta inflamatória, a partir de um específico receptor glucano, que está presente em leucócitos do sangue periférico e macrófagos extravasculares. A ativação deste receptor estimula a ampliação das defesas do hospedeiro, que envolve uma cascata de interações mediadas, principalmente por macrófagos e seus derivados, tais como citocinas (CZOP, 1986).

Sobre os efeitos no desempenho ponderal dos animais, não foi observado melhora dos ovinos de todos os grupos. Concordando com Arcos-García et al. (2000), que ao avaliarem o efeito de duas cepas comerciais de leveduras vivas na dieta de cordeiros Suffolk com 30kg de peso vivo, na dose de 1g dia⁻¹ de *S. cerevisiae*, não encontraram melhorias no desempenho animal, apesar de constatarem alterações benéficas no pH ruminal.

Conclusões

O uso de *S. cerevisiae* alterou o perfil da resposta celular por eosinófilos na mucosa abomasal, que interferiram no estabelecimento do *H. contortus* no abomaso dos ovinos suplementados com este probiótico, mostrando ser promissor para suplementação de ovinos, como uma medida alternativa de controle deste nematódeo. Os probióticos *S. boullardi* e *B. cereus* var. Toyoi nas condições estudadas não mostraram efeitos benéficos no controle da infecção por *H. contortus*.

Referências

ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v.59, p.622–625, 2010.

ARCOS-GARCÍA, J. L.; CASTREJÓN, F. A.; MENDOZA, G. D.; PÉREZ-GAVILÁN, E. P. Effect of two commercial yeast cultures with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. **Production Science, Livestock**, v.63(2), p.153-157, 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. T. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. **Parasite Immunology**, n.28, p.107-115, 2006.
- COLDITZ, I. G.; WATSON, D. L.; GRAY, G. D.; EADY, S. J. Some relationships between age, immune responsiveness and resistance to parasites in ruminants. **International Journal of Parasitology**, v.26, (8-9), p.869- 877, 1996.
- COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v.16, n.3, p.213-219, 2005.
- CZOP, J. K. Characterization of a phagocytic receptor for Beta-glucan on macrophages cultured from murine bone marrow. **Pathology and Immunopathology Research**, v.5, p.286-296, 1986.
- ECHEVARRIA, F.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.62, p.199-206, 1996.
- GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.15-28, 2010.
- GETACHEW, T.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. **Parasite**, v.14, p.3-14, 2007.
- GILL, H. S.; WATSON, D. L.; BRANDON, M. R. Monoclonal antibody to CD4 positive T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. **Immunology**, v.78(1), p.43-49, 1993.
- 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. Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.17(5), p.755-773, 2003.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.
- HARRISON, G. B. L.; PULFORD, H. D.; HEIN, W. R., BARBER, T. K.; SHAW, R. J.; MCNEILL, M.; WAKEFIELD, S. T. J.; SHOEMAKER, C. B. Immune rejection of

Trichostrongylus colubriformis in sheep; a possible role for intestinal mucus antibody against an L3-specific surface antigen. **Parasite Immunology**, v.25, p.45–53, 2003.

HUNTLEY, J. F.; NEWLANDS, G. F. J.; JACKSON, F.; MILLER, H. R. P. The influence of challenge dose, duration of immunity, or steroid treatment on mucosal mast cells and the distribution of sheep mast cell proteinase in *Haemonchus*-infected sheep. **Parasite Immunology**, v.14, p.429-440, 1992.

KAHN, L. P.; KNOX, M. R.; GRAY, G. D.; LEA, J. M.; WALKDEN-BROWN, S. W. Enhancing immunity to parasites in single-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. **Veterinary Parasitology**, v.112, p.211-225, 2003.

KEMP, J. M.; ROBINSON, N. A.; MEEUSEN, E. N. T.; PIEDRAFITA, D. M. The relationship between the rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues in immune sheep. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.1589-1594, 2009.

KLOOSTERMAN, A.; ALBERS, G. A. A.; VAN DEN BRINK, R. Counting eggs in utero of individual female nematode worms. **Veterinary Parasitology**, v.4, p.353–368, 1978.

LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A. L.; COOP, R. L.; Mc MANUS, C. M.; GENNARI, S. M. Effect of dietary protein intake on calf resilience to *Haemonchus placei* infection. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39(5), p.227-232, 2002.

MARTIN, F. P. J.; VERDU, E. F.; WANG, Y.; DUMAS, M. E.; YAP, I. K. S.; CLOAREC, O.; BERGONZELLI, G. E.; THEULAZ, I. C.; KOCHHAR, S.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; COLLINS, S. M.; NICHOLSON, J. K. Transgenomic metabolic interactions in a mouse disease model: interactions of *Trichinella spiralis* infection with dietary *Lactobacillus paracasei* supplementation. **Journal of Proteome Research**, v.5, p.2185-2193, 2006.

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

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for eggs-counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1(1), p.99-102, 1950.

ROOS, T. B.; TABELLEÃO, V. C.; DÜMMER, L. A.; SCHWEGLER, E.; GOULART, M. A.; MOURA, S. V.; CORRÊA, M. N.; LEITE, F. P. L.; GIL-TURNES, C. Effect of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v.21(2), p.113–118, 2010.

ROSE, A. H. Yeast, a microorganism for all species: a theoretical look at its mode of action. In: LYONS, T.P. (Ed.). **Biotechnology in the feed industry**, Nicholasville: Alltech Technical, p.113-118, 1997.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annual Review Immunology**, v. 24, p.147–174, 2006.

ROWE, A.; McMASTER, K.; EMERY, D.; SANGSTER, N., *Haemonchus contortus* infection in sheep: parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. **Veterinary Parasitology**, v.153(3-4), p.285-293, 2008.

S.A.S. Guide for personal computers. 6th ed. S.A.S. Institute Inc., Cary, NC, USA. 1998.

SHAKYA, K. P.; MILLER, J. E.; HOROHOV, D. W. 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.

SOLANO-AGUILAR, G.; DAWSON, H. D.; LEDBETTER, T.; SHEA DONOHUE, P. T.; SCHOENE, N. W.; CALL, J.; BESHAN, E.; HARE Jr, W. R.; URBAN Jr, J. F. The effect of human-derived probiotic bacteria on the intestinal function of pigs. **Veterinary Parasitology**, v.125(1-2), p.47-61, 2004.

STRAIN, S. A.; STEAR, M. J. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v.23, p.527-531, 2001.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; JACOBS, D. E.; AGUILAR-CABALLERO, A.; SANDOVAL-CASTRO, C.; MAY-MARTINEZA, M.; COB-GALERA, L. A. The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. **Veterinary Parasitology**, v.124(3-4), p.217-238, 2004.

WALLER, P. J.; RUDBY-MARTIN, L.; LJUNGSTROM, B. L.; RYDZIK, A. the epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. **Veterinary Parasitology**, v.122, p.207–220, 2004.

CAPÍTULO 2

Efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* na modulação da resposta imune de ovinos infectados com *Haemonchus contortus*

Tiago Gallina¹, Talita B. Roos¹, Fábio P. L. Leite², Maria E. A. Berne².

1 Programa de Pós Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas-Brasil, Faculdade de Veterinária, Campus Universitário s/n, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

2 Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Resumo

Haemonchus contortus é o parasito responsável pelos maiores prejuízos à produção ovina no mundo inteiro. Várias alternativas para tornar os métodos de controle mais eficientes e viáveis estão sendo estudadas. A suplementação de animais com probióticos tem mostrado resultados promissores no controle de algumas doenças, entretanto, com parasitos e animais de produção os estudos são restritos. A imunomodulação dos probióticos tem sido observada na proliferação de leucócitos, na produção de anticorpos, no aumento da atividade fagocitária e ainda da expressão de citocinas. Nesse estudo, ovinos infectados por *H. contortus* e suplementados com probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* foram avaliados quanto à modulação da resposta imune através do perfil da expressão de citocinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- γ e interferência na carga parasitária e de eosinófilos na mucosa abomasal. Os animais suplementados com *S. cerevisiae* apresentaram níveis maiores que 20x em relação à expressão de IL-4 e menor que 1,5x quanto aos níveis de IFN- γ em relação ao dia 0, sugerindo que a redução da carga parasitária é resultado da maior mobilização eosinofílica e predominância da resposta imune tipo Th-2.

Palavras chave: Probióticos. *Haemonchus contortus*. Ovinos. Resposta imune.

Introdução

O controle das infecções por nematódeos gastrintestinais constitui um grande desafio. Embora existam várias alternativas, isoladamente são ineficientes. A busca por métodos de controle, sem o uso exclusivo de quimioterápicos, portanto sem deixar resíduos nos alimentos, segue como uma tendência mundial. Na ovinocultura, os nematódeos gastrintestinais, em especial destaque o *H. contortus* podem inviabilizar essa prática produtiva (WALLER et al., 2004), se não for associado ao uso de anti-helmínticos. Contudo, nas últimas décadas, a eficácia das drogas anti-

helmínticas tem sido reduzida com a expansão de populações de parasitos resistentes aos fármacos disponíveis (ALMEIDA et al., 2010).

Apesar dos efeitos patogênicos que os parasitos provocam, animais em boa condição de saúde podem não apresentar sinais de parasitismo. Essa condição acontece devido à capacidade do sistema imune do hospedeiro em limitar a população de parasitos em níveis aceitáveis. A imunidade de ovinos e sua relação as parasitoses têm sido estudadas há décadas. Verifica-se estreita relação dos animais naturalmente resistentes e os mecanismos de controle natural da carga parasitária, o que permite que animais sejam produtivos com menor intensidade de parasitismo (AMARANTE et al. 1999, 2004).

A resposta imune é dependente do padrão de expressão gênica de citocinas induzidas durante a infecção (SHER et al., 1992; URBAN et al., 1992). Essa resposta tem impacto no nível de infecção, uma vez que a expulsão de helmintos é acompanhada por mobilização de eosinófilos e mastócitos na mucosa, elevados níveis de IgE, IgG1 e IgG4 parasito-específicos (ABBAS et al., 1996; MEEUSEN; BALIC; BOWLES, 2005; BALIC; CUNNINGHAM; MEEUSEN, 2006). Na resposta a presença de helmintos no lúmen gastrintestinal observa-se uma ativação de linfócitos que são capazes de produzir interleucinas (IL-4, IL5, IL13) e IFN- γ , e promover o recrutamento de eosinófilos e proliferação de mastócitos na mucosa abomasal (JASMER; LAHMERS; BROWN, 2007).

Compreender esses mecanismos de modulação e correlacionar a novas tendências, como o uso de probióticos, se faz necessário para a validação desses produtos como auxiliares no controle de doenças.

Probióticos são microrganismos vivos que, se administrados em quantidades adequadas, promovem benefícios à saúde do homem e dos animais. Alguns dos efeitos descritos dos probióticos são: proliferação de linfócitos, aumento na produção de anticorpos, aumento da atividade fagocítica e indução na produção de citocinas (HOLZAPFEL et al., 2001, ROOS et al., 2010). Alguns dos microrganismos conhecidos com efeito probiótico são *B. cereus* var. *Toyoi*, *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, que por sua resistência às variações de temperatura, podem ser fornecidos junto ao alimento e assim serem avaliados quanto aos benefícios de sua utilização em animais (COPPOLA, CONCEIÇÃO; GIL-TURNES, 2005; ROOS et al., 2010). Neste estudo buscou-se avaliar o efeito do uso destes probióticos na dieta de ovinos infectados por *H. contortus* nos aspectos da modulação da resposta imune

através da expressão de citocinas e sua associação com a carga parasitária e a presença de eosinófilos no abomaso.

Materiais e métodos

Local de estudo e animais experimentais

A pesquisa foi conduzida na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Brasil. Durante todo período experimental os animais foram mantidos estabulados e em condições aprovadas pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (COCEPE Nº 5.05.02.123).

Trinta e dois ovinos machos de 4 a 5 meses de idade, da raça Texel, foram alocados em quatro grupos de oito animais cada, divididos em lotes de acordo com o peso vivo. O período experimental foi de 64 dias, sendo os primeiros sete dias para adaptação dos animais ao ambiente e a dieta (1% do peso vivo em matéria seca de ração), sete dias para adaptação aos probióticos e os restantes 49 dias decorridos após a infecção experimental com 5000 L3 de *H. contortus*.

Probióticos

Os probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* foram produzidos no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP), do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. A dose de probiótico foi individualmente fornecida por via oral, sendo equivalente a 1×10^6 UFC gr^{-1} de ração, enquanto que o grupo controle recebeu somente placebo.

Infecção experimental com *Haemonchus contortus*

Para obtenção das larvas de terceiro estágio, 100 fêmeas de *H. contortus* obtidas de necropsia de ovinos foram maceradas e dispostas em recipiente com serragem por sete dias (27° C e 85% UR). Três ovinos adultos livres da infecção por nematódeos gastrintestinais, mantidos estabulados, foram infectados com 10000 L3, por animal. Após 28 dias, as fezes desses animais foram recolhidas com bolsas coletoras durante três dias. Coproculturas pela técnica de Roberts & O'Sullivan (1950) foram realizadas para obtenção das larvas a partir deste material. Quinze

dias após a estabulação dos 32 cordeiros, \pm 5000 L₃ de *H. contortus* foram inoculadas por via oral em cada ovino dos quatro grupos.

Parâmetros parasitológicos e eosinófilos abomasais

No 49º dia após a infecção experimental, todos os animais foram eutanasiados para quantificação dos nematódeos e quantificação de eosinófilos na mucosa abomasal. Para contagem de eosinófilos as amostras da área fúndica do abomaso foram seccionadas (2cm²), fixadas em formol a 10% por 24h e incluídos em parafina. Os cortes de 5µm foram corados pela hematoxilina-eosina para posterior contagem. A metodologia para obtenção do número de eosinófilos baseou-se na quantificação do total destas células obtidas em 15 microfotografias de campos aleatórios focalizados desde a camada muscular até a superfície da mucosa, em aumento de 400X, correspondentes a uma área de 0,04mm² (Sistema Axio-Vision 3.1). Foi realizada a contagem individual de cada animal e os resultados expressos como média do número de eosinófilos/mm² de mucosa.

Avaliação da imunidade através dos padrões de citocinas

Amostras de sangue (10mL) foram colhidas de todos animais nos dias 0 e 49 pós infecção, através da venocentese da jugular e armazenados em tubo estéril contendo 10% de citrato de sódio a 4%. O sangue foi coletado para realização de cultivo de leucócitos. As amostras foram centrifugadas a 250g por 20min a 18-20°C para separação das células, os leucócitos foram transferidos para outro tubo estéril e adicionados de 10mL de solução de lise (cloreto de amônia a 4%) por 5min em temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 220g por 10min e o sobrenadante descartado, as células foram suspensas em solução balanceada de HANK'S (Cultilab, Campinas, Brasil), novamente centrifugadas e suspensas em RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB). Foram semeadas em uma concentração de 2x10⁶ células viáveis por cavidade em placas de cultivo celular de 24 cavidades e incubadas por 24h em uma atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após foram retirados os sobrenadantes dos cultivos e as células foram estimuladas adicionando 300µL de suspensão contendo HcSo (2µg/µL) mais 700µL de meio RPMI 1640 com 5% de SFB, ou somente com meio utilizado como controle de célula. Após 24h o sobrenadante foi novamente retirado e as células ressuspensas em Trizol e armazenadas a -70°C.

O RNA total foi extraído pelo método do TRIZOL (Invitrogen) de acordo com o protocolo do produto. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 5µg de RNA total em uma reação de 25µl contendo 0,5µl (150ng) de *random primers* (Invitrogen), 1µl de *desoxynucleoside triphosphates* (dNTP - 10mM), 1 x *First Strand buffer* (New England Biolabs), 0,1M DDT, 40U of RNaseOUT (Invitrogen) e 50U of M-MuLV Transcriptase reversa (New England Biolabs), de acordo com a metodologia descrita (ULETT; KETHEESAN; HIRST, 2000). Após, as amostras foram incubadas por 10min a 25 °C, 50min a 42°C, 15min a 70°C, no termo ciclador (Eppendorf Mastercycler Gradient). O cDNA resultante foi estocado a -20°C.

Reações de PCR foram realizadas com 3µL de cDNA, 200µM de dNTPs, 1 x *buffer*, 1,5U de Taq DNA polymerase (Invitrogen), 1µM de cada primer, MgCl₂ (2mM para GAPDH, IL-4, IL-10 ou IL-17 e 1,5mM para IFN-γ), RNase free water (Gibco-BRL) para um volume final de 50µl. Os parâmetros do termociclador foram os seguintes: 95°C por 2min, 30 ciclos de 94°C por 50s, 58°C por 50s e 72°C por 1min, com uma temperatura final de extensão de 72°C por 7min. Os oligo iniciadores (GPDH, IL-4, IFN-γ) utilizados para esse experimento foram descritos na literatura (BUDHIA et al., 2006) e a IL-10 e IL-17 construídos e sintetizados por MWG-Biotech Inc. (USA). São eles:

GAPDH anterógrado 5' –CGGGAAGCTGTGGCGTGATG;

GAPDH retrógrado 5' –CTTGGCAGGTTTCTCCAGG;

IFN-γ anterógrado 5'-GAACGGCAGCTCTGAGAAAC;

IFN-γ retrógrado 5'-GCAGCCAGGAGAACCATTAC;

IL-10 anterógrado 5'-CTGTTGCCTGGTCTTCCTGG;

IL-10 retrógrado 5'-CATTTCGACAAGGCTTGGC;

IL-12 anterógrado 5'-TCAAACCAGACCCACCCAAG;

IL-12 retrógrado 5'-CACAGATGCCCATTCACTCC;

IL-4 anterógrado 5'-ATGTACCAGCCACTTCGTCC;

IL-4 retrógrado 5'-GAACAGGTCCTTGCCAG;

Reações de PCR utilizando oligômero iniciador de β-actina e sem cDNA foram realizadas como controle. Produtos do PCR foram visualizados sobre luz UV após eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio. A análise dos dados foi realizada utilizando Scientific Imaging System *software* (Kodak). A análise dos géis foi realizada através do *software* TotalLab TL 100 v. 2006. O *software* transforma as bandas para pixel. Todos valores em pixel de GAPDH foram

considerados normalizadores do restante das citocinas expressas, para assim quantificar as expressões.

Análise estatística

No modelo estatístico utilizado foram considerados os tratamentos como variáveis independentes e como variáveis dependentes: carga parasitária e eosinófilos de mucosa. A carga parasitária e o número de eosinófilos de mucosa foram analisadas através de variância one-way Anova. As diferenças entre os tratamentos foram verificadas pelo teste de Tukey e consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Resultados e discussão

Os resultados referentes à expressão das citocinas determinadas através da quantidade de mRNA, obtidos das análises das amostras do dia 0 (sem infecção parasitária) e o 49º dia após infecção são apresentados nas figuras 1 e 2. E os resultados referentes à carga parasitária e número de eosinófilos na mucosa abomasal encontram-se na tabela 1.

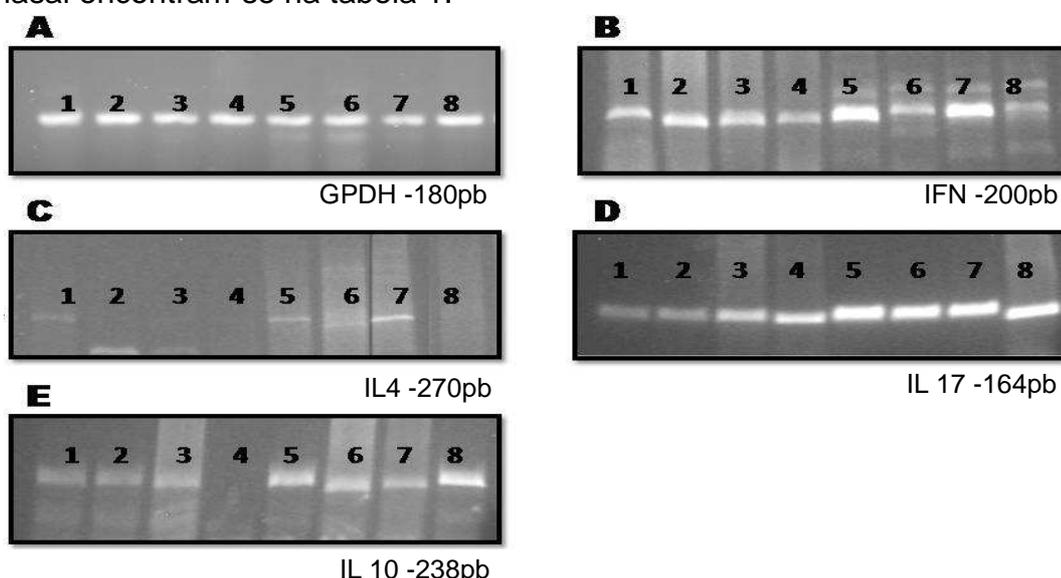


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do mRNA de leucócitos periféricos de ovinos experimentalmente infectados com *H. contortus*. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR resultantes da amplificação de (A) GPDH, (B) IFN- γ , (C) IL-4, (D) IL-17 e (E) IL-10. As bandas 1 e 5 representam grupo *B. cereus* var Toyoi, 2 e 6 grupo *S. boulardii*, 3 e 7 grupo *S. cerevisiae* e 4 e 8 grupo controle nos dias 0 e 49, respectivamente.

Tabela 1. Médias de *Haemonchus contortus* e eosinófilos da mucosa abomasal (\pm DP) nos grupos de ovinos suplementados durante 49 dias com diferentes probióticos e seus respectivos valores de p.

Tratamentos	Bc	Sb	Sc	Controle	p
Hc adultos	1492 ^a \pm 174.2	1447 ^a \pm 202.8	709 ^b \pm 223.1	1691 ^a \pm 299.2	0,0281
Eosinófilos/mm ²	661 ^a \pm 57.8	704 ^a \pm 78.0	1644 ^b \pm 139.3	668 ^a \pm 62.8	< 0,01

Hc= *Haemonchus contortus*, Bc= *Bacillus cereus* var. Toyoi; Sb= *Saccharomyces boulardii* e Sc= *S. cerevisiae* Letras diferenças na mesma linha indicam valores com diferença estatística.

Os animais suplementados *S. cerevisiae* apresentaram carga parasitária inferior aos demais grupos (41,92%) e a presença de eosinófilos na mucosa foi superior (40,6%) em relação aos demais grupos. A relação entre eosinófilos e carga parasitária em todos os grupos foi inversamente proporcional, deixando claro esse efeito como positivo no grupo Sc. A resposta tecidual local do abomaso com aporte significativamente maior de eosinófilos é um dos mecanismos de expulsão de helmintos bem descrito na literatura (MEEUSEN; BALIC; BOWLES, 2005; ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Estas células estão presentes já no início do estabelecimento da infecção (BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2002).

Pode-se observar que animais suplementados com *S. boulardii* (Sb) e *S. cerevisiae* (Sc) apresentaram maiores níveis de IL-4, 15 vezes superior, após as infecções experimentais, demonstrando estar envolvido na imunomodulação da resposta frente ao estímulo por *H. contortus*, comparados ao tratamento com *B. cereus* var. Toyoi (Bc) e o controle. Esses resultados sugerem ainda, que a modulação na expressão de IL-4 pode ter interferido como antagonista sobre o IFN- γ , que teve discreta elevação nos níveis de expressão nos grupo tratado com *S. boulardii* e *S. cerevisiae*. Essa relação de antagonismo é descrita por Steinman (2007).

O uso do probiótico *S. cerevisiae* proporcionou a maior expressão da IL-4, citocina que está presente na resposta imune do tipo Th2 e influencia no maior aporte celular na mucosa, uma vez que essa interleucina é fator importante associado à resposta mediada por IgE e eosinofilia (BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos por Else et al. (1994) que ao estudarem modelos murinos susceptíveis, com indução de IL-4, tiveram uma

modulação característica de resposta Th-2, capaz de eliminar a carga parasitária de *Trichuris muris*.

A resposta associada à IL-17 tem sido relacionada com doenças auto imunes e do tipo alérgica (TANABE; KINUTA; SAITO, 2008), o que nesse estudo, apesar da presença elevada de eosinófilos (grupo Sc), características de algumas doenças alérgicas, os níveis de IL-17 foram baixos. À esses menores níveis de expressão desta interleucina pode-se pressupor a interferência de IL-4, principalmente no grupo Sc, uma vez que a IL-4 é descrita como antagônica a IL-17 (STEINMAN, 2007). O mesmo autor descreveu que a resposta Th-17 é inibida enquanto a resposta Th-1 e Th-2, mediadas por IFN- γ ou IL-4 e IL-5 respectivamente, estão presentes.

A IL-10 apresentou aumento em sua expressão apenas no grupo controle, demonstrando o efeito da resposta imune inespecífica, após o primeiro contato com o antígeno. A IL-10 é em geral produzida por células Threg e tem como papel principal o controle da amplitude da resposta imune (MATSUZAKI; CHIN, 2000). Neste caso, parece não ter sido modificada em decorrência da presença dos probióticos, apenas sofrendo o efeito do estímulo do antígeno no hospedeiro.

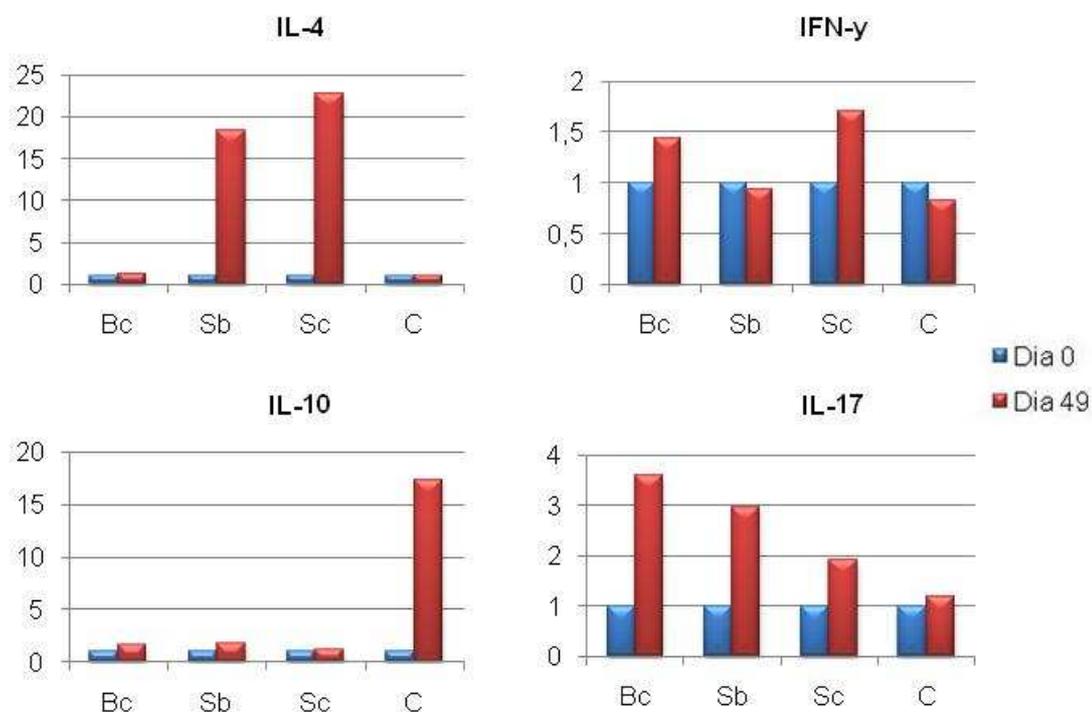


Figura 2: Modulação na expressão de citocinas produzidas por leucócitos periféricos estimulados com *Haemonchus contortus*. Dia 0, sem estímulo e dia 49, após a infecção, nos ovinos suplementados com *Bacillus cereus* var. Toyoi (Bc), *Saccharomyces boulardii* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) e controle (C).

Quando estudada a expressão das citocinas nos animais suplementados com os probióticos foi observado que a modulação na resposta imune não ocorre da mesma forma. Isto é compreensível, pois são microrganismos diferentes que apresentam estruturas distintas, podendo apresentar diferentes mecanismos na modulação da resposta imune (VINDEROLA; MEDICI; PERDIGÓN, 2004; ROOS et al., 2010). Também cabe ressaltar que as duas leveduras utilizadas como probióticos, *S. boulardii* e *S. cerevisiae* mostraram resultados semelhantes em relação às citocinas estudadas e distintos em relação à carga parasitária e número de eosinófilos, demonstrando que apesar de pertencerem ao mesmo gênero, por possuírem estruturas de parede celular distintas, podem interferir de diferentes formas no estímulo celular, como evidenciado na carga parasitária dos animais desafiados com *H. contortus* e suplementados com *S. cerevisiae*.

Conclusões

Analisando os dados obtidos pela expressão dessas citocinas em leucócitos periféricos, pode-se sugerir que houve efeito modulador pelos probióticos *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, demonstrado por maior nível de expressão de IL-4, caracterizando uma resposta Th2, que foi evidenciada pela redução da carga parasitária somente no grupo tratado com *S. cerevisiae*.

Referências

- ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v.383, p.787–793, 1996.
- ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v.59, p.622–625, 2010.
- AMARANTE, A. F. T.; CRAIG, T. M.; RAMSEY, W. S.; DAVIS, S. K.; BAZER, F. W. Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbred lambs. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.311-324, 1999.
- AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.91-106, 2004.

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. T. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. **Parasite Immunology**, n.28, p.107-115, 2006.

BUDHIA, S.; HARING, L. F.; McCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. A. Quantification of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. **Journal Immunological Methods**, v.309, p.160-172, 2006.

COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v.16(3), p.213-219, 2005.

ELSE, K. J.; FINKELMAN, F. D.; MALISZEWSKI, C. R.; GRENCIS, R. K. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. **Journal of Experimental Medicine**, v.179, p.347-351, 1994.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73(2), p.365-373, 2001.

JASMER, D. P.; LAHMERS, K. K.; BROWN, W. C. *Haemonchus contortus* intestine: a prominent source of mucosal antigens. **Parasite Immunology**, v.29, p.139-151, 2007.

MATSUZAKI, T.; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p. 67-73, 2000.

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.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for eggs-counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1(1), p.99-102, 1950.

ROOS, T. B.; TABELÃO, V. C.; DÜMMER, L. A.; SCHWEGLER, E.; GOULART, M. A.; MOURA, S. V.; CORRÊA, M. N.; LEITE, F. P. L.; GIL-TURNES, C. Effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v.21(2), p.113-118, 2010.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annual Review Immunology**, v.24, p.147-174, 2006.

SHER, A.; GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; CLERICI, M.; KULLBERG, M.; PEARCE, E. J.; BERZOFSKY, J. A.; MOSMANN, T. R.; JAMES, S. L.; MORSE, H. C. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immunology Review**, v.127, p.183-204, 1992.

STEINMAN, L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nature Medicine**, v.13(2), p.139-145, 2007.

TANABE, S.; KINUTA, Y.; SAITO, Y. *Bifidobacterium infantis* suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. **International Journal of Molecular Medicine**, v.22, p.181-185, 2008.

ULETT, G. C.; KETHEESAN, N.; HIRST, R. G. Cytokine gene expression in innately susceptible Balb/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. **Infection and Immunity**, v.68(4), p.2034-2042, 2000.

URBAN, J. F.; MADDEN, K. B.; SVETICA, A.; CHEEVER, A.; TROTTA, P. P.; GAUSE, W. C.; KATONA, I. M.; FINKELMAN, F. D. The Importance of Th2 Cytokines in Protective Immunity to Nematodes. **Immunological Reviews**, v.127, p.205-220, 1992.

VINDEROLA, C. G.; MEDICI, M.; PERDIGÓN, G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.230-243, 2004.

WALLER, P. J.; RUDBY-MARTIN, L.; LJUNGSTROM, B. L.; RYDZIK, A. The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. **Veterinary Parasitology**, v.122, p.207-220, 2004.

CAPÍTULO 3

Influência da suplementação do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* em ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais

Tiago Gallina¹, Maria A. M. P. Silva², Felipe G. Pappen¹, Emília W. Wendt², Luciana L. Dias de Castro², Talita B. Roos¹, Fábio P. L. Leite², Maria E. A. Berne²

1 Programa de Pós Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas-Brasil, Faculdade de Veterinária, Campus Universitário s/n, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

2 Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Resumo

Os prejuízos causados por nematódeos gastrintestinais de ovinos devem-se aos efeitos agudos da doença que resultam em morte e, principalmente, aos efeitos crônicos, que levam a um menor desenvolvimento corporal e redução na produção de carne e lã. O controle desses parasitos em ruminantes baseia-se, principalmente no uso de anti-helmínticos. Porém, a resistência dos parasitos aos anti-helmínticos representa um grave problema para o controle das helmintoses gastrintestinais, constituindo-se no principal agravo sanitário da ovinocultura. Neste estudo buscou-se avaliar o efeito do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* como uma alternativa auxiliar no controle das parasitoses gastrintestinais de ovinos em condições de campo. Durante um ano, quarenta cordeiros machos da raça Ideal foram alocados em dois grupos de 20 animais, em dois piquetes de quatro hectares com contaminação natural por nematódeos gastrintestinais. *S. cerevisiae* foi fornecido na dose diária de 1×10^6 UFC gr^{-1} de ração ao grupo tratamento. Análise da condição corporal e pesagem foram realizadas mensalmente. Amostras de fezes e sangue foram coletadas quinzenalmente, durante o período de um ano. Os animais foram abatidos no fim do experimento para recuperação da carga parasitária. Não houve diferenças estatísticas no desempenho ponderal, valores hematológicos, valores de OPG. Porém, houve importante diferença na carga parasitária dos nematódeos gástricos, principalmente *Haemonchus* sp. que teve redução da carga parasitária em 72% ($p < 0.01$) no grupo tratado com *S. cerevisiae*.

Palavras-chave: *Haemonchus contortus*. *Saccharomyces cerevisiae*. Probióticos.

Introdução

Haemonchus contortus é considerado o parasito mais patogênico para ovinos em regiões subtropicais e tropicais no mundo inteiro (FABIYI, 1987; BATH; VAN WYK, 2001). As infecções são caracterizadas por gastropatias intensas. Devido ao seu hábito alimentar hematófago, causa anemia, que pode levar o ovino à morte.

Além disso, as consequências relacionadas à hipoproteïnemia levam os animais à sérias perdas de desempenho produtivo. Outros nematódeos gastrintestinais, como: *Ostertagia* sp., *Trichostrongylus* sp, *Cooperia* sp., *Oesophagostomum* sp., *Strongyloides* sp. e *Nematodirus* sp. também afetam o desempenho dos ovinos, e podem levar os animais à perdas significativas na produtividade. Ademais, com os crescentes relatos de resistência anti-helmíntica, os problemas tendem a ficar mais graves se novas alternativas para controle não forem implementadas.

A necessidade da oferta de alimentos é crescente no mundo inteiro devido ao aumento da população humana nas últimas décadas. Dentre as possibilidades para suprir parte dessa demanda, a exploração de pequenos ruminantes, como fonte protéica, se mostra como alternativa viável, principalmente nas pequenas propriedades (KNOX; TORRES-ACOSTA; AGUILAR-CABALLERO, 2006). Aliado a isso, o consumidor, cada dia mais exigente, procura carne e leite com menor risco de contaminação por resíduos químicos, o que tem incentivado a busca por meios alternativos na prevenção das enfermidades, principalmente no que se trata quanto ao uso de antibióticos e anti-helmínticos. Neste aspecto ocorre a expansão do mercado de produtos orgânicos na Europa (LAMPKIN, 2000) e esta é uma tendência mundial em franco crescimento.

Existem fatores específicos que estão correlacionados à resistência dos animais frente as parasitoses. Dentre estes, a nutrição tem um efeito importante sobre a resistência e resiliência ao *H. contortus* e nas consequências da infecção (COOP; HOLMES, 1996; HOUTERT; SYKES, 1996; CAMARGO et al., 2010). Suplementação alimentar, particularmente com adição de proteína, pode ajudar a resistência à infecção por nematódeos durante o tempo em que os recursos do metabolismo da dieta estão sendo direcionados para controlar os efeitos fisiopatológicos da infecção (KNOX; TORRES-ACOSTA; AGUILAR-CABALLERO, 2006). A suplementação protéica está associada à redução da contagem de ovos de nematódeos, compensação da hipoproteïnemia causada pela inapetência decorrente das infecções parasitárias e também melhorando as condições hematológicas dos animais (LOUVANDINI et al., 2002). Portanto, aos fatores nutricionais estão diretamente associados à imunidade, que atuará diretamente sobre a infecção parasitária, através da hiperplasia das células da mucosa do abomaso com produção de muco, da eosinofilia tecidual, da produção de anticorpos específicos e consequentemente a expulsão dos nematódeos. Também, poderá acarretar

alterações na morfologia dos parasitos e redução na fecundidade das fêmeas (BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2000; GONZÁLEZ et al., 2008). Já a resistência contra os estádios larvais se manifesta pela eliminação de larvas infectantes ingeridas (L3) ou pela inibição do desenvolvimento das mesmas (hipobiose) (BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2000).

Alternativas que contribuam para minimizar os prejuízos causados por patógenos têm sido amplamente estudadas. Como é relatado em relação ao uso de probióticos; que estão associados com melhora no desempenho metabólico de ruminantes, auxiliando na digestão dos alimentos, na síntese de nutrientes, na manutenção do pH e na integridade do trato digestório, através da competição com bactérias patogênicas por sítios de ligação e na imunoestimulação (COPPOLA; GIL TURNES, 2004; ROOS et al., 2010). Neste contexto, buscou-se verificar o efeito do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* sobre ovinos infectados naturalmente por nematódeos gastrintestinais.

Materiais e métodos

Quarenta ovinos machos da raça Ideal, de aproximadamente quatro meses de idade foram divididos em dois grupos de 20 animais, de acordo com o resultado da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de três exames (GORDON; WHITLOCK, 1939) realizados em dias alternados. Esses animais permaneceram durante 14 meses em uma área de oito hectares de pastagem nativa (Capão do Leão – RS, 31°45'30"S e 52°30'33"W), que após formação dos grupos foi dividida em dois poteiros de quatro hectares.

Um grupo recebeu o probiótico *S. cerevisiae* (Sc) na concentração de 1×10^6 UFC/g de ração, diariamente, durante um ano, e o outro grupo, Controle (C), recebeu apenas ração. A quantidade de ração fornecida diariamente, para ambos os grupos, foi equivalente a 0,8% de MS/kg de peso vivo e era constituída de casca de soja (11% de PB). Todos os animais foram tratados com anti-helmíntico de eficácia comprovada (Triclorfon por via oral na dose de 97 mg.kg⁻¹ de peso vivo), quando o OPG atingiu valor ≥ 800 .

No dia zero (fevereiro de 2009), e a cada 15 dias foram realizadas coletas de fezes para contagem de ovos (OPG) e coprocultura (ROBERTS; O'SULLIVAN, 1950) e também coleta de sangue para determinar o volume globular (vg).

Mensalmente os ovinos foram avaliados conforme peso vivo e escore de condição corporal, sendo 1 o menor escore de condição e 5 o maior. No final do experimento, (fevereiro de 2010) todos os animais foram abatidos para quantificação da carga parasitária, utilizando metodologia descrita por Ueno; Gonçalves (1998).

O modelo estatístico utilizado incluiu os tratamentos como variáveis independentes e as variáveis peso, vg, carga parasitária como dependentes. Para a análise das variáveis: peso, vg, foi utilizado análise pelo método procmixed para medidas repetidas. A avaliação da carga parasitária, que foi medida uma só vez, foi realizada através da análise de variância one-way Anova. Além disso, as médias gerais das variáveis: peso, vg, também foram comparadas entre os grupos por fatorial - Anova, incluindo o fator mensal e tratamento como fatores. As variáveis que não se apresentavam normais no teste de Shapiro–Wallis foram normalizadas pela função Log do SAS (SAS institute, 1998). As diferenças entre os tratamentos foram verificadas pelo teste de Tukey com significância quando $p < 0.05$.

As condições de pesquisa foram aprovadas pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (COCEPE Nº 5.05.02.123).

Resultados

O nematódeo predominante nas avaliações quinzenais das coproculturas, durante todo período experimental foi *Haemonchus* sp. (> 95%), em ambos grupos testados. Resultados semelhantes foram encontrados na recuperação dos nematódeos após as necropsias. O grupo tratado com *S. cerevisiae* apresentou uma redução significativa na carga parasitária no abomaso, para *H. contortus* ($p < 0.001$) e *Ostertagia* sp., ($p < 0.05$) e não significativa para *Trichostrongylus* sp. ($p > 0.05$) (Fig. 1). No intestino delgado de poucos animais (< 20% em ambos grupos) foram identificados alguns parasitos dos gêneros *Trichostrongylus* sp., *Strongyloides* sp. e *Nematodirus* sp. e no intestino grosso *Oesophagostomum* sp. e *Trichuris* sp., e não havendo diferença entre as médias de parasitos recuperados nos animais dos grupos Sc e Controle. Não houve diferença significativa nas taxas de ganho de peso, contagem de OPG e nos valores de volume globular (fig. 2) entre os grupos durante todo período experimental ($p > 0.05$).

Apesar de estatisticamente não ter demonstrado valores significativos, a análise de caráter subjetivo através de escore de condição corporal (CC) mostrou

que os animais do grupo Sc apresentaram melhor desempenho ($CC > 3$) (fig. 3), confirmado posteriormente na condição das carcaças no abatedouro, no critério acabamento.

Quando foi analisado o número de tratamentos anti-helmínticos a que foram submetidos todos os animais do grupo Sc e controle, não houve diferença entre o número de dosificações entre os animais do grupo Sc e controle, sendo que no total foram necessárias 83 e 85 intervenções com o uso de anti-helmíntico, em cada grupo, respectivamente ($p > 0.05$).

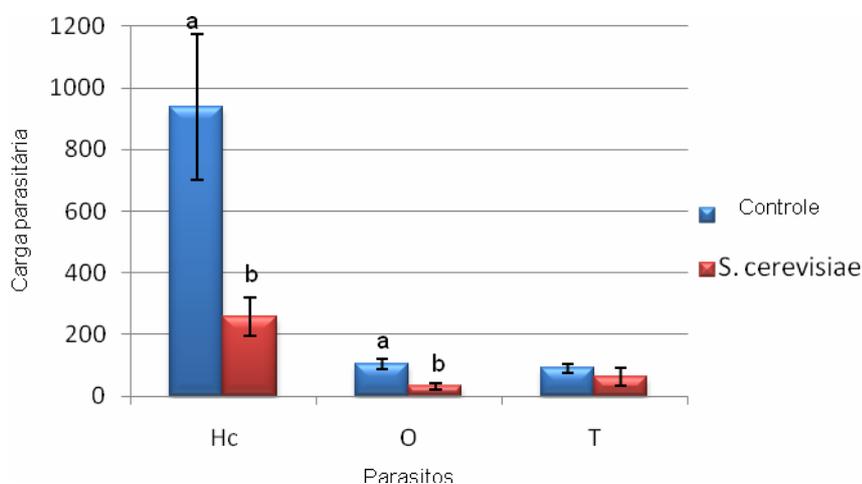


Figura 1. Carga parasitária média do abomaso de ovinos suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* e grupo controle, mantidos com infecção natural por nematódeos gastrintestinais no período de um ano. Hc- *Haemonchus contortus*. O- *Ostertagia* sp. T – *Trichostrongylus* sp. Letras diferentes na mesma coluna representando cada parasito indicam valores com diferença estatística significativa.

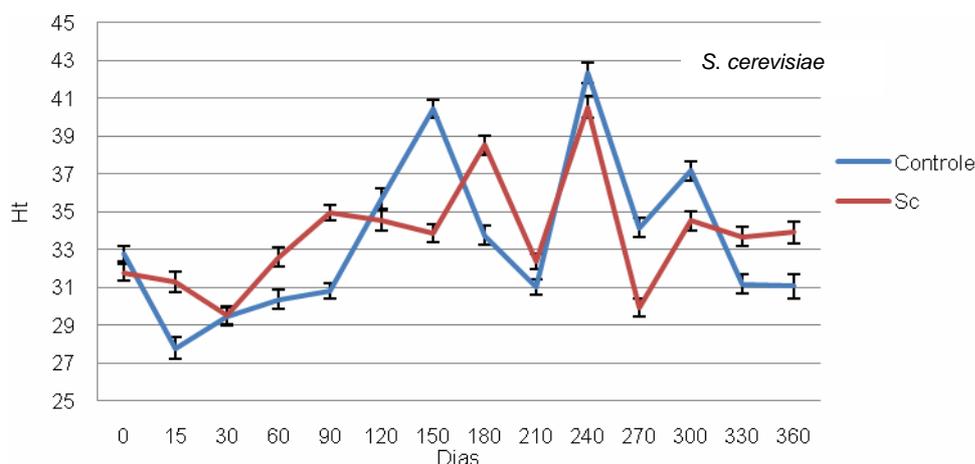


Figura 2. Médias do volume globular de ovinos suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e o grupo controle, mantidos com infecção natural por nematódeos gastrintestinais no período de um ano.

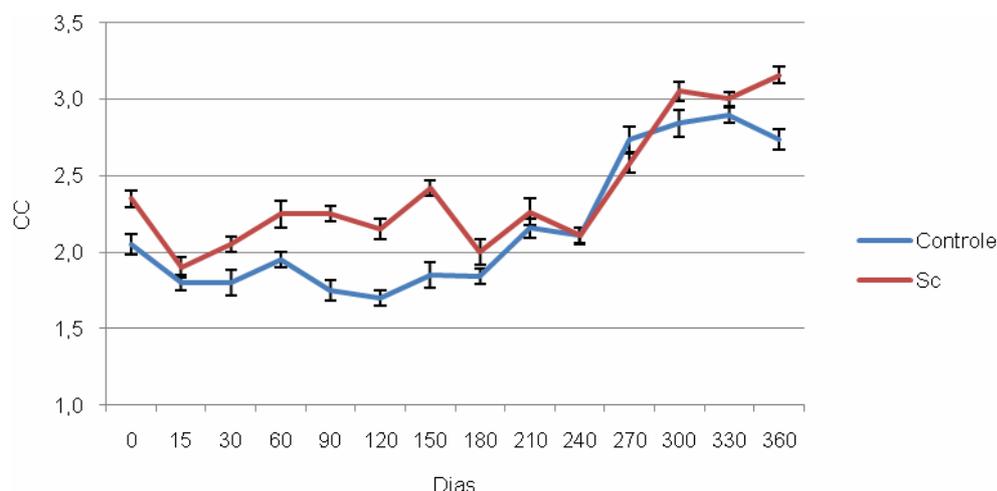


Figura 3. Médias do escore corporal de ovinos suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e o grupo controle, mantidos com infecção natural por nematódeos gastrintestinais no período de um ano. Escore de condição corporal (CC) 1 = mínimo e 5 = máximo.

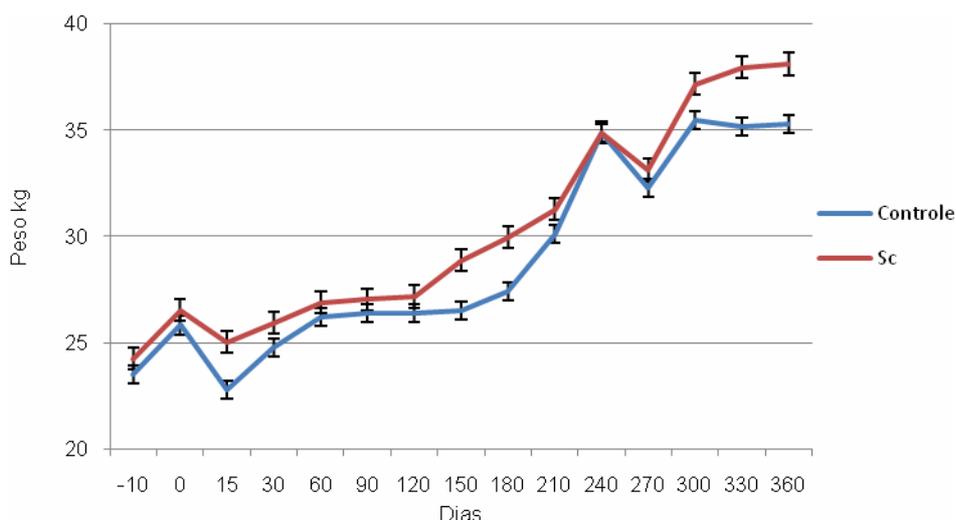


Figura 4. Peso médio dos ovinos suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e o grupo controle, mantidos com infecção natural por nematódeos gastrintestinais no período de um ano.

Discussão

O probiótico *S. cerevisiae* mostrou efeito benéfico sobre a redução da carga parasitária de ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais, provavelmente por induzir uma resposta imune mais efetiva dos ovinos, inviabilizando a fixação e/ou estabelecimento destes parasitos. Outros efeitos

positivos dos probióticos sobre a resposta imune de ovinos foram recentemente descritos em ovinos sob desafios vacinais (ROSS et al., 2010). Porém, a avaliação desses probióticos frente as parasitoses gástricas de ovinos ainda requer mais estudos, uma vez que existem apenas informações empíricas sobre essa correlação.

No presente estudo pôde-se observar ao longo do ano que não houve efeito quanto ao número de tratamentos anti-helmíntico, sendo que ambos os grupos receberam número semelhante de tratamentos anti-helmíntico (83 para o grupo Sc e 85 para o controle), no critério de tratar quando o OPG atingisse ≥ 800 . Critério adotado por prévio conhecimento de prevalência nas coproculturas realizadas anteriormente nesses mesmos animais durante os dois meses de adaptação, quando se evidenciou mais que 90% de larvas de *Haemonchus* sp. Dado também confirmado na recuperação da carga parasitária com mais de 80% de *H. contortus* em ambos grupos ao final do experimento. Esta prevalência elevada deste nematódeo foi descrita no Brasil por diferentes autores (RAMOS et al., 2004; MOLENTO et al., 2004).

Ao final do período de um ano foi verificada a redução da carga parasitária em 72% (*Haemonchus contortus*), demonstrando assim, o efeito positivo desse probiótico sobre os animais suplementados com *S. cerevisiae*.

Quanto aos demais nematódeos coletados no abomaso, *Ostertagia* e *Trichostrongylus*, somente o primeiro apresentou redução da carga parasitária ($p < 0.05$). Na avaliação da carga parasitária, a maior prevalência de *H. contortus* poderia ser atribuída à época de abate dos animais (com temperatura e umidade elevadas), porém, mesmo nos meses com temperaturas baixas foi o parasito mais prevalente, nunca perfazendo menor que 75% de larvas identificadas nas coproculturas. Poucos parasitos foram recuperados do intestino delgado e grosso, e em um número reduzido de animais. Esses demais parasitos são igualmente afetados pelas drogas que controlam o *H. contortus* que é mais prevalente, sofrendo assim uma pressão terapêutica, que associada às boas condições nutricionais dos animais foram determinantes para menor carga parasitária no intestino delgado e grosso. Efeito semelhante foi relatado por Ramos et al. (2004) quando atribuíram a redução de parasitos pulmonares de ovinos em relação aos anti-helmínticos.

A oferta de alimento (campo nativo) durante o período em que os animais foram desafiados foi sempre superior a 3% de matéria seca/kg de peso vivo, assim a suplementação ofertada proporcionou a manutenção de uma dieta equilibrada, o que

pode ter sido uma das razões pelas quais os valores hematológicos e de escore corporal não terem apresentado alterações negativas ou positivas representativas.

Apesar do peso vivo não ter revelado efeito significativo, durante o abate, foi observado que os animais suplementados com Sc mostravam melhor acabamento de carcaça (CC 3-3,5), enquanto que os animais do grupo controle tinham carcaças sem cobertura de gordura e escore corporal <3. Estes resultados são corroborados com o estudo de Arcos-García et al. (2000), que também verificou melhorias no desempenho animais, suplementados com *S. cerevisiae*.

Embora não existam estudos com esse probiótico no controle específico de parasitoses em ovinos, seu uso tem demonstrado efeitos positivos em outras enfermidades, como transtornos metabólicos e funcionais do rúmen (ROSE, 1997), De acordo com Newbold, Wallace, Mcintosh (1996), essa levedura tem a capacidade de estimular a multiplicação de bactérias ruminais anaeróbicas totais, bactérias celulolíticas e bactérias utilizadoras de ácido láctico no rúmen, que conseqüentemente, alteram o metabolismo e melhoram os processos de digestão da porção fibrosa da dieta. O que nos permite sugerir que o melhor desempenho dos ovinos frente à infecção parasitária, no período de estudo, pode estar diretamente ligada à manutenção do pH no rúmen e ao suprimento de nutrientes para a população bacteriana no trato digestório, melhor aporte protéico e, como consequência, interferência indireta positiva no sistema imune.

Conclusões

O probiótico *Saccharomyces cerevisiae* mostrou efeitos benéficos em ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, traduzidos principalmente pela redução da carga parasitária de *Haemonchus contortus* e melhora na condição corporal.

Referências

ARCOS-GARCÍA, J. L.; CASTREJÓN, F. A.; MENDOZA, G. D.; PÉREZ-GAVILÁN, E. P. Effect of two commercial yeast cultures with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. **Production Science**, Livestock, v.63, n.2, p.153-157, 2000.

- BALIC, A.; BOWLES, V. M.; MEEUSEN, E. N. T. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. **Advances in Parasitology**, n.45, p.181-241, 2000.
- BATH, G. F.; VAN WYK, J. A. Using the Famacha system on commercial sheep farms in south Africa. **In: International sheep veterinary congress, Cidade do Cabo. Anais...** Cidade do Cabo: University of Pretoria, v.1. p.3, 2001.
- CAMARGO, E. V.; LOPES, S. T. A.; COSTA, M. M.; PAIM, F.; BARBOSA, C. S.; LEAL, M. L. R. Neutrophil oxidative metabolism and haemogram of sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and vitamin E. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94(5), p.1-6, 2010.
- COOP, R. L.; HOLMES, P. H. Nutrition and parasite interaction. **International Journal for Parasitology**, n.26, p.951-962, 1996.
- COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34(4), p.1297-1303, 2004.
- FABIYI, J. P. Production losses and control of helminths in ruminants of tropical regions. **International Journal for Parasitology**, v.17(n), p.435-442, 1987.
- GONZÁLEZ, J. F.; HERNÁNDEZ, A.; MOLINA, J. M.; FERNÁNDEZ, A.; RAADSMA, H. W.; MEEUSEN, E. N.; PIEDRAFITA, D. Comparative experimental *Haemonchus contortus* infection of two sheep breeds native to the Canary Islands. **Veterinary Parasitology**, v.153(3-4), p.374-378, 2008.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.
- HOUTERT, M. F. J.; VAN and SYKES, A. R. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. **International Journal for Parasitology**, v.26, p.1151-1167, 1996.
- KNOX, M. R.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; AGUILAR-CABALLERO, A. J. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, n.139, p.385-393, 2006.
- LAMPKIN, N. European Union-overview, policies and perspectives. **Les Colloques de l'INRA**, v.95, p.23-25, 2000.
- LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A. L.; COOP, R. L.; Mc MANUS, C. M.; GENNARI, S. M. Effect of dietary protein intake on calf resilience to *Haemonchus placei* infection. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39(5), p.227-232, 2002.

MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha® como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v.34(4), p.1139-1145, 2004.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; MCINTOSH, F. M. Mod of action of yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminates. **Bristish Journal of Nutrition**, v.76(n.2), p.249-261, 1996.

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(6), p.889-1895, 2004.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for eggs-counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1(1), p.99-102, 1950.

ROOS, T. B.; TABELÃO, V. C.; DÜMMER, L. A.; SCHWEGLER, E.; GOULART, M. A.; MOURA, S. V.; CORRÊA, M. N.; LEITE, F. P. L.; GIL-TURNES, C. Effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v.1(2), p.113–118, 2010.

ROSE, A. H. Yeast, a microorganism for all species: a theoretical look at its mod of action. In: LYONS, T.P. (Ed.). **Biotechnology in the feed industry**, Nicholasville, p.113-118, 1997.

S.A.S. Guide for personal computers. 6th ed. S.A.S. Institute Inc., Cary, NC, USA. 1998.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**, Japan International Cooperation, Tokyo. 1998. 166p.

CONCLUSÕES GERAIS

O probiótico *Saccharomyces cerevisiae* possui efeitos benéficos em ovinos experimentalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, tendo como efeito mais importante a redução da carga parasitária de *Haemonchus contortus*.

Saccharomyces cerevisiae possui efeito modulador na resposta imune, estimulando a produção de IL-4 e proporcionando um maior aporte de eosinófilos na mucosa abomasal.

Em condições de infecção natural, *Saccharomyces cerevisiae* demonstrou ser eficiente como medida auxiliar no controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos, reduzindo a carga parasitária dos ovinos.

Saccharomyces boulardii e *Bacillus cereus* var. Toyoi não mostraram efeitos benéficos sobre ovinos experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus*.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v.383, p.787–793, 1996.
- ABBOTT, E. M.; PARKINS, J. J.; HOLMES, P. H. Influence of dietary protein on parasite establishment and pathogenesis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection of *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v.38, p.6-13, 1985.
- ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v.59, p.622–625, 2010.
- AMARANTE, A. F. T.; BAGNOL JUNIOR, 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.; CRAIG, T. M.; RAMSEY, W. S.; EI-SAYED, N. M.; DESOUKI, A. Y.; BAZER, F. W. Comparison of naturally acquired parasite burdens among Florida native, Rambouillet and crossbreed ewes. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.61-69, 1999a.
- AMARANTE, A. F. T.; CRAIG, T. M.; RAMSEY, W. S.; DAVIS, S. K.; BAZER, F. W. Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbred lambs. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.311-324, 1999b.
- AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematodes infection. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.91-106, 2004.
- AMARANTE, F. A. T. Nematoides gastrintestinais de ovinos, p.17-61. In: CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. SOUZA; MOLENTO, M. B. (Eds), **Doenças Parasitárias de Caprinos e Ovinos - Epidemiologia e Controle**, v.1, 1ª ed., EMBRAPA, Brasília, DF, 2009.
- ARIZMENDI-PUGA, N. G.; ENCISO, J. A.; ORTEGA-PIERRES, G. *Trichinella spiralis*: Histamine secretion induced by TSL-1 antigens from unsensitized mast cells. **Experimental Parasitology**, v.114, p.67–76, 2006.
- BAHIRATHAN, M.; MILLER, J. E.; BARRAS, S. R.; KAERNEY, M. T. Susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongylate nematode infection. **Veterinary Parasitology**, v.65, p.259-268, 1996.
- BALIC, A.; BOWLES, V. M.; MEEUSEN, E. N. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Parasite Immunology**, v.24, p.39-46, 2002.

BARGER, I. A.; COX, H. W. Wool production of sheep chronically infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.15, p.169-175, 1984.

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 immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v.51, p.75-83, 2004.

BRICARELLO, P. A.; AMARANTE, A. T. F.; ROCHA, R. A.; CABRAL FILHO, S. L.; HUNTLEY, J. F.; HOUDIJK, J. G.; 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.

BURKE, J. M.; MILLER, J. E.; LARSEN, M.; TERRILL, T. H. Interaction between copper oxide wire particles and *Duddingtonia flagrans* in lambs. **Veterinary Parasitology**, v.134, p.141-146, 2005.

CABARET, J.; GASNIER, N.; JACQUIET, P. Faecal egg counts are representative of digestive tract strongyle worm burdens in sheep and goats. **Parasite**, v.5, p.137-142, 1998.

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; HARVEY, R. B.; GENOVESE, K. J.; KENNEDY, C. N.; VENN, D. W.; NISBET, D. J. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v.9(2), p.217–225, 2008.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P. J.; HOGLUND, J.; LARSEN, M.; ZAHARI, W. M. Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia: a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Research**, v.33, p.685-696, 2002.

CLAEREBOUT, E.; HILDERSON, H.; MEEUS, P.; De MAREZ, T.; BEHNKE, J.; HUNTLEY, J.; VERCRUYSSSE, J. The effect of truncated infections with *Ostertagia ostertagi* on the development of acquired resistance in calves. **Veterinary Parasitology**, v.66, p.225-239, 1996.

COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Nutrition–parasite interaction. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p.187–204, 1999.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34(4), p.1297-1303, 2004.

COX, F. E. G.; LIEW, F. Y. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. **Parasitology Today**, v.8, p.371–374, 1992.

- DAVIS, M. E.; BROWN, D.; BAKER, A.; BOS, K.; DIRAIN, M.; HALBROOK, E.; JOHNSON, Z.; MAXWELL, C.; REHBERGER, T. Effect of direct-fed microbial and antibiotic supplementation on gastrointestinal microflora, mucin histochemical characterization, and immune populations of weanling pigs. **Livestock Science**, v.108(1-3), p.249-253, 2007.
- DE VEER, M. J.; KEMP, J. M.; MEEUSEN, E. N. T. The innate host defense against nematode parasites. **Parasite Immunology**, v.29, p.1-9, 2007.
- DENWOOD, M. J.; STEAR, M. J.; MATTHEWS, L.; REID, S. W. J.; TOFT, N.; INNOCENT, G. T. The distribution of the pathogenic nematode *Nematodirus battus* in lambs is zero-inflated. **Parasitology**, v.135, p.1225-1235, 2008.
- DOUGLAS, L. C.; MARY, R. D.; SANDERS, E. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v.8(3), 2008.
- ERICKSON, L. K.; HUBBARD, E. N. Probiotic immunomodulation in health and disease. **Journal of Nutrition**, v.130, p.403-109, 2000.
- FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Estatísticas FAO, 2007. Disponível em: www.fao.org. Acesso em 20 de outubro de 2010.
- FERNANDES, L. H.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T.; SOUZA, H.; BELLUZZO, C. E. C. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56(6), p.733-740, 2004.
- FERNANDEZ, A. S.; LARSEN, M.; HENNINGSEN, E., NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; BJORN, H.; WOLSTRUP, J. Effect of *Duddingtonia flagrans* against *Ostertagia ostertagi* in cattle grazing at different stocking rates. **Parasitology**, v.119, p.105-111, 1999.
- FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C. A.; MORRIS, S. C.; MADDEN, K. B.; GAUSE, W. C. Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annual Review Immunology**, v.15, p.505-533, 1997.
- FOX, M. T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. **Veterinary Parasitology**, v.72, p.285-308, 1997.
- FREITAS, M. G. **Helmintologia veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo & Brasil, 1976. 369p.
- GAMBLE, H. R.; ZAJAC, A. M. Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. **Veterinary Parasitology**, v.41, p.211-225, 1992.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1412, 1995.

- GILL, H. S. Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.17(5), p.755-773, 2003.
- GILLETTE-FERGUSON, I.; DAEHNEL, K.; HISE, A. G.; SUN, Y.; CARLSON, E.; DIACONU, E.; MCGARRY, H. F.; TAYLOR, M. J.; PEARLMAN, E. Toll-Like Receptor 2 Regulates CXC Chemokine Production and Neutrophil Recruitment to the Cornea in *Onchocerca volvulus*/*Wolbachia*-Induced Keratitis. **Infection and Immunity**, v.75, p.5908-5915, 2007.
- GIL-TURNES, C.; SANTOS, A. F.; CRUZ, F. W.; MONTEIRO A. V. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.30(1), p.11-14, 1999.
- GOMES, A. M. P.; MALCAT, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biociência alimentar**, Escola Superior de Biociência, Universidade Católica Portuguesa, p.12-22
Disponível em:
http://dequim.ist.utl.pt/bbio/64/pdf/agentes_probioticos_em_alimentos.pdf
Acesso em: 14 setembro de 2006.
- GONÇALVES, I. G.; ECHEVARRIA, F. A. M. Cobre no controle da verminose gastrointestinal em ovinos. **Ciência Rural**, v.34(1), p.183-188, 2004.
- GOPAL, R. M.; POMROY, W. E.; WEST, D. M. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectin. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.781-786, 1999.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.
- GRAY, G. D.; PRESSON, B. L.; ALBERS, G. A. A.; LE JAMBRE, L. F.; PIPER, L. R.; BARKER, J. S. F. Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pastures contaminated with parasitic nematodes. In: Merino improvement programs in Australia. Melbourne. Australian Wool Corporations, p.365-369, 1987.
- GRAY, G. D.; BARGER, I. A.; Le JAMBRE, L. F.; DOUCH, P. G. Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pastures contaminated with parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology**, v.22, p.417-425, 1992.
- GUILLOT, J. F. Les probiotiques en alimentation animale. **Cahiers d'Agriculture**, v.7, p.49-54, 1998.
- HOLMES, P. H. Pathogenesis of trichostrongylosis. **Veterinary Parasitology**, v.18, p. 89-101, 1985.

HOLMES, P. H. Pathophysiology of nematode infections. **International Journal for Parasitology**, v.17(2), p.443–451, 1987.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73(2), p.365-373, 2001.

HOUDIJK, J. G.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; HUNTLEY, J. F.; COOP, R. L. Effects of protein supply and reproductive status on local and systemic immune responses to *Teladorsagia circumcincta* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.129, p.105-117, 2005.

HOUDIJK, J. G. M. Influence of periparturient nutritional demand on resistance to parasites in livestock. **Parasite Immunology**, v.30, p.113–121, 2008.

HUNTLEY, J. F.; NEWLANDS, G. F. J.; JACKSON, F.; MILLER, H. R. P. The influence of challenge dose, duration of immunity, or steroid treatment on mucosal mast cells and the distribution of sheep mast cell proteinase in *Haemonchus*-infected sheep. **Parasite Immunology**, v.14, p.429-440, 1992.

IBGE. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp> acesso em 30 de novembro de 2010.

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

IQBAL, Z.; AKHTAR, M. S.; SINDHU, Z.; KHAN, M. N.; JABBAR, A. Review Herbal Dewormers in Livestock – A Traditional therapy. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.5(2), p.199-206, 2003.

IQBAL, Z.; SARWAR, M.; JABBAR, A., AHMED, S., NISA, M.; SAJID, M. S.; KHAN, M. N.; MUFTI, K. A.; YASEEN, M. Direct and indirect anthelmintic effects of condensed tannins in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.125-131, 2007.

JACOBS, H. J.; WILTSHIRE, C.; ASHMAN, K.; MEEUSEN, E. N. Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. **Vaccine**, v.17. p.362-368, 1999.

JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia, o sistema imune na saúde na doença**. 5ª ed., 2002.

JASMER, D. P.; LAHMERS, K. K.; BROWN, W. C. *Haemonchus contortus* intestine: a prominent source of mucosal antigens. **Parasite Immunology**, v.29, p.139–151, 2007.

KAHIYA, C.; MUKARATIRWA, S.; THAMSBORG, S. M. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. **Veterinary Parasitology**, v.115, p.265-274, 2003.

KAPLAN, R. M.; BURKE, J. M.; TERRILL, T. H.; MILLER, J. E.; GETZ, W. R.; MOBINI, S.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; LARSEN, M.; VATTA, A. F. Validation of the FAMACHA eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.105-120, 2004.

KNOX, M.; STEEL, J. Nutritional enhancement of parasite control in small ruminant production systems in developing countries of south-east Asia and the Pacific. **International Journal for Parasitology**, v.26(8-9), p.963-970, 1996.

KRITAS, S. K.; GOVARIS, A.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; BURRIEL, A. R. Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53, p.170–173, 2006.

LARSEN, M.; FAEDO, M.; WALLER, P.; HENNESSY, D. R. The potential of nematophagus fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Studies with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.76, n.121-128, 1998.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious microfungi. **Parasitology**, v.120 (Suppl), p.121-131, 2000.

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

LEMA, M.; WILLIAMS, L.; RAO, D. R. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. **Small Ruminant Research**, v.39, p.31–39, 2001.

LEVINE, N. D.; CLARK, D. T.; BRADLEY, R. E.; KANTOR, S. Relationship of pasture rotation to acquisition of gastrointestinal nematodes by sheep. **American Journal for Veterinary Research**, v.36, p.1459-1464, 1975.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. R.; QUEIROZ-JUNIOR, E. M.; TOMÉ, A. R.; NASCIMENTO, N. R. F. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.173 (1-2), p.93-98, 2010.

MACK, D. R.; AHRNE, S.; HYDE, L.; WEI, S.; HOLLINGSWORTH, M. A. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**, v.52(6), p.827-833, 2003.

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

MARTIN, F. P. J.; VERDU, E. F.; WANG, Y.; DUMAS, M.; YAP, I. K. S.; CLOAREC, O.; BERGONZELLI, G. E.; CORTHEZY-THEULAZ, I.; KOCHHAR, S.; HOLMES, E.; LINDON, J.; STEPHEN, M. C.; NICHOLSON, J. K. Transgenomic metabolic interactions in a mouse disease model: interactions of *Trichinella spiralis* infection

with dietary *Lactobacillus paracasei* supplementation. **Journal of Proteome Research**, v.5(9), p.2185-2193, 2006.

MCKELLAR, Q. A.; SCOTT, E. W.; BAXTER, P.; ANDERSON, L. A.; BAIRDEN, K. Pharmacodynamics, pharmaco-kinetics and faecal persistence of morantel in cattle and goats. **Journal of Veterinary Pharmacology and therapeutics**, v.16, p.87–92, 1993.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological Review**, v.173, p.89–97, 2000.

MEEUSEN, E. N. T.; BALIC, A. Do Eosinophils have a Role in the Killing of Helminth Parasites? **Parasitology Today**, v.16(3), p.95-101, 2000.

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.

MILLER, J. E.; HOROHOV, D. W. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. **Journal of Animal Science**, v.84, p.124-132, 2006.

MINHO, A. P.; ABDALLA, A. L.; GENARI, S. M. The effect of condensed tannins on *Haemonchus contortus* in sheep experimentally infected. In: **British Society of Animal Science Annual Meeting**, YORK, 2005.

MISSOTTEN, J. A. M.; MICHIELS, J.; GORIS, J.; HERMAN, L.; HEYNDRICKX, M.; de SMET, S.; DIERICK, N. A. Screening of two probiotic products for use in fermented liquid feed. **Livestock Science**, v.108(1-3), p.232-235, 2007.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Nematode control and the possible development of anthelmintic resistance. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.8(1), p. 75-86, 1999.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v.7, p.145–173, 1989.

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(3), p.93-100, 2003.

MÜLLER, C. A.; AUTENRIETH, I. B.; PESCHEL, A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62(12), p.1297-307, 2005.

NARI, A.; FIEL, C. (Eds.). **Enfermedades parasitarias de importancia economica en bovinos: Bases epidemiológicas para su prevencion y control**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1993. 420p.

NAWA, Y.; ISHIKAWA, N.; TSUCHIYA, K.; HORII, Y.; ABE, T.; KHAN, A. I.; HI, B.; ITOH, H.; IDE, H.; UCHIYAMA, F. Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. **Parasite Immunology**, v.16, p.333-338, 1994.

NEWTON, S. E.; MEEUSEN, E. N. Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. **Parasite Immunology**, v.25, p.283-296, 2003.

O'CONNOR, L. J.; WALKDEN-BROWN, S. W.; KAHN, L. P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, v.142, p.1-15, 2006.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T.; SEQUEIRA, J. L. Parasitological parameters and tissue response in the abomasum of sheep infected with *Haemonchus* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52(5), p.447-452, 2000.

PAOLINI, V.; BERGEAUD, J. P.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; DORCHIES, P.; HOSTE, H., Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.113, p.253-261, 2003.

PARKINS, J. J.; TAYLOR, L. M.; HOLMES, P. H.; BAIRDEN, K.; SALMAN, S. K.; ARMOUR, J. Pathophysiological and parasitological studies on a concurrent infection of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. **Research in Veterinary Science**, v.48, p.201-208, 1990.

PATURI, G.; PHILLIPS, M.; JONES, M.; KAILASAPATHY, K. Immune enhancing effects of *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 in mice. **International Journal of Food Microbiology**, v.115(1), p.115-118, 2007.

PENA, M. T. The role of immunity in resistance of Gulf Coast Native sheep to *Haemonchus contortus* infection. **Ph.D. Dissertation**, Louisiana State University, Baton Rouge, 2001.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S. Probiotics and the immune state. In: FULLER, R., ed. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman and Hall, p.145-180, 1992.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for eggs-counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1(1), p.99-102, 1950.

ROMAGNANI, S. Th1/Th2 cells. **Inflammatory Bowel Disease**, v.5, p.285-294, 1999.

ROOS, T. B.; TABELEÃO, V. C.; DÜMMER, L. A.; SCHWEGLER, E.; GOULART, M. A.; MOURA, S. V.; CORRÊA, M. N.; LEITE, F. P. L.; GIL-TURNES, C. . Effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v.21(2), p.113-118, 2010.

ROSE, A. H. Yeast, a microorganism for all species: a theoretical look at its mod of action. In: LYONS, T.P. (Ed.). **Biotechnology in the feed industry**, Nicholasville: Alltech Technical, p.113-118, 1997.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN. S. P. The eosinophil. **Annual Review Immunology**, v.24, p.147-174, 2006.

SAAD. S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42(1), p.1-16, 2006.

SALMINEN, S., ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie Leeuwenhoek**, v.70, p.347-358, 1996.

SANTURIO, J. M.; ZANETTE, R. A.; SILVA, A. S.; DE LA RUE, M. L.; MONTEIRO, S. G.; ALVES, S. H. Improved method for *Duddingtonia flagrans* chlamydospores production for livestock use. **Veterinary Parasitology**, v.164(2-4), p.344-346, 2009.

S.A.S. Guide for personal computers. 6th ed. S.A.S. Institute Inc., Cary, NC, USA. 1998.

SCHALLIG, H. D., Van LEEUWEN, M.A. Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. **Parasitology**, v.14, p.293-299, 1997.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73(2), p.361-364, 2001.

SHER, A.; GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; CLERICI, M.; KULLBERG, M.; PEARCE, E. J.; BERZOFISKY, J. A.; MOSMANN, T. R.; JAMES, S. L.; MORSE, H. C.; SHEARER, G. M. Role of T-cell derived cytokines in the down regulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immunology Review**, v.127, p.183-204, 1992.

SILVA, W. W.; BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. L. A. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no semi-árido paraibano - Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12(2), p.71-75, 2003.

SOLANO-AGUILAR, G.; DAWSON, H. D.; LEDBETTER, T.; SHEA DONOHUE, P. T.; SCHOENE, N. W.; CALL, J.; BESHAN, E.; HARE Jr, W.R.; URBAN Jr, J.F. The effect of human-derived probiotic bacteria on the intestinal function of pigs. **Veterinary Parasitology**, v.125(1-2), p.47-61, 2004.

SOULSBY, E. J. L. **Textbook of veterinary clinical parasitology. Helminths**, v.1. Blackwell, Oxford, 1965. 1120p.

STANKIEWICZ, M.; JONAS, W. E.; DOUCH, P. C. G.; RABEL, B.; BISSET, S.; CABAJ, W. Globule leukocytes in the rumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. **Journal of Parasitology**, v.79(6), p.940-945, 1993.

STEAR, M. J.; STRAIN, A. S.; BISHOP, B. S. C. How lambs control infection with *Ostertagia circumcincta*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.72(1-8), p.213-218, 1999.

STERN, R. M.; STORRS, A. B. The rationale of *Lactobacillus acidophilus* in feeding programs for livestock. **Proc. 36th Minnesota Nutrition Confederation**, p.191, 1975.

TEPPER, R. I.; LEVINSON, D. A.; STANGER, B. Z.; CAMPOS-TORRES, J.; ABBAS, A. K.; LEADER, P. IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T-cell development in transgenic mice. **Cell**, v.62, p.457-467, 1990.

THOMKE, S.; ELWINGER, K. Growth promotants in feeding pigs and poultry. III Alternatives to antibiotic growth promotants. **Annales de Zootechnie**, v.4, p.245-271, 1998.

TIZARD, I. R. **Imunologia**, 6ª ed. Editora Roca, São Paulo. 2000. 531p.

TORRES-ACOSTA, J. F.; JACOBS, D. E.; AGUILAR-CABALLERO, A.; SANDOVAL-CASTRO, C.; MAY-MARTINEZ, M.; COB-GALERA, L. A. The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.217-238, 2004.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Japan International Cooperation, Tokyo, 1998. 166p.

URBAN, J. F.; MADDEN, K. B.; SVETIC, A.; CHEEVER, A.; TROTTA, P. P.; GAUSE, W. C.; KATONA, I. M.; FINKELMAN, F. D. Importance of Th2 cytokines on protective immunity to nematodes. **Immunology Review**, v.127, p.205-220, 1992.

van WYK, J. A.; HOSTE, H.; KAPLAN, R. M.; BESIÉ, R. B. Targeted selective treatment for worm management-how do we sell rational programs to farmers? **Veterinary Parasitology**, v.139, p.336-346, 2006.

VATTA, A. F.; KRECEK, R. C.; LETTY, B. A.; van der LINDE, M. J.; GRIMBEEK, R. J.; de VILLIERS, J. F.; MOTSWATSWE, P.W.; MOLEBIEMANG, G. S.; BOSHOFF, H. M.; HANSEN, J. W. Incidence of *Haemonchus* spp. and effect on haematocrit and eye colour in goats farmed under resource-poor conditions in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.119-131, 2002.

VIEIRA, L. S.; BERNE, M. E. A.; CAVALCANTE, A. C. R. *Haemonchus contortus* Resistance to Ivermectin and Netobimin in Brazilian Sheep. **Veterinary Parasitology**, v.45, p.111-116, 1992.

VLIAGOFTIS, H.; BEFUS, A. D. Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces. **Immunology Review**, v.206, p.190–203, 2005.

WALLER, P. J.; RUDBY-MARTIN, L.; LJUNGSTRO“M, B. L.; RYDZIK, A. The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. **Veterinary Parasitology**, v.122, p.207–220, 2004.

WOOSTER, M. J.; WOODGATE, R. G.; CHICK, B. F. Reduced efficacy of ivermectin, abamectin and moxidectin against field isolates of *Haemonchus contortus*. **Australian Veterinary Journal**, v.79(12), p.840–842, 2001.

YOUNG, A. R.; MEEUSEN, E. N. Galectins in parasite infection and allergic inflammation. **Glycoconjugate journal**, v.19, p.601–606, 2004.

ZÁRATE, G.; NADER-MACIAS, M. E. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. **Letters in Applied Microbiology**, v.43(2), p.174-180, 2006.

ZIOMKO, I. Experimental invasion of *Strongyloides papillosus* (Wedl, 1856) in sheep. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.44(2), p.179-186, 2000.