

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

CLEYDLENNE COSTA VASCONCELOS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PÓ DA CASCA DE ACÁCIA (*Acacia mangium*
Willd – Mimosaceae) SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA E INFECÇÕES POR
Haemonchus contortus e *Trichostrongylus colubriformis* EM CAPRINOS

Belo Horizonte
Abril/2014

CLEYDLENNE COSTA VASCONCELOS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PÓ DA CASCA DE ACÁCIA (*Acacia mangium*
Willd – Mimosaceae) SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA E INFECÇÕES POR
Haemonchus contortus e *Trichostrongylus colubriformis* EM CAPRINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Parasitologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito à obtenção do título
de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Belo Horizonte
Abril/2014

Vasconcelos, Cleydlenne Costa.

Efeito da suplementação com pó da casca de acácia (*Acacia mangium* Willd - Mimosaceae) sobre a resposta imunológica e infecções por *Haemonchus contortus* e *trichostrongylus colubriformis* em caprinos [manuscrito] / Cleydlenne Costa Vasconcelos. - 2014.

112 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

Este experimento foi desenvolvido no setor de pequenos ruminantes e Laboratório de Parasitologia Animal do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da UFMA, *Campus* Chapadinha – MA, no Laboratório de Imunofisiologia da UFMA, *Campus* São Luís e no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG).

COLABORADORES

Laboratório de Parasitologia Animal – Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias – CCAA/UFMA.

Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior (Co – orientador)

Giselle Cutrim de Oliveira

Luciana Traesel

Alberto Jorge Oliveira Lopes

Laboratório de Imunofisiologia – Departamento de Ciências Fisiológicas – CCBS – UFMA.

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

Laboratório de Nutrição Animal - Centro de Energia Nuclear Aplicada a Agricultura (CENA) - Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Helder Louvandini

ORGÃOS FINANCIADORES: CAPES, CNPq e FAPEMA

Dedico este trabalho a Deus, por me dar coragem e determinação para concluí-lo. Aos meus pais e irmãos pelo companheirismo, compreensão e amor, aos meus avós (in memoriam) pelo carinho, aos meus sogros pelo apoio e ao meu esposo pelo amor, dedicação e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e infinito amor, e por me fortalecer diante das dificuldades;

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara pela orientação, ensinamentos e pela confiança em mim depositada. Por sempre me incentivar a ser independente e buscar as respostas para os meus questionamentos. Pelas suas inúmeras qualidades, que em especial gostaria de destacar a sua humildade;

Ao Prof. Dr. Livio Martins Costa Júnior, meu co-orientador, pelos ensinamentos e auxílio, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação e meu crescimento profissional. Por sempre me fazer perceber que podemos encontrar uma solução para os problemas, por mais difíceis que pareçam;

A profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos pelo auxílio e orientação nas análises imunológicas e conhecimento a mim repassado, que foram essenciais para o meu aprendizado e realização deste trabalho;

A profa. Dr. Flavia Raquel Fernandes do Nascimento, por ter aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento de uma parte deste trabalho;

As amigas e companheiras de trabalho Giselle C. Oliveira e Luciana Traesel, pela parceria e troca de conhecimento durante a execução deste experimento, foram momentos muito difíceis, onde cada dia parecia que travávamos uma grande batalha para superar os problemas intermináveis deste experimento, mas uma coisa podemos afirmar com grande certeza: aprendemos muito;

Ao Prof. Dr. Henrique Nunes Parente por ceder o espaço, onde os animais foram mantidos durante todo o experimento;

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Animal (LPA): Itala Caroline P. D. Lobo, Joseane R. de Sousa, Aldilene S. Lima, Suzana G. Lopes, Sebastião F. de Araújo Neto, Melise S. Lopes, Aline R. Pereira, José Gracione do N. Sousa Filho, Jorgiane F. de Carvalho, Lilyan Bruna G. Barros e demais. Pelo auxílio nos trabalhos, em especial o de manejo dos animais e abate. Sem vocês estas atividades talvez não fossem possíveis, muito obrigada!

Aos estagiários: Henry M. S. Almeida, Isaias S. Reis e Isabel C. de A. Araújo. Pelo apoio na realização deste trabalho e pela sempre agradável companhia;

Ao Johnny R. do Nascimento pela ajuda com o citometro de fluxo;

Aos colegas Ana Karlla dos S. Sousa e Luis Douglas M. Silva pela ajuda com os hemogramas e paciência;

A técnica do LIF, Renata A. G. Almeida, pelo apoio e amizade;

A todos os membros do LIF, por terem me recebido muito bem e pela companhia. A dona Joana, minha companhia de todas as manhãs, que sempre me recebia com um grande sorriso e um abraço, fazendo o dia ficar melhor;

Ao Dr. Marcos Grissoto e Dra. Elizabete, pelo auxílio com materiais durante o experimento;

A Michele S. de Matos, gerente do laboratório Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - (ICB/UFMG), por ser sempre tão atenciosa, me ajudando bastante no envio de materiais;

A Sumara A. G. Ferreira e Sibebe Abreu por serem muito prestativas e eficientes, mantendo sempre o bom andamento do programa;

Ao programa de Pós- graduação em parasitologia, pela oportunidade;

Aos professores do programa de pós graduação em parasitologia, pelos ensinamentos que foram fundamentais para minha formação;

Aos meus pais Conceição M. G. C. Vasconcelos e Edmilson A. Vasconcelos pela amizade, confiança, carinho e amor, pelos ensinamentos e paciência e acima de tudo pela doação incondicional a mim e por serem a minha maior inspiração. Amo vocês!

Aos meus irmãos: Edlaina M. C. V. Bezerra, Edmilson A. V. Júnior e Helton Jânio C. Vasconcelos pela amizade, conversas e por estarem sempre ao meu lado;

Ao meu marido Alberto J. O. Lopes, que tem sido um grande companheiro e amigo, sem o qual nada disso seria possível, pelo incentivo e presença constante em cada projeto meu, pelo amor e dedicação a mim, pela paciência para me ajudar a superar os momentos de dificuldade. Obrigada por fazer parte da minha vida e compartilhar das minhas alegrias e angústias. Te amo!

Aos meus sobrinhos: Mateus L. V. Pinheiro, Phamela Araújo, Clarice V. Bezerra, José Aquiles A. Vasconcelos e Nicolas Emanuel A. Vasconcelos, pela alegria que trazem a minha vida com cada sorriso e gesto de amor. Titia ama muito vocês!

Aos meus sogros: Jorge P. Lopes e Jane G. Oliveira por me acolherem em sua família com carinho e me tratarem com uma filha, pela dedicação, paciência e pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos de turma (Lado B), que ganharam um espaço especial no meu coração pela amizade, companheirismo e humildade. Em especial a minha amiga Larissa F. Paranaíba, que esteve sempre ao meu lado me dando sempre um ombro amigo para chorar nos momentos de desespero e um sorriso nos momentos de alegria.

Ao amigo Adalberto A. Pereira Filho (carinhosamente Dalbis), por sempre estar disposto a ouvir meus problemas e compartilhar os momentos de alegria comigo. E por sempre dar um jeitinho no transporte de materiais do meu experimento. Te adoro!

A amiga Caroline Cavalcanti, pela acolhida em sua casa, pela amizade e companhia. Você é uma pessoa muito especial, que tem um coração gigante!

A Ana Cristina P. de P. Bello e Luis Fernando V. Furtado pelo incentivo e amizade.

Ao amigo Sebastião R. Ferreira, que sempre esteve ao meu lado durante as etapas mais difíceis do mestrado, sempre disposto a me ouvir, aconselhar e fazer companhia;

A Livia S. A. Passos, que apesar do pouco tempo de convívio, foi uma grande amiga, sendo peça fundamental para o meu aprendizado no desenvolvimento das metodologias desenvolvidas em parte do meu trabalho. Muito obrigada por sua humildade e parceria!

Ao Maurício, pelo cuidado e carinho com os animais, sempre deixando tudo limpo e dando um apoio indescritível nas tarefas mais pesadas;

Aos animais que foram alvo de pesquisa deste experimento;

Aos órgãos financiadores: CAPES, CNPq e FAPEMA que proporcionaram o desenvolvimento desta pesquisa;

E a todos que contribuíram de forma direta e indireta, para a realização desta pesquisa, meu muito obrigado.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	XIII
Lista de figuras	XV
Lista de tabelas	XIX
Resumo	XX
Abstract	XXI
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Caprinocultura	02
1.2 Parasitoses por nematoides gastrintestinais em pequenos ruminantes	03
1.2.1 Gênero <i>Haemonchus</i>	04
1.2.2 Gênero <i>Trichostrongylus</i>	07
1.3 Fatores que influenciam a resposta imune do hospedeiro no controle da infecção	08
1.4 Resposta imunológica à infecções por helmintos	09
1.5 Resposta imunológica de caprinos a infecções por nematódeos gastrintestinais	12
1.6 Métodos de Controle de Nematódeos	13
1.6.1 Uso de anti-helmínticos	13
1.6.2 Resistência	13
1.6.3 Métodos adicionais de controle	14
1.7 Plantas com propriedades bioativas	17
1.7.1 Metabólitos secundários	19
1.7.2 Taninos	20
1.7.3 Ação direta de TC	23

1.7.4 Ação indireta de TC	24
1.8 Efeitos de compostos de plantas sobre células do sistema imune.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 População estudada	33
4.2 Coleta e processamento das plantas	33
4.2.1 Análise bromatológica do material vegetal	33
4.3 Manutenção da cepa de <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i>	34
4.4 Delineamento experimental	35
4.5 Necropsia dos animais	37
4.6 Preparo de antígenos brutos de vermes adultos	38
4.7 Processamento de sangue	38
4.7.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico de caprinos	38
4.7.2 Cultura de PBMCs	39
4.8 Ensaio <i>in vitro</i>	39
4.9 Imunofenotipagem	40
4.10 Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo	41
4.11 Análise estatística	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Efeito da suplementação com o pó de Acácia sobre o consumo voluntários dos caprinos	44
5.2 Efeito da suplementação com o pó de Acácia sobre o ganho de peso dos	

caprinos	45
5.3 Efeito da suplementação com o pó de Acácia sobre a contagem de Ovos por Grama de Fezes (OPG)	46
5.4 Efeito da suplementação com o pó da casca de com Acácia sobre o número de <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i> adultos recuperados de abomaso e intestino delgado	47
5.5 Avaliação do perfil de linfócitos do sangue periférico de caprinos suplementados com <i>Acacia mangium</i> (grupos Acácia e Acácia+ PEG) e não suplementados com <i>A. mangium</i> (grupo Controle)	50
5.6 Análise da produção das citocinas IL-4, IFN- γ e IL-10 em linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD21 ⁺ de caprinos suplementados com <i>A. mangium</i> (grupos Acácia e Acácia+ PEG) e não suplementados com <i>A. mangium</i> (grupo controle)	51
5.7 Análise imunofenotípica de linfócitos de caprinos não infectados após estimulação com antígeno bruto de <i>H. contortus</i>	58
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgBr - Antígenos bruto
BSA – Albumina sérica bovina
CC - Culturas controle
CD - *Cluster of differentiation*
CD8 - Molécula de identificação de células T citotóxicas
CD21 – Molécula de identificação de linfócitos B
CD4 - Molécula de identificação de células T *helper*
DPI – Dias pós infecção
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EST-Ag – Estimulado com antígeno bruto
FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA - Fibra em detergente ácido
FDN - Fibra em detergente neutro
FITC - Isoticianato de fluoresceína
FL - Fluorescência
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ID – Intestino delgado
IFN- γ - Interferon –gamma
IgG- imunoglobulinas
IL- Interleucina
IL-10 - Interleucina 10
IL-4 - Interleucina 4
L1 - Larva de primeiro estágio
L2 - Larva de segundo estágio
L3 - Larva de terceiro estágio
L4 - Larva de quarto estágio
L5- adulto jovem
MFF - Solução fixadora
MM - Matéria mineral
MO - Matéria orgânica
MS – Matéria seca
NGI - Nematoides gastrintestinais

NK - *Natural Killer*

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPG - Ovos por grama de fezes

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PB - Proteína bruta

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PBS - Tampão fosfato salínico

PBS P - Tampão fosfato salínico permeabilizante

PBS W - Tampão fosfato salínico de lavagem

PE – Ficoeritrina

PEG - Polietilenoglicol

PV- Peso vivo

RPM- Rotações por minuto

RPMI - Meio de cultivo celular

TAC- Tanino altamente concentrado

TC - Taninos condensados

TH - Taninos Hidrolizáveis

Th1 - Células T CD4+ produtoras de citocinas do padrão 1 de citocinas

Th2 - Células T CD4+ produtoras de citocinas do padrão 2 de citocinas

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática do ciclo de vida de nematoides gastrintestinais de ruminantes..... 06
- Figura 2:** Delineamento experimental utilizado no estudo..... 37
- Figura 3:** Método de análise utilizada para avaliação dos dados. A - *gate* da população de linfócitos; B - Perfil fenotípico dos linfócitos, em função das fluorescências FL-1 e FL-2. 42
- Figura 4:** Média e desvio padrão do consumo voluntário de ração. Os valores estão expressos pela média em percentual de consumo de cada grupo, durante três períodos de 15 dias cada. Dias de avaliação: **(D-15 a D-0)** - primeiros 15 dias de administração da planta, sem infecção; **(D-0 a D+15)**- intervalo de 15 a 30 dias após a administração da planta e primeiros 15 dias da infecção; **(D+15 a D+30)** intervalo de 30 a 45 dias após a administração da planta e 15 a 30 dias da infecção. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia)..... 44
- Figura 5:** Ganho de peso dos caprinos. Os valores estão expressos pela média do ganho dos animais de peso de cada grupo, acompanhadas de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Dias de avaliação: **(D-0)**- dia da infecção; **(D+15)** 15 após a infecção e **(D+30)** 30 dias após a infecção..... 45
- Figura 6:** Número médio da contagem ovos por grama de fezes (valores transformados por $\text{Log}(x+2)$) dos caprinos dos grupos Controle, Acácia e Acácia + PEG, no período de 21º a 30º DPI. Os valores estão expressos pela média da contagem de OPG dos animais de cada grupo, acompanhadas de desvio padrão..... 46
- Figura 7:** Carga parasitária de abomaso. Os valores estão expressos pela média do número de macho, fêmeas e número total de vermes da espécie *H. contortus* encontrados no abomaso dos

caprinos dos grupos Controle, Acácia e Acácia + PEG após necropsia, acompanhada de desvio padrão..... 48

Figura 8: Carga parasitária de intestino delgado (ID). Os valores estão expressos pela média do número de macho, fêmeas e número total de vermes da espécie *T. colubriformis* encontrados no ID dos caprinos dos grupos Controle, Acácia e Acácia + PEG após necropsia, acompanhada do desvio padrão..... 49

Figura 9: Perfil hematológico de linfócitos do sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após infecção; (D+30) - 30 dias após infecção 50

Figura 10: Número de linfócitos CD4⁺ produtores de IFN- γ presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos T CD4⁺IFN⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após infecção; (D+30) - 30 dias após infecção. 52

Figura 11: Número de linfócitos CD4⁺ produtores de IL-4 presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos T CD4⁺IL-4⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após infecção; (D+30) - 30 dias após infecção 53

Figura 12: Número de linfócitos CD4⁺ produtores de IL-10 presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos T CD4⁺IL-10⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após infecção; (D+30) - 30 dias após infecção..... 54

Figura 13: Número de linfócitos CD8⁺ produtores de IFN- γ presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após infecção; (D+30) - 30 dias após infecção..... 55

Figura 14: Número de linfócitos CD8⁺ produtores de IL-4 presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos T CD8⁺IL-4⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após infecção; (D+30) - 30 dias após infecção 56

Figura 15: Número de linfócitos CD8⁺ produtores de IL-10 presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos T CD8⁺IL-10⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período

de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após infecção; (D+30) - 30 dias após infecção 57

Figura 16: Número de linfócitos CD21⁺ produtores de IL-10 presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos B CD21⁺/IL-10⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após infecção; (D+30) - 30 dias após infecção 58

Figura 17. Avaliação da expressão de (CD4⁺IFN- γ ⁺ (A); CD4⁺IL-4⁺ (B); CD4⁺IL-10⁺ (C); CD8⁺IFN- γ ⁺ (D); CD8⁺IL-4⁺ (E); CD8⁺IL10⁺ (F); CD21⁺IL-10⁺ (G)) em cultura de linfócitos de caprinos não infectados estimulados (EST-AgBr n= 18) com antígenos antígeno bruto e em culturas controles (CC n=18). Os resultados estão expressos por percentual de células positivas para as moléculas avaliadas..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise bromatológica da casca de <i>A. mangium</i> expressos em g/kg de matéria seca.	33
Tabela 2: Análise de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados na casca de <i>A. mangium</i>	34
Tabela 3: Painel de anticorpos monoclonais usados na imunofenotipagem de células mononucleares do sangue periférico de caprinos.	41
Tabela 4: Eficiência da administração de Acácia e Acácia+PEG sobre a redução da carga parasitária de <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i> de caprinos. Valores determinados a partir da fórmula Coles et al (1992): $100 \times [1 - (\text{média do grupo tratado} / \text{média do grupo controle})]$	49

RESUMO

O desenvolvimento da caprinocultura sofre grandes prejuízos em decorrência das infecções por nematóides gastrointestinais e o principal método de controle, o uso dos anti-helmínticos sintéticos, enfrentam problemas devido à crescente seleção de populações de nematóides resistentes, tornando imprescindível a busca por novos métodos de controle. Os metabólitos secundários presentes em várias plantas com propriedades bioativas representam uma alternativa promissora para o controle da verminose dos pequenos ruminantes, podendo atuar de forma direta ou indireta sobre os parasitos. O objetivo deste trabalho foi determinar se a suplementação com o pó da casca da Acacia mangium, planta rica em Taninos condensados (TC), estimularia um padrão de resposta imune em caprinos, e conseqüentemente afetaria a infecção por Haemonchus contortus e Trichostrongylus colubriformis. Este experimento foi realizado com 18 caprinos, inicialmente livres de infecção helmíntica, que foram distribuídos em três grupos: I - controle (n=6), II - Acácia (n=6) e III - Acácia+PEG (n=6). Os animais dos grupos II e III receberam junto com o concentrado (88% farelo de milho e 12% farelo de soja) suplementação com pó da casca de A. mangium (100mg TC /Kg PV), e o grupo III recebeu também tratamento adicional de A. mangium com 10 g de polietilenoglicol. Após 15 dias do início da administração da planta todos os animais foram infectados por via oral com um pool de 12.000 larvas L3 de H. contortus e T. colubriformis. Após 35 dias de infecção os animais foram sacrificados e a carga parasitária de abomaso e intestino delgado foi avaliada. Ao longo de experimento amostras de sangue e fezes foram coletadas para determinação de parâmetros imunológicos e parasitológicos. Os resultados revelaram que a suplementação alimentar com A. mangium promoveu mudanças no perfil imunológico dos caprinos, aumentando o número de linfócitos TCD4⁺ produtores de IL-4 e TCD8⁺ produtores de IL-4 e IFN- γ circulantes; além disso, a suplementação com A. mangium também foi eficiente em promover a redução da carga parasitária de vermes adultos de T. colubriformis, apesar de não impedir o estabelecimento da infecção por H. contortus e T. colubriformis. Estes resultados demonstram que a A. mangium possui propriedades bioativas que induzem uma resposta imune associada ao controle de infecções helmínticas.

Palavras chaves: ruminantes, polifenóis, infecções helmínticas

ABSTRACT

The development of goat breeding is largely impaired by losses due to gastrointestinal nematodes infection and the main control method, the use of synthetic anthelmintics face problems due to the growing selection of resistant populations of nematodes, making it imperative to search for new methods of control. The secondary metabolites present in several plants with bioactive properties represent a promising alternative for the control of worms parasites of small ruminants and may act directly or indirectly on the parasites. The aim of this study was to assess whether food supplementation with the powdered bark of Acacia mangium, a plant rich in condensed tannin (TC), would stimulate a pattern of immune response in goats, and consequently affect the experimental infection with Haemonchus contortus and Trichostrongylus colubriformis. This experiment was carried out with 18 goats, initially free of helminth infection, that were distributed in three groups: I - control (n = 6), II - Acacia (n = 6) and III - Acacia + PEG (n = 6). The animals in groups II and III received together with the concentrated (88% corn meal and 12% soybean meal) supplementation with bark of A. mangium (CT 100mg / kg BW), and the group III also received additional treatment of A. mangium with 10 g of polyethylene glycol. Fifteen days after the begin the administration of the plant, all animals were infected orally with a pool of 12,000 L3 larvae of H. contortus and T. colubriformis. After 35 days of infection the animals were euthanized and parasite burden of abomasum and thin intestine was determined. Blood samples and feces were collected for determination of immunological parasitological and parameters throughout the experiment. Our results showed that supplementation with A. mangium promoted changes in the immune profile of goats, inducing the increase of the number of circulating CD4⁺ T lymphocytes producing IL-4 and CD8⁺ T producing IL-4 and IFN- γ . Moreover, the supplementation with A. mangium demonstrated to be also effective for reducing the burden of parasitic adult worms of T. colubriformis despite it not prevented the establishment of infection and H. contortus and T. colubriformis. These results suggest that A. mangium may present bioactive property that induce an immune response associated with the control of helminth infections.

Key-words: ruminants, polyphenols, helminth infections

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caprinocultura

A produção de caprinos é uma atividade com grande importância econômica e social, principalmente na região nordeste do Brasil, onde é exercida tipicamente por pequenos produtores e tradicionalmente explorada com tecnologia menos especializada, sendo historicamente um meio de subsistência nas áreas economicamente debilitadas, fornecendo alimento e renda para muitas famílias (IBGE 2006).

A maior concentração dos rebanhos de caprinos no Brasil encontra-se na região Nordeste, que detém 90,98 % do rebanho nacional (IBGE 2011). A criação de caprinos nesta região é praticada desde a colonização, principalmente devido esses animais serem bem adaptados às condições ambientais e climáticas deste local (EMBRAPA 2005; SEAPA 2006). O Brasil é o décimo sexto criador mundial de caprinos, com um efetivo de aproximadamente 9,38 milhões de cabeças (FAO 2011).

Apesar da caprinocultura ser uma atividade exercida principalmente por pequenos produtores, possui um enorme potencial econômico, pois a carne destaca-se pela sua qualidade nutritiva devido aos baixos teores de colesterol e gorduras, sendo inclusive mais magra que a carne de frango, possui sabor característico e maciez, apta a atender um consumidor que se preocupa cada vez mais com sua saúde e bem-estar (Guimarães & Holanda 2002). As peles de caprinos são também um subproduto importante da pecuária de corte, pois fornecem matéria prima para as indústrias de vestuário e de calçados (Couto Filho 1999). Outro grande destaque são os produtos lácteos: o leite de cabra possui 20% mais cálcio e até 30% menos colesterol que o leite de vaca, possuindo menor teor de açúcar e teores semelhantes de proteínas e vitaminas (Alves 2002). Estes fatores incentivam o crescimento da caprinocultura e o interesse comercial pelos seus produtos.

Apesar do crescimento do rebanho em função do aumento do consumo de carne e leite, a produção ainda não atende se quer a demanda nacional (Censo Agropecuário 2006). Isso ocorre devido a diversos fatores que limitam o desenvolvimento da caprinocultura, entre os quais se destaca as endoparasitoses gastrintestinais (Pinheiro et al. 2000; Molento 2004; Sotomaior 2007).

As parasitoses que acometem a criação de caprinos, promovendo perdas significativas a esta atividade (Gzada 2006). As eimerioses e as helmintoses estão entre as endoparasitoses de maior importância na criação de pequenos ruminantes. As eimerioses são ocasionadas por espécies de coccídios do gênero *Eimeria* (Fitzgerald 1980; Foreyt 1990); e são caracterizadas

por alterações gástricas, apatia e anorexia que podem culminar com a morte dos animais infectados (Lima 1992; Vieira 2000). As helmintoses são causadas por parasitos pertencentes às classes Nematoda, Cestoda e Trematoda, tendo como os principais gêneros parasitas: *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides*, *Moniezia*, *Cooperia*, *Oesophagostomum*, *Skrjabinema*, *Trichuris* e *Cysticercus* (Athayde et al. 1996; Vieira 2005). Sendo que os nematóides gastrintestinais, pertencentes à família Trichostrongylidae, destacam se como principais responsáveis pelos prejuízos a criação de pequenos ruminantes (Amarante 2004; Santos 2004; Vieira 2005).

1.2 Parasitoses por nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes

As infecções por nematóides gastrointestinais (NGI) assumem grande importância na caprinocultura, pois representam um dos mais graves problemas sanitário que acomete os pequenos ruminantes chegando a inviabilizar economicamente a criação, devido à queda nos índices de produção e reprodução (Papadopoulos et al. 2001; Rinaldi 2007; Vieira 2008). Dentre as parasitoses observadas em caprinos e ovinos, as mais importantes são as parasitoses gastrintestinais, sendo que os caprinos são mais afetados do que os ovinos (Costa 2009). A maior frequência da doença em caprinos do que em ovinos pode estar associada ao hábito alimentar desses animais que, por preferirem forrageiras arbustivas, não foram expostos durante sua domesticação a altas infecções parasitárias (Costa Júnior et al. 2005).

Quando ambas as espécies pastejam gramíneas em forma conjunta, é possível perceber que os caprinos possuem menor habilidade em desenvolver uma resposta imune contra os nematódeos, demonstrando sua maior sensibilidade às infecções (Torres-Acosta & Hoste 2008). Outro fator que pode também estar envolvido com a maior incidência da doença em caprinos é que estes são tratados com anti-helmínticos de forma semelhante aos ovinos, quando o correto seria que fossem estabelecidas doses específicas para espécie animal, uma vez que caprinos metabolizam mais rapidamente determinados fármacos (Csiro 1994). Considerando as particularidades de cada espécie, estudos mais aprofundados para caprinos são essenciais para que sejam propostos métodos mais eficientes de controle (Hoste et al. 2010).

Os efeitos do parasitismo pelos NGI variam de acordo com a espécie de parasito, intensidade da infecção e estado do hospedeiro. Os principais impactos do parasitismo são evidenciados pela perda em índices de produção como diminuição da produção de leite, diminuição do ganho de peso, mortalidade dos animais, principalmente em animais mais

susceptíveis, além de custos com medicamentos e mão de obra (Mota et al. 2003; Cezar et al. 2008). Dentre os nematoides gastrintestinais que acometem os pequenos ruminantes no Brasil, destacam-se o *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei* no abomaso; *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides papillosus*, *Cooperia sp.* e *Bunostomum sp.*, no intestino delgado; e *Oesophagostomum colubianum*, *Trichuris sp.* e *Skrjabinema sp.*, no intestino grosso sendo considerados os nematódeos de maior importância econômica para a exploração de caprinos e ovinos (Costa & Vieira 1984; Amarante 2001; Silva et al. 2003; Viana 2008, Vieira et al. 2009).

1.2.1 *Gênero Haemonchus*

Os representantes deste gênero encontram-se distribuídos preferencialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem seu desenvolvimento e transmissão (Fabiyyi 1987). São parasitos hematófagos que habitam o abomaso de ruminantes (Anderson 2000; Hoberg et al. 2004) causando perdas significativas a estes (Waller & Chandrawathani 2005).

Os vermes adultos possuem algumas características morfológicas que permitem sua identificação. Em ambos os sexos existem papilas cervicais muito desenvolvidas e proeminente, localizadas lateralmente na região esofagiana e uma lanceta minúscula no interior da cápsula bucal, cutícula com estriações longitudinais e transversais. As fêmeas apresentam de 18 a 30 mm de comprimento e os machos de 10 a 20 mm (Almeida 1935; Ueno & Gonçalves 1998). Os machos possuem bolsa copulatória trilobada, sendo dois lóbulos laterais grandes e largos e um lóculo pequeno e assimétrico; possui espículos relativamente curtos e fortes providos de ganchos. As fêmeas com vulva localizada no terço posterior do corpo, protegida ou não por expansão cuticular de forma muito variável, com formas que podem ser lisa, botão e linguiforme (Le Jambre & Whitlock 1968); ovojetor bem desenvolvido, útero e ovários duplos. Os ovários brancos enrolando-se em espiral ao redor do intestino repleto de sangue. (Lichtenfels et al. 1994).

O gênero *Haemonchus* Cobb (1898) possui várias espécies, no entanto, *H. contortus* é a espécie dominante em termos de prevalência e intensidade de infecção (Costa & Vieira 1984; Silva et al. 1998; Achi et al. 2003). Estudos reportam que *H. contortus* representam em média mais de 80% da carga parasitária de um caprino (Costa & Vieira 1984; Girão et al. 1992; Arosemena et al. 1999). A elevada prevalência de *H. contortus* parece estar associada às condições ambientais favoráveis a manutenção de seu ciclo de vida. Na região Nordeste o

período chuvoso promove elevação significativas na pluviosidade, criando condições ideais de temperatura e umidade para sobrevivência das larvas na pastagem e o seu maior desenvolvimento em menor tempo possível (Silva et al. 2003). A alta capacidade reprodutiva das fêmeas de *H. contortus* é também um fator que favorece sua alta prevalência, um dos mais prolíficos dos nematoides chega a produzir 10 mil ovos/por fêmea/dia causando elevada contaminação das pastagens e re-infecções (Diehl et al. 2004; Vieira et al. 1986; Anderson et al. 1991a).

O *H. contortus* é a principal espécie que parasita ovinos e caprinos no Brasil e possui grande importância pela sua patogenicidade. Este helminto devido ao hábito hematófago provoca uma anemia hemorrágica aguda, sendo que um único verme adulto consome 0,05mL de sangue por dia (Allomby 1973). Um animal com uma infecção elevada (acima de 2.000 parasitos) pode perder 5 a 7% do seu volume de sangue por dia, sendo incapaz de compensar esta perda de sangue, apresentando assim um quadro clínico grave de anemia em um curto espaço de tempo (Anderson et al. 1991b)

A espécie *H. contortus* (Rudolphi 1803) é classificada taxonomicamente como pertencente ao Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongylida, Superfamília Trichostrongyloidea, Família Trichostrongylidae e gênero *Haemonchus* (Blaxter et al. 1998). O ciclo evolutivo do *H. contortus*, descrito por Veglia (1915) é direto (Figura 1). As fêmeas são ovíparas prolíferas, eliminam seus ovos junto com as fezes do hospedeiro e em condições ideais os ovos e as larvas se desenvolvem no ambiente até larvas de terceiro estágio infectante (L3), em aproximadamente 5 dias. Do ovo eclode uma larva rhabditiforme (L1) que irá se desenvolver para L2 também rhabditiforme. Nos dois primeiros instares, denominados L1 e L2, a larva alimenta-se de bactérias encontradas no bolo fecal do hospedeiro. Quando inicia sua transformação para o 3º estágio (L3 ou larva infectante), ocorrem grandes modificações morfológicas: o vestíbulo bucal perde sua primitiva forma cônica, o esôfago passa do antigo tipo rhabditiforme para um novo tipo, chamado filariforme, a cutícula velha se desprende, mas não é abandonada, continua a envolver a larva e mantém-se destacada da nova pele, como uma bainha protetora, a larva de terceiro estágio não se alimenta. A larva infectante é bastante móvel e migra para a pastagem. A temperatura ótima para a sobrevivência das larvas é de 18 a 26°C (Onyiah & Arslan 2004). Em baixas temperaturas as larvas sobrevivem por longos períodos devido ao seu baixo metabolismo e reservas energéticas. A umidade é também um fator importante para a sobrevivência da larva (Arosemena et al. 1999). A irrigação de pastagens pode influenciar na disponibilidade de L3, sendo encontradas em grande número em pastagens irrigadas durante o verão com temperaturas em torno de 24°C (Krecek al.

1991). Os ruminantes se infectam ao ingerir larvas infectantes L3 durante o pastejo. Ao passar pelo rúmen a bainha protetora da L3 é removida. A larva passa para o abomaso e penetra na mucosa onde atinge o quarto estágio (L4) após 48 horas. A larva de 4º estágio (L4) retorna ao lúmen do abomaso e muda para L5, em seguida atinge o estágio adulto, diferenciado em macho e fêmea. A partir da L4 os vermes desenvolvem a lanceta perfurante, que lhes permite a obtenção do sangue dos vasos da mucosa do abomaso, local de fixação do parasito. Quando adultos, movem-se livremente na superfície da mucosa do abomaso dos animais. O período pré-patente geralmente é de duas a três semanas (Soulsby 1987; Zajac 2006).

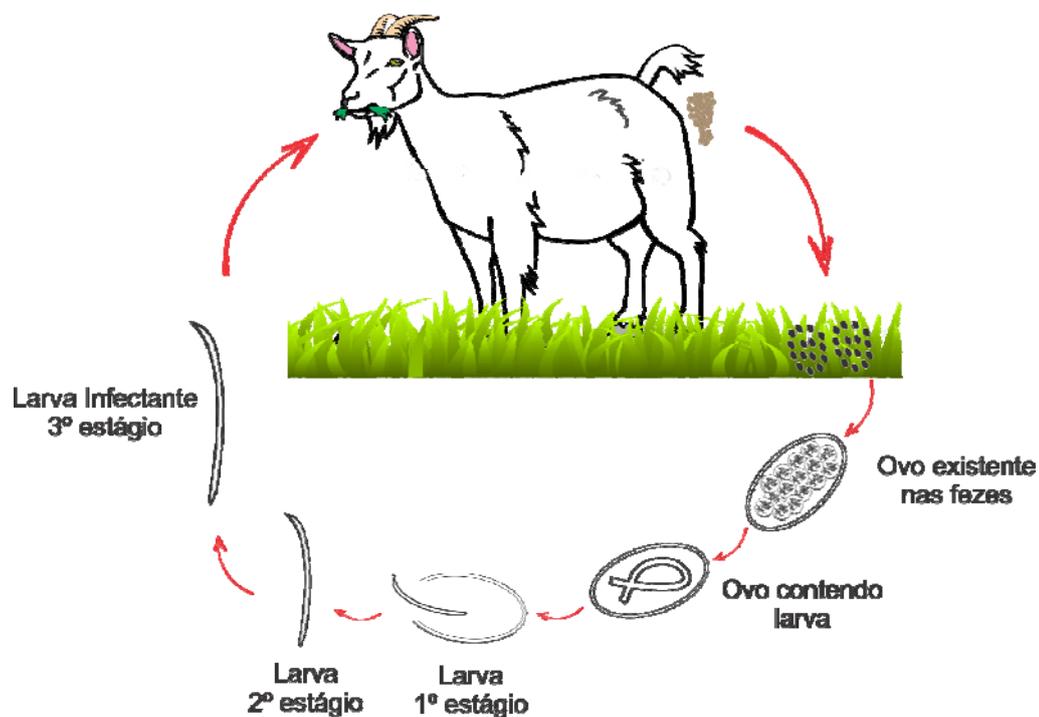


Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de vida de nematoides gastrintestinais de ruminantes.

Os animais infectados por esse nematoide apresentam geralmente perda de peso, desidratação, anemia e formação de edemas submandibulares, em virtude da diminuição na concentração de proteína total sérica (hipoproteïnemia) especialmente da albumina, causando hipoalbuminemia. Os animais mostram-se fracos, debilitados, apáticos e com pequeno ganho de peso e redução progressiva do volume globular, e geralmente não ocorre diarreia (Freitas 1982; Cavalcante et al. 2009). Na fase aguda ocorre geralmente uma anemia moderada,

gastroenterite catarral, desidratação, retardo de desenvolvimento e crescimento. Na fase crônica, observa-se debilidade orgânica geral, edema submandibular e ventral, diminuição significativa na produção de leite e carne, emagrecimento e anemia acentuada, podendo ser acompanhada de morte. (Santa Rosa, 1996).

1.2.2 *Gênero Trichostrongylus*

O gênero *Trichostrongylus* Loss (1905) possui várias espécies, sendo a grande maioria destas, parasitas do intestino delgado de ruminantes (Audebert et al. 2002). O gênero *Trichostrongylus* aparece como o segundo mais prevalente em caprinos e ovinos, sendo que a espécie *T. colubriformis* é a principal responsável por estas infecções (Githigia et al. 2001; Amarante 2004).

Os representantes deste gênero apresentam ciclo de vida bastante semelhante ao do gênero *Haemonchus*, que também é compartilhado pelos demais gêneros da Família Trichostrongilydae. Envolvendo uma fase de vida livre no ambiente, e outra fase parasitária, no hospedeiro (Holmes 1985; Oliveira-Sequeira & Amarante 2001).

Os vermes adultos do gênero *Trichostrongylus* são capiliformes e possuem pequeno porte, são extremamente delgados, dificilmente vistos a olho nu. As fêmeas medem de 5 a 12 mm e os machos, 4 a 8 mm (Ueno & Gonçalves, 1994). Os parasitos machos possuem bolsa copuladora bem desenvolvida com gubernáculo navicular e espículos curtos e espessos, de coloração acastanhada. Já as fêmeas apresentam ovários com ductos ovejetores bem desenvolvidos e vulva na metade posterior do corpo, sem apêndices vulvares, além de uma cauda curta e afilada abruptamente, podendo eliminar após a cópula até 600 ovos por dia nas fezes (Dobson et al. 1990; Amarante et al. 2007).

Quanto à patogenia, altas cargas parasitárias podem gerar graves enterites com deformação e achatamento das vilosidades, erosão do epitélio intestinal, espessamento de mucosa, além de infiltrados inflamatórios leucocitários (Barker 1973a; Barker 1975) acompanhados de prejuízos à motilidade, fluxo, digestão e absorção de nutrientes (Coop e Angus 1975; Jones 1983; Gregory et al. 1985). As lesões na mucosa intestinal podem ainda provocar perdas de proteínas plasmáticas para o lúmen intestinal, levando a significativas diminuições na concentração de albuminas, com quadros de hipoalbuminemia nos animais (Barker 1973b; Steel et al. 1980). Os sinais clínicos mais observados em infecções maciças

são diarreia, perda de peso e anorexia, que podem levar os animais a morte (Roseby 1973; Kyriazakis et al. 1996; Horak et al. 1968; Larsen et al. 1994).

1.3 Fatores que influenciam a resposta imune do hospedeiro no controle da infecção

A resposta imune do hospedeiro após o contato com o parasito é complexa. Vários fatores estão relacionados para uma resposta imunológica eficiente como: genética, categoria do animal, nutrição, sexo, raça, estado hormonal entre outros, assim como a espécie de parasito e grau de exposição do hospedeiro a este (Amarante et al. 2004; Hoste et al. 2001; Hoste et al. 2008).

Em pequenos ruminantes o número de infecções influencia de forma relevante na capacidade de resposta a infecções helmínticas. Pérez (2003) observou que cabras sujeitas à reinfecções produziam um número maior de linfócitos, células B e anticorpos, que seriam essenciais na resposta imune contra *H. contortus*, em relação aos grupos sujeitos a uma única exposição.

O fator racial também evidencia diferenças na susceptibilidade às infecções parasitárias em caprinos e ovinos. No Brasil a raça Santa Inês tem se destacado como mais resistente. Bueno et al. (2002) estudaram diferentes raças de ovelhas durante um ano e observaram que a raça Santa Inês foi a mais resistente aos parasitos, enquanto que as raças Suffolk, Ile de France e Poll Dorset demonstraram um grau de infecção intermediário. Bricarello et al. (2005) avaliaram a influência da suplementação proteica na infecção por nematoides e observaram que suplementação resultou em redução dos vermes em ovinos da raça Santa Inês, mas não nos da raça Ile de France. Enquanto, entre as raças de caprinos a raça Anglo-Nubiana tem demonstrado melhor tolerância à verminose gastrintestinal (Costa et al., 2000). Além da variação de resistência observada entre as diferentes raças, existe a ainda dentro de uma mesma raça animais mais resistentes, pois a resposta imunológica de cada animal também é variável, e dentro de uma raça específica, alguns animais são relativamente resistentes e/ou tolerantes e apresentam a resposta imune generalizada e local mais eficiente, quando comparados com animais susceptíveis (Windon 1996; Saddiqi et al. 2011).

A resposta a infecções helmínticas também sofre variações com a idade do hospedeiro, os animais jovens são mais susceptíveis do que os adultos (Girão et al. 1980; Ahid et al. 2008), que são menos predispostos às infecções devido ao desenvolvimento de uma melhor resposta imune. Pesquisadores já observaram que cordeiros de quatro a oito meses de idade

têm menos linfócitos T CD4⁺ circulantes do que ovelhas de três a seis anos (Watson et al. 1994)

O aumento da quantidade de ovos de nematoides eliminados por ovelhas e cabras no período de peri-parto (próximo a parto e durante a lactação) demonstra bem a susceptibilidade do organismo e da sua resposta imune a variações no estado do hospedeiro. Acredita-se que no peri-parto as fêmeas tenham uma queda na imunidade devido à imunossupressão de origem endócrina decorrente de variações hormonais, que permitem o desenvolvimento de larvas em hipobioses e/ou um maior estabelecimento de novas larvas, ou ainda, uma maior fecundidade das fêmeas de nematoides existentes levando ao aumento do número de ovos eliminados nas fezes (Barker 1975; Stear et al. 1997)

O estado nutricional também é considerado um importante fator de equilíbrio na relação parasito-hospedeiro, assim como na patogênese da infecção parasitária. Animais que receberam em sua dieta uma suplementação proteica tem maior resiliência, suportando de melhor forma os efeitos da infecção (Bambou et al. 2011). A suplementação que promove uma melhora nutricional do hospedeiro representa uma forma importante de manter o animal saudável e produtivo e representa uma forma de compensar os custos da infecção. Durante a infecção os parasitos podem lesionar tecidos e ao reparar a lesão, o organismo utiliza as proteínas da dieta, que usualmente seriam destinadas para a manutenção, desenvolvimento e reprodução do animal. Além desses fatores, a proteína da dieta pode ser desviada para contribuir com a resposta imune (Houdijk et al. 2001). Desta maneira, os animais parasitados necessitam de uma quantidade extra de proteínas metabolizáveis para que a produtividade não seja afetada, reparando os danos da infecção (Rocha et al. 2011).

1.4 Resposta imunológica a infecções por helmintos

As infecções por helmintos e as respostas imunológicas do hospedeiro a estas são resultados da extensa coevolução dinâmica entre hospedeiro e parasito, onde o hospedeiro aprimora a resposta imune à infecção para promover uma rápida eliminação do parasita, e pelo outro lado o parasita desenvolve estratégias que visam retardar este processo de rejeição e garantir a sobrevivência e distribuição de seus descendentes (Anthony et al. 2007).

Os helmintos chegam a ser chamados de "mestres da imunomodulação" (Maizels et al. 2004), haja vista a capacidade que estes organismos desenvolveram para persistir no hospedeiro "ludibriando" seu sistema imune, como ocorre nas infecções por *H. contortus* e *Nippostrongylus brasiliensis*, em que através da produção de cistina modulam a apresentação

antigênica as células T, por inibição das proteases de cisteína, envolvidas no processamento do antígeno (Dainichi et al. 2001; Newlands et al. 2001).

Os hospedeiros também se utilizam de uma série de ferramentas para combater os invasores, e recorrem tanto à resposta imune inata com a adaptativa para fazer frente às infecções helmínticas. A imunidade inata se utiliza de barreiras anatômicas e fisiológicas, células e componentes humorais para controlar a infecção. As barreiras anatômicas e fisiológicas são constituídas pela pele intacta, constituintes das secreções do organismo, como lágrimas e salivas, e mecanismos mucociliares. As células envolvidas na imunidade inata incluem células como: macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, células *natural killer* (NK) entre outras (Turvey & Broide 2009).

Em infecções por nematóides gastrointestinais algumas destas barreiras são observadas a partir da hipermotilidade gástrica, hipersecreção e hiperplasia das células calciformes e subsequente aumento da produção de muco, além da mobilização e ativação de eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e sistema complemento para a área da infecção, que podem conseqüentemente estimular a resposta imune adquirida (Miller 1996; Meeusen & Balic 2000b; Balic et al. 2002).

A resposta imune adquirida auxilia a resposta inata na eliminação dos patógenos e é desenvolvida apenas após a apresentação ao antígeno e envolve componentes celulares e humorais, sendo que os linfócitos T e B são as principais células de defesa que mediam esta imunidade (Turvey & Broide 2009).

Vários perfis imunes de células T já foram caracterizados, dentre eles estão os perfis Th1, Th2, Th17 e T regulador (Treg) (Mosmann et al. 1986; Mosmann & Sad 1996; Boyton et al. 2002). A diferenciação dos perfis imunes de células T é definida predominantemente pelas citocinas do microambiente e pela interação do receptor de célula T com o antígeno (Boyton et al. 2002). O perfil Th1 é caracterizado pela produção de IFN- γ e está envolvido na imunidade celular a patógenos intracelulares. A IL-12, produzida por macrófagos e células apresentadoras de antígeno, assim como o IFN- γ produzido pelas células NK e células T, induzem a diferenciação do perfil Th1 (Boyton et al. 2002). A produção de IFN- γ antagoniza os mecanismos que induzem a diferenciação do perfil Th2 (Ansem et al. 2009).

As células do perfil Th2 produzem principalmente citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e IL-5 e participam na imunidade humoral, estimulando a produção de anticorpos em infecções helmínticas e outros patógenos extracelulares. As citocinas do perfil Th2, principalmente IL-4 podem inibir os mecanismos de diferenciação do perfil Th1 (Ansem et al. 2009). A IL-33 é também uma importante citocina para indução do perfil Th2. A IL-33 é produzida por células

T CD4⁺, T CD8⁺, NK-T, basófilos, eosinófilos e mastócitos (Barner et al. 1998; Emson et al. 1998; Gessner et al. 2005; Anthony et al. 2007) atua como uma importante citocina quimioatrativa e indutora de células Th2, pois aumenta a produção de IL-4, IL-13 e IL-5 (Komai-Koma et al. 2007). Além de promover uma importante interação entre a imunidade inata e adaptativa frente à infecção por diferentes nematódeos intestinais (Humphreys et al. 2008).

O perfil imune Th17 é induzido pelo fator transformador do crescimento (TGFβ), juntamente com IL-6, IL-21 e IL-23. O perfil Th17 é caracterizado pela produção de IL-17 e IL-22 e participam na defesa contra bactérias e fungos extracelulares, principalmente na superfície de mucosas (Chen et al. 2007). Já o perfil Treg, caracterizado pela expressão do fator Foxp3 e produção de IL-10 (Khattry et al. 2003; Fontenot et al. 2003) exerce uma função essencial na manutenção da homeostase imune, regulando as respostas T efectoras, como Th1 e Th2, prevenindo seus potenciais efeitos patogênicos (Vignali et al. 2008 ; Shevach 2009; Kim et al. 2007).

A IL-10 é uma importante citocina que pode ser produzida por diferentes tipos celulares, como: Th0, Th1, Th2, linfócitos B, mastócitos e monócitos, dependendo das condições do microambiente inflamatório. A IL - 10 possui propriedades anti - inflamatórias potentes que desempenha um papel central na resposta imune do hospedeiro, com efeitos supressores potentes na prevenção da doença (Saraiva & O'Garra 2010; Iyer & Cheng 2012).

A imunidade humoral é mediada por anticorpos, que são produzidos por linfócitos B, os anticorpos neutralizam os agentes infecciosos como microrganismos extracelulares e toxinas bacterianas (Maglione et al. 2009).

Em pequenos ruminantes o que se conhece sobre resposta imune a infecções por NGI é oriundo de estudos realizados principalmente em ovinos (Jackson & J.Miller 2006). Apesar da similaridade do parasitismo gastrointestinal de ovinos com caprinos, poucos estudos têm investigado a resposta contra a infecção por nematoides neste modelo (Hoste et al. 2010). Em ovinos a resposta imune é mediada por proliferação de mastócitos, eosinófilos e leucócitos glóbulares na mucosa do abomaso (Meeusen et al. 2005), assim como pela a expressão aumentada de citocinas de tipo Th2 e de imunoglobulinas A (IgA) e E (IgE) parasitos específicas (Gill et al. 2000; Shakya et al. 2009).

A presença de células inflamatórias e de anticorpos IgA específicos contra nematóides do abomaso tem sido inversamente associadas à intensidade de infecção, sugerindo que estas inviabilizam o desenvolvimento de NGI ou a fecundidade dos parasitos (Balic et al. 2006). Na resposta imune contra a hemoncose IgA e IgG1 atuam neutralizando ou inativando enzimas

metabólicas vitais para o *H. contortus*. Gill et al. (1993) e Miller (1996) sugeriram também a participação de ambas imunoglobulinas nas reações de hipersensibilidade, associada à desgranulação eosinofílica (Abu-Ghazaleh et al. 1989). A IgE específica também desempenha papel importante na resposta à infecção por helmintos (Jarret & Miller 1982; Hagan 1993; Pritchard 1993).

É amplamente aceito que helmintos e seus antígenos induzem no hospedeiro uma resposta imune adquirida do tipo Th2. Um bom exemplo deste padrão de resposta nas infecções helmínticas foi observado na resposta de bovinos infectados naturalmente com *Fasciola hepatica*, que tiveram um aumento significativo de IL - 4 e IL - 10, caracterizando um perfil com polarizam de resposta para Th2 (Mendes et al. 2013). Entretanto, em algumas infecções helmínticas o hospedeiro pode apresentar uma resposta imune celular mista Th1/Th2 para melhor controlar as infecções e os efeitos da resposta imune sobre o próprio hospedeiro, como é o caso das infecções por Ancilostomídeos e *Schistosoma* em humanos (Hoffman et al. 2000; Geiger et al. 2004; Gryseels et al. 2006).

A dicotomia Th1/Th2 parece também existir em ruminantes. Gill et al. (2000) observou em seu estudo com ovinos que o aumento da secreção de IL-5 de células isoladas de linfonodos estimulados com antígeno do parasito foi associado com uma diminuição na secreção de IFN- γ . Gill et al. (1993) realizou o primeiro estudo a confirmar o papel da ativação de linfócitos TCD4⁺ na resistência a infecções por *H. contortus* no sangue periférico de ovinos. Este estudo evidenciou também a importância dos linfócitos TCD4⁺ na amplificação e regulação do recrutamento, diferenciação e proliferação de eosinófilos, mastócitos, leucócitos globulares e imunoglobulinas.

Em ovelhas geneticamente resistentes a *T. colubriformis* também tem sido registrada uma resposta de citocinas do tipo Th2, como IL-4 nos tecidos linfáticos do trato gastrointestinal e no sangue periférico (Pernthaner et al. 1997).

1.5 Resposta imunológica de caprinos a infecções por nematoides gastrintestinais

Os poucos estudos realizados em caprinos revelam que a resposta imunológica de caprinos a infecções por *H. contortus* ocorre de forma mais efetiva após um tempo maior de infecção e as re-infecções são essenciais para o melhor estabelecimento de células de defesa. A presença de leucócitos globulares no local da infecção, principalmente em infecções crônicas, parece ter importância crucial na imunidade protetora contra *H. contortus* em caprinos. Outras células também parecem atuar na defesa e tem sido encontradas no hospedeiro no período que coincide com a redução da carga parasitária, como linfócitos T

CD3⁺, células B e imunoglobulinas tipo IgG, além de eosinófilos e mastócitos (Pérez et al. 2003). Em caprinos a resposta imune envolvendo ativação de IgE parece ter um importante papel contra L3 de *H. contortus* e tem sido associada à resistência a NGI (Chevrotière et al. 2011).

Paolini et al. (2003a) também demonstrou a presença de leucócitos globulares na mucosa abomasal de caprinos infectados e observou uma relação negativa entre leucócitos globulares presentes na mucosa abomasal e número de *H. contortus*. Da mesma forma, os mastócitos têm sido reportados como importantes elementos para resposta imune local contra nematóides tanto em caprinos com em ovinos.

A resposta imune em caprinos resistentes e susceptíveis também tem sido estudada, com o intuito de evidenciar os principais elementos envolvidos na defesa do hospedeiro. Bambou et al. (2009) avaliaram a resposta imune periférica de caprinos resistentes e suscetíveis à infecção por *H. contortus* e observaram que a contagem de linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ não variou entre estes grupos no momento 0 e 3 dias após a infecção (DPI), mas 35 DPI os linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ foram mais elevados em animais susceptíveis, enquanto os linfócitos B foram mais baixos nos animais susceptíveis após 3 e 35 dias de infecção. Os autores sugerem que os linfócitos TCD4⁺ em animais resistentes sejam mais ativos no local da infecção, como já foi registrado em estudos com ovinos (Balic et al., 2000a). Quanto ao aumento de linfócitos B nos animais resistentes, sugere-se que o aumento pode ser devido ao não-específico recrutamento de linfócitos através de estímulos inflamatórios induzido pela invasão de tecidos de larvas de *H. contortus*, como já demonstrado em outros estudos, que verificaram um recrutamento inicial de linfócitos B ativados na mucosa abomasal após infecção por *H. contortus* (Balic et al. 2000b; Pérez et al. 2001).

1.6 Métodos de Controle de Nematoides

1.6.1 Uso de anti-helmínticos

Usualmente, a principal ferramenta utilizada para controle desses parasitos são medicamentos anti-helmínticos sintéticos. A maioria dos anti-helmínticos disponíveis no mercado foi desenvolvida a partir da década de 60 e se tornaram peças fundamentais no controle da verminose. Dentre as principais bases químicas utilizadas estão as lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas), imidatiazóis (cloridrato de levamisol) e benzimidazóis (albendazole, mebendazol etc) (Vieira & Cavalcante 1999; Molento 2004; Vieira 2008; Melo et al. 2003).

A utilização desses fármacos foi, em parte, responsável pelo aumento na produtividade dos rebanhos. Entretanto, o uso indiscriminado dessas bases por parte dos produtores, teve como consequência a seleção de nematoides resistentes aos diferentes grupos químicos utilizados no tratamento dos animais (Amarante et al. 1992; Vieira & Cavalcante 1999; Molento 2004; Vieira 2008).

Recentemente foi lançado no mercado, um novo anti-helmíntico o ZOLVIX® (Monepantel), primeiro anti-helmíntico derivado de um novo grupo químico, a aminoacetoneitrila (AADs), como possível solução contra os nematoides resistentes as bases químicas mais antigas (Kaminsky et al. 2008). Contudo, apesar do pouco tempo de atuação deste composto, relatos de resistência já têm sido registrados (Scott et al. 2013).

1.6.2 Resistência

Adota-se como conceito de resistência o aumento significativo de indivíduos que não são afetados por doses do composto químico que seriam letais para a maioria da população de indivíduos sensíveis da mesma espécie (Vieira 2008). A resistência também é caracterizada quando não se verifica redução de adultos ou ovos excretados nas fezes após as vermifugações (Silvestre et al. 2002).

Em todos os continentes já existem registros de resistências às bases químicas disponíveis no mercado, incluindo a resistência a várias bases simultaneamente (Molento & Prichard 1999; Kaplan 2004). No Nordeste do Brasil, as primeiras suspeitas de nematoides gastrintestinais de caprinos resistentes aos anti-helmínticos datam da década de 1980 (Vieira 1986). Vieira et. al. (1999) verificaram resistência de *H. contortus* aos benzimidazóis, configurando-se desse modo, como o primeiro relato especificando o grupo químico de anti-helmíntico e espécie. Após isso, diversos casos de resistências a outros grupos químicos e normalmente até resistência a mais de um grupo químico foram registrados em todo o país (Molento 2005).

1.6.3 Métodos adicionais de controle

Em decorrência da resistência amplamente difundida aos anti-helmínticos sintéticos, uma busca constante por métodos adicionais de controle têm sido desenvolvida (Hay et al. 1997). Alguns dos controles parasitários adicionais incluem o controle integrado, controle biológico, seleção genética, nutrição, homeopáticos, vacinas e fitoterapia (Meeusen 1996; Larsen 1999; Butter et al. 2000; Cezar et al. 2008).

O controle integrado consiste na adoção de um conjunto de medidas estratégicas, que visam principalmente reduzir a contaminação dos animais e da pastagem, assim como manter

a eficácia das drogas antiparasitárias. O uso de pastejo rotacionado e integrado entre diferentes espécies animais e descontaminação prévia das pastagens estão entre as medidas adotadas por este método de controle (Fernandes et al. 2004; Rocha et al. 2008).

O controle biológico tem sido outro método alternativo bastante estudado, que reporta a atividade parasiticida realizada por agentes como bactérias, insetos e fungos (Molento 2004). Dentre os agentes utilizados no controle biológico os fungos tem apresentado resultados mais significativos. Trabalhos reportam alta eficiência de fungos nematófagos em condições *in vitro* e *in vivo* (Padilha 1996; Mota et al. 2003; Chandrawathani et al. 2004; Graminha et al. 2005; Araújo et al. 2007). Embora já se tenha demonstrado os fungos nematófagos como uma alternativa viável de controle biológico, a ausência de formulações que permitam a sua comercialização em larga escala e custos compatíveis com os benefícios ainda é um fator limitante deste método de controle (Cezar et al. 2008).

O uso de animais resistentes é também uma alternativa de controle. Dentro de um rebanho existem animais denominados resistentes, ou seja, que são capazes de suprimir o estabelecimento de parasitos, e a identificação e seleção de raças ou indivíduos com esta característica pode ser uma forma alternativa complementar para o controle de nematódeos (Vieira 2003; Waller 1997). Alguns estudos evidenciam este fenômeno, Moraes et al. (2000) observaram que ovelhas da raça Santa Inês mostraram-se mais resistentes à infecção natural por tricostrongilídeos que as da raça Suffolk. Os cordeiros da raça Santa Inês também demonstraram maior resistência às infecções por nematódeos gastrintestinais quando comparados a cordeiros Suffolk e Ile de France (Amarante et al. 2004). Da mesma forma, no período do periparto, ovelhas Santa Inês apresentaram maior resistência que ovelhas Ile de France (Rocha et al. 2004). Além da diferença entre as raças no que diz respeito à suscetibilidade à verminose, verifica-se também a existência de animais com maior ou menor resistência a essa doença dentro de cada raça e a seleção dos animais menos susceptíveis dentro de cada raça, possibilita a formação de rebanhos com maior resistência às verminoses (Gray et al. 1987)

Quanto à homeopatia, no geral poucos são os resultados positivos (Veríssimo, 2008), sendo os tratamentos homeopáticos na maioria das vezes considerados como não detentores de atividade anti-helmíntica, possibilitando apenas ao hospedeiro suportar melhor a infecção (Cabaret et al. 2002). Cavalcanti et al. (2007) demonstrou que o tratamento de cordeiros sem raça definida, com os produtos homeopáticos não reduziu o OPG, mas proporcionou aumento significativo de peso, em relação ao grupo controle que não recebeu o medicamento. Alberti

et al. (2005) avaliaram o uso de homeopáticos em 10 ocasiões sobre nematódeos de ovinos, sem verificar nenhuma diferença estatística entre tratamento e controle. Entretanto, estudos realizados por Cruz et al. (2006) utilizando homeopático em caprinos sem raça definida, por período de 84 dias ininterruptos, constataram que o produto foi eficaz em reduzir o número de ovos por grama de fezes no 84º dia, em relação aos grupos que receberam outros tratamentos, esses resultados permitem relatar que a ação dos produtos homeopáticos ocorre de maneira lenta e progressiva, restabelecendo o equilíbrio do organismo e não a cura imediata da enfermidade.

O desenvolvimento de vacinas pode também representar uma alternativa para estimular ou aumentar a imunidade adquirida do hospedeiro para controle de nematoides gastrintestinais em ruminantes. Os principais candidatos antigênicos utilizados na produção de vacinas têm sido proteínas extraídas a partir do intestino de parasitos adulto ou de produtos de excreção/secreção (ES) (Newton & Munn 1999; Vervelde et al. 2003). Nisbet et al. (2013) testaram oito proteínas recombinantes, baseadas em produtos ES de *Teladorsagia circumcincta* e observaram que estes candidatos vacinais foram capazes de induzir elevados níveis de proteção (redução de até 92% em contagens fecais de ovos (FEC) e redução de até 75% da carga parasitária) em ovinos. Roberts et al. (2013) produziu Aminopeptidase H11, uma glicoproteína de membrana presente no intestino de *H. contortus*, através de expressão recombinante de proteínas usando *Caenorhabditis elegans* e testou em ovinos infectados com *H. contortus*, contudo a H11 recombinante não foi capaz de promover imunização dos ovinos e conseqüentemente não promoveu redução da carga parasitária e eliminação de ovos, diferentemente da forma nativa. Estes resultados revelam uma dificuldade na produção de vacinas, pois as formas recombinantes ainda apresentam limitações que interferem significativamente na eficiência do antígeno.

O manejo nutricional do rebanho pode também favorecer o controle parasitário, visto que animais submetidos a baixo nível nutricional tornam-se mais susceptíveis ao parasitismo. Phengvichith & Ledin (2007) alcançaram melhores índices produtivos e menor necessidade de tratamentos anti-helmínticos em caprinos com dieta de alta qualidade proteica e energética quando comparados a outros com dieta nutricionalmente mais pobre.

A fitoterapia é outra alternativa bastante estudada, que consiste na utilização de plantas e seus subprodutos, sendo bastante difundida em várias regiões, inclusive no Brasil para combater nematódeos gastrintestinais de ruminantes (Athanasiadou & Kyriazakis 2004; Costa-Junior et al. 2013). Dentre as vantagens da fitoterapia, considera-se principalmente a

redução de custos com tratamentos, menores impactos ambientais (Vieira et al. 1999) e eficiência em nematóides resistentes. Diversas pesquisas têm revelado o papel promissor de algumas plantas no controle do parasitismo por nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes (Min et al. 2004; Min et al. 2005; Minho et al. 2008ab) levando o interesse cada vez maior ao estudo de plantas e seus princípios ativos.

1.7 Plantas com propriedade bioativas

Durantes muitos séculos as plantas foram usadas no tratamento de doenças e continuam sendo em todo o mundo, o núcleo das soluções tanto em medicamentos humanos como veterinários (Hammond et al. 1997). Estima-se que mais de 30% dos medicamentos recentemente introduzidos são direta ou indiretamente, obtidos a partir de origens naturais (Willcox et al. 2001).

Estudos etnoveterinários revelam uma grande variedade de plantas com propriedades medicinais. No entanto, evidências científicas sobre a eficácia da maioria dos produtos vegetais é limitada, independentemente de sua ampla utilização etnoveterinária. A validação científica da eficácia da planta e avaliação de possíveis efeitos colaterais são necessários antes da sua adoção como um novo método de tratamento (Githiori et al. 2006). Para a maioria das plantas que tem propriedades bioativas os compostos envolvidos nesta função ainda são desconhecidos, pois em geral a composição química é complexa e exige muito estudo até a total identificação.

Para o controle do parasitismo gastrintestinal em pequenos ruminantes, destaca-se o uso de plantas bioativas como alternativa aos anti-helmínticos sintéticos. Em alguns vegetais, os compostos ativos já foram identificados, mas em outros ainda são desconhecidos. Na maioria dos casos, esses compostos são metabólitos secundários dos vegetais (Athanasiadou et al. 2008). Várias pesquisas, em especial com leguminosas e árvores forrageiras, mostram o efeito bioativo dessas plantas contra vários estágios de vida das populações de parasitas (Niezen et al. 1995; Kahiya et al. 2003; Athanasiadou et al. 2005; Martínez-Ortiz-de-Montellano et al. 2010). E os taninos condensados são incriminados como o composto bioativo de grande parte destas plantas (Niezen et al. 1995; Nguyen et al. 2005; Iqbal et al. 2007; Dasgupta et al. 2010; Max 2010; Sadaghian et al. 2011; Azando et al. 2011).

As leguminosas forrageiras constituem um dos principais grupos de plantas taníferas, são boas fonte de alimentação de pequenos ruminantes sendo capazes de aumentar

a sua produtividade, principalmente no período de seca, quando a pastagem sofre um declínio e o potencial produtivo dos rebanhos é limitado (Castro 2005; Monteiro et al. 2009). Considerando as propriedades bioativas e nutricionais das leguminosas forrageiras, estas podem ser chamadas de nutracêutico (Waller e Thamsborg 2004; Hoste et al. 2006; Alonso-Diaz et al. 2010). O termo nutracêutico é conferido a qualquer substância que se comporta como alimento e ao mesmo tempo também fornece benefícios a saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doença (Andlauer & Fürst 2002). Os efeitos nutracêuticos são geralmente obtidos por um relativo consumo a longo prazo (Hoste et al. 2012).

No caso da infecção com nematoides gastrintestinais, o conceito de nutracêuticos tem sido ilustrado por estudos de forragens previamente conhecidas pelos seus valores nutritivos, como as leguminosas (Niezen et al. 1995, 1998ab; Waller e Thamsborg 2004). A integração de nutracêuticos no sistema de produção pode levar a um controle mais sustentável dos NGI promovendo uma redução na frequência de tratamentos químicos, que devem ajudar a reduzir a pressão de seleção de parasitos resistentes (Waller 2006).

A *Acacia mangium* é uma leguminosa tropical rica em proteínas (Man et al. 1995; Van et al. 2005; Salazar et al. 2008) e taninos condensados (Barahona et al. 2003; Wina et al. 2010). Espécie de crescimento rápido, é utilizada para o reflorestamento em regiões tropicais e atua também na regeneração de áreas degradadas devido à sua capacidade de reciclar nutrientes e alta produção de biomassa (Lorenzi 1992; Man et al. 1995). Árvores de Acácia têm em média 35% de taninos (Gujrathi & Babu, 2007), sendo distribuídos em todas as partes da planta, concentrados principalmente na casca do caule (Santana et al. 1997). Espécies deste gênero tem sido alvo de constante pesquisa sobre ação antiparasitária. Extratos de acácia são conhecidos no Brasil como tanino altamente concentrado (TAC). Minho et al. (2004) forneceram a cordeiros uma dieta suplementada com TC oriundo de sorgo (2% de TC) e acácia negra (*A. mearnsii*) (15% de TC), duas vezes por semana. Após 10 semanas de tratamento, houve diminuição significativa na contagem de OPG dos grupos suplementados com taninos condensados ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle. Minho et al. (2010) também observaram que o tratamento de cordeiros com extrato de *A. mearnsii* (extrato comercial produzido por Tannery And Manufacturing Company) reduziu significativamente o número de ovos encontrados nas fezes, assim como também afetou a viabilidade dos ovos, quando comparado com grupo não tratado. Estudos realizados por Max (2010) também avaliaram a eficácia de um extrato rico em TC de *A. mearnsii* (Acácia Negra) fornecendo dose de 1,3 g e 1,6 g TC/ kg de peso corporal por dia durante três dias consecutivos a ovinos e caprinos, mas observaram que apenas nos ovinos houve redução do OPG e da carga

parasitária de *H. contortus*, demonstrando claramente a influência da espécie de hospedeiro na bioatividade de plantas contra os NGI.

Kahiya et al. (2003) também estudaram o efeito de dietas com as leguminosas *Acacia karoo* e *A. nilótica* sobre infecção de *H. contortus* em caprinos e observaram que apenas administração de *A. karoo* reduziu a contagem de ovos, desse verme, demonstrando que espécies do mesmo gênero podem apresentar diferentes atividades biológicas.

1.7.1 *Metabólitos secundários*

O metabolismo vegetal é dividido em primário e secundário. O metabolismo primário está associado com a formação, manutenção e reprodução das plantas. Esse é o caso das proteínas, carboidratos e lipídios. Os metabólitos secundários são derivados biologicamente dos metabólitos primários, as plantas produzem uma série de metabólitos secundários como alcaloides, terpenoides, lectinas, polifenóis entre outros, que não estão diretamente relacionados com crescimento ou reprodução, e são sintetizados pela planta para exercerem atividade de atração de polinizadores, adaptação ambiental e mecanismos de defesa contra nematoídeos fitopatogênicos, insetos ou aves (Peumans & Van Damme 1995; Taiz & Zeigler 2004).

O metabolismo secundário pode ser dividido em três grandes grupos, segundo sua biossíntese: terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos. Cerca de 55.000 terpenoides já foram isolados, estes podem ser subdivididos em várias classes de acordo com o número de átomos de carbono. Os alcaloides, já são conhecidos em torno de 1.200 compostos, sendo que estes apresentam uma ou mais moléculas de nitrogênio e são sintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Os compostos fenólicos ou polifenóis estão presentes em todos os órgãos das plantas e já foram caracterizados mais de 8.000 compostos, que compreendem estruturas diversas variando de moléculas simples como os ácidos fenólicos a compostos cujas moléculas são altamente ramificadas, como os taninos (Croteau et al. 2000).

Dentre os principais metabólitos secundários de plantas que são reportados como detentores de atividade anti-helmíntica, destacam-se monoterpenos (Camurca-Vasconcelos et al. 2007; Macedo et al. 2010; Zhu et al. 2013), cumarinas, saponinas, flavonoides (Hernández-Villegas et al. 2011), lectinas (Ríos de Álvarez et al. 2012 a,b) e taninos condensados (Athanasiadou et al. 2005; Kamaraj & Rahuman 2011; Hoste et al. 2012).

Os polifenóis são alguns dos compostos mais frequentemente descritos na literatura científica. Estes compostos constituem um grupo diversificado de metabolitos de plantas, com

uma estrutura de múltiplos anéis de fenol e, pelo menos, dois grupos hidroxila. São formados por duas rotas bioquímicas diferentes, quer pela via do chiquimato ou vias de acetato/malonato, com outros metabolitos geralmente ligados enzimaticamente. (Quideau et al. 2011; Holderness et al. 2008). Os polifenóis são comumente classificados de acordo com suas estruturas químicas em não flavonóides como ácidos fenólicos ou flavonóides, subdivididos devido ao padrão de hidroxilação e variações no anel cromano em isoflavonas, neoflavonóides, chalconas, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonols, flavonols, proantocianidinas e antocianidinas (Tsao 2010). Numerosos estudos têm atribuído a eles uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória (Recio et al. 2012), antioxidante (Eberhardt et al. 2000), protetor cardiovascular (Andriantsitohaina et al. 2012), ações anti - cancerígena (Spagnuolo et al. 2012), anti-helmíntica (Iqbal et al. 2007; Yoshihara et al. 2013), entre muitos outros (Vauzour et al. 2010).

Atividade antiparasitária de plantas ricas em taninos condensados (TC) tem sido relatada por um número crescente de estudos realizados para verificar, validar e quantificar cientificamente seus efeitos (Min et al. 2004; Min et al. 2005; Minho et al. 2008ab). Trabalhos registram ação de TC promovendo a redução da quantidade de ovos liberados junto com as fezes dos animais infectados e/ou carga parasitária (Minho et al. 2010; Martínez-Ortíz-de-Montellano et al. 2010) como também reduzindo o estabelecimento das larvas infectantes em ovinos e caprinos (Brunet et al. 2008a; Joshi et al. 2011).

1.7.2 *Taninos*

Os taninos são um grupo complexo de compostos polifenólicos encontrados numa vasta gama de espécies de plantas geralmente consumidas pelos ruminantes. (Singh et al. 2003; Frutos et al. 2004). A estrutura e a quantidade de taninos variam de acordo com a planta e as condições ambientais, e no geral apresentando grande variabilidade (Otero & Hidalgo 2004). Os taninos são classicamente distinguidos em dois grandes grupos de acordo com sua estrutura química: os taninos hidrolisáveis (TH) e os taninos condensados (TC). Os taninos hidrolisáveis não são encontrados com muita frequência na natureza, restringindo-se praticamente às espécies de angiospermas dicotiledôneas. São constituídos por uma parte polialcoólica (normalmente a glucose, mas também o ácido quínico, outros fenóis e outros glicósidos) e por uma parte fenólica (ácido gálico) ligados através de uma ligação éster (Khanbabaee et al. 2001). Nos ruminantes, os TH podem ser degradados pelos micro-organismos ruminais e originar compostos potencialmente tóxicos. Acredita-se que a

toxicidade é causada pela absorção dos produtos da degradação e alta concentração de fenóis no sangue, que é maior do que a capacidade de detoxificação do fígado (Makkar et al. 2007).

Os taninos condensados (TC) ou proantocianidinas são polímeros formados por unidades de flavan-3-ol ou flavan-3,4-diol unidas por ligações carbono-carbono (Salunkhe et al. 1990). Com base na natureza dos monômeros constitutivos de TC (flavan-3-ol), quatro sub-classes se distinguem dentro do TC: os prodelfinidinas, procianidinas, prorobetinidinas e profisetinidinas. As procianidinas e prodelfinidinas são as duas principais classes de TC (Bruneton 1993; Mueller-Harvey 2006; Hoste et al. 2012). As diferenças estruturais podem produzir uma infinidade de estruturas químicas que por sua vez afetam as propriedades físicas e biológicas dessas moléculas (Min & Hart 2003). Contudo, não são suscetíveis à degradação enzimática anaeróbica, portanto, são relativamente estáveis no trato digestivo dos ruminantes e raramente tóxicos (Waghorn 2008).

Por muito tempo os taninos foram considerados como “vilões” prejudiciais para ruminantes, contudo hoje se considera que seu efeito pode ser tanto benéfico como maléfico, dependendo do tipo de tanino consumido, estrutura química, peso molecular, quantidade ingerida e a espécie animal em questão (Hagerman & Butler 1991). Altas concentrações de taninos podem reduzir a ingestão voluntária de alimento devido à baixa palatabilidade dos TC, retardamento da digestão e/ou efeitos dos taninos sobre microorganismos ruminais (Frutos et al. 2004). Altas concentrações de TC apresentam importante ação antinutricional devido à formação do complexo TC-proteína salivar durante a mastigação que geram uma sensação de adstringência, diminuindo a palatabilidade e o consumo de alimentos (Otero & Hidalgo 2004). Esses compostos em altas concentrações também diminuem a digestibilidade de matéria seca, matéria orgânica, proteínas, carboidratos e fibras, diminuindo produtividade dos rebanhos (Min et al. 2003).

Alguns estudos evidenciaram que o consumo de espécies de plantas com altos teores de TC (geralmente $> 50 \text{ g kg}^{-1}$ de matéria seca - MS) reduz significativamente o consumo voluntário, enquanto que concentrações baixas a moderadas podem melhorar a utilização digestiva dos alimentos (Barry & Duncan 1984; Waghorn et al. 1994). Barry & McNabb (1999) indicaram que o efeito negativo do consumo de *Lotus pedunculatus* com teor de TC $> 50 \text{ g kg}^{-1}$ MS sobre o consumo voluntário de ovelhas não é visto quando os mesmos animais consomem *L. corniculatus*, que tem apenas 34-44 g TC kg^{-1} de MS.

Uma revisão dos experimentos realizados em ovinos com plantas taniníferas sugeriu que concentrações baixas a moderadas de TC (3-6% MS) podem ter efeitos positivos sobre a fisiologia do hospedeiro, crescimento, produção de leite e lã, e em concentrações mais elevadas (7-8% de MS), podem deprimir o consumo de ração, perturbar a fisiologia digestiva e diminuir a digestibilidade dos nutrientes (Hoste et al. 2006). A estrutura dos TC e sua concentração nas plantas parecem ser os principais fatores moduladores da eficácia desses metabólitos contra nematóides. Devem existir no mínimo 30 a 40g TC kg⁻¹MS (3 a 4% de MS) para ser observada atividade antiparasitária em ovinos (Hoste et al. 2006).

O papel de forrageiras taniníferas ou extratos de taninos no controle de parasitos tem sido estudado em todo o mundo devido seus efeitos no controle de infecções por nematóides gastrintestinais. Os resultados iniciais obtidos na Nova Zelândia, sugerem que o consumo de plantas taniníferas pode afetar a biologia de diferentes espécies de helmintos, e que os taninos condensados podem ser responsáveis por estes efeitos (Niezen et al. 1998 a, b). Além desta propriedade acredita-se também que as plantas que contém TC e são utilizadas na dieta de ruminantes têm produzido outros benefícios para estes animais. Nos ovinos, os taninos têm sido capazes de aumentar significativamente a eficiência da produção de leite, a produção de proteína e lactose, diminuir o teor de gordura do leite (Wang et al. 1996) e aumentar a porcentagem de parição. Ovelhas pastando *L. corniculatus* (17 g TC kg/ MS) aumentaram sua produção de cordeiros em 25% devido ao aumento das taxas de ovulação e um posterior aumento percentual de parto, possivelmente relacionadas a maior absorção de proteínas (Min et al. 1999). O aumento da produção de lã também tem sido observado com a utilização de TC na dieta de carneiros, variando de 10-14% com o consumo de *L. corniculatus* (30-35 g TC kg/ MS). A utilização de plantas taniníferas na alimentação de ruminantes pode também apresentar aspectos positivos para o ambiente devido a possibilidade de reduzir a produção de gás metano no rúmen, e posteriormente sua eliminação para a atmosfera através da ação deletéria dos TC sobre as bactérias responsáveis pela produção desse gás (Oliveira & Berchielli, 2007). Outro benefício aos ruminantes que pastejam em leguminosas contendo CT é a prevenção do timpanismo (Mangan 1988; Aerts et al. 1999; Barry & McNabb 1999; McMahan et al. 2000).

Quanto ao efeito anti-helmíntico dos TC contra os NGI, duas hipóteses têm sido discutidas. A primeira baseia-se no efeito direto dos TC sobre os vermes, seja sobre ovos, larvas ou adultos. A segunda sugere o efeito indireto dos TC, melhorando a utilização protéica pelo hospedeiro e conseqüentemente, melhorando a resposta imune dos ruminantes aos

parasitas (Hoste et al. 2012). Contudo, a confirmação de uma hipótese não necessariamente exclui a outra. Em estudos *in vivo* a ação sobre carga parasitária e eliminação de ovos nas fezes pode ser explicada por ambas as repostas e para compreender melhor a atuação de cada possível modo de ação mais estudos precisam ser realizados.

1.7.3 Ação direta de TC

A ação direta refere-se à capacidade dos taninos interagirem com os nematóides em alguma de suas fases de vida e promoverem destruição dos parasitos ou impedirem seu desenvolvimento de forma a interromper seu ciclo biológico. De acordo com a hipótese de ação direta os TC se ligam com a cutícula dos nematóides, que é rica em prolina e hidroxiprolina alterando suas propriedades físico-químicas (Thompson & Geary 1995; Athanasiadou et al. 2000b; Hoste et al. 2006). Os TC ao se ligarem às proteínas do parasito podem produzir lesões na cutícula, além de afetar a motilidade e alimentação do mesmo (Brunet et al. 2011). Martínez-Ortiz-de-Montellano et al. (2013) utilizando microscopia eletrônica de varredura para avaliar o efeito direto (*in vitro* e *in vivo*) do extrato de *Onobrychis viciifolia* e *Lysiloma latisiliquum* sobre *H. contortus* observaram a presença de rugas longitudinais e transversais na cutícula ao longo do corpo e região cefálica de fêmeas de *H. contortus* quando em contato com o extrato. Também foram observados agregados dos extratos ao redor da cápsula bucal, região da vulva e ânus. No estudo *in vivo*, alterações semelhantes foram observadas, com exceção dos agregados que só foram descritos na região ao redor da cápsula bucal.

Até o momento a hipótese de ação direta é a mais aceita, sendo corroborada pelos resultados obtidos a partir de estudos *in vitro* que tendem a determinar os efeitos destes polifenóis. Em menor proporção, alguns experimentos *in vivo* também têm trazido evidências de efeitos diretos de TC (Athanasiadou et al. 2001; Marley et al. 2003; Tzamaloukas et al. 2006; Iqbal et al. 2007).

A atividade anti-helmíntica *in vitro* dos TC tem sido avaliada sobre diferentes estágios dos nematóides, como ovos, larvas de primeiro estágio (L1), larvas de terceiro estágio (L3) e adultos. Os efeitos registrados foram redução de eclodibilidade, desenvolvimento, motilidade e desembainhamento larvar e motilidade de adultos (Hoste et al. 2006).

Estudos *in vivo* realizados com o fornecimento a curto prazo da forragem *L. latisiliquum*, rica em TC, causou um rápido e constante decréscimo do OPG de ovinos.

Segundo os autores este resultado suporta a hipótese da ação direta dos taninos, por afetar negativamente a biologia da população de *H. contortus*, sendo que os vermes do grupo tratado eram menores, e de acordo com seu tamanho continham menos ovos no útero das fêmeas, do que os vermes do grupo controle (Martinez-Ortiz de Montellano et al. 2010). Paolini et al. (2003a,b) também relataram diminuição da fecundidade das fêmeas de *H. contortus* e *T. colubriformis* em caprinos.

A ação direta dos taninos também tem sido evidenciada através da ação dos extratos ricos em TC sobre larvas onde alguns estudos observaram o retardo ou inibição do desembainhamento de larvas *H. contortus* e *T. colubriformis* após incubação com extratos de plantas taniníferas (Bahuaud et al. 2006; Brunet et al. 2007; Alonso-Díaz et al., 2008ab; Oliveira et al., 2011).

Estudos *in vitro* realizados com taninos extraídos de forragens *Hedysarum coronarium* e *Lotus pedunculatus* inibiram a eclodibilidade de larvas de *T. colubriformis* e o desenvolvimento para larvas infectantes (L3) e também reduziu a motilidade larval, sugerindo que os taninos de forragens podem alterar o ciclo de vida dos nematóides e reduzir a contaminação da pastagem com larvas infectantes (Molan et al., 2000 a, b)

O consumo de plantas taniníferas também tem reduzido o estabelecimento de larvas durante a infecção. Brunet et al. (2008a) revelaram um decréscimo significativo no estabelecimento de larvas infectantes (L3) de *H. contortus* e *T. colubriformis*, após 5 dias de infecção, nos grupos tratados *L. latisiliquum*, rico em TC quando comparado com o grupo controle ($P < 0.01$). Minho et al. (2008a) também observaram a ação de direta de extratos de TC de acácia sobre a inibição da alimentação de larvas L1 de *H. contortus*, *Trichostrongylus vitrinus* e *Teladorsagia circumcincta*.

1.7.4 Ação indireta de TC

O efeito indireto de taninos no controle das infecções parasitárias seria resultado de melhoras na resposta imune do hospedeiro (Kahn & Diaz-Hernandez 2000). Segundo esta hipótese o aumento da resposta imune seria proporcionado pelo fato dos TC protegerem as proteínas da degradação ruminal, aumentando sua disponibilidade no intestino delgado e levando a uma maior absorção de aminoácidos (principalmente os essenciais) (Schwab 1995; Barry e McNabb 1999; Min et al. 2003), promovendo conseqüentemente, melhorias no estado nutricional do animal que poderiam refletir em mudança na resposta imune, levando

possivelmente ao controle de infecções parasitárias (Mangan 1988; Waghorn & Shelton 1997; Makkar 2003). Os TC interagem com as proteínas predominantemente via pontes de hidrogênio, formando complexos de tanino-proteína (Haslam 1996). Diversos fatores afetam a formação desses complexos, mudanças estruturais e proporção relativa dos monômeros de TC. Além disso, a variação destes fatores também pode influenciar na eficácia dos TC sobre nematoides (Molan et al. 2000a; Brunet et al. 2008b).

Em pequenos ruminantes a maior disposição de aminoácidos absorvidos no intestino delgado promove melhoras da homeostase e do sistema imune do hospedeiro, contribuindo com a resiliência do animal frente a desafios como o parasitismo gastrointestinal (Coop & Kyriazakis 2001). Abbott et al. (1988) sugeriram um aumento da resposta imune como consequência da maior disponibilidade de proteína. A maior disponibilidade de proteína pode também compensar a perda ocasionada pelo parasitismo, melhorando o estado geral do animal. Experimentos demonstraram que essas perdas são consideráveis, variando de 20 a 125 g de proteína por dia em infecções por *T. colubriformis* (Soulsby 1987).

Contudo, poucos estudos visam examinar esta hipótese, através da avaliação do número de diferentes células efetoras (eosinófilos, mastócitos, leucócitos globulares e células caliciformes) na mucosa digestiva em ovinos (Tzamaloukas et al. 2006;. Martínez -Ortiz-De-Montellano et al. 2010;. Rios- de- Álvarez et al. 2010) ou de caprinos (Paolini et al. 2003a,b) que consumiam forrageiras ricas em TC. Algumas das evidências mais aceitas para apoiar a hipótese de ação indireta foram obtidas por Tzamaloukas et al. (2006) que mostrou que cordeiros pastando sulla ou chicória tiveram um desenvolvimento reduzido de vermes, associado com o maior números de mastócitos e leucocitos globulares no local da infecção. Contudo estudos realizados por Brunet et al. (2008a) não registraram alteração significativa no número de células inflamatórias da mucosa abomasal e intestinal de caprinos após o fornecimento de outra planta rica em TC, sendo que tal fato foi atribuído ao curto período experimental, que pode não ter sido suficiente para a expressão de resposta imune. Paolini et al. (2003b) observaram que animais tratados com taninos apresentaram um aumento no número de células inflamatórias, incluindo eosinófilos e mastócitos, contudo somente o número de mastócitos diferir significativamente do grupo controle.

1.8 Efeitos de compostos de plantas sobre células do sistema imune

Existe uma grande diversidade de produtos químicos produzidos pelas plantas que pode ter efeitos sobre o sistema imunológico. Embora não estejam bem descritos os compostos envolvidos nesta ação, os metabolitos secundários têm se destacado como possíveis responsáveis por estes efeitos. Várias atividades biológicas têm sido descritas para os compostos polifenólicos, incluindo um efeito modulador sobre o sistema imunológico. Os efeitos destes compostos biologicamente ativos sobre o sistema imune estão associados a processos de diferenciação e ativação de células imunes (Karasawa et al. 2011; John et al. 2011).

Os polifenóis de diversas fontes parecem promover uma modulação do sistema imunológico. Estudos realizados com camundongos que receberam tratamento oral com extratos ricos em polifenóis de frutos de palmeira datileira (*Phoenix dactylifera L.*) ameixa (*Prunus domestica*) e figo (*Ficus carica*) tiveram um incremento de células imunocompetentes, incluindo Th1, NK, macrófagos e células dendríticas (DCs) de placas de Peyer's e/ou baço (Karasawa et al. 2011).

Em experimentos *in vitro*, utilizando células T CD4+ Jurkat (linhagem de células T de leucemia) tratadas com epigallocatequina-3-galato (EGCG), membro da classe de flavanóis encontrados no chá verde, promoveram um aumento na expressão do gene Foxp3 e IL10. Em paralelo, foi realizado um experimento *in vivo* com um grupo de camundongos Balb/c que receberam diariamente EGCG (50 mg / kg), durante sete dias, que evidenciou o aumento da frequência e número de Treg em baços, linfonodos pancreáticos e linfonodos mesentéricos. Além disso, as células Treg obtidas do grupo tratado foram capazes de suprimir a função das células T, que mostra uma redução na capacidade proliferativa das células T e de produção interferon gama (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2) (Wong et al. 2011).

Estudos realizados por Daughenbaugh et al. (2011) demonstraram o papel *in vivo* e *in vitro* de procianidinas sobre células do sistema imune inato. Demonstrando a capacidade de procianidinas para ativar as células T $\gamma\delta$, e de atuar com agonistas. A célula T $\gamma\delta$ é uma célula imune inata com funções efetoras que podem modular as respostas inflamatórias, bem como suprimir a inflamação e promovem a cicatrização de feridas. A ativação da população de células T $\gamma\delta$ por extratos de cascas de maçãs verdes, rico em procianidinas induz um fenótipo que leva a uma resposta primária que é semelhante a uma resposta desenvolvida por Padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) acoplamento dos receptores do tipo toll. Estes autores avaliaram a ação de procianidinas sobre células T $\gamma\delta$ de bovinos, ratos e humanos. Em

células T $\gamma\delta$ purificadas de bovinos o tratamento com procianidinas aumentou significativamente os níveis de transcrição de 200 genes, envolvidos com a produção de citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição entre outros. Em ratos, mostraram a relevância *in vivo* para a resposta de citocina induzida por procianidina com a observação de que a injeção de extratos de cascas de maçãs verdes rico em procianidinas resultou no rápido influxo de neutrófilos para o peritônio e sangue dos ratos. Em células T $\gamma\delta$ de humanos observaram que o tratamento com procianidinas estabiliza a transcrição de GM-CSF (Fator 2 estimulador de colônias) e IL-8.

O papel das procianidinas é explorado por vários pesquisadores, revelando sua ação no tratamento de doenças inflamatórias (Blazsó et al. 1997), bem como na eliminação de infecções (Cheshier, et al. 1996; Liu et al. 1998), indicando que os polifenóis têm propriedades anti- e pró-inflamatórias. Algumas procianidinas podem inibir ativação de fatores de transcrição nuclear Kappa b (NF-kB) (Mackenzie, et al. 2004; Terra et al. 2007; Oh, et al. 2004; Williams et al. 2004) e desempenhar um papel na inibição do desenvolvimento de alergias alimentares (Akiyama, et al. 2005) rinites alérgicas (Enomoto et al. 2006) e podem desempenhar atividade antitumoral via mecanismos imunomoduladores (Zhang et al. 2005).

Em uma revisão realizada por Cuevas et al. (2013) indicou que os polifenóis são capazes de modificar os mecanismos epigenéticos promovendo imunomodulações. Os mecanismos epigenéticos estão envolvidos no controle da expressão dos genes, que atuam sobre a manutenção da funcionalidade de numerosos processos fisiológicos, as modificações epigenética por polifenóis podem gerar mudanças no sistema imunológico importantes no controle de infecções.

2. JUSTIFICATIVA

As infecções de caprinos por NGI constituem um sério problema à caprinocultura, pois geram significativas perdas econômicas em decorrência da elevada taxa de mortalidade, baixa produtividade, retardo no crescimento dos animais e custos com a prevenção e os tratamentos (Vieira et al. 1997; Pinheiro et al. 2000).

Para o controle destes parasitos têm se utilizado quase exclusivamente compostos químicos, no entanto a resistência a esses produtos, gerada pela seleção de nematóides resistentes (Amarante et al. 1992), e os possíveis impactos ambientais, a acumulação de resíduos nos alimentos e o custo com estes produtos (Edwards et al. 2001; Melo et al. 2003), tornam imprescindível a busca por novas formas de controle que possuam boa eficiência e baixo impacto ambiental (Athanasiadou et al. 2008).

Os pequenos ruminantes podem se beneficiar com métodos adicionais de controle como a inclusão de plantas ricas em taninos condensados em sua dieta, que em quantidades adequadas, resultam em aumento do ganho de peso, da produção de leite e diminuição do parasitismo gastrointestinal (Niezen et al. 2002 a,b; Chafon 2006). Embora a utilização de plantas taníferas ou taninos condensados como uma alternativa para o uso de anti-helmínticos no controle nematodes gastrointestinais tem sido amplamente documentada em ovinos, estudos permanecem escassos em caprinos.

Os taninos condensados presentes nas leguminosas têm demonstrado efeito antiparasitário e por essas plantas representarem uma fonte alimentar de fácil acesso e disponibilidade para os ruminantes, baixos custos aos produtores e com menor impacto ambiental podem vir a ser utilizadas como importante alternativa do controle de parasitos em adição aos métodos clássicos realizados com drogas sintéticas. Contudo é preciso compreender como os taninos condensados atuam no organismo destes animais, investigando principalmente os efeitos indiretos dos taninos, que permanecem ainda obscuro devido à quase ausência de estudos. Dessa forma, o conhecimento deste mecanismo de ação faz-se necessário, para tornar possível uso mais apropriado destas plantas com propriedades bioativas, em sistemas pecuários.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antiparasitário e o perfil da resposta imunológica em caprinos após suplementação com o pó da casca de *Acacia mangium*, rica em taninos condensados.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se o consumo de casca de Acácia afeta o consumo voluntário de ração dos caprinos;
- Observar se o consumo de casca Acácia afeta o ganho de peso dos caprinos;
- Verificar se alimentação de caprinos com o pó da casca de *Acacia mangium* é capaz de evitar ou controlar a infecção por *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus columbriformis*;
- Comparar o perfil da resposta imune em animais alimentados com o pó de casca de *A. mangium* com animais controle;
- Determinar se a dieta com o pó da casca Acácia estimula a polarização da resposta imune;
- Associar o perfil da resposta imunológica com o efeito anti-parasitário do pó da casca de *A. mangium* sobre caprinos infectados artificialmente com *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus columbriformis*;
- Avaliar a influência da estimulação *in vitro* com antígenos brutos de *Haemonchus contortus* sobre células mononucleares do sangue periférico de animais suplementados ou não com Acácia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População estudada

Foram utilizados 18 caprinos machos, castrados, mestiços - meio sangue de cruzamentos entre as raças Boer e Anglo Nubiana, de 9 a 10 meses de idade.

4.2 Coleta e processamento das plantas

As cascas de *Acacia mangium* foram coletadas no campus da Universidade Estadual do Maranhão, situado no município de São Luis – MA, coordenadas 02°32'S 44°17'W, no mês de julho de 2013. Foram coletados 20 Kg de cascas, em cinco árvores de *A. mangium*. A coleta foi realizada em um único dia, entre o período de 8:00 às 10:00 da manhã, no momento da coleta a temperatura variou entre 26 e 31°C.

As cascas coletadas foram colocadas em estufa de secagem com circulação e renovação de ar a 40 °C durante 96 horas. Depois de secas as cascas foram trituradas em desintegrador e moídas em moinho tipo Willye TE-650 (TECNAL), utilizando-se peneira com a malha de 0,25 mm. O material moído foi armazenado em sacos plástico, devidamente identificada e condicionado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

4.2.1 Análise bromatológica do material vegetal

As Análises bromatológicas foram realizadas por colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear Aplicada a Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP) conforme procedimentos descritos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990) e Van Soest et al. (1991) (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise bromatológica da casca de *Acacia mangium* expressos em g/kg de matéria seca.

Parâmetro*	<i>Acacia mangium</i> – casca
Matéria mineral*	22,3
Matéria organica *	977,6
Proteína bruta *	68,7
Fibra em detergente neutro *	468,6
Fibra em detergente ácido *	390,04
Lignina *	219,9

*** Valores expressos em g/kg de matéria seca**

A determinação dos compostos polifenólicos também foi realizada por colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear Aplicada a Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP). Para determinação de fenóis totais e taninos totais foi utilizada a metodologia proposta por Makkar et al. (1993). Para a determinação dos taninos condensados foi usada a metodologia de Porter et al. (1986). Os resultados da análise indicaram que o pó da casca *A. mangium* apresentou 20,2% de TC (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados na casca de *Acacia mangium*.

AMOSTRA	Fenóis totais *	Taninos totais *	Taninos Condensados **
<i>Acacia mangium</i> casca	495,87	489,36	202,73

* Valores expressos em equivalente grama de ácido tânico / kg de matéria seca

** Valores expressos em equivalente grama de leucocianidina / kg de matéria seca

4.3 Manutenção da cepa *H. contortus* e *T. colubriformis*

Para obtenção de larvas infectantes (L3) foi criada e mantida um cepa mista de *H. contortus* e *T. colubriformis*. Inicialmente fêmeas de *H. contortus* foram recuperados de abomasos de caprinos infectados naturalmente e abatidos comercialmente. As fêmeas foram maceradas em almofariz para liberação dos ovos contidos em seus úteros e o macerado foi utilizado em uma coprocultura, esta foi preparada em copos de vidro, onde misturou - se o macerado, vermiculita e conteúdo do omaso (como substrato), depois de pronta a coprocultura, o copo foi coberto com uma placa de Petri, e com um papel dobrado na borda do copo foi deixando um espaço para aerização da cultura. Os cultivos foram mantidos por períodos de 15 dias em temperatura ambiente, e umedecidos com água quando necessário, após este período as larvas infectantes foram coletadas da cultura de acordo com a metodologia de Robert & O'Sullivan (1950). Para identificadas das larvas uma pequena amostra das larvas recuperadas da cultura foi alíquotada em lâminas e em seguida adicionado lugol e observada em microscópio.

Após identificação as larvas foram armazenadas a temperatura de 4°C para posterior utilização. Após 30 dias as larvas de *H. contortus* foram utilizadas para infecção experimental de caprinos doadores (utilizados para manutenção da cepa), o qual já possui uma infecção

monoespecífica natural por *T. colubriformis*. Após 21 dias da infecção as fezes passaram a ser coletadas diariamente e realizado a contagem de OPG, e novas coproculturas utilizando a metodologia de Robert e O'Sullivan (1950) foram realizadas, estas forneceram as larvas de *H. contortus* e *T. colubriformis* para infecção artificial dos animais utilizados neste experimento.

4.4 Delineamento experimental

Todos os animais utilizados neste experimento foram inicialmente vacinados contra botulismo com doses individuais de 2mL de Botulinobac (Hertape calier ®) e também receberam doses de 1 mL do complexo vitamínico (ADE Calbos®). Os animais encontravam-se no momento de sua aquisição, infectados por nematoides gastrintestinais, por isso foram desverminados, utilizando Monepantel (ZOLVIX® 5mg/Kg). Os animais foram mantidos confinados em baias de piso de concreto, durante todo o período experimental, sendo alimentados com concentrado (88% farelo de milho e 12% farelo de soja) no cocho representando 3% do peso vivo, calculado quinzenalmente com base no peso vivo individual, com feno de capim Tifton (*Cynodon* sp.) picado, água e suplemento mineral para caprinos (Caprinofós®) *ad libitum*. Os animais eram pesados quinzenalmente em balança digital, após jejum de 8 horas.

Após vermifugação, as fezes dos animais foram coletadas diretamente do reto do animal, por três dias consecutivos durante quatro semanas, e realizadas análises quantitativas de número de ovos por grama de fezes (OPG), pelo método de centrifugo-flutuação como solução supersaturada de cloreto de sódio, para confirmar se a vermifugação foi bem sucedida. Após 20 dias os animais encontravam-se sem a presença de ovos nas fezes. O sangue destes animais foi coletado, por punção da veia jugular, com agulha e tubos estéreis contendo heparina como anticoagulante, para avaliação imunológica na condição basal, 30 dias antes da infecção experimental (D-30 a D-27), em seguida os animais foram distribuídos uniformemente de acordo com o peso em três grupos (D-18).

Grupo I: Controle - animais infectados que não receberam taninos condensados (n=6).

Grupo II: animais infectados que receberam diariamente adicionado à ração 100 mg de tanino condensado (disponível em 490 mg de pó da casca de *Acacia mangium*), por Kg de peso vivo do animal (n=6).

Grupo III: animais infectados que receberam diariamente adicionado à ração 100 mg de tanino condensado (disponível em 490 mg de pó da planta), por Kg de peso vivo do animal, mais 10g de Polietilenoglicol (PEG) (De acordo com Alves et al. 2011) (n=6).

O PEG foi utilizado no grupo III para bloquear a atividade dos TC. Em estudos *in-vitro* e *in-vivo* estes agentes bloqueadores tem sido bastante utilizados para confirmar a atuação dos taninos sobre o controle de NGI. Durante todo o experimento foi fornecido uma ração isoproteica aos animais dos três grupos, contendo aproximadamente 14% de proteínas brutas.

No dia -15 (D-15) os animais dos grupos **II** e **III** passaram a receber as rações modificadas, nas quais foram adicionados respectivamente, pó da casca de *Acacia mangium* e pó da casca de *Acacia mangium* + PEG. Nos dias -8 a -5(D-8 a D-5) o sangue dos animais foi novamente coletado, utilizando o mesmo procedimento descrito acima, para avaliação dos parâmetros imunológicos.

Durante todo o período de administração da ração suplementada com o pó da casca *Acacia mangium*, foi avaliado o consumo dos animais, com objetivo de perceber se havia rejeição da ração pelos animais suplementados. O consumo foi avaliado diariamente, a partir da quantidade de sobra de concentrado fornecida aos animais, as sobras eram recolhidas dos cochos e pesadas, o valor era então subtraído do valor fornecido diariamente e calculava-se o percentual consumido.

No dia 0 (D0) os animais dos três grupos foram infectados individualmente por via oral com um *pool* de 12.000 larvas (L3), sendo 6600 de *H. contortus* (55% da carga parasitária) e 5400 de *T. colubriformis* (45% da carga parasitária). Cada animal recebeu o *pool* de 12.000 L3 em uma única dose, através de uma aplicação oral com auxílio de pipeta.

Após 7 dias (D+7) da infecção artificial, o sangue dos animais foi novamente coletado e após 14 dias da infecção, amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais para avaliar a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG), com o objetivo de acompanhar a evolução da infecção.

Depois de confirmada a infecção, acompanhou-se a variação da contagem de OPG por 10 dias (D+21 a D+31) e ao final deste tempo o sangue dos animais foi novamente coletado (D+34 a D+36). Em seguida os animais foram abatidos e realizou-se a avaliação da carga parasitária do abomaso e intestino delgado.

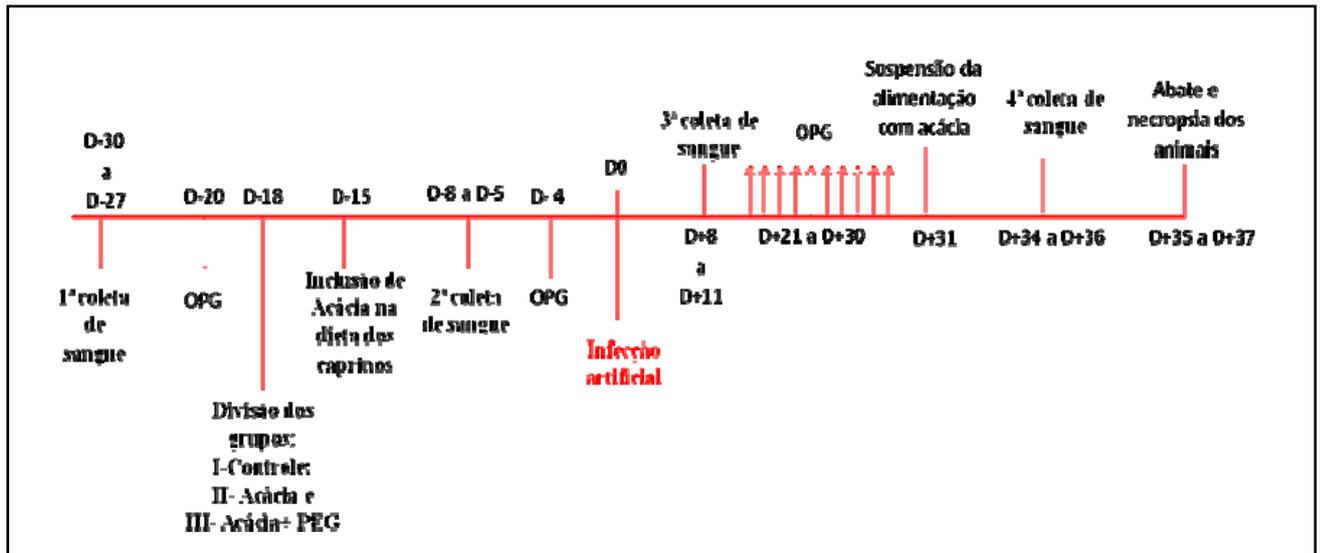


Figura 2 - Delineamento experimental utilizado no estudo.

O projeto em questão foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMA, sob protocolo de número 23115018061/2011-01.

4.5 Necropsia dos animais

Entre 35 e 37 dias após infecção, procedeu-se o abate de 6 animais por dia, após jejum de 12h. Com o objetivo de avaliar carga parasitária, os animais abatidos foram eviscerados e os abomasos e intestinos delgado e grosso foram coletados, antes da liberação dos órgãos estes foram separados por ligaduras duplas com barbante na região anterior e posterior de cada órgão, que em seguida foram cortados entre as ligaduras e levados ao laboratório. Estes órgãos foram abertos individualmente com auxílio de tesoura, dentro de recipientes, lavados com água e a mucosa foi raspada cuidadosamente com auxílio de uma espátula, também dentro deste recipiente, para a remoção dos vermes da mucosa do abomaso utilizamos ainda um processo de coleta manual por “pescagem” com agulhas curvadas. O lavado dos órgãos que foi colocado nos recipiente foi passado através de tamís e lavado sucessivamente em água corrente. Os vermes retidos no tamís foram transferidos para outro recipiente com auxílio de espátulas e com lavagens do tamís. Os vermes por fim foram conservados em um frasco de vidro com 400 mL de solução de formol a 10%, diluído em água a temperatura ambiente, para posterior quantificação e identificação de acordo com Ueno & Gonçalves (1998).

Depois de realizados, os procedimentos acima descritos com o abomaso, este foi também submetido a um processo de digestão sem pepsina. O órgão foi colocado em um

recipiente com solução de ácido clorídrico 1% e armazenado em estufa por 2 horas a 40°C, em seguida o órgão foi retirado do recipiente, e o conteúdo do recipiente foi homogeneizado e transferido a uma proveta de 500 mL, o volume foi completado com água até 500 mL e deixado em repouso para decantação e em seguida o sobrenadante foi descartado, este procedimento foi realizado até o conteúdo ficar transparente (Dorchies & Lahitte, 1986).

4.6 Preparo de antígenos brutos de vermes adultos

Para produção de antígenos bruto (AgBr), vermes adultos de *H. contortus* foram recuperados do abomaso de caprinos infectados naturalmente, abatidos comercialmente. Os vermes recuperados foram depositados em placa de Petri contendo solução salina tamponada de fosfato de sódio 0,015M, pH 7,4 (PBS), em seguida os vermes foram lavados por duas vezes com o próprio PBS e mais duas vezes com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), com finalidade de remover todas as partículas indesejadas e impurezas. Após o processo de lavagem os vermes adultos foram utilizados para a produção do antígeno bruto. A obtenção do antígeno foi realizada por maceração mecânica do parasito em solução PBS em almofariz.

O produto da maceração foi mantido sob resfriamento em gelo e sonificado a 40 Watts durante 1 minuto, com intervalos de 1 minuto para cada ciclo, totalizando sete ciclos. Em seguida, o produto bruto solúvel foi obtido por centrifugação a 400g durante 3 minutos a temperatura de 18°C. O sedimento foi então descartado e os sobrenadantes armazenados a -86°C até o seu uso. A quantidade de antígenos na preparação antigênica foi dosada pelo uso de kit comercial BCA (Pierce, EUA), realizado conforme as instruções do fabricante.

4.7 Processamento do sangue

4.7.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico de caprinos.

Para separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), aproximadamente 20 mL de sangue periférico de cada caprino foi coletado em tubos heparinizados. Após a coleta o sangue foi centrifugado para a remoção do plasma (que foi armazenado a -20°C para posteriores análises) em seguida o sangue foi diluído com solução fisiológica e aplicado lentamente sobre 20 mL de solução de Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1.077, Sigma, EUA) em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA), e centrifugados a 400 g por 40 minutos a 18 °C. O anel contendo as células mononucleares foi removido com auxílio de pipeta e lavado por três vezes a 400 g por 10

minutos a 18°C com solução fisiológica. Ao final, as células foram ressuspensas para 1 mL com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), e foi retirada uma alíquota para a contagem das mesmas em câmara hemocitométrica de Neubauer, na diluição de 1:2 em Solução de azul de tripan (Sigma, EUA).

4.7.2 – Cultura de PBMCs

Após separação e contagem de PBMCs, 1×10^6 células por poço foram incubadas com meio RPMI em placas de 24 poços, em estufa a 37°C e 5% CO₂ por duas horas, para separar as células aderentes das não aderentes. Após este período o sobrenadante das culturas contendo as células não aderentes (linfócitos) foi homogeneizado e removido. Uma alíquota desta suspensão de células foi colocada em microtubos de 0,5 mL e as células foram novamente contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer, na diluição de 1:2 em Solução de azul de tripan (Sigma, EUA).

4.8 – Ensaio in vitro

Alíquotas da suspensão de linfócitos também foram utilizadas para realização de culturas na presença ou ausência de antígeno solúvel de *H. contortus*, para posterior imunofenotipagem. Foram utilizadas 1×10^6 células por poço e os antígenos foram utilizados na concentração de 100 µg/poço (1 mL volume final) de acordo com Gill et al. (2000), em meio RPMI 1640 (Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma, EUA), 3% de solução de antibiótico/antimicótico (Invitrogen, EUA) e 2 mM de L-glutamina (Sigma, EUA). As placas foram incubadas durante 20 horas em estufa com 5% CO₂ a 37°C (Forma Scientific, E.U.A).

Após este período de incubação foram adicionados 10µL de Brefeldina A (SIGMA, E.U.A), na concentração estoque de 1 mg/mL (concentração final de 10 µg/mL). As amostras foram incubadas por mais quatro horas em estufa nas mesmas condições acima. A utilização da Brefeldina assegura a retenção da citocina no interior das células, uma vez que essa substância mantém a citocina no aparelho de golgi. Ao final do período de incubação foi retirada uma alíquota para contagem de células e a suspensão celular foi transferida para microtubos de 2 mL, centrifugada e ressuspensa em tampão PBS-W (PBS pH 7.4 contendo 0.5% BSA e 0.1% de azida sódica) em volume adequado a quantidade células, para posterior imunofenotipagem.

4.9 Imunofenotipagem

As células obtidas da cultura foram ressuspensas em Tampão PBS-W de forma que para cada 100 μL contivesse 1×10^5 células. Inicialmente os tubos foram devidamente identificados de acordo com cada painel e os anticorpos monoclonais de superfície marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), descritos na Tabela 3 (ABD Serotec, USA), foram alíquotados nos tubos e em seguida 100 μL da suspensão celular foram adicionados aos mesmos. As células e anticorpos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e em seguida adicionado às amostras 1 mL de PBS-W (PBS pH 7.4 contendo 0.5% BSA e 0.1% de azida sódica) e estas foram centrifugadas a 14.850 x g (centrifuga tipo 5810 R- Eppendorf®) por 1 minuto a 18°C e o sobrenadante foi descartado.

Para a detecção de citocinas intracitoplasmáticas, foram acrescentados aos tubos 1 mL de PBS-P (PBS, pH 7.4, contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 15 minutos à temperatura ambiente, e estas foram centrifugadas a 14.850 x g por 1 minuto a 18°C, descartado o sobrenadante e logo em seguida foram adicionados 20 μL de anticorpos anti-citocina marcados com ficoetrina (PE), diluídos 1:20 em PBS-P aos respectivos tubos e posteriormente incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 1 mL de PBS-W e centrifugadas a 14.850 x g por 1 minuto a 18°C e o sobrenadante foi descartado. Para os painéis com marcação de IL-10 biotinizada ainda foi acrescentado 50 μL de estreptavidina PE, diluído 1:300 em PBS-P aos respectivos tubos e incubados por mais 30 minutos. Estas células foram novamente lavadas com 1 mL de PBS-W e centrifugadas a 14.850 x g por 1 minuto a 18°C e o sobrenadante foi descartado.

No final, foram adicionados a todos os tubos 200 μL de solução fixadora MFF (10g/L paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). As amostras marcadas foram então lidas em citômetro de fluxo (FACSCalibur- BD, E.U.A). Controles isotópicos marcados foram utilizados em todos os experimentos para calibração da leitura. Foram lidos 10.000 eventos totais em cada painel.

Tabela 3. Pannel de anticorpos monoclonais usados na imunofenotipagem de células mononucleares do sangue periférico de caprinos.

Anticorpos monoclonais	Hospedeiro	Clone	Isotipo	Especificidade
Anti-CD21 (FITC e PE)	Rato	CC21	IgG1	Células B
Anti-CD4 (FITC)	Rato	44.38	IgG2a	Células T auxiliares
Anti- CD8 (FITC)	Rato	38.65	IgG2a	Células T citotóxicas
Anti-IgG de rato (FITC)	Coelho	Policlonal Rat IgG	-	Controle isotípico
Anti-IL-4 (PE)	Rato	CC303	IgG2a	Células T CD4 subtipoTh2
Anti-IFN-γ (PE)	Rato	CC302	IgG1	Células T CD4 subtipoTh1
Anti- IL-10 (Biotinilado)	Rato	CC320	IgG1	Regulatória

Todos os anticorpos foram produzidos e adquiridos pela ABD SEROTEC. PE= ficoeritrina, FITC= isotiocianato de fluoresceína.

4.10 - Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo

A análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos das células presentes em cada tubo foi determinada com auxílio de um citômetro de fluxo (FACScalibur - BD, EUA), utilizando-se o *software* CELLQuestTM para aquisição dos dados.

Para a realização das análises foi utilizado o *software* Flow-Jo®. Inicialmente a população de linfócitos foi selecionada de acordo com os parâmetros morfométricos de

tamanho e granulosidade. A partir da população de linfócitos em cada amostra, foi estabelecido de acordo com a fluorescência os quadrantes e *gates* para a população dupla positiva em cada marcação ($CD4^+IFN^+$; $CD4^+IL4^+$; $CD4^+IL10^+$; $CD8^+IFN^+$; $CD8^+IL4^+$; $CD8^+IL10^+$ e $CD21^+IL10^+$) (Fig. 3).

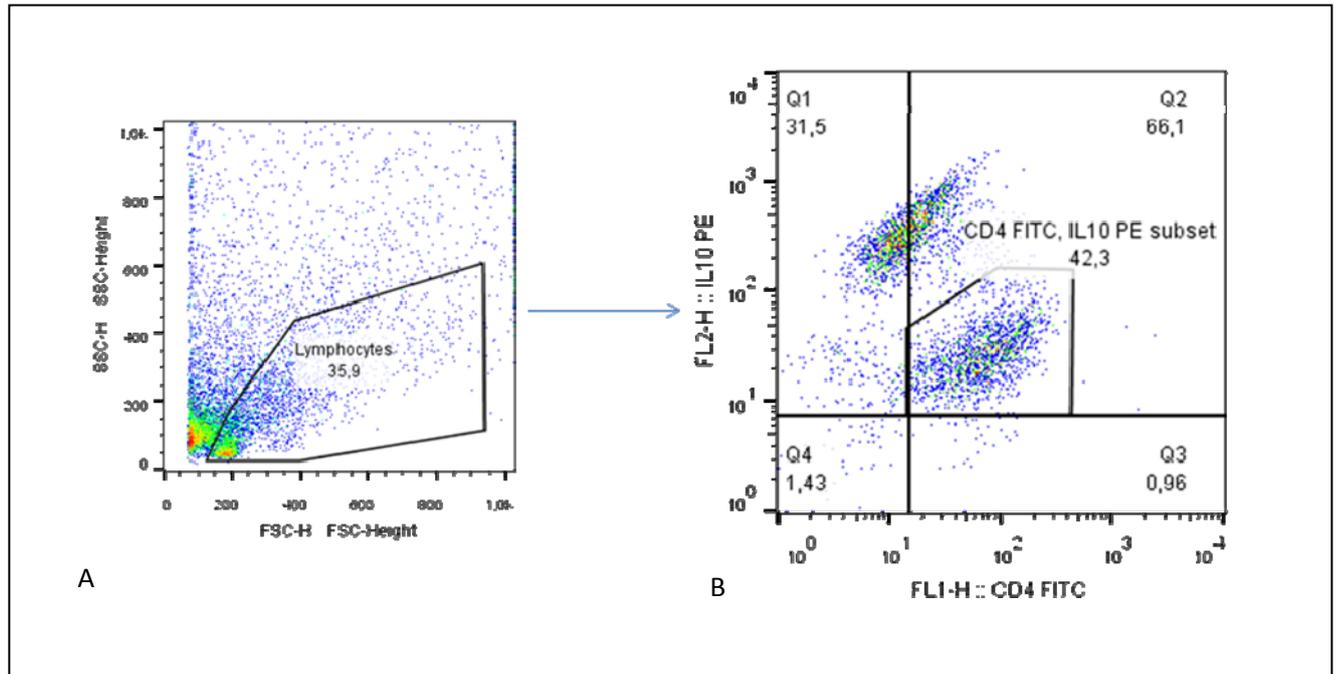


Figura 3- Método de análise utilizada para avaliação dos dados. A - *gate* da população de linfócitos; B - Perfil fenotípico dos linfócitos, em função das fluorescências FL-1 e FL-2.

4.11 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc, EUA). A distribuição dos dados foi avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-smirnov. Para comparação entre os grupos quanto aos dados de imunofenotipagem, carga parasitária, OPG, consumo, peso e hemograma foram utilizados os testes 2way- ANOVA seguido pelo Teste de Tukey's.

Para comparar a razão entre machos e fêmeas encontrados nos três grupos usamos Kruskal-Wallis seguido pelo Dunns (dados não-paramétricos). Para avaliar a correlação entre carga parasitária e perfil fenotípico dos linfócitos utilizamos a correlação de Spearman. A eficiência do consumo de Acácia sobre a redução da carga parasitária foi avaliada utilizando a fórmula $100 \times [1 - (\text{média do grupo tratado} / \text{média do grupo controle})]$ (Coles et al., 1992).

5.1 Efeito da suplementação com o pó da casca de Acácia sobre o consumo voluntário dos caprinos

Considerando que a dose de TC fornecida aos animais pode ocasionar reduções no consumo voluntário da ração, avaliou-se o efeito do fornecimento diário de 100 mg de TC (no pó da casca de *A. mangium*) por kg de peso vivo de cada animal. A dose ofertada aos caprinos não afetou significativamente o consumo voluntário da ração (**Fig. 4**). Sendo que os animais alimentados com Acácia (grupos Acácia e Acácia + PEG) consumiram quantidades similares às consumidas pelos animais que não receberam Acácia (controle).

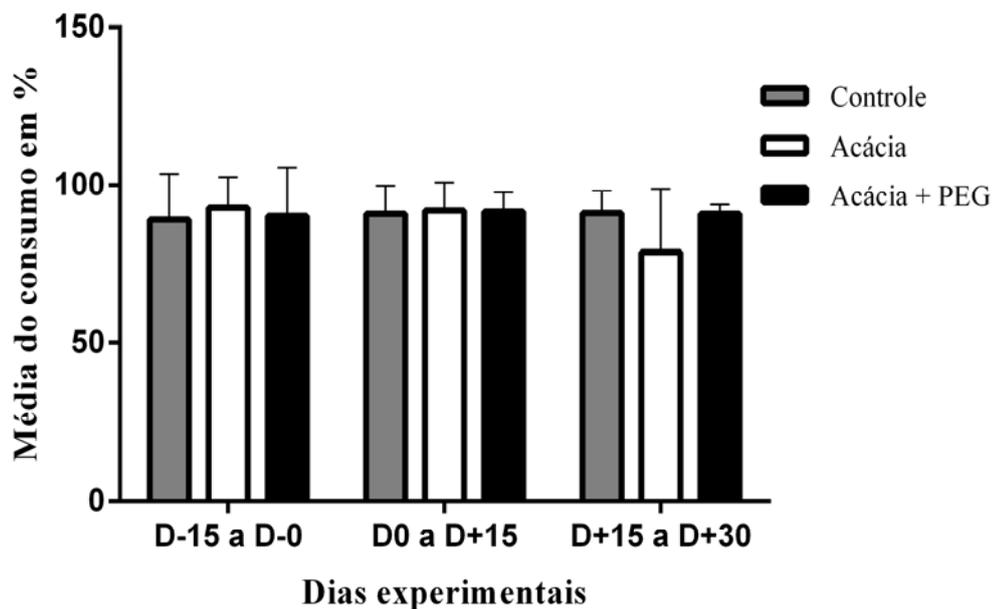


Figura 4: Média e desvio padrão do consumo voluntário de ração. Os valores estão expressos pela média em percentual de consumo de cada grupo, durante três períodos de 15 dias cada. Dias de avaliação: (**D-15 a D-0**) - primeiros 15 dias de administração da planta, sem infecção; (**D-0 a D+15**)- intervalo de 15 a 30 dias após a administração da planta e primeiros 15 dias da infecção; (**D+15 a D+30**) intervalo de 30 a 45 dias após a administração da planta e 15 a 30 dias da infecção. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia).

5.2 Efeito da suplementação com o pó da casca de Acácia sobre o ganho de peso dos caprinos

O peso corporal é outro parâmetro que pode ser afetado pelo consumo de plantas taniníferas, entretanto, neste experimento a dieta com Acácia também não afetou o ganho de peso corporal dos animais que receberam a planta, quando comparado com o controle (**Fig. 5**). Dessa forma, não houve interferência da dieta com Acácia sobre o ganho de peso, na concentração de TC fornecida. O fornecimento de acácia, não afetou a produtividade dos caprinos, e não produziu efeitos antinutricionais sobre os mesmos.

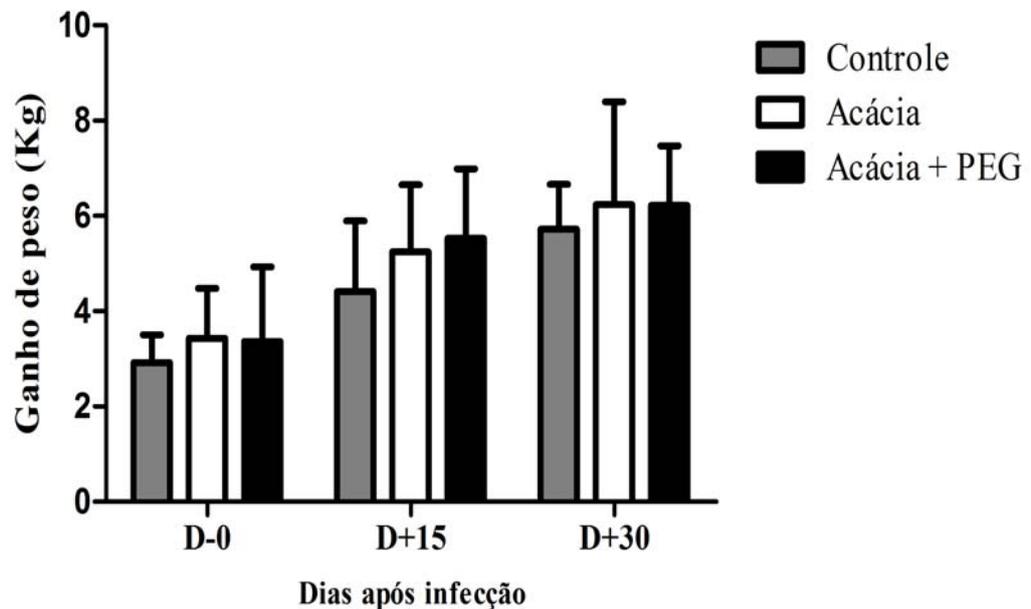


Figura 5: Ganho de peso dos caprinos. Os valores estão expressos pela média do ganho dos animais de peso de cada grupo, acompanhadas de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Dias de avaliação: (**D-0**)- dia da infecção; (**D+15**) 15 após a infecção e (**D+30**) 30 dias após a infecção.

5.3 Efeito da suplementação com o pó da casca de Acácia sobre a contagem de Ovos por Grama de Fezes (OPG)

O pó da planta começou a ser administrado 15 dias antes da infecção artificial com o intuito de verificar se a suplementação como o pó da casca de Acácia evitaria o estabelecimento da infecção ou o desenvolvimento das formas imaturas para adultos. Contudo, a eliminação de ovos junto com as fezes dos caprinos demonstrou que a alimentação com acácia não evitou o estabelecimento da infecção e nem o desenvolvimento de L3 para adultos.

Ao compararmos os resultados da contagem de OPG entre os animais dos três grupos, verificamos que o consumo de acácia não promoveu diferenças significativas na excreção de ovos em relação ao controle ($p > 0,05$) (Fig. 6). Os valores foram previamente transformados por Log (x+2).

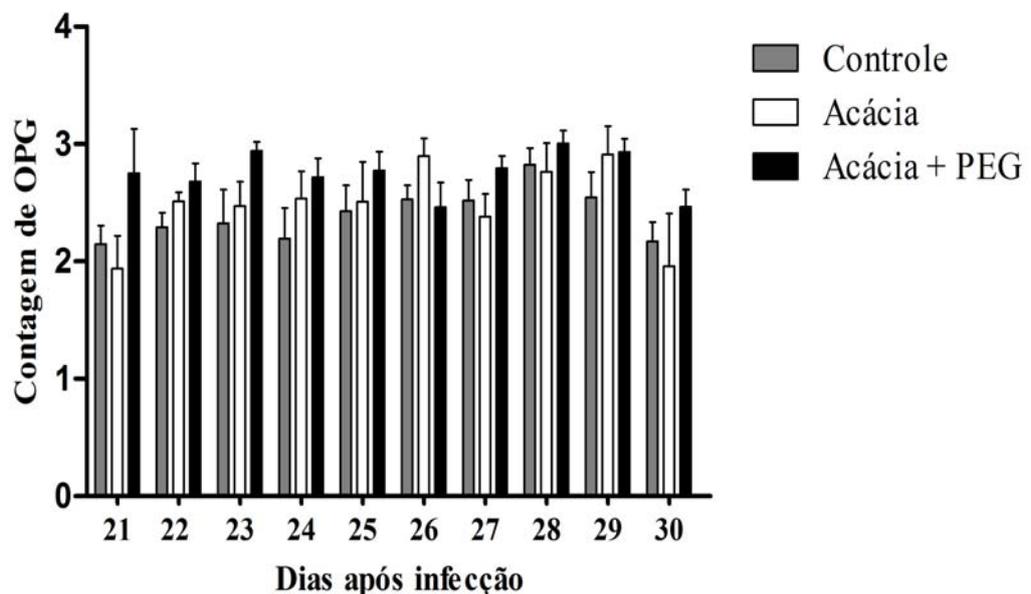


Figura 6: Número médio da contagem ovos por grama de fezes (valores transformados por Log (x+2)) dos caprinos dos grupos Controle, Acácia e Acácia + PEG, no período de 21º a 30º DPI. Os valores estão expressos pela média da contagem de OPG dos animais de cada grupo, acompanhadas de desvio padrão.

5.4 Efeito da suplementação com o pó da casca de Acácia sobre o número de H. contortus e T. colubriformis adultos recuperados de abomaso e intestino delgado

Foi realizada necropsia dos animais e coleta dos helmintos do abomaso e intestino dos caprinos dos grupos controle, Acácia e Acácia+PEG, com o objetivo de verificar se a dieta com Acácia reduziria a carga parasitária total, bem com o número de machos e fêmeas. A proporção sexual é um dado importante a ser considerado, pois quanto maior o número de fêmeas maior o número de ovos eliminadas nas fezes dos caprinos e consequentemente maior a contaminação da pastagem.

O consumo de acácia não produziu diferenças significativas quanto à intensidade da infecção por *H. contortus* entre os grupos alimentados com Acácia e o controle ($P > 0,05$). A razão sexual entre fêmeas e machos *H. contortus* também não diferiu estatisticamente entre os grupos (**Fig. 7**).

Apesar de não haver diferenças significativas na intensidade da infecção entre os grupos, o cálculo de eficiência demonstrou que os animais que receberam casca de acácia (grupo Acácia e Acácia + PEG) tiveram uma redução na carga parasitária de 15,5% e 14,9% de *H. contortus*, respectivamente (Tabela 4).

O consumo de acácia também não promoveu diferenças significativas quanto à intensidade da infecção por *T. colubriformis* entre os grupos alimentados com Acácia (grupos Acácia e Acácia+PEG) e o controle ($P > 0,05$). A razão sexual entre fêmeas e machos *T. colubriformis* também não diferiu estatisticamente entre os grupos (**Fig. 8**).

Entretanto, o cálculo eficiência do consumo de Acácia (grupo Acácia) sobre a redução na carga parasitária de *T. colubriformis*, demonstrou que a suplementação com pó da casca de acácia teve eficiência de aproximadamente 96% sobre a redução da carga parasitária (Tabela 4). Estes resultados evidenciaram uma ação mais efetiva do consumo de acácia sobre a redução da carga parasitária de *T. colubriformis* do que sobre *H. contortus*.

Considerando a eficiência do consumo de Acácia, principalmente sobre a redução da carga parasitária de *T. colubriformis*, a ausência de diferenças significativas entre os grupos pode estar associada à alta variabilidade individual e baixo número de animais por grupo, que segundo Bambou et al. (2013), são fatores limitantes para melhor compreensão de vários parâmetros associados a caprinos.

O PEG foi utilizado neste experimento como um inibidor para atuação dos compostos fenólicos, como é o caso dos TC. Os resultados confirmaram a atuação dos compostos

fenólicos no controle da infecção por NGI, pois a adição do PEG junto ao pó da casca de Acácia fornecido aos animais foi capaz de reverter à eficiência da Acácia na redução da carga parasitária de *T.colubriformis*. Os resultados de carga parasitária, apresentados pelo grupo que consumiu Acácia+ PEG foram semelhantes ao do grupo controle.

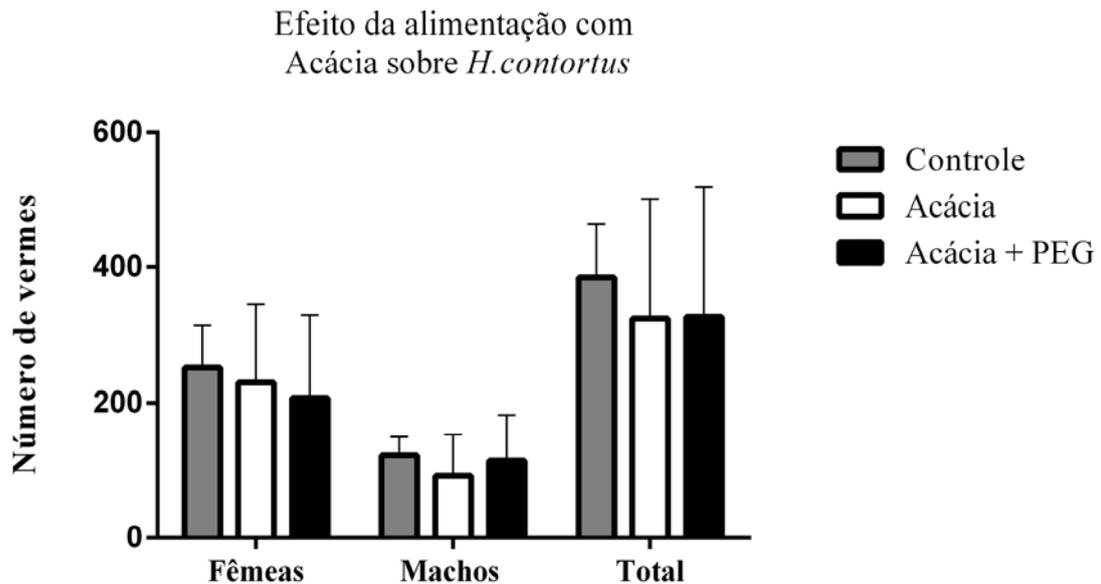


Figura 7: Carga parasitária de abomaso. Os valores estão expressos pela média do número de macho, fêmeas e número total de vermes da espécie *H. contortus* encontrados no abomaso dos caprinos dos grupos Controle, Acácia e Acácia + PEG após necropsia, acompanhada de desvio padrão.

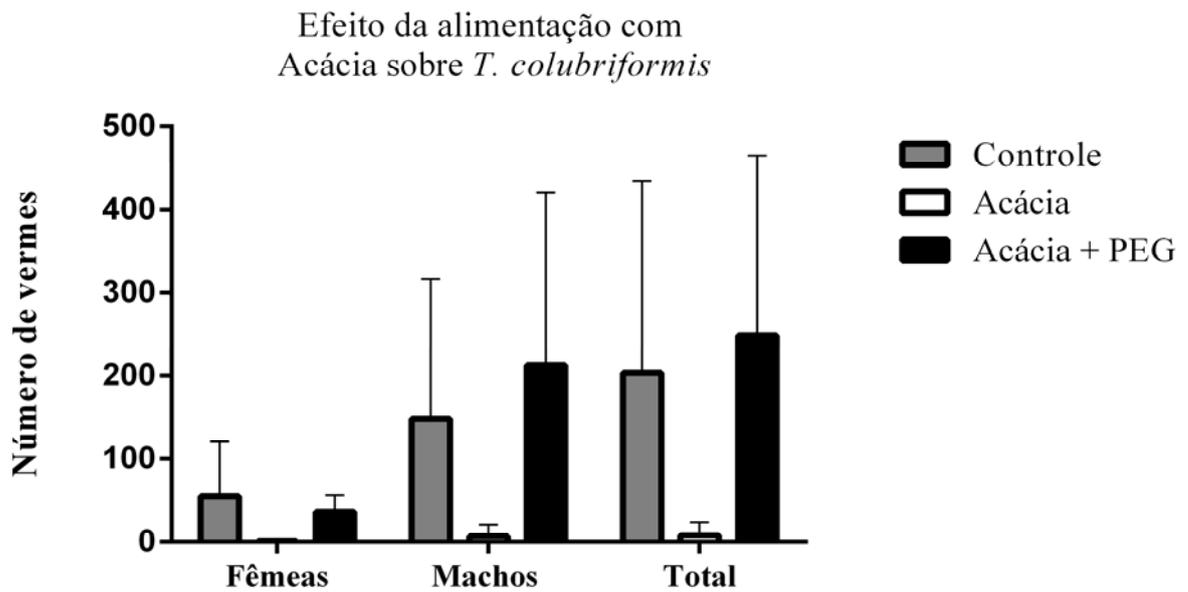


Figura 8: Carga parasitária de intestino delgado (ID). Os valores estão expressos pela média do número de macho, fêmeas e número total de vermes da espécie *T. colubriformis* encontrados no ID dos caprinos dos grupos Controle, Acácia e Acácia + PEG após necropsia, acompanhada do desvio padrão.

Tabela 4: Eficiência da administração de Acácia e Acácia+PEG sobre a redução da carga parasitária de *H. contortus* e *T. colubriformis* de caprinos. Valores determinados a partir da fórmula Coles et al. (1992): $100 \times [1 - (\text{média do grupo tratado} / \text{média do grupo controle})]$.

Grupos	<i>H. contortus</i>	<i>T. colubriformis</i>
Acácia	15,5	96,0
Acácia + PEG	14,9	0,0

5.5 Avaliação do perfil de linfócitos do sangue periférico de caprinos suplementados com *Acacia mangium* (grupos Acácia e Acácia+ PEG) e não suplementados com *Acacia mangium* (grupo controle)

Diante da necessidade de investigar a hipótese de ação indireta de plantas taniníferas, que consiste na ideia de que estas plantas melhoram a resposta imune a partir de melhoras nutricionais, observou-se o padrão de resposta imune em caprinos alimentados com *A. mangium*.

Inicialmente, avaliaram-se os efeitos da inclusão de Acácia, na dieta dos caprinos, sobre número de linfócitos encontrados no sangue periférico. Através de hemogramas realizados nas amostras de sangue periférico dos caprinos dos grupos controle, Acácia e Acácia + PEG nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos durante as análises realizadas antes da infecção (D-8) e após a infecção (D+8 e D+30) ($P>0,05$) (**Fig. 9**).

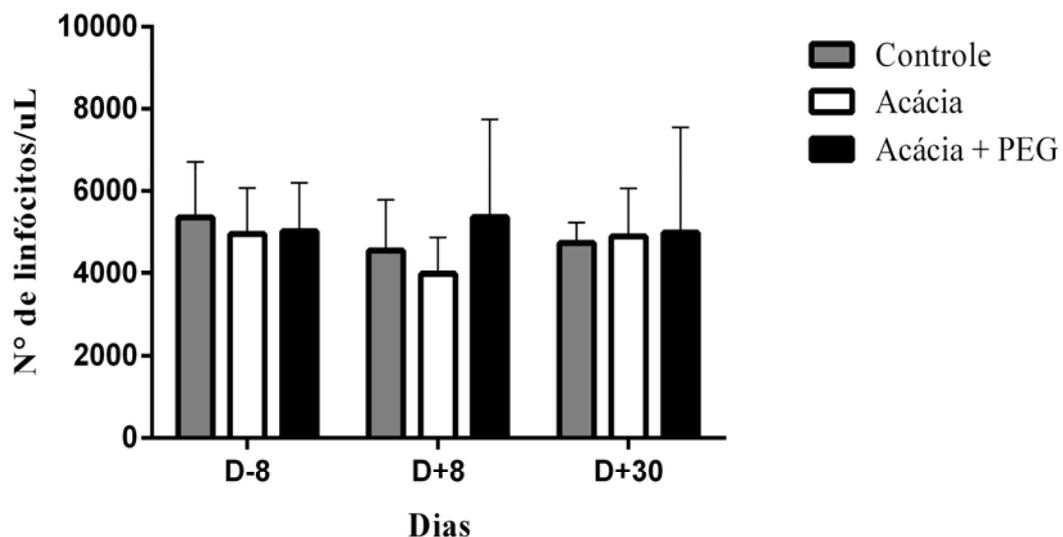


Figura 9: Perfil hematológico de linfócitos do sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após infecção; (D+30) - 30 dias após infecção.

5.6 Análise da produção das citocinas IL-4, IFN- γ e IL-10 em linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD21⁺ de caprinos suplementados com *A. mangium* (grupos Acácia e Acácia+ PEG) e não suplementados com *A. mangium* (grupo controle)

Avaliou-se imunofenotipicamente por citometria de fluxo células mononucleares do sangue periférico, positivas para as moléculas CD4, CD8 e CD21 e através de marcação intracelular, a expressão de citocinas IL-4, IFN- γ e IL-10.

Em uma primeira análise não houve qualquer diferença entre os grupos controle, Acácia e Acácia + PEG quanto ao perfil imunofenotípico dos linfócitos circulantes observados nos período que antecede a infecção (D-8) e de infecção recente (D+8) (**Fig. 10 a 16**).

No entanto, a avaliação imunofenotípica dos linfócitos circulantes realizada após um tempo maior de infecção (D+30), após o período pré-patente, evidenciou diferenças significativas entre os três grupos: controle, Acácia e Acácia + PEG. Demonstrando o efeito significativo da inclusão de Acácia na dieta dos caprinos, bem como o papel da infecção neste estímulo.

Os animais tratados com Acácia tiveram um maior número de células CD4⁺ produtoras de IL-4 em relação ao controle, revelando um perfil tipicamente anti-helmíntico e anti-inflamatório (**Fig. 11**).

As células CD8⁺ produtoras de IFN- γ e IL-4 (**Fig. 13 e 14**) também foram significativamente maiores nos grupos Acácia e Acácia + PEG em relação ao controle. A produção de IL-4 também por CD8⁺ acentua a influência da dieta com Acácia sobre a produção desta citocina, que tem um papel crucial nas infecções helmínticas. Quanto à produção de IFN- γ , citocina tipicamente pró – inflamatória, pode ser um indicativo de que a planta influencia no desenvolvimento de uma resposta mista.

Ao analisarmos o padrão fenotípico de cada grupo ao longo dos dias experimentais (em resposta à infecção) observou-se ainda que praticamente todas as populações de linfócitos estudadas, aumentaram significativamente no dia (D+30) para os animais que consumiram acácia (Acácia e Acácia+ PEG), com exceção de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺, que não aumentou significativamente em nenhum dos grupos (**Fig. 10**). Já o grupo controle somente apresentou mudanças no perfil fenotípico de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ e linfócitos B CD21⁺ IL-10⁺, o primeiro diminuiu significativamente após a infecção (D+8) (P<0,05) (**Fig. 13**) e o segundo aumentou significativamente após 30 dias de infecção (P<0,05) (**Fig.16**). Estes resultados

sugerem que células CD21⁺ produtoras de IL-10 são aumentadas com a evolução da infecção, em todos os grupos, indicando que estas células têm um papel significativo na infecção, apesar de não diferir entre os grupos.

Considerando que as células CD4⁺ produtoras de IL-4 e CD8⁺ produtoras de IL-4 e IFN- γ aumentaram no grupo Acácia em relação ao controle, correlacionamos o número de células encontradas para cada um destes perfis imunofenotípicos com a carga parasitária de *T.colubriformis*, a qual foi reduzida no grupo Acácia. Os resultados mostraram haver uma correlação inversa significativa entre as variáveis ($r = - 0,7746$; $P < 0,0001$) indicando que o aumento destas células esta relacionados com a diminuição da carga parasitária de *T. colubriformis* encontrados no intestino delgado.

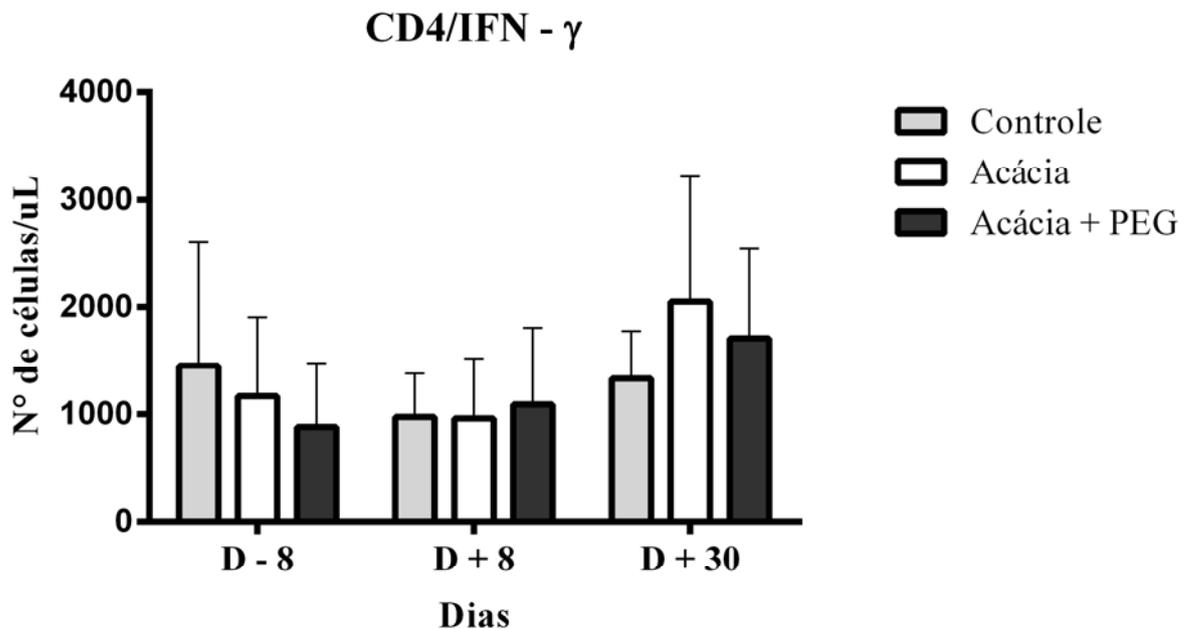


Figura 10: Número de linfócitos CD4⁺ produtores de IFN- γ presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos CD4⁺/IFN⁺- γ , acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após a infecção; (D+30) - 30 dias após da infecção.

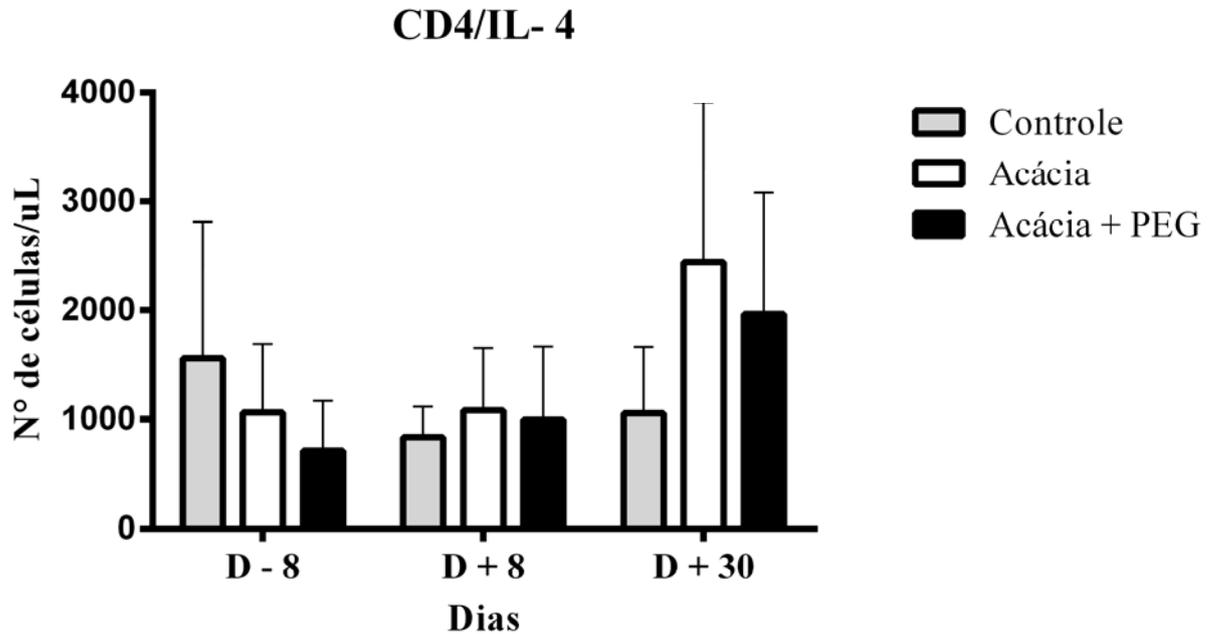


Figura 11: Número de linfócitos CD4⁺ produtores de IL-4 presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos CD4⁺/IL-4⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após a infecção; (D+30) - 30 dias após da infecção. * - Diferiu significativamente em relação ao controle.

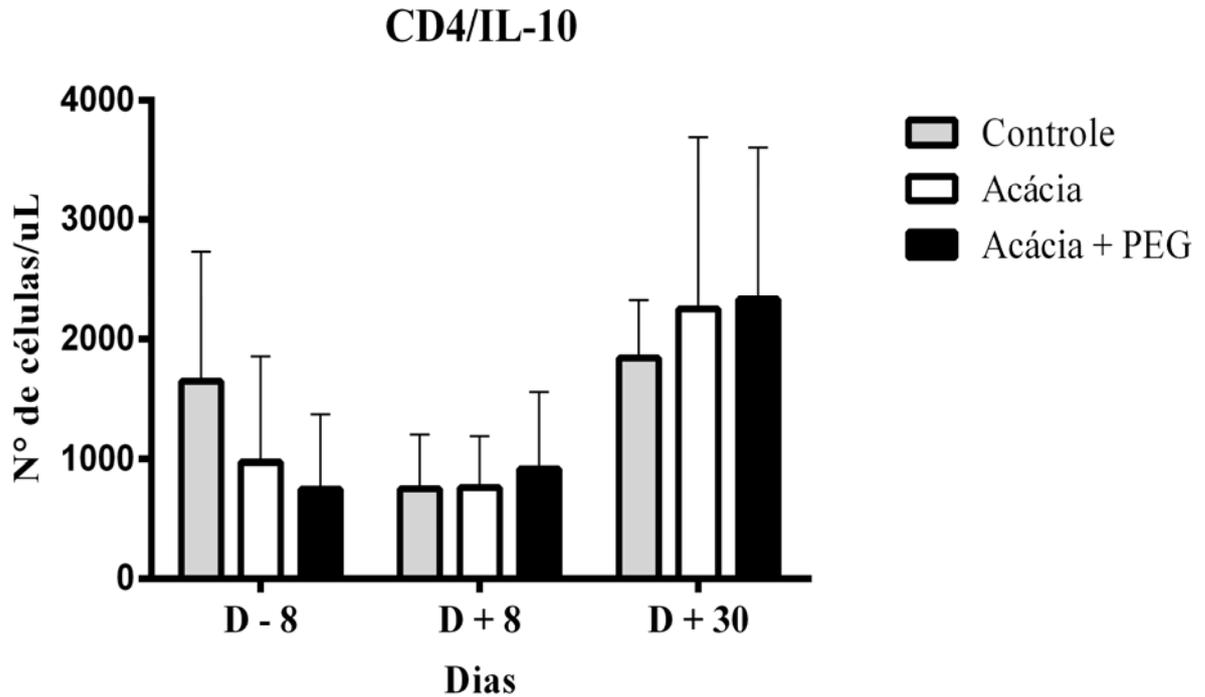


Figura 12: Número de linfócitos CD4⁺ produtores de IL-10 presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos CD4⁺/IL-10⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após a infecção; (D+30) - 30 dias após da infecção.

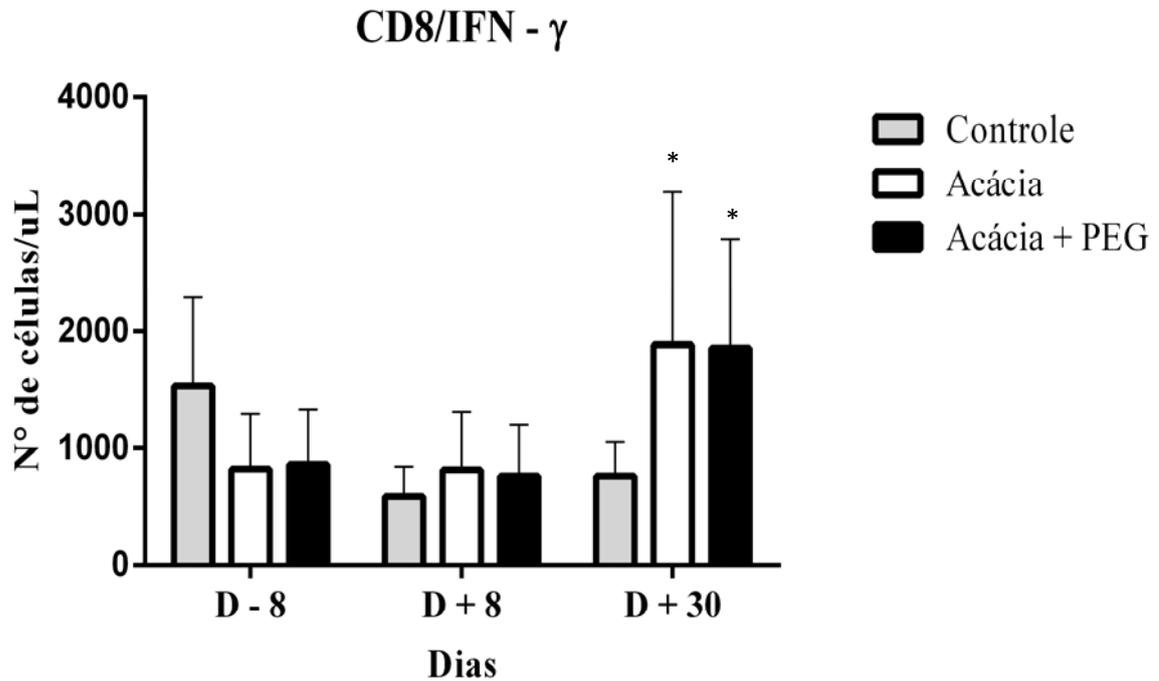


Figura 13: Número de linfócitos CD8⁺ produtores de IFN- γ presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos CD8⁺/IFN- γ ⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após a infecção; (D+30) - 30 dias após da infecção. * - Diferiu significativamente em relação ao controle.

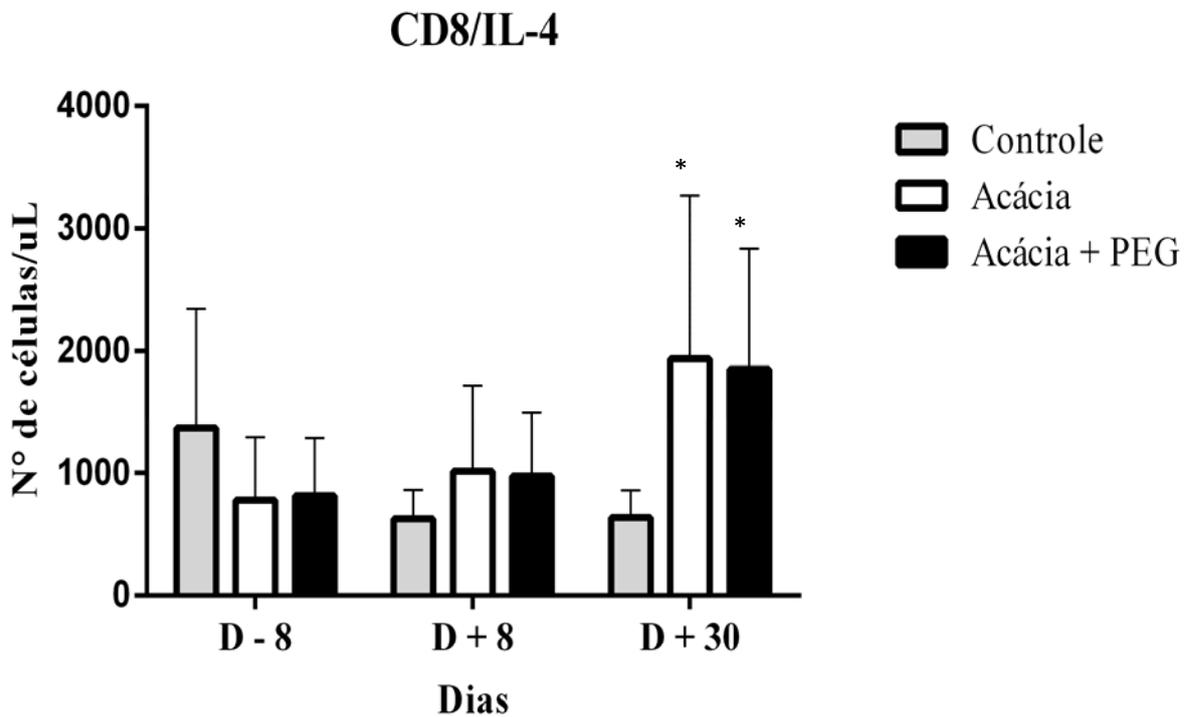


Figura 14: Número de linfócitos CD8⁺ produtores de IL-4 presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos CD8⁺/IL-4⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após a infecção; (D+30) - 30 dias após da infecção. * - Diferiu significativamente em relação ao controle.

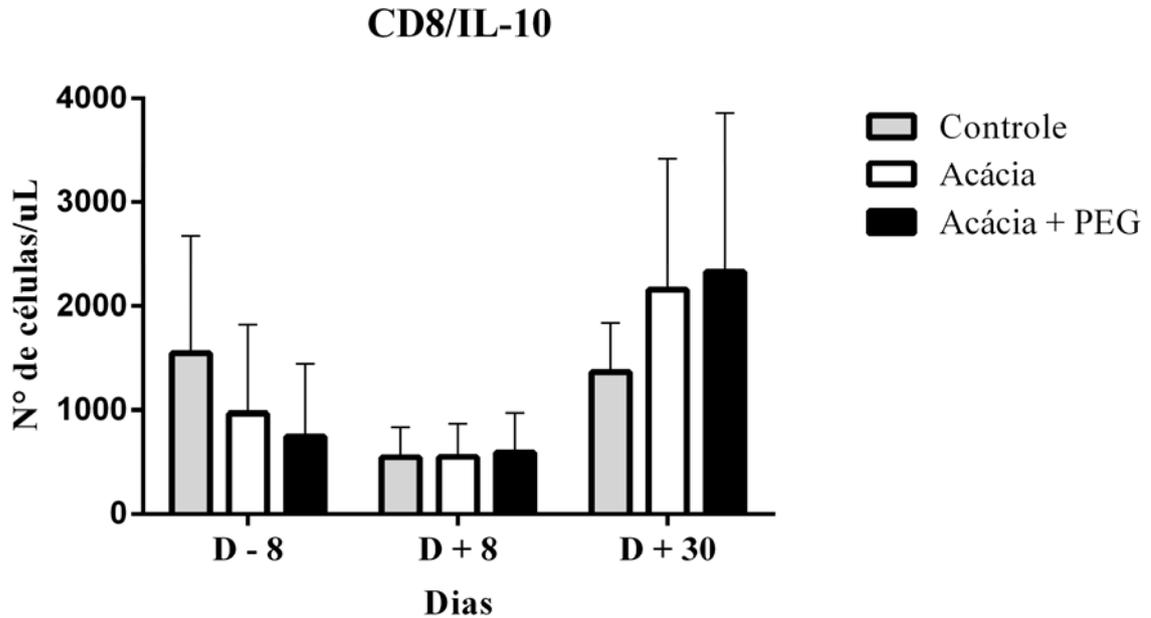


Figura 15: Número de linfócitos CD8⁺ produtores de IL-10 presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos CD8⁺/IL-10⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após a infecção; (D+30) - 30 dias após da infecção.

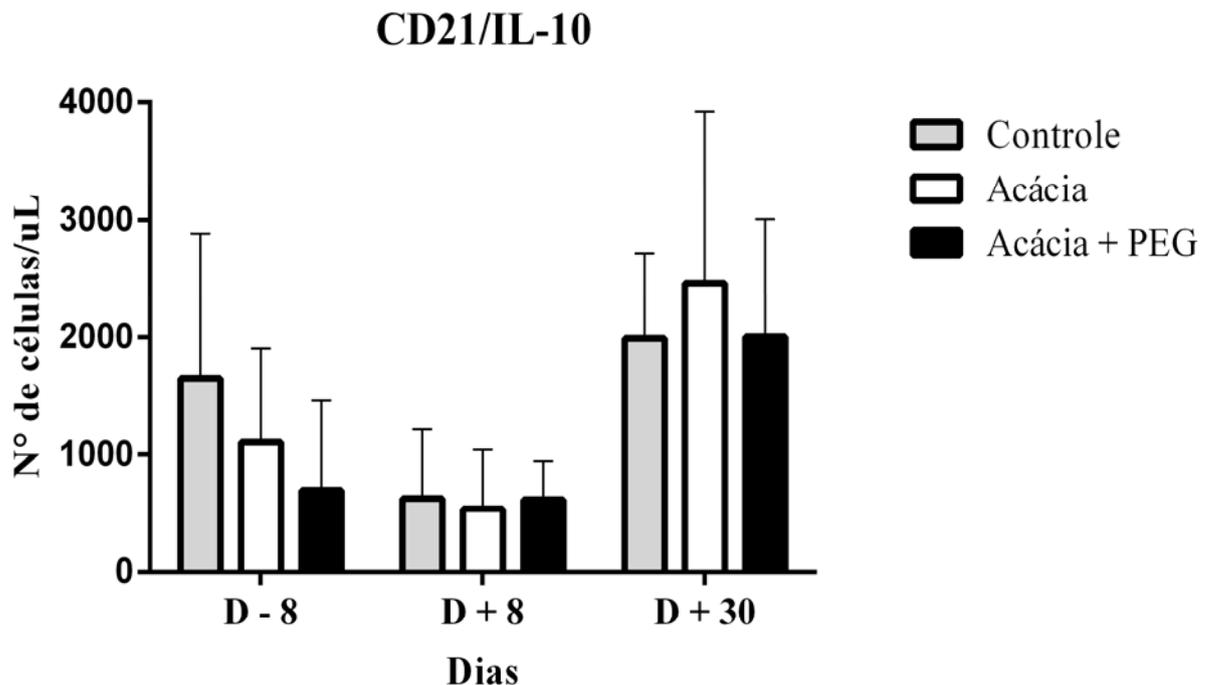


Figura 16: Número de linfócitos CD21⁺ produtores de IL-10 presentes no sangue periférico de caprinos. Os resultados estão expressos pela média dos valores absolutos de linfócitos CD21⁺/IL-10⁺, acompanhada de desvio padrão. **Controle** = animais alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja, sem adição do pó de *A. mangium*; **Acácia**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja + pó de casca de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV); **Acácia+PEG**= alimentados com concentrado de farelo de milho + farelo de soja+ pó de *A. mangium* (100mg TC /Kg PV) + PEG (10g/por dia). Período de avaliação: (D-8) - 8 dias antes da infecção; (D+8) - 8 dias após a infecção; (D+30) - 30 dias após da infecção.

5.7 Análise imunofenotípica de linfócitos de caprinos não infectados após estimulação com antígeno bruto de *H. contortus*

Para avaliar a capacidade dos antígenos de *H. contortus* em promover mudanças associadas ao fenótipo dos linfócitos de caprinos não infectados, foram realizadas, após separação de PBMCs e separação de células não-aderentes, culturas de linfócitos com duração de 24 horas, na presença e na ausência do antígeno bruto (AgBr) do parasito, na concentração de 100µg/mL. Após o término do período de cultura, foi feita análise imunofenotípica das células por citometria de fluxo.

A avaliação de células duplamente positivas para as moléculas ($CD4^+/IL-4^+$; $CD4^+/IFN-\gamma^+$; $CD4^+/IL-10^+$; $CD8^+/IL-4^+$; $CD8^+/IFN-\gamma^+$; $CD8^+/IL10^+$; $CD21^+/IL-10^+$) não evidenciaram diferenças significativas entre culturas estimuladas com antígenos do parasito (AgBr) e culturas controles (CC) (**Fig. 17**). Essa abordagem foi realizada considerando o valor percentual de células para as moléculas avaliadas. A mesma análise foi feita para os linfócitos dos caprinos infectados, após diferentes tempos de infecção (dados não apresentados) e também não foram encontradas diferenças significativas entre as culturas estimuladas e não estimuladas com o antígeno bruto.

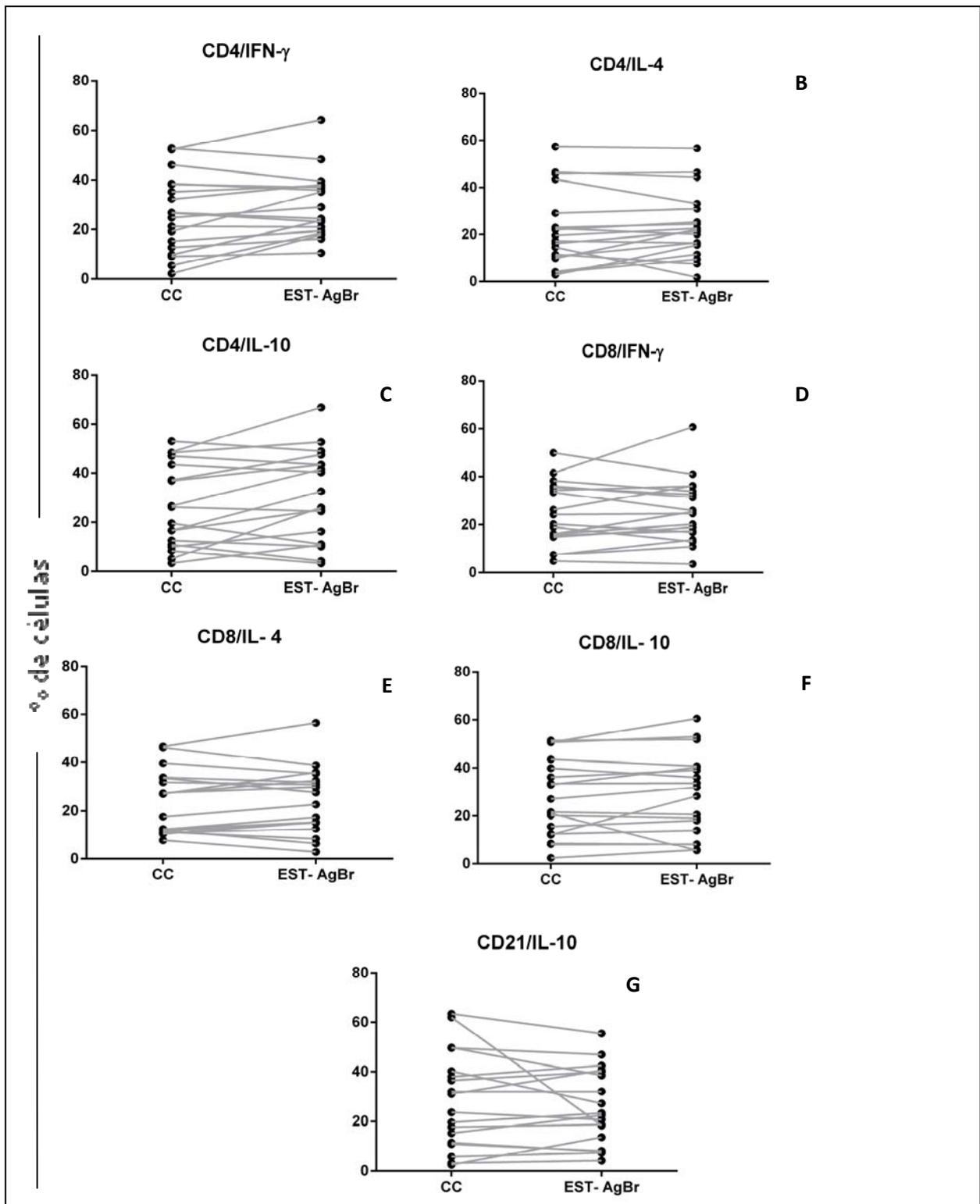


Figura 17. Avaliação da expressão de ($CD4^+/IFN-\gamma^+$ (A); $CD4^+/IL-4^+$ (B); $CD4^+/IL-10^+$ (C); $CD8^+/IFN-\gamma^+$ (D); $CD8^+/IL-4^+$ (E); $CD8^+/IL10^+$ (F); $CD21^+/IL-10^+$ (G)) em cultura de linfócitos de caprinos não infectados estimulados (EST- AgBr = 18) com antígenos antígeno bruto e em culturas controles (CC n = 18). Os resultados estão expressos por percentual de células positivas para as moléculas avaliadas.

Considerando que os TC podem produzir alguns efeitos negativos sobre o consumo e produtividade de ruminantes foi avaliado inicialmente o efeito da alimentação com Acácia sobre o consumo voluntário e peso dos caprinos. No presente estudo não houve interferência da dieta com acácia (100 mg TC/kg PV) sobre o consumo voluntário e ganho de peso nos animais que receberam a planta, quando comparado com o controle. Dessa forma, na concentração de 100 mg TC/kg PV/animal/dia não causou prejuízos ao consumo e produtividade dos animais. Outros estudos com uso de TC estão de acordo com os resultados aqui apresentados. Cenci et al. (2007) também não relataram efeito negativo sobre o peso de cordeiros alimentados com *A. mearnsii* (contendo 18% de TC). Minho et al. (2008b) observaram que o fornecimento de extrato de *A. molissima* (1,6 g de extrato kg⁻¹ PV) por dois dias consecutivos, duas vezes ao mês a cordeiros naturalmente infectados com *H. contortus* e *T. colubriformis* também não afetaram o ganho de peso dos ovinos. Min et al. (2003) afirmaram que o efeito de TC, em concentrações moderadas, pode ser utilizado para promover aumento da eficiência de digestão de proteínas. Contrariamente, Kahiya (2003) revelou menores ganhos de peso nos animais infectados que receberam outras espécies de Acácia em sua dieta. Athanasiadou et al. (2000a) observaram que ovinos infectados tratados por uma semana com extrato de tanino condensado oriundo de *Schinopsis spp.* (representando 8% da dieta diária) apresentaram menor ganho de peso do que os animais controle, que não receberam a planta.

Quanto ao efeito da alimentação com Acácia sobre os parâmetros parasitológicos aqui avaliados, observamos que a alimentação com Acácia não resultou em redução de contagem de OPG e teve baixa eficiência sobre a redução da infecção por *H. contortus* (em torno de 15%) quando comparada a redução observada para *T. colubriformis* (96%). Contrariamente, Minho et al. (2008b) analisaram o efeito dos TC provenientes do extrato de *A. molissima* em cordeiros naturalmente infectados com *H. contortus* e *T. colubriformis* relataram que houve redução na contagem de OPG e na carga parasitária de *H. contortus* no abomaso quando os mesmos receberam 1,6 g de extrato (contendo 15%TC) kg⁻¹ /PV/dia, durante 2 dias consecutivos em intervalos de 30dias, fato esse não observado na carga parasitária de *T. colubriformis* em intestino delgado. Considerando o % de TC contido no extrato de *A. molissima*, um cordeiro de 20 Kg, recebeu em torno de 4,8 g de TC dia, então 9,6 g TC por mês. Comparativamente um caprino de 20 kg que se alimentou com o pó da casca de acácia recebeu 2g de TC/dia, o que daria em torno de 30g TC mês. Em termos de fornecimento

diário os cordeiros receberam uma dose mais de duas vezes maior de TC que os caprinos deste experimento.

A dose fornecida para estes animais pode ser a principal explicação para diferente na atividade biológica das duas espécies de Acácia. Talvez doses maiores em um menor intervalo de tempo sejam fundamentais para o controle de *H. contortus*, mas para *T. colubriformis* seja mais eficiente menores doses em maior tempo de fornecimento. Ou ainda as diferenças sejam devido à espécie de hospedeiro. E quando o estudo refere-se a ovinos e caprinos é importante destacar que contrariamente aos ovinos, os caprinos apresentam adaptações fisiológicas capazes de neutralizar os metabólitos secundários das plantas, que podem interferir na atividade biológica destes compostos (Athanasiadou et al. 2007).

Entretanto, as diferenças observadas quanto à atividade biológica destas duas espécies de Acácia sobre estes dois parasitos podem também ser consequência de diferenças na estrutura química, grau de polimerização do TC ou mesmo concentração dos polifenóis em cada espécie de planta, fatores que podem influenciar diretamente na atividade anti-helmíntica sobre um determinado parasito (Reed 1995; Brunet et al. 2007). Os resultados obtidos por Kahiya et al. (2003) estudando outras duas espécies de Acácia também apóiam esta hipótese, pois ao fornecerem *Acacia karoo* e *A. nilótica* para caprinos infectados com *H. contortus*, observaram que somente *A. karoo* reduziu a contagem de ovos. Estes resultados confirmam a importância da estrutura de cada TC na sua atividade biológica e incita pesquisas que busquem conhecer a estrutura química dos compostos fenólicos de cada planta e trabalhem como estes compostos de forma isolada.

Outros fatores também podem influenciar a atividade biológica destes compostos, como a espécie do hospedeiro e parasito (Hoste et al. 2011). A diferença da susceptibilidade de *H. contortus* e *T. colubriformis* aos TC foi reportada em ensaios *in vitro* de desembainhamento de L3, onde catequingalato, epicatequina e epigalocatequina apresentaram atividade sobre *T. colubriformis*, mas não sobre *H. contortus* (Brunet & Hoste 2006). Os dados desses autores confirmam resultados prévios de outros estudos realizados *in vivo* com plantas ricas em taninos, que apresentam ação anti-helmíntica dependente da espécie de parasito e localização anatômica. Isso foi bem observado quando o tratamento com extrato de quebracho em ovinos (Athanasiadou et al. 2001) demonstraram efeitos apenas sobre as populações de parasitos do intestino delgado (*T. colubriformis* e *Nematodirus battus*) sem nenhum efeito sobre o parasito abomasal *H. contortus*.

Considerando estas informações, pode-se concluir que a atividade dos TC é determinada por diversos fatores e explicar as suas diferentes ações anti-helmínticas é uma tarefa difícil, que exige pesquisas mais complexas que envolvam uma avaliação minuciosa da estrutura química de cada um destes compostos, sendo ainda necessário isolá-los para que sejam determinadas suas atividades tanto *in vitro* com o *in vivo*.

Neste estudo também foi avaliado se atividade biológica das plantas estava ligada aos compostos polifenólicos. Para isso, utilizamos um grupo que consumiu o pó da casca de *A. mangium* associado ao polietilenoglicol (PEG), que possui a habilidade de bloquear os compostos fenólicos (Makkar et al. 1995; Makkar 2003) e inibem os efeitos anti-helmínticos caso estes sejam promovidos por compostos polifenólicos (Alonso-Díaz et al. 2008a,b). O PEG é um polímero sintético, não nutritivo que contém um número de moléculas de oxigênio suficiente para formar fortes ligações com os grupos fenólicos e hidroxilas dos taninos (Silanikove et al. 2001). O PEG se liga aos taninos com maior afinidade que as proteínas e com isso irá substituí-las nos complexos tanino-proteína, inclusive os pré-formados sem ser degradados ou absorvidos pelos animais (Lascano & Carulla 1992; Ben Salem et al. 1999).

Os resultados aqui apresentados revelaram que os animais do grupo controle e Acácia+ PEG tiveram carga parasitária de *T.colubriformis* semelhantes, diferindo da carga parasitária observada no grupo Acácia, que foi drasticamente reduzida. Dessa forma, concluímos que o PEG ao bloquear a atividade dos compostos fenólicos, alterou a habilidade da planta em reduzir a infecção por *T.colubriformis*. Dessa forma, podemos afirmar que os compostos fenólicos estão claramente envolvidos na redução da carga parasitária de *T.colubriformis*.

Sabendo que os linfócitos desempenham um papel importante na geração de respostas imunitárias contra helmintos (Schallig 2000) e que diversos metabolitos secundários de planta, em especial os flavonóides, podem modular a atividade de células de sistema imune (Kim et al. 2004; Lyu & Park 2005; Biesalski 2007). Neste estudo, avaliou-se o efeito da alimentação com acácia, rica em TC, um tipo de flavonóide, sobre o perfil fenotípico de linfócitos circulantes em caprinos. Através da imunofenotipicamente por citometria de fluxo, observou-se as células mononucleares do sangue periférico, positivas para as moléculas CD4, CD8 e CD21 e, através de marcação intracelular, a expressão de citocinas IL-4, IFN- γ e IL-10.

Na observação do perfil fenotípico dos linfócitos, do sangue periférico de caprinos, diferenças significativas entre os grupos controle, Acácia e Acácia + PEG só foram

verificadas na avaliação realizada após 30 dias de infecção, período que pode ser associado à patência da infecção. Considerando a infecção, também verificou-se que os linfócitos B (CD21+) produtoras de IL-10 aumentaram com a evolução da infecção, em todos os grupos. Indicando que estas células têm um papel significativo na infecção, apesar de não diferir entre os grupos. A IL-10 é uma citocina com ação imunossupressora, importante no estabelecimento da tolerância imunológica do hospedeiro a infecções, atuando no controle de intensas reações inflamatórias. A IL-10 tem a capacidade de suprimir praticamente todas as citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, e ao mesmo tempo inibir a expressão de moléculas na superfície de células apresentadoras de antígenos (Doetze et al. 2000; Moore et al. 2001). Em infecções helmínticas as células B produtoras de IL-10, conhecidas como células Breg, desempenham um papel importante na infecção através da sua capacidade para modular as respostas de células T (Gillan et al. 2005).

Os resultados também demonstram que a evolução da infecção interage de forma significativa com a resposta imune e que infecções mais prolongadas promoveram um aumento significativo dos linfócitos avaliados. Estas diferenças podem ser reflexos da evolução cronológica das lesões que são descritas durante o curso da infecção (Barker 1975), ou ainda podem ser uma resposta ao estágio do parasito observado em cada fase da infecção. Resultados apresentados por outros estudos também observam que algumas células do sistema imune são aumentadas em períodos maiores de infecção. Bambou et al. (2013) avaliando o número de eosinófilos no sangue de caprinos só observou aumento destas células após 35 dias de infecção.

Em infecções recentes por *T. colubriformis*, enquanto predominam os estágios larvais, as modificações nas vilosidades são geralmente moderadas (Hoste & Reilly 1988), já na presença de formas adultas a atrofia das vilosidades é bem maior (Barker 1973a; Martin & Lee 1980). Estas mudanças observadas em cada fase da infecção podem ser responsáveis pelas mudanças na resposta imune, assim como o estágio do parasito também pode ser responsável por essas modificações (Meeusen et al. 2005). Alguns estudos com *H. contortus* e *T. circumcincta* sugerem que cada fase do parasito expressa um perfil antigênico único, que pode ser considerado como um organismo antigênico distinto no contexto da resposta imune do hospedeiro (Bowles et al. 1995; Balic et al. 2003; Meeusen et al. 2005). Nas esquistosomiasis já está bem caracterizado que as diferentes formas do parasito induzem diferentes mecanismos imunológicos no hospedeiro (Anthony et al. 2007; Burke et al. 2009)

Na avaliação do perfil fenotípico realizada após 30 dias da infecção verificou-se que os animais tratados com Acácia (grupo Acácia) tiveram um maior número de células CD4⁺ produtoras de IL-4 em relação ao controle, confirmando que Acácia estimulou o desenvolvimento de um perfil tipicamente anti-helmíntico e anti-inflamatório. Os linfócitos T CD4⁺ estão envolvidos principalmente na ativação e regulação de outras células sendo, portanto, denominados auxiliares. Células TCD4⁺ produtoras de citocina IL-4 estão associadas a uma resposta imune tipo Th2, bastante comum nas infecções helmínticas. A resposta tipo Th2 é caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-9 (Urban et al. 1992; Finkelman et al. 1997). Outras citocinas, produzidas por células da resposta imune inata, como IL-21, IL-33 e IL-25, também contribuem para o estabelecimento da resposta Th2 (Anthony et al. 2007).

A resposta imune do tipo Th2 estimula uma resposta imune humoral e também a diferenciação e ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, importantes fontes de IL-4 nas fases iniciais da resposta Th2 (Min et al. 2004; Shinkai et al. 2002; Anthony et al. 2007; Finkelman et al. 2004; Zhao et al. 2003; Patel et al. 2009). A IL-4 tem sido descrita como o principal estímulo para o desenvolvimento de células Th2 e também, como o principal estímulo para a produção de anticorpos IgE e IgG (Del Prete et al. 1988; Maizels et al. 2004), assim como também atua na regulação de células T e B e modulação de respostas inflamatórias (Robinson et al. 1997; Allen & Maizels 2011)

Diferentes trabalhos também evidenciam a participação direta de IL-4 na mucosa intestinal do hospedeiro promovendo o desenvolvimento da imunidade protetora, pois atuam em mastócitos, células epiteliais e células caliciformes produtoras de RELM- β , que induzem a expulsão do parasito por meio de reações fisiológicas, como produção de muco e hipercontratilidade muscular (Zhao et al. 2003; Cliffe et al. 2005; Maizels et al. 2004; Artis et al. 2004; Herbert et al. 2009). Em algumas infecções pode também promover a formação de granuloma e ativação alternativa de macrófagos com consequente produção de arginase (Gordon et al. 2003; Anthony et al. 2006).

O aumento da produção de IL-4 por células TCD4⁺ observados aqui sugerem a atuação dos polifenóis na modulação da resposta imune em caprinos, estimulando a produção de citocinas tipicamente envolvidas na proteção contra helmintos. O papel modulador do polifenóis ou flavonóides tem sido bastante estudado tanto *in vitro* como *in vivo* com modelos experimentais (Calixto et al. 2004; Santangelo et al. 2007) e estes estudos tem atribuído aos flavonoides uma importante ação anti-inflamatória devido a habilidade destes compostos modularem a produção de citocinas pró-inflamatória (Madhavan et al. 2006).

Miles et al. (2005) avaliaram o efeito de vários compostos fenólicos sobre a produção de citocinas pro- inflamatórias e anti-inflamatória, através da estimulação *in vitro* de células do sangue de humanos, e observaram que um dos polifenóis testados na concentração 10^{-4} M (molar) reduziram significativamente a produção de IFN- γ , mas não afetou a produção de IL-2 e IL-4. Contrariamente nossos resultados revelaram um aumento da produção de IL-4, estimulada por polifenóis.

Os resultados apresentados por Okamoto et al. (2002) avaliando o efeito de um flavonoide, o kaempferol em células T de ratos observou que este composto fenólico suprime a produção de citocinas do tipo Th1 como IFN- γ e IL-2, deslocando o equilíbrio Th1/Th2 em direção a um fenótipo Th2 dominante. Liu et al. (2012) em um estudo *in vivo* com camundongos também demonstrou a interferência de flavonóides no equilíbrio Th1/Th2, sendo que os flavonóides levaram a um aumento da produção de IL-4 e IL-10 e inibiram a produção de IFN- γ e IL-2 intra-hepática. Zhong et al. (2014) também observaram uma inibição de citocinas IFN- γ e IL-2 e aumento da expressão de citocinas IL4 e IL-10 em leucócitos de ovelhas, estimuladas *in vitro* com antígenos de *H. contortus* e ácido tânico.

Além do aumento das células T CD4⁺IL-4⁺ no grupo Acácia, as células CD8⁺ produtoras de IFN- γ e IL-4 também foram significativamente maiores nos grupos Acácia e Acácia + PEG em relação ao controle, após 30 dias de infecção. O aumento desta resposta não só no grupo Acácia, mas também no grupo Acácia+ PEG, sugere que essa resposta não é induzida por compostos fenólicos, já que o PEG tem a capacidade de inibi-los. Dessa forma, podemos afirmar que outros compostos presentes na Acácia também atuam sobre a resposta imune em caprinos.

Os linfócitos T CD8⁺ são células do sistema imune adaptativo, capazes de induzir a morte de células infectadas através de mecanismos citotóxicos, assim como também podem produzir citocinas e estimular outras células do sistema imune (Shresta et al. 1998). Os linfócitos T CD8⁺ são importantes mediadores da resposta imune adaptativa contra determinado vírus, protozoários e bactérias patogênicas (Kimura et al. 1999; Kumar et al. 1998; Harty et al. 2000; Sud et al. 2006; Sandalova et al. 2010), mas que geralmente não estão associadas às infecções helmínticas.

A produção aumentada de IFN- γ , citocina pro-inflamatória, pelas células TCD8⁺ caracteriza um perfil de resposta tipo Th1, que está tipicamente envolvida na imunidade contra patógenos intracelulares (Boyton et al. 2002; Scollard et al. 2006). A produção desta citocina ativa e recruta macrófagos para o sítio de infecção estimulando-os a produzir outras citocinas, como o TNF- α (Boehm et al. 1997). Nas infecções por helmintos a produção de

INF- γ geralmente não coincide com uma resposta protetora, sendo geralmente regulada negativamente, quando isso não ocorre pode produzir prejuízos ao hospedeiro (Maizels et al. 2004).

Avaliado de forma conjunta os perfis fenotípicos dos linfócitos observados neste estudo, verificou-se que o consumo de Acácia estimulou um padrão de resposta misto como produção tanto de citocinas INF- γ como IL-4, que se associam com respostas Th1 e Th2, respectivamente.

A maior parte dos estudos com metabólitos secundários em especial os flavonóides, determinam que estes compostos reduzem a proliferação de citocinas pró inflamatórias, como INF- γ (Comalada et al. 2006; Wong et al. 2011). Contudo, parece que a habilidade dos compostos em modular a produção de citocinas não se refere somente a citocinas pró inflamatórias, mas também são determinadas pelo perfil imune requerido em cada infecção. Nas infecções por *Schistosoma* já é bem evidente o papel de citocinas pró inflamatórias e anti-inflamatórias, que se reflete em um balanço da resposta Th1/Th2, que diante das diferentes formas do parasito requer a atividade mais aguçada de Th1 ou Th2 para controlar o parasito e a imunopatologia da infecção (Grzych et al. 1991; Yu et al. 2012). Allan & Abuelsaad (2013) observou que ao tratar com hesperidina (um tipo de flavonoide) esplenócitos de camundongos infectados com *Schistosoma*, e estimulados *in-vitro* com antígenos de verme adulto e ovos, as citocinas IL-4 e INF- γ foram aumentadas. Esses dados nos permitem sugerir que os metabólitos secundários modulam a resposta imune, orientados pela necessidade de resposta requerida em cada tipo de infecção. Portanto, os resultados aqui obtidos parecem sugerir que a infecção dos caprinos induziu a produção de IL-4 e INF- γ e os compostos presentes no pó da casca de Acácia atuaram aumentando a produção destas citocinas.

Nos ruminantes, a natureza da resposta imune contra nematóides gastrintestinais parece estar associada a uma dicotomia Th1/Th2 como tem sido observado em outros organismos (Brown et al. 1998; Pernthaner et al. 1997; Lacroux et al. 2006). Gill et al. (2000) avaliando a produção de citocinas em células de linfonodos abomasais e mesentéricos de ovinos após estimulação *in vitro* com *H. contortus* supôs haver uma polarização da resposta imune para um perfil Th2. A polarização Th2 tem sido também demonstrada em ovelhas infectadas por *T. colubriformis* (Pernthaner et al. 2005). Contudo, os escassos estudos em caprinos não nos permitem afirmar que haja uma polarização da resposta para Th1 ou Th2. A informação que possuímos sobre caprinos quanto aos mecanismos de controle de infecções por nematoides gastrintestinais, como *H. contortus* parecem ser complexos e envolvem tanto linfócitos TCD4⁺ como TCD8⁺ (Muleke et al. 2013). Os resultados apresentados neste estudo

também evidenciam a participação destes linfócitos na infecção por *H. contortus* e *T. colubriformis* em caprinos.

Talvez se o padrão de resposta fosse avaliado durante período mais longo, uma polarização da resposta imune para um padrão tipicamente anti-helmíntico com aumento de IL-4 e redução de IFN- γ poderia ter sido observado. A avaliação da resposta imune local, poderia também auxiliar na compreensão do padrão de resposta destes organismos na situação aqui estudada, e permitiria determinar como as mudanças sistêmicas se associam a resposta efetora contra os parasitos. A avaliação da resposta imune local poderia também nos permitir determinar se a menor eficiência da planta quanto a carga parasitária de *H. contortus* estava associada a uma menor resposta imune no sítio de infecção abomasal em relação ao intestinal.

Os resultados de forma geral nos permitem afirmar que o consumo de Acácia por caprinos infectados estimulou a resposta imune e promoveu uma redução da carga parasitária de *T. colubriformis*, que está correlacionada com o aumento da resposta imune no grupo Acácia. Contudo, não é possível afirmar que a resposta imune foi induzida de forma indireta devido a uma mudança no status nutricional ou se os compostos fenólicos atuaram diretamente sobre as células do sistema imune no local da infecção induzindo a resposta imune observada a nível sistêmico.

Dessa forma, este estudo representa a primeira investigação sobre a atuação de compostos presentes no pó da casca de *A. mangium* sobre a resposta imune sistêmica em caprinos frente a infecções helmínticas e revela uma atuação promissora destes compostos sobre o sistema imune, tornando mais consistente as investigações sobre a hipótese de ação indireta dos TC.

Com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o consumo *A. mangium* atua sobre infecções helmínticas através de ação indireta, pois promoveu alterações no padrão da resposta imune em caprinos, induzindo um perfil de resposta misto com aumento de IL-4 e IFN- γ , que foram associados com a redução da carga parasitária de *T. colubriformis*. Dessa forma, o uso de *A. mangium* na dieta de caprinos representa uma ferramenta em potencial para o controle do parasitismo gastrintestinal de pequenos ruminantes e crescimento da caprinocultura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott EM, Parkins JJ, Holmes PH 1988. Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infection. *Res Vet Sci* 45: 41-49.
- Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA, Gleich G 1989. IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol* 142: 2393-2400.
- Achi YL, Zinsstag J, Yao K, Yeo N, Dorchies P, Jacquet P 2003. Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. *Vet Parasitol* 116: 151–158.
- Aerts RJ, Barry TN, McNabb WC 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agr Ecosyst Environ* 75: 1-12.
- Ahid SMM, Suassuna ACD, Maia MB, Costa VMM, Soares HS 2008. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da região oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. *Cienc Anim Bras* 9: 212-218.
- Akiyama H, Sato Y, Watanabe T, Nagaoka MH, Yoshioka Y, Shoji T, Kanda T, Yamada K, Totsuka M, Teshima R, Sawada J, Goda Y, Maitani T 2005. Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. *FEBS Lett* 579: 4485–4491.
- Alberti H, Hellmeister ZMM, Santarém VA, Laposy CB, Alberti ALL 2005. Eficácia do composto homeopático (Fator Ovino®) no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos naturalmente infectados. Anais do SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE DE PARASITAS EM PEQUENOS RUMINANTES. Tema: Avanços e Alternativas, São Paulo, Brasil. Nova Odessa, São Paulo p. 47-51.
- Allan G, Abuelsaad ASA 2013. Differential effect of hesperidin on Th1, Th2, Th17, and proinflammatory cytokines production from splenocyte of *Schistosoma mansoni* infected mice. *Centr Eur J Immunol* 38: 29-36.
- Allen JE, Maizel RM 2011. Diversity and dialogue in immunity to helminthes. *Nat Rev Immunol* 11: 375-388.

- Allomby EW 1973. Ovine Haemonchosis: Epidemiology, Clinical Signs and Diagnosis. In: Urquhart GM, Armour JR, Helminth Diseases of Cattle, sheep and Horses in Europe. University Press, Glasgow, p. 59-71.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Hoste H 2008b. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet Parasitol* 153: 313-319.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal C, Brunet S, Hoste H 2008a. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet Parasitol* 153: 187-192.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Hoste H 2010. Tannins in tanniniferous tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe? *Small Rumin Res* 89, 164–173.
- Alves AR, Beelen PMG, Medeiros AN, Gonzaga Neto S, Beelen RN 2011. Consumo e digestibilidade do feno de sabiá por caprinos e ovinos suplementados com polietilenoglicol. *Rev. Caatinga*, 24: 152-157
- Alves FSF 2002. O leite de cabra é tão nutritivo quanto os leites de vaca e materno? *Re. Cienc Hoje* 32: 20-26.
- Almeida JL 1935. Revisão do gênero *Haemonchus* Cobb, 1898: (Nematoda: Trichostrongylidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 30: 57-114.
- Amarante AFT, Barbosa MA, Oliveira MAG, Carmello MJ, Padovani CR 1992. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. *Braz J Vet Res Anim Sci* 29: 31-38.

- Amarante AFT, Bricarello PA, Rocha RA 2007. Relationship of intestinal histology with the resistance to *Trichostrongylus colubriformis* infection in three breeds of sheep. *Pesq Vet Bras* 27: 43-48.
- Amarante AFT, Bricarello PA, Rocha RA, Gennari SM 2004. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Vet Parasitol* 120: 91-106.
- Amarante AFT 2001. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: Mattos WRS A produção animal na visão dos brasileiros. Fealq, Piracicaba, p. 461-473.
- Anderson N, Martin PJ, Jarret RG 1991a. The efficacy of mixtures of albendazol sulphoxide and levamisol against sheep nematodes resistant to benzimidazol and levamisol. *Aust Vet J* 68: 127-132.
- Anderson N, Martin PJ, Jarret RG 1991b. The field evaluation of mixtures of albendazol sulphoxide and levamisol against *Ostertagia* and *Trichostrongylus spp.* in sheep. *Aust Vet J* 68: 133-136.
- Anderson R.C. 2000. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission, pp 650.
- Andlauer W, Fürst P 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Res Int* 35: 171–176.
- Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Étienne-Selloum N, Li H, Martínez MC, Schini-Kerth VB, Laher I 2012. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr* 108: 1532–1549.
- Ansem D, Spilianakis CG, Flavel RA 2009. How are Th1 and Th2 effector cells made? *Curr Opin Immunol* 21: 153–160.
- Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC. 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7: 975–987.

Anthony RM, Urban JF Jr, Alem F, Hamed HA, Rozo CT, Boucher JL, Van Rooijen N, Gause WC 2006. Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* 12: 955–960.

Araújo JV, Rodrigues MLA, Silva WW, Vieira LS 2007. Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. *Pesq Agropec Bras* 42: 1177- 1181.

Arosemena NAE, Bevilaqua CML, Melo ACFL, Girão MD 1999. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi- arid area in Brazil. *Rev Méd Vet* 150: 873-876.

Artis D, Wang ML, Keilbaugh SA, He W, Brenes M, Swain GP, Knight PA, Donaldson DD, Lazar MA, Miller HR, Schad GA, Scott P, Wu GD 2004. RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13596-13600.

Athanasiadou S, Houdijk J, Kyriazakis I 2008. Exploiting synergisms and interactions in the nutritional approaches to parasite control in sheep production systems. *Small Ruminant Res* 76: 2-11.

Athanasiadou S, Kyriazakis I 2004. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proc Nutr Soc* 63: 631–639.

Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL 2000a. Effects of short term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Rec* 146: 713–734.

Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL 2000b. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 30: 1025–1033.

- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL 2001. Direct anthelmintic effect of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: In vitro and in vivo studies. *Vet Parasitol* 99: 205-219.
- Athanasiadou S, Tzamaloukas O, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL 2005. Testing for anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Vet Parasitol* 127: 233–243.
- Athayde, A. C. R. 1996. Surto epizootico de haemoncose e strogiloidose caprina no semi-árido paraibano. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, p. 264.
- Audebert F, Hoste H, Durette-Desset MC 2002. Life cycle of *Trichostrongylus retortaeformis* in its natural host, the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Helminthol* 90: 189-192.
- Azando EVB, Hounzangbé-Adoté MS, Olounlade PA, Brunet S, Fabre N, Valentin A, Hoste H 2011. Involvement of tannins and flavonoids in the in vitro effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 180: 292-297.
- Bahuaud D, Martinez-Ortiz de Montellano C, Chauveau S, Prevot F, Torres-Acosta F, Fouraste I, Hoste H 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132: 545-554.
- Balic A, Bowles VM & Meeusen EN 2000b. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv Parasitol* 45: 181–24.
- Balic A, Bowles VM, Liu YS, Meeusen EN 2003. Local immune responses in sensitized sheep following challenge infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol* 25: 375–381.
- Balic A, Bowles VM, Meeusen EN 2000a. Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 75: 109-120.

- Balic A, Bowles VM, Meeusen EN 2000b. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv Parasitol* 45: 181–241.
- Balic A, Bowles VM, Meeusen EN 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol* 24: 39–46.
- Balic A, Cunningham CP, Meeusen EN 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol* 28: 107-115.
- Bambou JC, Archimède H, Arquet R, Mahieu M, Alexandre G, Gonzalez-Garcia E, Mandonnet N 2011. Effect of dietary supplementation on resistance to experimental infection with *Haemonchus contortus* in creole kids. *Vet Parasitol* 178: 279–285.
- Bambou JC, González-García E, Chevrotière C, Arquet R, Vachiéry N, Mandonnet N. 2009. Peripheral immune response in resistant and susceptible Creole kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Res* 82: 34–39.
- Bambou JC, Larcher T, Ceï W, Dumoulin PJ, Mandonnet N 2013. Effect of Experimental Infection with *Haemonchus contortus* on Parasitological and Local Cellular Responses in Resistant and Susceptible Young Creole Goats. *Biomed Res Int* 2013:902759.
- Barahona R, Lascano CE, Narvaez N, Owen E, Morris P, Theodorou M 2003. In degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition. *J Sci Food Agric* 83: 1256-1266.
- Barker IK 1973a. Scanning electron microscopy of the duodenal mucosa of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasitology* 3: 307-314.
- Barker IK 1973b. A study of pathogenesis of *Trichostrongylus colubriformis* infection in lambs with observations on the contribution of gastrointestinal plasma loss. *Int J Parasitol* 3: 743-757.

- Barker IK 1975. Intestinal pathology associated with *Trichostrongylus colubriformis* infection in sheep: Histology. *Parasitology* 70: 165-171.
- Barner M, Mohrs M, Brombacher F, Kopf M 1998. Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Curr Biol* 8: 669-672.
- Barry TN, Duncan SJ 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 1. Voluntary intake. *Br J Nutr* 51: 485-491.
- Barry TN, McNabb WC 1999. The implication of condensed tannins on the nutritive value of temperature forages fed to ruminants. *Br J Nutr* 81: 263-272.
- Ben Salem H, Nefzaoui A, Ben Salem L, Tisserand JL 1999. Intake, digestibility, urinary excretion of purine derivatives and growth by sheep given fresh, air-dried or polyethylene glycol-treated foliage of *Acacia cyanophylla* Lindl. *Anim Feed Sci Techn* 78: 297-311.
- Biesalski HK 2007. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 724-728.
- Blaxter ML, Ley P, Garey JR, Liuk LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, FrisseI L M, Vidal JT, Thomas WK 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.
- Blazsó G, Gábor M, Rohdewald P 1997. Antiinflammatory activities of procyanidin-containing extracts from *Pinus pinaster* Ait. after oral and cutaneous application. *Pharmazie* 52: 380-382.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15: 749-795.
- Bowles VM, Brandon MR, Meeusen E 1995. Characterization of local antibody responses to the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. *Immunology* 84: 669-674.

- Boyton RJ, Altmann DM 2002. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol* 23: 526-529.
- Bricarello PA, Amarante AFT, Rocha RA, Cabral Filho SL, Huntley JF, Houdijk JGM, Abdalla AL, Gennari SM 2005. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. *Vet Parasitol* 134: 99-109.
- Brown WC, Rice-Ficht AC, Estes DM 1998. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol* 63: 45–55.
- Brunet S, Aufrere J, Babili F, Fouraste I, Hoste H 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in presence of a tannin rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134: 1253-1262.
- Brunet S, de Montellano CM, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Capetillo-Leal C, Hoste H 2008a. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Vet Parasitol* 157: 81–88.
- Brunet S, Foruquaux I, Hoste H 2011. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol Int* 60: 419-424.
- Brunet S, Hoste H 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J Agric Food Chem* 54: 7481-7487.
- Brunet S, Jackson F, Hoste H 2008b. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explant. *Int J Parasitol* 38: 783-790.
- Bruneton J 1993. Tannins. In: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3. ed., Tec and Doc, Paris, p. 370–404

- Bueno MS, Cunha EA, Veríssimo CJ, Santos LE, Lara MAC, Oliveira SM, Spósito Filha E, Rebouças MM 2002. Infecção por nematodos em razas de ovelhas carniças criadas intensivamente em la región del sudeste del Brasil. *Archiv de Zootec* 51: 273-280.
- Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol* 31: 163-176.
- Butter NL, Dawson JM, Wakelin D, Buttery JP 2000. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. *J Agr Sci* 134: 89-99.
- Cabaret J, Bouilhol M, Mage C 2002. Managing helminthes of ruminants in organic farming. *Vet Res* 33: 625-640.
- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 70: 93-103.
- Camurça-Vasconcelos AL, Bevilaqua CM, Morais SM, Maciel MV, Costa CT, Macedo IT, Oliveira LM, Braga RR, Silva RA, Vieira LS 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet Parasitol* 148: 288-294.
- Castro AC 2005. *Avaliação de sistema silvipastoril através do desempenho produtivo de búfalos manejados nas condições climáticas de Belém, Pará*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 75 pp.
- Cavalcante ACR, Vieira LS, Chagas ACS, Molento MB 2009. *Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 604 pp.
- Cavalcanti ASR, Almeida MAO, Dias AVS 2007. Efeito de medicamentos homeopáticos no número de ovos de nematódeos nas fezes (OPG) e no ganho de peso em ovinos. *Rev Bras Saúde Prod Anim* 8: 162-169.

- Cenci FB, Louvandini H, McManus CM, Dell'Porto A, Costa DM, Araújo SC, Minho AP, Abdalla AL 2007. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. *Vet Parasitol* 144: 132–137.
- Cezar AS, Catto JB, Bianchin I 2008. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. *Cien Rural* 38: 2083-2091.
- Chafton BS 2006. *The effect of a condensed tannin containing forage, Sericea lespedeza, on existing and challenge infections of Haemonchus contortus in sheep*. Master in Science Thesis, Louisiana State Universit, Louisiana, 40 pp.
- Chandrawathani P, Jamnah O, Adnan M, Waller PJ, Larsen M, Gillespie AT 2004. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Vet Parasitol* 120: 177–187.
- Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ 2007. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin. Immunol* 19: 400-408.
- Cheshier JE, Ardestani-Kaboudanian S, Liang B, Araghiniknam M, Chung S, Lane L, Castro A, Watson RR 1996. Immunomodulation by pycnogenol in retrovirus-infected or ethanol-fed mice. *Life Sci* 58: 87-96
- Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grecis RK 2005. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science* 308: 1463-1465.
- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 44: 35–44.
- Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, de Medina FS, Zarzuelo A 2006. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse

macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 72: 1010-1021.

Coop RL, Angus KW 1975. The effect of continuous doses of *Trichostrongylus colubriformis* larvae on the intestinal mucosa of sheep and on liver vitamin A concentration. *Parasitology* 70: 1-9.

Coop RL, Kyriazakis I 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol* 17: 325–330.

Costa CAF, Vieira LS 1984. *Controle de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos no estado do Ceará*. EMBRAPA, Sobral, 6 pp.

Costa Júnior GS, Mendonça IV, Campelo JEG, Cavalcante RR, Dantas Filho LA, Nascimento IMR, Almeida ECR, Chaves RM 2005. Efeito de vermifugação estratégica, com princípio ativo à base de ivermectina na incidência de parasitos gastrintestinais no rebanho caprino da UFPI. *Cienc Anim Bras* 6: 279-286.

Costa VMM 2009. Doenças Parasitárias em ruminantes no semi-árido e Alternativas para o controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 60 pp.

Costa-Junior LM, Lopes SG, Oliveira GC, Lopes AJO, Costa FM, Almeida-Junior EB . The potential use of plants for helminth control of goats in Brazil. In: 7th Novel Approaches Meeting with a session of the CAPARA COST ACTION 'Goat parasite interaction : from knowledge to control', 2013, Toulouse. Novel approaches to the control of helminth parasites of livestock, 2013.

Costa CAF, Vieira LS, Berne MEA, Silva MUD, Guidoni AL, Figueiredo EAP 2000. Variability of resistance in goats infected with *Haemonchus contortus* in Brazil. *Vet Parasitol* 88: 153- 158.

- Couto Filho CA 1999. A pele como fonte de renda. Anais do WORKSHOP SOBRE CAPRINOS E OVINOS TROPICAIS. Fortaleza. Brasil. Banco do Nordeste, Fortaleza p. 40-45.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B, Grissem W, Jones R *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Courier Companies, Rockville, p. 1250-318.
- Cruz JF, Viana AES, Oliveira DF, Ferraz RCN, Magalhães MP, Santos DD, Cruz RS, Cruz AD, Zacharias FA 2006. A homeopatia como ferramenta de controle de helmintos gastrintestinais em caprinos criados em sistema extensivo. *A Hora Vet* 26: 37-40.
- CSIRO 1994. Successful worm treatment. Folder, Division of Animal Health, Communication Group, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia.
- Cuevas A, Saavedra N, Salazar LA, Abdalla DS 2013. Modulation of Immune Function by Polyphenols: Possible Contribution of Epigenetic Factors. *Nutrients* 5: 2314-2332.
- Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, Zhang T, Nashed BF, Sakai T, Takashima M, Himeno K 2001. Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen specific immune response. *Infect Immun* 69: 7380–7386.
- Dasgupta S, Roy B, Tandon V 2010. Ultrastructural alterations of the tegument of *Railletina echinobothrida* treated with the stem bark of *Acacia oxyphylla* (Leguminosae). *J Ethnopharmacol* 127: 568-571.
- Daughenbaugh KF, Holderness J, Graff JC, Hedges JF, Freedman B, Graff JW, Jutila MA 2011. Contribution of transcript stability to a conserved procyanidin induced cytokine response in $\gamma\delta$ T cells. *Genes Immun* 12: 378–389.

- de la Chevrotière C, Bambou JC, Arquet R, Jacquet P, Mandonnet N 2011. Genetic analysis of the potential role of IgA and IgE responses against *Haemonchus contortus* in parasite resistance of Creole goats. *Vet Parasitol* 186: 337–343.
- Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, De Vries J, Romagnani S 1988. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J. Immunol.* 140: 4193-4198.
- Diehl MS, Atindehou KK, Téré H, Betschart B 2004. Prospect for anthelmintic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. *J Ethnopharmacol* 95: 277-284.
- Dobson RJ, Waller PJ, Donald AD 1990. Popuation dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: The effect of infection rate on the establishment of infective larvae parasite fecundity. *Int J Parasitol* 20: 347-352
- Doetze A, Satoguina J, Burchard G, Rau T, Löliger C, Fleischer B, Hoerauf A 2000. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by Th3/Tr1-type cytokines IL-10 and TGF- β but not by a Th1 to Th2 shift. *Int Immunol* 12: 623–630.
- Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405: 903–904.
- Edwards CA, Atiyeh RM, Römbke J 2001. Environmental impact of avermectins. *Rev Environ Contam Toxicol* 171: 111-137.
- EMBRAPA 2005. Sistema de produção de caprinos e ovinos de corte para o Nordeste Brasileiro. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/index.htm>> Acesso em 19 dez 2012.
- Emson CL, Bell SE, Jones A, Wisden W, McKenzie AN 1998. Interleukin (IL)-4-independent induction of immunoglobulin (Ig)E, and perturbation of T cell development in transgenic mice expressing IL-13. *J Exp Med* 188: 399-404.

- Enomoto T, Nagasako-Akazome Y, Kanda T, Ikeda M, Dake Y 2006. Clinical effects of apple polyphenols on persistent allergic rhinitis: A randomized double-blind placebo-controlled parallel arm study. *J Invest Allergol Clin Immunol* 16: 283-289.
- Fabiyi JP 1987. Production losses and control of helminths in ruminants of tropical regions. *Intern Journ for Parasitol* v.17: 435-442.
- Fernandes LH, Seno MCZ, Amarante AFT, Souza H, Belluzzo CEC 2004. Effect of rotational and alternate grazing with adult cattle on the control of nematode parasites in sheep. *Arq Bras Med Vet Zootec* 56: 733-740.
- Finkelman DF, Shea – Donohue T, Goldhill J, Sullivan AC, Morris CS, Maddens BK, Gause CW, Urban Jr FJ 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol* 15: 505-533.
- Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, Schopf L, Urban JF Jr. 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev* 201: 139-155.
- Fitzgerald PR 1980. The economic impact of coccidiosis in domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med* 24: 121-143.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336.
- FAO.ORG [homepage de internet]. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2011 [Citado em 24/01/2013]. Disponível em <http://faostat.fao.org>.
- Foreyt WJ 1990. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 6: 655 – 670.
- Freitas MG 1982. *Helmintologia Veterinária*. 4ª Ed., Rabelo, Belo Horizonte, 396 pp.

- Frutos P, Hervás G, Giraldez FJ, Mantecon AR 2004. Tannins and ruminant nutrition. *Span J Agric Res* 2: 191-202.
- Gzada TL 2006. Distribuição de larvas de nematodeos gastrintestinais de ovinos em pastagens tropicais e temperadas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná 82 pp.
- Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Corrêa-Oliveira R. 2004. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. *Clin Exp Immunol* 136: 334-340.
- Gessner A, Mohrs K, Mohrs M 2005. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol* 174: 1063-1072.
- Gill HS, Altmann K, Cross ML, Husband AJ 2000. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology* 99: 458 – 463.
- Gill HS, Watson DL, Brandon MR 1993. Monoclonal antibody to CD4+ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunology* 78: 43-49.
- Gillan V, Lawrence RA, Devaney E 2005. B cells play a regulatory role in mice infected with the L3 of *Brugia pahangi* *Int Immunol* 17: 373–382.
- Girão ES, Girão RN, Medeiros LP 1980. Prevalência e variação estacional de helmintos gastrintestinais de caprinos no município de Valença do Piauí. Embrapa 5 pp.
- Girão ES, Medeiros LP, Girão RN 1992. Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrointestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí. *Cienc Rural* 22: 197-202.
- Githigia SM, Thamsborg SM, Munyua WK, Maingi N 2001. Impact of gastrointestinal helminthes on production of the goats in Kenia. *Small Ruminant Res* 42: 21-29.

- Githiori JB, Athanasiadou S, Thamsborg SM 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminthes in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasitol* 139: 308–320.
- Gordon S 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
- Graminha EBN, Monteiro AC, Silva HC, Oliveira GP, Costa AJ 2005. Controle de Nematóides parasitos gastrintestinais de ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. *Pesq Agropec Bras* 40: 927-933.
- Gray GD 1987. Genetic resistance to haemonchosis in sheep. *Parasitol. Today* 3: 253-255.
- Gregory PC, Wenham G, Poppi D, Coop RL, Macrae JC, Miller SJ 1985. The influence of a chronic subclinical infection of *Trichostrongylus colubriformis* on gastrointestinal motility and digesta flow in sheep. *Parasitology* 91: 381-396.
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L 2006. Human schistosomiasis. *Lancet* 368: 1106-1118.
- Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine *Schistosomiasis mansoni*. *J Immunol* 146: 1322-1327.
- Guimarães Filho C, Holanda Jr EV 2002. “A caprinocultura com alternativa de uso sustentado dos recursos do semi-árido: proposições para o desenvolvimento integrado da zona caprinícola do semi-árido baiano”. Anais do Seminário Internacional Sociedades e Territórios no Semi-Árido Brasileiro: em busca da sustentabilidade. Editora UFCG, Campina Grande.
- Gujrathi AM, Babu VB 2007. Environment friendly products from black wattle. *Energy Education Science and Technology* 19: 37-44.
- Hagan P 1993. IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunol* 15: 1-4.

- Hagerman AE, Butler LG 1991. Tannins and lignins. In: Rosental GA Janzen TH. *Herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, San Diego, USA pp. 355–376.
- Hammond JA, Fielding D, Bishop SC 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet Res Commun* 21: 213-228.
- Harty JT, Tvinnereim AR, White DW 2000. CD8⁺T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 18: 275–308.
- Haslam E 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J Nat Prod* 59: 205-215.
- Hay FS, Niezen JH, Miller C, Bateson L, Robertson H 1997. Infestation of sheep dung by nematophagous fungi and implications for the control of free-living stages of gastro-intestinal nematodes. *Vet Parasitol* 70: 247-254.
- Herbert DR, Yang JQ, Hogan SP, Groschwitz K, Khodoun M, Munitz A, Orekov T, Perkins C, Wang Q, Brombacher F, Urban JF Jr, Rothenberg ME, Finkelman FD 2009. Intestinal epithelial cell secretion of RELM- β protects against gastrointestinal worm infection. *J Exp Med* 206: 2947-2957.
- Hernández-Villegas MM, Borges-Argáez R, Rodríguez-Vivas RI, Torres-Acosta JF, Méndez-Gonzalez M, Cáceres-Farfan M 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 179: 100-106.
- Hoberg EP, Lichtenfels JR, Gibbons L. 2004. Phylogeny for species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): considerations of their evolutionary history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). *J Parasitol* 90:1085-1102.
- Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA 2000. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol* 164: 6406–6416.

- Holderness J, Hedges JF, Daughenbaugh K, Kimmel E, Graff J, Freedman B, Jutila MA 2008. Response of gammadelta T Cells to plant-derived tannins. *Crit Rev Immunol* 28: 377-402.
- Holmes PH 1985. Pathogenesis of trichostrongylosis. *Vet Parasitol* 18: 89-101.
- Horak IG, Clark R, Gray RS 1968. The pathological physiology of helminth infestations. III. *Trichostrongylus colubriformis*. *Onderstepoort J Vet Res* 35: 195-224.
- Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol* 32: 253–261.
- Hoste H, Le Frileux Y, Pommaret A 2001. Distribution and repeatability of fecal egg counts and blood parameters in dairy goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Res Vet Sci* 70: 57–60.
- Hoste H, Martinez-Ortiz-De-Montellano C, Manolaraki F, Brunet S, Ojeda-Robertos N, Fourquaux I, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet Parasitol* 186: 18-27.
- Hoste H, Reilly M 1988. Scanning electron microscopy of the jejunal and ileal mucosa of rabbits infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Ann Rech Vet* 19: 123-128.
- Hoste H, Sotiraki S, Landau SY, Jackson F, Beveridge I 2010. Goat-nematode interactions: think differently. *Trends Parasitol* 26 :376–381.
- Hoste H, Sotiraki S, Landau SY, Jackson F, Beveridge I 2010. Goat–Nematode interactions: think differently. *Trends Parasitol* 26: 376-381.
- Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ 2008 Nutrition- parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasite immunol* 30: 79-88.
- Houdijk JG, Jessop NS, Kyriazakis I 2001. Nutrient partitioning between reproductive and immune functions in animals. *Proc Nutr Soc* 60: 515-525.

- Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grecis RK 2008. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol* 180: 2443- 2449.
- IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE 2006. Censo Agropecuário 2006 (resultados preliminares), IBGE, Rio de Janeiro, 142 p.
- Iqbal Z, Sarwar M, Jabbar A, Ahmed S, Nisa M, Sajid MS, Khan MN, Mufti KA, Yaseen M 2007. Direct and indirect anthelmintic effects of condensed tannins in sheep. *Vet Parasitol* 144: 125-131.
- Iyer SS, Cheng G 2012. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 32: 23-63.
- Jackson F, Miller J 2006. Alternative approaches to control – Quo vadit? *Vet Parasitol* 139: 371-384
- Jarret EE, Miller HR 1982. Production and activities of IgE in helminth infection. *Prog Allergy* 31: 178-233.
- John CM, Sandrasaigaran P, Tong CK, Adam A, Ramasamy R. 2011. Immunomodulatory activity of polyphenols derived from cassia auriculata flowers in aged rats. *Cell Immunol* 271, 474–479.
- Jones DC 1983. Intestinal enzyme activity in lambs chronically infected with *Trichostrongylus colubriformis*: Effect of anthelmintic treatment. *Vet Parasitol* 12: 79-89.
- Joshi BR, Kommuru DS, Terrill TH, Mosjidis JA, Burke JM, Shakya KP, Miller JE 2011. Effect of feeding *Sericea lespedeza* leaf meal in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 178: 192-197.
- Kaminsky R, Gauvry N, Schorderet WS, Skripsky T, Bouvier J, Wenger A, Schroeder F, Desaulles Y, Hotz R, Goebel T, Hosking BC, Pautrat F, Wieland-Berghausen S, Ducray P

2008. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasit Researc* 108: 931-939.
- Kahiya C, Mukaratirwa S, Thamsborg SM 2003. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet Parasitol* 115: 265–274.
- Kahn LP, Diaz-Hernandez A 2000. Tannins with anthelmintic properties. In: Brooker JD *Tannins in Livestock and Human Nutrition* Australia, pp. 140–149.
- Kamaraj C, Rahuman AA 2011. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Res Vet Sci* 91: 400-404.
- Kaplan RM 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20: 477- 481.
- Karasawa K, Uzuhashi Y, Hirota M, Otani H 2011. A matured fruit extract of date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) stimulates the cellular immune system in mice. *J Agric Food Chem* 59: 11287–11293.
- Khanbabaee K, van Ree T 2001. Tannins: Classification and definition. *Nat Prod Rep* 18: 641-649.
- Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-342.
- Kim HP, Leonard WJ 2007. CREB/ATF-dependent T cell receptor induced Foxp3 gene expression: A role for DNA methylation. *J Exp Med* 204: 1543-1551.
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS 2004. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *J Pharmacol Sci* 96: 229 – 245.
- Kimura K, Ando K, Tomita E, Ohnishi H, Ishikawa T, Kakumu S, Muto Y, Moriwaki H 1999. Elevated intracellular IFN- γ levels in circulating CD4+ lymphocytes in patients with fulminant hepatitis. *J Hepatol* 31: 519-583.

- Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol* 37: 2779-2786.
- Krecek RC, Groeneveld HT, Van Wik JA 1991. Effects of time of day, season and stratum on *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* third-stage larvae on irrigated pasture. *Vet Parasitol* 40: 87-98.
- Kumar S, Tarleton RL 1998. The relative contribution of antibody production and CD8⁺ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 20: 207–216.
- Kyriazakis I, Anderson DH, Oldham JD, Coop RL, Jackson F 1996. Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. *Vet Parasitol* 61: 297-313.
- Lacroix C, Nguyen TH, Andreoletti O, Prevot F, Grisez C, Bergeaud JP, Gruner L, Brunel JC, Francois D, Dorchies P, Jacquet P 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet Res* 37: 607-622.
- Larsen JW, Anderson N, Vizard AL, Anderson GA, Hoste H 1994. Diarrhea in merino ewes during winter: association with trichostrongylid larvae. *Aust Vet J* 71: 365-372.
- Larsen M 1999. Biological control of helminths. *Int J Parasitol* 29: 139-146.
- Lascano CE, Carulla J 1992. Quality evaluation of tropical leguminous trees and shrubs with tannins for acid soil. Anais do SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, Lavras, Brasil, SBZESAL, Lavras, p. 108-130.
- Le Jambre LF, Whitlock JH 1968. Seasonal fluctuation in linguiform morphs of *Haemonchus contortus cayugensis*. *J Parasitol* 54: 827-830.
- Lichtenfels JR, Pilitt PA, Hoberg EP 1994. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. *J Parasitol* 80: 107-119.

- Lima, JD Eimeriose 1992. In Charles TP; Furlong GJ. Diarreia dos bezerros. EMBRAPA, p. 74-83.
- Liu FJ, Zhang YX, Lau BH 1998. Pycnogenol enhances immune and haemopoietic functions in senescence-accelerated mice. *Cell Mol Life Sci* 54: 1168-1172.
- Liu T, Zhao J, Ma L, Ding Y, Su D 2012. Hepatoprotective Effects of Total Triterpenoids and Total Flavonoids from *Vitis vinifera* L against Immunological Liver Injury in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 969386.
- Lorenzi H 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Ed. Plantarum, Nova Odessa, 352 pp.
- Lyu SY, Park WB 2005. Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC *in vitro* incubation with flavonoids. *Arch Pharm Res* 28: 573-581.
- Macedo IT, Bevilaqua CM, de Oliveira LM, Camurça-Vasconcelos AL, Vieira Lda S, Oliveira FR, Queiroz-Junior EM, Portela BG, Barros RS, Chagas AC 2010. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Eucalyptus globulus* essential oils on *Haemonchus contortus*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 18: 62-66.
- Mackenzie GG, Carrasquedo F, Delfino JM, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI 2004. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J* 18: 167-169
- Maglione PJ, Chan J 2009. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 39: 676-686.
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE 2004. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol Rev* 201: 89-116.
- Makkar HP, Blümmel M, Becker K 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *Br J Nutr* 73: 897-913.

- Makkar HP, Francis G, Becker K 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal* 1: 1371-1391
- Makkar HPS 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Res* 49: 241–256.
- Makkar HPS, Blummel M, Borowy NK, Becker K 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. *J Sci Food Agric* 61: 161-165
- Man NV, Hao NV, Tri VM 1995. Biomass production of some leguminous shrubs and trees in Vietnam. *Livest Res Rural Dev* 7: 1-4.
- Madhavan PN, Supriya M, Jessica LR, Ravikumar A, Harikrishnan N, Stanley AS, Chithan K 2006. The flavonoid quercetin inhibits Proinflammatory Cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells via Modulation of the NF- κ B System. *Clin. Vaccine Immunol* 13:319.
- Mangan JL 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutr Res Rev* 1: 209–231.
- Marley CL, Cook R, Keatinge R, Barrett J, Lampkin NH 2003. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. *Vet Parasitol* 112: 147-155.
- Martin J, Lee DL 1980. *Nematodirus battus* Scanning electron microscope studies of the duodenal mucosa of infected lambs. *Parasitology* 81: 573-578.
- Martínez-Ortiz-De-Montellano C, Arroyo-López C, Fourquaux I, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H 2013. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under in vivo and in vitro conditions. *Exp Parasitol* 133: 281-286.

- Martínez-Ortíz-de-Montellano C, Vargas-Magaña JJ, Canul-Ku HL, Miranda-Soberanis R, Capetillo-Leal C, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Torres-Acosta JF 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol* 172: 283–290.
- Max RA 2010. Effect of repeated wattle tannin drench on worm burdens, fecal egg counts and egg hatchability naturally acquired nematode infections in sheep and goats. *Vet Parasitol* 169: 138-143.
- McMahon LR, McAllister TA, Berg BP, Majak W, Acharya,SN, Popp JD, Coulman BE, Wang Y, Cheng KJ 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can J Plant Sci* 80: 469-485.
- Meeusen EN, Balic A, Bowles V 2005. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Vet Immunol Immunopathol* 108: 121–125.
- Meeusen ENT 1996. Rational design of nematode vaccines; natural antigens. *Int J Parasitol* 26: 813-818.
- Meeusen ENT, Balic A 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today* 16: 95–101.
- Melo ACFL, Reis IF, Bevilaqua CML, Vieira LS, Echevarria FAM, Melo LM 2003. Nematódeos resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos no estado do Ceará, Brasil. *Cienc. Rural* 33: 339-344.
- Mendes EA, Mendes TA, dos Santos SL, Menezes-Souza D, Bartholomeu DC, Martins IV, Silva LM, Lima W dos S 2013. Expression of IL-4, IL-10 and IFN- γ in the liver tissue of cattle that are naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 195: 177-182.

- Miles EA1, Zoubouli P, Calder PC 2005. Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. *Clin Nutr* 24: 780-784.
- Miller HR 1996. Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites. *Vet Immunol Immunopathol* 54: 331–336.
- Miller HRP 1996. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes: natural immunity, can it be harnessed? *Int J Parasitol* 26:801-811.
- Min BR, Hart SP 2003. Tannin for suppression of internal parasites. *J Anim Sci* 81: 102-109.
- Min BR, Hart SP, Miller D, Tomita GM, Loetz E, Sahlu T. 2005. The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastro-intestinal parasite infection and milk composition in Angora does. *Vet Parasitol* 130: 105–113.
- Min BR, McNabb WC, Barry TN, Kemp PD, Waghorn GC, McDonald MF 1999. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in sheep during late summer and autumn. *J Agric Sci* 132: 323-334.
- Min BR, Pomroy WE, Hart SP, Sahlu T 2004. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Ruminant Res* 51: 279–283.
- Minho AP, Bueno ICS, Gennari SM, Jackson F, Abdalla AL 2008a. In vitro effect of condensed tannin extract from *Acacia (Acacia mearnsii)* on gastrointestinal nematodes of sheep. *Rev Bras Parasitol Vet* 17: 47- 151.
- Minho AP, Bueno ICS, Louvandini H, Jackson F, Gennari SM, Abdalla AL 2008b. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. *Anim Feed Sci Tech* 147: 172–181.
- Minho AP, Filippesen LF, Amarante AFT, Abdalla AL 2010. Efficacy of condensed tannin presents in acacia extract on the control of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Cienc Rural* 40: 1360–1365.

- Minho AP, Godoy PB, Gennari SM, Castilho A, Abdalla AL 2004. Taninos condensados no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos: resultados preliminares. Anais do CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO DE LATINO-AMERICANO DE RICKETTISIOSES, Ouro Preto, Brasil.
- Molan AL, Alexander R, Brookes IM, McNabb WC 2000b. Effect of an extract from *Sulla* (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes in vitro. *Proc N Z Soc Anim Prod* 60: 21–25.
- Molan AL, Waghorn GC, Min BR, McNabb WC 2000a. The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. *Folia Parasitol* 47: 39–44.
- Molento MB 2005. Avanços no diagnóstico e controle das helmintoses em caprinos. Anais do I Simpósio Paulista de Caprinocultura, SIMPAC. Jaboticaba, Brasil, Multipress, Jaboticabal, p.101-110.
- Molento MB 2004. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. *Rev Bras Parasitol Vet* 13: 82-87.
- Molento MB, Prichard RK 1999. Nematode control and the possible development of anthelmintic resistance. *Rev Bras Parasitol Vet* 8: 75-86.
- Monteiro EMM, Lourenço Júnior JB, Santos NFA, Aviz MAB 2009. Valor nutritivo da leguminosa *Pueraria phaseoloides* como alternativa na suplementação alimentar de ruminantes na Amazônia Oriental. *Cien Rural* 39: 613-618.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
- Moraes FR, Thomaz-Soccol V, Rossi Junior P, Wolff FM, Castilho GG 2000. Susceptibilidade de ovinos das raças Suffolk e Santa Inês à infecção natural por tricostrongilídeos. *Arch Vet Sci* 6: 63-69.

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Gierdlin MA, Coffman RL 1986. Two types of murine helper T cell clone. *J Immunol* 136: 2348-2357
- Mosmann TR, Sad S 1996. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 142-156.
- Mota MA, Campos AK, Araújo JV 2003. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pes Vet Bras* 23: 93-100.
- Mueller-Harvey I 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J Sci Food Agric* 86: 2010–2037.
- Muleke CI, Yan R, Sun Y, Osuga IM, Shivairo RS, Li X 2013. Cellular Immune Response and Abomasum worm burden in Goats Vaccinated with HC58cDNA Vaccine against *H. contortus* Infection *Adv L Sci Techn* 13: 26-33.
- Newlands GF, Skuce PJ, Knox DP, Smith WD 2001. Cloning and expression of cystatin, a potent cysteine protease inhibitor from the gut of *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 122: 371–378.
- Newton SE, Munn EA 1999. The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol Today* 15: 116–122.
- Nguyen TM, Binh DV, Orskov ER 2005. Effect of foliages containing condensed tannins and on gastrointestinal parasites. *Anim Feed Sci Tech* 121: 77-87.
- Niezen JH, Charleston WA, Robertson HA, Shelton D, Waghorn GC, Green R 2002a. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 105: 229-245.
- Niezen JH, Robertson HA, Waghorn GC, Charleston WA 1998a. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Vet Parasitol* 80: 15-27.

- Niezen JH, Waghorn GC, Charleston WA 1998b. Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*Lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass. *Vet Parasitol* 78: 13-21.
- Niezen JH, Waghorn GC, Graham T, Carter JL, Leathwick DM 2002b. The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. *Vet Parasitol* 105: 269-283.
- Niezen JH, Waghorn TS, Charleston WAG, Waghorn GC 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *J Agric Sci* 125: 281-289.
- Nisbet AJ, McNeilly TN, Wildblood LA, Morrison AA, Bartley DJ, Bartley Y, Longhi C, McKendrick LJ, Palarea-Albaladejo J 2013. Successful immunization against a parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine* 31: 4017-4023.
- Oh GS, Pae HO, Choi BM, Lee HS, Kim IK, Yun YG, Kim JD, Chung HT 2004. Penta-O-galloyl-beta-D-glucose inhibits phorbol myristate acetate-induced interleukin-8 [correction of intereukin-8] gene expression in human monocytic U937 cells through its inactivation of nuclear factor-kappaB. *Int Immunopharmacol* 4: 377-386.
- Okamoto I, Iwaki K, Koya-Miyata S, Tanimoto T, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M 2002. The Flavonoid Kaempferol Suppresses the Graft-versus-Host Reaction by Inhibiting Type 1 Cytokine Production and CD8⁺ T Cell Engraftment. *Clin Immunol* 103: 132-144
- Oliveira LM, Bevilaqua CM, Macedo IT, Morais SM, Monteiro MV, Campello CC, Ribeiro WL, Batista EK 2011. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 20: 155-160.
- Oliveira SG, Berchielli TT 2007. Potencialidades da utilização de taninos na conservação de forragens e nutrição de ruminantes – revisão. *Arch Vet Sci* 12: 1-9.

- Oliveira-Sequeira, TCG, Amarante AFT 2001. *Parasitologia Animal: Animais de Produção*. EPUB, Rio de Janeiro, 158p.
- Onyiah LC, Arslan O 2004. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. *J Thermal Biol* 30: 203–211.
- Otero MJ, Hidalgo LG 2004. Taninos condensados en espécies forrajeras de clima templado: efectos sobre productividad de ruminantes afectados por parasitosis gastrointestinales. *Livest Res Rural Dev* 16: 1-9.
- Padilha T 1996. Controle da verminose gastrintestinal em pequenos ruminantes nas regiões áridas e semi-áridas do nordeste do Brasil In Padilha T. *Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes*. EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco, p.169-178.
- Paolini V, Bergeaud JP, Grisez C, Prevot F, Dorchies P, Hoste H 2003a. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 113: 253-261.
- Paolini V, Frayssines A, De La Farge F, Dorchies P, Hoste H 2003b. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet Res* 34: 331-339.
- Papadopoulos E, Himonas C, Coles GC 2001. Drought and flock isolation may enhance the development of anthelmintic resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 97: 253-259. *Parasitology* 120: 563-572.
- Patel N, Kreider T, Urban JF Jr, Gause WC 2009. Characterisation of effector mechanisms at the host: parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *Int J Parasitol* 39: 13-21.
- Pérez J, Garcia PM, Hernandez S, Martinez-Moreno A, Martin de las Mulas J, Camara S 2001. Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Res* 32 : 463–473.

- Pérez J, Garcia PM, Hernández S, Mozos E, Cámara S, Moreno AM 2003. Experimental haemonchosis in goats: effects of single and multiple infections in the host response. *Vet Parasitol* 111: 333–342.
- Pernthaner A, Cole SA, Morrison L, Hein WR 2005. Increased expression of interleukin-5 (IL-5), IL-13, and tumor necrosis factor alpha genes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Infect Immun* 73: 2175–2183.
- Pernthaner A, Vlassoff A, Douch PGC, Maass DR 1997. Cytokine mRNA expression and IFN-gamma production in nematode resistant and susceptible line lambs artificially infected with gastro-intestinal nematodes. *Acta Parasitol* 42: 55–61.
- Peumans WJ, Van Damme EJM 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* 109: 347 – 352.
- Phengvichith V, Ledin II 2007. Effect of a diet high in energy and protein on growth, carcass characteristics and parasite resistance in goats. *Trop Anim Health Prod* 39: 59–70.
- Pinheiro RR, Gouveia MAG, Alves FSF, Haddad JPA 2000. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras Med Vet Zootec* 52: 534-543
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG 1986. The conversion of proanthocyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidins. *Phytochemistry* 25: 223–230.
- Pritchard DI 1993. Immunity to helminths: is too much IgE parasite- rather than host-protective? *Parasite Immunol* 15: 5-9.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységú L 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 586-621.
- Recio MC, Andujar I, Rios JL 2012. Anti-inflammatory agents from plants: Progress and potential. *Curr Med Chem* 19: 2088–2103.

- Reed JD 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J Anim Sci* 73: 1516–1528.
- Rinaldi L, Veneziano V, Cringoli G 2007. Dairy goat production and the importance of gastrointestinal strongyle parasitism. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 745-746.
- Ríos-de- Álvarez L, Jackson F, Greer A, Bartley Y, Bartley DJ, Grant G, Huntley JF 2012a. In vitro screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Vet Parasitol.* 186: 390-398.
- Ríos-de Álvarez L, Jackson F, Greer AW, Grant G, Jackson E, Morrison AA, Huntley JF 2012b. Direct anthelmintic and immunostimulatory effects of oral dosing semi-purified phytohaemagglutinin lectin in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* L. *Vet Parasitol.* 187: 267-274.
- Ríos-de-Alvarez L, Greer AW, Jackson F, Athanasiadou S, Kyriazakis I, Huntley JF.2010. The effect of dietary sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on local cellular responses to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Parasitology* 135: 1117-1124.
- Roberts B, Antonopoulos A, Haslam SM, Dicker AJ, McNeilly TN, Johnston SL, Dell A, Knox DP, Britton C 2013. Novel expression of *Haemonchus contortus* vaccine candidate aminopeptidase H11 using the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Vet Res* 44: doi: 10.1186/1297-9716-44-111.
- Roberts FHS, O'Sullivan PJ 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust J Agric Res* 1: 99-102.
- Robinson P, Atman RL, Lewis DE, White AC 1997. Granuloma cytokines in murine cysticercoses. *Infect Immun* 65: 2925-2931.
- Rocha RA, Amarante AFT, Bricarello PA 2004. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. *Small Ruminant Res* 55: 65 – 75.

- Rocha RA, Bresciani TFM, Barros LH, Fernandes MB, Amarante AFT 2008. Sheep and cattle alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. *Small Ruminant Res* 75: 135- 143.
- Rocha RA, Bricarello PA, Silva MB, Houdijkc JGM, Almeida FA, Cardia DFF, Amarante AFT 2011. Influence of protein supplementation during late pregnancy and lactation on the resistance of Santa Ines and Ile de France ewes to *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 181: 229-238.
- Roseby FB 1973. Effects of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda) on nutrition and metabolism of sheep. I. Feed intake, digestion and utilization. *Aust J Agri Res* 24: 947-953.
- Sadaghian M , Hassanpour S, Maheri-Sis N, Eshratkhan B, Gorbani A, Chaichi-Semsari M 2011. Effects of different levels of wattle tannin drenches on faecal egg counts during naturally acquired mixed nematode infections in Moghani sheep. *Ann Biol Res* 2: 226-230.
- Saddiqi HA, Jabbar A, Sarwar M, Iqbal Z, Muhammad G, Nisa M, Shahzad A 2011. Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res* 109(6):1483-500.
- Salazar JCS, Carulla JE, Velásquez JE 2008. Chemical Composition and *In Vitro* Digestibility of Some Tree Species Established in the Amazonian Piedmont. *Zootec Trop* 26: 231-234.
- Salunkhe DK, Chavan JK, Kadam SS 1990. Dietary Tannins consequences and remedies. CRC Press, Boca Raton, 310 pp
- Sandalova E, Laccabue D, Boni C, Tan AT, Fink K, Ooi EE, Chua R, Shafaeddin Schreve B, Ferrari C, Bertoletti A 2010. Contribution of Herpes virus Specific CD8 T Cells to Anti- Viral T Cell Response in Humans. *PLoS Pathog* 6: e1001051.
- Santa Rosa J 1996. Enfermidades em Caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle – Embrapa Caprinos p.101-105.

- Santana MD, Baumann MG, Conner AH 1997. Utilization of Black Wattle Bark and Tannin Liquefied in Phenol in the Preparation of Resol - Type Adhesives In: Leao A, Carvalho F, Frollini E. *Lignocellulosic-Plastics Composites* 325-341.
- Santos ACG, Guerra RMSNC, Pereira LA, Waquim MAM, Feitosa MLT, Teixeira WC, Chaves EP 2004. Estudo preliminar do parasitismo por helmintos gastritestinais em ovinos deslanados da baixada Maranhense. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p 262.
- Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita* 43: 394-405.
- Schallig HDFH 2000. Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 120: 63-72.
- Saraiva M, O'Garra A 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10: 170– 181.
- Schwab CG 1995. Protected proteins and amino acids for ruminants. In: Wallace RJ Chesson A *Biotechnology in animal feeds and animal feeding* V.C.H. Press, Weinheim, pp. 115-141.
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 19: 338-381.
- Scott I, Pomroy WE, Kenyon PR, Smith G, Adlington B, Moss A 2013. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol* 198: 166-171.
- SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E BASTECIMENTO (SEAPA) 2006. Superintendência de Economia Agrícola. Caprinos. Belo Horizonte.
- Shakya KP, Miller JE, Horohov DW 2009. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet Parasitol* 163: 57–66.

- Shevach EM 2009. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636-645.
- Shinkai K, Mohrs M, Locksley RM 2002. Helper T cells regulate type-2 innate immunity *in vivo*. *Nature* 420: 825-829.
- Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ 1998. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10: 581-587.
- Silanikove N, Perevolotsky A, Proveza FD 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Anim Feed Sci Techn* 91: 69-81.
- Silva WW, Bevilaqua CML, Costa AI 1998 Natural evolution of gastrointestinal nematodes in goats (*Capra hircus*) in the semi-arid ecosystem of the Paraíba backwoods, northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 80: 47-52.
- Silva WW, Bevilaqua CML, Rodrigues MLA 2003. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no Semi-árido Paraibano-Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 12: 71-75.
- Silvestre A, Leignel V, Berrag B, Gasnier N, Humbert JF, Chartiere C, Cabaret J 2002. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Vet Res* 33: 465-480.
- Singh B, Bhat TK, Singh B 2003. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *J Agric and Food Chem* 51: 5579-5597.
- Soulsby EJJ 1987. *Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. Editorial Interamericana, 782p.
- Spagnuolo C, Russo M, Bilotto S, Tedesco I, Laratta B, Russo GL 2012. Dietary polyphenols in cancer prevention: The example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Ann N Y Acad Sci* 1259: 95-103.

- Stear MJ, Bairden K, Bishop SC, Buitkamp J, Duncan JL, Gettinby G, McKellar QA, Park M, Parkins JJ, Reid SW, Strain S, Murray M 1997. The genetic basic of resistance to *Ostertagia circumcincta* in lambs. *Vet J* 154: 111 – 119.
- Steel JW, Symons LEA, Jones WO 1980. Effects of level of larval intake on the productivity and physiological and metabolic responses of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Aust J Agri Res* 31: 821-838.
- Sotomaior, C. S. Di Carli LM, Tangleica L, Kaiber bk, Souza FP 2007. Identificação de Ovinos e Caprinos Resistentes e Susceptíveis aos Helmintos Gastrintestinais. *Rev Acad* 5: 397-412.
- Sud D, Bigbee C, Flynn JL, Kirschner DE 2006. Contribution of CD8⁺ T Cells to Control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol* 176: 4296-4314.
- Taiz L, Zeiger E 2004. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia vegetal*. Artimed, Porto Alegre, RS, p. 309-332.
- Terra X, Valls J, Vitrac X, Mérrillon JM, Arola L, Ardèvol A, Bladé C, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Salvadó J, Blay M 2007. Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. *J Agric Food Chem* 55: 4357-4365.
- Thompson DP, Geary TG 1995. The structure and function of helminth surfaces. In: Marr JJ, Muller M. *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. 1st ed. Academic Press, NewYork, pp. 203–232.
- Torres-Acosta JFJ, Hoste H 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Res* 77: 159-173.
- Tsao R 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231–1246.
- Turvey SE, Broide DH 2009. Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: 24-32

- Tzamaloukas O, Athanasiadou S, Kyriazakis I, Huntley JF, Jackson F 2006. The effect of chicory (*Cichorium intybus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on larval development and mucosal cell responses of growing lambs challenged with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology* 132: 419–426.
- Ueno H, Gonçalves PC 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4° ed., JIICA. Tokyo, Japan. 143 pp.
- Urban JF Jr, Madden KB, Svetić A, Cheever A, Trotta PP, Gause WC, Katona IM, Finkelman FD 1992. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol Rev* 127: 205-220.
- Van DTT, Mui NT, Ledin I 2005. Tropical foliages: effect of presentation method and species on intake by goats. *Anim Feed Sci Technol* 118: 1–17.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74: 3583–3597.
- Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JP 2010. Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* 2: 1106–1131.
- Veglia F 1915. The anatomy and life-history of the *Haemonchus contortus* (Rud.). Union So. Afr Dept Agr Dir Ver Res Rept 3: 349-500.
- Veríssimo CJ 2008. Homeopatia e controle da verminose. In: Veríssimo CJ *Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes*. Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, p. 65-71.
- Vervelde L, Bakker N, Kooyman FN, Cornelissen AW, Bank CM, Nyame AK, Cummings RD, van Die I 2003. Vaccination-induced protection of lambs against the parasitic nematode

Haemonchus contortus correlates with high IgG antibody responses to the LDNF glycan antigen. *Glycobiology* 13: 795-804.

Viana JGA 2008. *Governança da cadeia produtiva da ovinocultura no rio grande do sul: estudo de caso à luz dos custos de transação e produção*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 137 pp

Vieira LS 2000. Eimeriose caprina: aspectos clínicos e de controle. *Cien Anim* 10: 31-33.

Vieira LS 2003. Alternativas de controle da verminose gastrointestinal dos pequenos ruminantes. Circular técnica, Embrapa, Sobral, p.1-10.

Vieira LS 2005. Endoparasitoses gastrointestinais em caprinos e ovinos. EMBRAPA documento on line, N° 58.

Vieira LS, Chagas ACS, Molento MB 2009. Nematóide gastrointestinais e pulmonares de caprinos. In: *Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle*. 1º Edição, Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica. p. 63 – 94.

Vieira LS 1986. *Atividade ovicida “in vitro” e “in vivo” dos benzimidazóis: oxfendazole, fenbendazole, albendazole e thiabendazole em nematódeos gastrointestinais de caprinos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 115 pp.

Vieira LS 2008. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrointestinais em caprinos e ovinos. *Tecno Cien Agropec* 2: 49-56.

Vieira LS, Cavalcante ACR 1999. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. *Pesqui Vet Bras* 19: 99-103.

Vieira LS, Cavalcante ACR, Pereira MF, Dantas LB, Ximenes LJJF 1999. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará, North - East Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. *Rev Med Vet* 150: 447-452.

- Vieira LS, Cavalcante ACR, Ximenes LJJ 1997. Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi – áridas do Nordeste do Brasil. Circular técnica. EMBRAPA/ CAPRINOS – Merial, Sobral, 49p.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8: 523-532.
- Waghorn CG, Shelton ID, McNabba WC, McCutcheon SN 1994. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. *J Agric Sci* 123: 109-119.
- Waghorn G 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production. Progress and Challenges. *Anim Feed Sci Tech* 174: 116-139.
- Waghorn GC, Shelton ID 1997. Effect of condensed tannins in *lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. *J Agri Sci* 128: 365-372.
- Waller PJ 1997. Anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 72: 391–412.
- Waller PJ 2006. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Anim Feed Sci Tech* 126: 277–289.
- Waller PJ, Thamsborg SM 2004. Nematode control in ‘green’ ruminant production systems. *Trends Parasitol* 20: 493–497.
- Waller PJ, Chandrawathani P 2005. *Haemonchus contortus*: Parasite problem N° 1 from Tropics – Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Trop. Biomed.* 22:131-137.
- Wang, Y., Douglas, G.B., Waghorn, G.C., Barry, T.N., Foote, A.G., 1996. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance in ewes. *J Agric Sci* 126, 353–362.
- Watson DL, Colditz IG, Andrew M, Gill HS, Altmann KG 1994. Age-dependent immune response in Merino sheep. *Res Vet Sci* 57: 152–158.

- Willcox ML, Cosentino MJ, Pink R, Bodeker G, Wayling S 2001. Natural products for the treatment of tropical diseases. *Trends Parasitol* 17: 58–60.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36: 838-849.
- Wina E, Susana IWR, Tangendjaja B 2010. Biological Activity of Tannins from *Acacia mangium* Bark Extracted by Different Solvents. *Media Peternakan* 33: 103-107.
- Winton RG 1996. Genetic control of resistance to helminthes in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 54: 245-254.
- Wong CP, Nguyen LP, Noh SK, Bray TM, Bruno RS, Ho E 2011. Induction of regulatory T cells by green tea polyphenol egcg. *Immunol Lett* 139: 7–13.
- Yoshihara E, Minho AP, Yamamura MH 2013. Anthelmintic effect of condensed tannins in gastrointestinal nematodes of sheep (*Ovis aries*). *Semina: Ciências Agrárias*, 34: 3935-3950.
- Yu L, Sun X, Yang F, Yang J, Shen J, Wu Z 2012. Inflammatory cytokines IFN- γ , IL-4, IL-13 and TNF- α alterations in schistosomiasis: a meta-analysis. *Parasitol Res* 110: 1547-1552.
- Zajac AM 2006. Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. *Vet Clin of North Americ* 22: 529-541.
- Zhang XY, Li WG, Wu YJ, Zheng TZ, Li W, Qu SY, Liu NF 2005. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. *Int Immunopharmacol* 5: 1247-1257.
- Zhao A, Mcdermott J, Urban JF JR, Gause W, Madden KB, Yeung KA, Morris SC, Finkelman FD, Shea-Donohue T 2003. Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on stat-6 and enteric nerves. *J Immunol* 171: 948-954.

Zhong RZ, Sun HX, Liu HW, Zhou DW 2014. Effects of tannic acid on *Haemonchus contortus* larvae viability and immune responses of sheep white blood cells in vitro. *Parasite Immunol* 36: 100-106.

Zhong RZ, Sun HX, Liu HW, Zhou DW 2014. Effects of tannic acid on *Haemonchus contortus* larvae viability and immune responses of sheep white blood cells in vitro. *Parasite Immunol* 36: 100–106.

Zhu L, Dai JL, Yang L, Qiu J 2013. In vitro ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 195: 112-117.