



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO



Perfil eletroforético de antígenos totais de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum* e suas reatividades aos soros de bovinos naturalmente infectados

FERNANDA PAULA FERNANDES DOS SANTOS VELOSO

Campo Grande – MS
2023

FERNANDA PAULA FERNANDES DOS SANTOS VELOSO

Perfil eletroforético de antígenos totais de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum* e suas reatividades aos soros de bovinos naturalmente infectados

Electrophoretic profile of total antigens from and *Haemonchus placei* and *Oesophagostomum radiatum* and their reactivity to sera from naturally infected cattle

FERNANDA PAULA FERNANDES DOS SANTOS VELOSO

Orientador: Fernando Paiva

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Mestrado.

Campo Grande – MS
2023

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	ix
Abstract	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Nematodioses gastrointestinais em bovinos	4
3.2 Nematodas gastrointestinais de bovinos com importância no Brasil central	5
3.3 Mecanismos imunológicos frente a esses parasitos	6
3.4 Imunização de ruminantes contra helmintos	9
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	14
3.6 Western Blot	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Área de estudos, delineamento e coleta de dados	17
4.2 Produção de antígenos totais	17
4.3 Processamento das amostras em SDS	18
4.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas totais (AT) das espécies alvo	18
4.3.2 Coloração dos géis em nitrato de prata	19
4.3.3 Western Blot	19
4.3.4 Análises	20
4.3.5 Aspectos éticos	21

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Perfil da contagem de ovos nas fezes nas diferentes categorias animais.....	22
5.2 . Reações sorológicas.....	24
5.3 Perfil eletroforético dos Extratos Totais de <i>H. placei</i> e <i>O. radiatum</i>	30
5.4 <i>Western Blot</i>	33
6. CONCLUSÕES	33
6.1 Perfil das contagens de ovos nas fezes nas diferentes categorias animais.....	33
6.2 Reações sorológicas.....	34
6.3 Perfil Eletroforético dos Extratos Totais de <i>H. placei</i> e <i>O. radiatum</i>	34
6.4 <i>Western Blot</i>	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Média, desvio padrão, amplitude e mediana das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) em diferentes categorias de bovinos naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, em duas propriedades comerciais no Mato Grosso do Sul, no período entre 2016 e 2017 (MARTINS, 2018) 22
- Tabela 2. Média, desvio padrão e amplitude das densidades ópticas obtidas por ELISA, empregando IgG total sobre antígenos totais de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum*, em reações com amostras de soros de bovinos de corte naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, distribuídos em diferentes categorias etárias (pré-desmame, desmamados, sobreanos e adultos), em duas propriedades comerciais no Mato Grosso do Sul, Brasil, no período entre 2016 e 2017 (MARTINS, 2018) 28
- Tabela 3. Média, desvio padrão e amplitude das densidades ópticas obtidas por ELISA, empregando IgG total sobre antígenos totais de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum*, em reações com amostras de soro de bovinos de corte naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, classificados em função da contagem do OPG (alto x baixo), em duas propriedades comerciais no Mato Grosso do Sul, Brasil, no período entre 2016 e 2017 (MARTINS, 2018) 29
- Tabela 4. Comparação entre os perfis de antígenos totais (AT) de *Haemonchus placei*, nas concentrações de 57,2; 41,6 e 31,2 µg, e de *Oesophagostomum radiatum*, nas concentrações de 46,3; 33,6 e 25,2 µg; respectivamente nas colunas 2 a 4 relativas a cada espécie; submetidos à eletroforese em SDS-PAGE a 12%. As colunas 1 são os perfis do padrão de referência de peso molecular (kDa). As frações destacadas em amarelo são aquelas cujas estimativas de peso molecular são próximas ou iguais 32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Imagem em Microscopia Eletrônica de Varredura da porção anterior de <i>H. placei</i> .	5
Figura 2.	Imagem em Microscopia Eletrônica de Varredura da porção anterior de <i>O. radiatum</i> evidenciando abertura oral e papilas	6
Figura 3.	Representação gráfica da dispersão das frequências relativas nas contagens de ovos por grama de fezes (OPG) por categoria (pré-desmama, desmamados, sobreano e adulto), discriminando as classes calculadas pelo método de Sturges (1926) em bovinos de corte, naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, em duas propriedades comerciais no Mato Grosso do Sul, Brasil, no período entre 2016 e 2017 (adaptado de MARTINS, 2018)	23
Figura 4.	Distribuição dos gêneros das larvas infectantes recuperadas nas coproculturas, em cada categoria de bovinos naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, em propriedades comerciais de Mato Grosso do Sul, no período 2016-2017 (adaptado de Martins, 2018)	23
Figura 5.	Distribuição das densidades ópticas (DO) para antígenos totais de <i>Haemonchus placei</i> em soros de bovinos de corte pertencentes à diferentes categorias etárias (pré-desmame, desmamados, sobreanos e adultos), naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, em duas propriedades comerciais em Mato Grosso do Sul, Brasil, entre os anos de 2016 e 2017 (Adaptado de Martins, 2018)	25
Figura 6.	Distribuição das densidades ópticas (DO) para antígenos totais de <i>Oesophagostomum radiatum</i> em soros de bovinos de corte pertencentes à diferentes categorias etárias (pré-desmame, desmamados, sobreanos e adultos), naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, em duas propriedades comerciais em Mato Grosso do Sul, Brasil, entre os anos de 2016 e 2017 (Adaptado de Martins, 2018)	26
Figura 7.	Índice de Reatividade (IR) aos antígenos totais (AT) de <i>Oesophagostomum radiatum</i> de soro de bovinos de corte pertencentes à diferentes categorias etárias (A: pré-desmame, B: desmamados, C: sobreanos e D: adultos) e distribuído segundo as respectivas classes das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), calculadas segundo Sturges (1926); representados segundo os dados de Martins, (2018)	27

- Figura 8. Índice de Reatividade (IR) aos antígenos totais (AT) de *Haemonchus placei* de soro de bovinos de corte pertencentes à diferentes categorias etárias (A: pré-desmame, B: desmamados, C: sobreanos e D: adultos) e distribuído segundo as respectivas classes das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), calculadas segundo Sturges (1926); representados segundo os dados de Martins (2018) 27
- Figura 9. Perfil eletroforético de Proteínas Totais (AT) de *Haemonchus placei*, em A: as colunas 1 e 5, são os perfis do padrão de referência de peso molecular (kDa). Nas colunas 2, 3 e 4 são amostras de AT nas concentrações de 57,2, 41,6 e 31,2 µg, respectivamente. Em B, perfil do padrão de referência para as comparações das amostras; em C, perfil da amostra da coluna 2, destacando os 4 conjuntos de frações principais; em D, perfil da coluna 3 destacando as frações isoladas, e em E, o perfil da coluna 4 na qual foi aplicada a menor quantidade de AT. 30
- Figura 10. Perfil eletroforético de Proteínas Totais (AT) de *Oesophagostomum radiatum*, em A: as colunas 1 e 5, são os perfis do padrão de referência de peso molecular (kDa). Nas colunas 2, 3 e 4 são amostras de AT nas concentrações de 46,3; 33,6 e 25,2 µg, respectivamente. Em B, perfil do padrão de referência para as comparações das amostras; em C, perfil da amostra da coluna 2, destacando os 4 conjuntos de frações principais; em D, perfil da coluna 2 destacando as frações isoladas, e em E, o perfil da coluna 4 na qual foi aplicada a menor quantidade de AT 31

RESUMO

VELOSO, F. P. Perfil eletroforético de antígenos totais de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum* e suas reatividades aos soros de bovinos naturalmente infectados. 2023. MESTRADO. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2023.

A pecuária continua sendo uma atividade econômica crucial para o Brasil, desempenhando um papel importante na economia nacional. No entanto, a população bovina encontra um desafio no combate às infecções por nematodas gastrointestinais. *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum* destacam-se como espécies conhecidas por sua alta infecção e capacidade reprodutiva, juntamente com sua resistência a muitos métodos de controle predominantes. Apesar das formulações químicas servirem como a principal ferramenta para o controle de parasitas, elas enfrentam limitações nos mercados consumidores devido aos resíduos que deixam na carne. Além disso, essas formulações promovem a seleção de organismos resistentes aos seus componentes ativos. Por isso, novas estratégias de controle devem ser exploradas. Considerando estas estratégias, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar os perfis dos antígenos totais de espécimes nematodas parasitos gastrointestinais de bovinos (*Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum*) e comparar a resposta imune humoral por *Western Blot* pela Imunoglobulina G (IgG total), empregando os soros de animais caracterizados pela contagem de ovos nas fezes (OPG) amostrados em rebanhos comerciais de bovinos de corte, buscando relacionar os *status* imunitários em animais com idades diferentes pelos seus respectivos OPG's. Neste estudo, um total de 1147 animais foram amostrados e categorizados em quatro grupos: pré-desmame, desmamados, sobreanos e adultos. Amostras de fezes e sangue foram coletadas e submetidas à técnica McMaster e de ELISA, respectivamente. Os antígenos totais (AT) foram extraídos de espécimes adultos desintegrados de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum*, obtidos por meio de infecções mistas induzidas. O estudo envolveu ainda a caracterização de AT de ambas as espécies, por eletroforese SDS-PAGE e posterior *immunoblotting*. Os resultados apresentaram variações significativas nas contagens de ovos por grama de fezes (OPG) entre essas categorias, com os bovinos pré-desmame apresentando os valores mais elevados de OPG, seguidos pelos desmamados. Todos os soros apresentaram reatividade para anticorpos séricos da classe IgG total quando expostos a antígenos de *Haemonchus placei* e de *Oesophagostomum radiatum*. Os bovinos mais jovens apresentaram maiores contagens de OPG e menor índice de reatividade, enquanto os bovinos mais velhos o oposto. Sobre os perfis eletroforéticos dos extratos totais de *Haemonchus placei* e de *Oesophagostomum radiatum*, foram identificadas diferentes frações proteicas em ambos os antígenos. Embora tenham sido observadas algumas semelhanças no tamanho entre as frações, os perfis foram diferentes. Em *Western Blot* foram observadas reatividades para algumas frações proteicas de *Oesophagostomum radiatum*, especialmente em animais mais velhos e com baixas contagens de OPG. No entanto, não foram observadas reações para as frações de *Haemonchus placei*. Em conclusão, esta pesquisa fornece uma análise abrangente das infecções por parasitos gastrointestinais em bovinos, destacando a influência da faixa etária, a resposta imunológica e a complexidade das frações antigênicas desses parasitos, ressaltando a resistência naturalmente adquirida em animais e fornecendo uma visão geral sucinta dos perfis eletroforéticos dos ATs, no qual aponta as frações reconhecidas por imunoglobulinas G em soros - particularmente em animais exibindo contagens de OPG mais baixas, que se depreende como os mais resistentes.

Palavras-chave: Eletroforese, helmintos, imunoblotes, proteínas, ruminantes.

ABSTRACT

VELOSO, F. P. Electrophoretic profile of total antigens from *Haemonchus placei* and *Oesophagostomum radiatum* and their reactivity to sera from naturally infected cattle. 2023. MASTER. Graduate Program in Veterinary Sciences. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2023.

Livestock farming continues to be a crucial economic activity for Brazil, playing a significant role in the national economy. However, the bovine population faces a challenge in combating gastrointestinal nematode infections. *Haemonchus placei* and *Oesophagostomum radiatum* stand out as species known for their high infection rates and reproductive capacity, along with their resistance to many predominant control methods. Despite chemical formulations serving as the primary tool for parasite control, they face limitations in consumer markets due to [the](#) residues they leave in meat. Additionally, these formulations promote the selection of organisms resistant to their active components. Therefore, new control strategies must be explored. Considering these strategies, the present study aimed to characterize the profiles of total antigens from gastrointestinal nematode specimens in cattle (*Haemonchus placei* and *Oesophagostomum radiatum*) and compare the humoral immune response via *Western Blot* using Immunoglobulin G (IgG Total), employing sera from animals characterized by fecal egg count (EPG) sampled from commercial beef cattle herds, seeking to relate the immune status in animals of different ages to their respective EPG's. In this study, a total of 1147 animals were sampled and categorized into four groups: pre-weaning, weaned, yearlings, and adults. Fecal and blood samples were collected and subjected to the McMaster technique and ELISA, respectively. Total antigens (TAs) were extracted from disintegrated adult specimens of *Haemonchus placei* and *Oesophagostomum radiatum* obtained through induced mixed infections. The study also involved the characterization of TAs from both species by SDS-PAGE electrophoresis and subsequent immunoblotting. The results revealed significant variations in fecal egg counts (EPG) among these categories, with pre-weaning calves having the highest EPG values, followed by weaned calves. All sera showed reactivity to total immunoglobulin G (IgG) when exposed to *Haemonchus placei* and *Oesophagostomum radiatum* antigens. Younger cattle had higher EPG's and lower reactivity indices, while older cattle exhibited the opposite trend. Regarding the electrophoretic profile of total extracts from *Haemonchus placei* and *Oesophagostomum radiatum*, different protein fractions were identified in both antigens. Although some size similarities among fractions were observed, the profiles differed. In *Western Blot*, reactivity was observed for some proteins from *Oesophagostomum radiatum*, especially in older animals with lower EPG's. However, no reactions were observed for *Haemonchus placei* fractions. In conclusion, this research provides a comprehensive analysis of gastrointestinal nematode infections in cattle, highlighting the influence of age, immune response, and the complexity of antigenic fractions of these parasites, emphasizing naturally acquired resistance in animals, and providing a succinct overview of TA electrophoretic profiles, which identifies fractions recognized by immunoglobulins G in sera — particularly in animals displaying lower EPG's, indicative of higher resistance.

Keywords: Electrophoresis, helminths, immunoblots, proteins, ruminants.

1. INTRODUÇÃO

As infecções parasitárias são uma das principais causas de doenças em bovinos, afetando a produção e a saúde desses animais. Podem causar sintomas como perda de peso, diarreia, anemia e lesões na pele. Além disso, a presença de parasitas pode comprometer a imunidade do animal, tornando-o mais suscetível a outras doenças e infecções (COLES *et al.*, 2017).

A prevenção e o controle de infecções parasitárias em bovinos são fundamentais para garantir a saúde e o bem-estar desses animais, bem como a produtividade da pecuária. Medidas como o manejo adequado dos pastos, a utilização de antiparasitários e o controle ambiental são importantes para evitar a infecção e o agravamento de infestações parasitárias (SUTHERLAND & LEATHWICK, 2011). Por isso, nas últimas décadas, o uso sistemático e contínuo de produtos anti-helmínticos permitiu um bom domínio sobre as parasitoses, porém, simultaneamente, propiciou o surgimento da resistência dos parasitas às drogas destinadas ao seu combate. Todavia, de nenhum modo pode-se atribuir o desenvolvimento da resistência como consequência direta dos programas estratégicos, mas sim, ao uso sistemático, frequente, contínuo e, muitas vezes, sem critérios dos produtos químicos. Os relatos mais numerosos são aqueles envolvendo ovinos e caprinos, nos quais observou-se até mesmo resistência simultânea às várias classes de drogas (BORSTEEDE, 1990; VAN WYK, 1990; VAN WYK *et al.*, 1997; HOLSBACK *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2022). Como perspectivas para este problema houve o aprofundamento em estudos que buscam alternativas de controle, como a utilização de fungos nematófagos, besouros coprófagos e fitoterápicos. (ARAÚJO *et al.*, 2006; BERTONE *et al.*, 2005; HOSTE *et al.*, 2006). Cita-se também as vacinas, como a Barbervax®, a Bovilis Huskvac e Providean Hidatil EG95, que já são comercialmente disponíveis. São destinadas ao controle de *Haemonchus contortus*, *Dictyocaulus viviparus* e *Echinococcus granulosus*, respectivamente.

Ao longo do desenvolvimento dos animais, ocorre uma série de mudanças no sistema imunológico que os tornam mais resistentes a doenças. Segundo Menino *et al.* (2020), os bovinos nascem com baixa imunidade, sendo essa adquirida compensada através do contato com os microrganismos presentes no ambiente e com as vacinas utilizadas no programa de imunização.

O desenvolvimento da imunidade também está relacionado com a raça do hospedeiro, início de pastejo, espécie do parasita, tipo de clima, quantidade e qualidade

do colostro recebido, além de fatores genéticos (MICHEL, 1963; MICHEL *et al.*, 1973; PRESTON & ALLONBY, 1979; BANKS *et al.*, 1990, GÓRNIAK *et al.*, 2016).

A imunidade adaptativa se traduz pelo aumento do período pré-patente, aumento no número de larvas que apresentam inibição, alterações morfológicas nos parasitas, interrupção no desenvolvimento com eliminação de larvas e, o mais importante, redução no número de adultos e na postura de ovos produzidos pelas fêmeas parasitas (HERLICH, 1960). Assim, o efeito epidemiológico mais expressivo é a redução da contaminação das pastagens e consequente declínio na transmissão das parasitoses aos rebanhos (GASBARRE *et al.*, 2001).

A busca por técnicas de imunização aos agentes parasitários gastrointestinais é estimulada pelo reconhecimento das características desejáveis contidas nestes métodos: devem ser sem contaminantes para os animais ou ao ambiente com resíduos químicos e se apresentarem inócuas ao homem e animais; também podem ser uma solução ao problema da resistência dos parasitas aos anti-helmínticos. A partir de então, envidar esforços para aprofundar estudos sobre a dinâmica da resposta imune em animais expostos às infecções naturalmente adquiridas e, desta forma, entender e identificar quais antígenos estão intrinsecamente relacionados à condição de resistência que se desenvolve com o avançar da idade. Técnicas sorológicas para diagnóstico ou para avaliação do *status* imunológico de bovinos são ferramentas que agregam informações valiosas sobre a condição de imunidade dos hospedeiros, logo, podem ser instrumentos para determinar a dinâmica da resposta imune.

A resposta imune de bovinos contra produtos de Excreção/Secreção (E/S) e Extratos Totais (AT) de formas adultas de *H. placei* foi estudada por Schallig *et al.* (1996), os quais constataram que na primeira infecção não houve significativa elevação de imunoglobulina G (IgG), porém, verificaram que em infecções seriadas havia uma marcada elevação desta imunoglobulina e o grupo de antígenos reconhecido com mais evidência situou-se na faixa de 50-55 kDa. A utilização dos produtos de E/S e AT permanece promissora, considerando que estes produtos estão intimamente ligados aos processos da interação parasito/hospedeiro, desde a invasão dos tecidos, com algumas proteinases já caracterizadas, até o envolvimento nos fenômenos imunobiológicos (HERLICH & DOUVRES, 1977; MUNN *et al.*, 1987; BRITTON *et al.*, 1993; KNOX *et al.*, 1993).

A espécie *Oesophagostomum radiatum* (Rudolphi, 1803) Railliet, 1898 apresenta maior capacidade de induzir uma resposta imunológica protetora logo após a primeira

exposição, como evidenciado por estudos anteriores (Keith, 1967; Gasbarre, 1997 e Gasbarre *et al.*, 2001). Esta espécie é notável entre os nematodas parasitas gastrointestinais de bovinos encontrados nas condições do Brasil Central devido ao seu alto potencial patogênico. Apesar disso, sua prevalência em bovinos é relativamente baixa, menos de 15% (MELO & BIANCHIN, 1977; BIANCHIN *et al.*, 1990, FELIZ, 2011). Durante a fase larval, o parasita invade a mucosa e submucosa do intestino delgado, enquanto na fase adulta, habita a luz do intestino grosso dos bovinos.

Assim estudos direcionados para caracterizar as frações proteicas presentes em nematodas e seu eventual reconhecimento pelo soro de animais naturalmente infectados pode contribuir para identificar aquelas envolvidas no desenvolvimento da resistência naturalmente adquirida e, por consequência, se utilizadas podem contribuir para uma nova abordagem terapêutica das helmintoses gastrointestinais empregando imunógenos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar os perfis dos antígenos totais de espécimes nematodas parasitas gastrointestinais de bovinos (*Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum*) e comparar a resposta imune humoral por *Western Blot* pela Imunoglobulina G (IgG total), empregando os soros de animais caracterizados pela contagem de ovos nas fezes (OPG) amostrados em rebanhos comerciais de bovinos de corte, buscando relacionar os *status* imunitários nas diferentes categorias animais pelos seus respectivos OPG's.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar e classificar os resultados das contagens de ovos nas fezes e os respectivos índices individuais de reatividade obtidos por Elisa, obtidos em amostras processadas em dois rebanhos comerciais (dados de Martins, 2018);
- Caracterizar por eletroforese em gel de poliacrilamida as proteínas totais (AT) das formas adultas de *H. placei* e *O. radiatum*;
- Destacar as variações nas bandas proteicas distinguidas por *Western Blot*, utilizando os soros com as mais altas e mais baixas densidades ópticas, levando em consideração as diferentes categorias de animais (pré-desmame, desmamados, sobreanos e adultos) e suas respectivas distribuições de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e;

- Estabelecer a relação entre as variáveis consideradas: contagens de OPG, títulos das reações sorológicas, reconhecimento de proteínas por *Western Blot*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Nematodioses gastrointestinais em bovinos

As nematodioses gastrointestinais são uma das principais doenças que comprometem a produção de bovinos em todo o mundo. Essas parasitoses são causadas por várias espécies de nematodas que habitam o trato gastrointestinal dos animais, causando prejuízos econômicos significativos para os bovinocultores. Um estudo realizado por Oliveira *et al.* (2020) na região sul do Brasil, mostrou que as perdas causadas por nematodas gastrointestinais (NGI) podem chegar a R\$ 16,55 por animal/ano. Em um rebanho com 1000 animais, isso representaria uma perda de R\$ 16.000,00 por ano. Outro estudo realizado por Amarante *et al.* (2018) na região centro-oeste do Brasil, mostrou que infecções por NGI podem causar uma redução na produção de leite de até 21%. Além disso, os animais infectados apresentaram uma taxa de conversão alimentar pior e um aumento no tempo necessário para atingir o peso de abate, o que pode trazer dispêndios ao produtor.

Os maiores rebanhos bovinos do país encontram-se nos estados do Brasil Central – Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul (ABIEC, 2020). Nessa região, a taxa de mortalidade proveniente das helmintoses é estimada em 2% em animais jovens e também decréscimo no peso corporal em torno de 41 Kg até o abate (BIANCHIN *et al.*, 1995). Danos causados à saúde do animal acarretam em perdas econômicas consideráveis. Estimou-se que as gastroenterites parasitárias em bovinos determinem perdas ao redor de 7,11 bilhões de dólares anuais (GRISI *et al.* 2014). Outro referencial que pode ser avaliado é o valor de 76 milhões de dólares em aquisições de antiparasitários bovinos no mercado brasileiro no ano de 2017 (SINDAN, 2018).

Contudo, o uso frequente e continuado destas substâncias pode acelerar a resistência parasitária, suscitando demasiado revés econômico para o pecuarista (CANÇADO *et al.*, 2019).

Visto os prejuízos econômicos, cita-se também os de ordem patológica, prejudicando a produtividade dos rebanhos. As NGI podem causar diarreia, perda de peso, anemia e diminuição na produção de carne e leite. No trato gastrointestinal do hospedeiro causam destruição das vilosidades, espessamento da mucosa muscular

externa, ausência de diferenciação celular e hiperplasia abomasal (RITCHIE *et al.*, 1966). Estas alterações levam à diminuição da secreção de pepsina, aumentando o pH abomasal. Por conseguinte, há elevação de pepsinogênio sérico, aumento da permeabilidade abomasal e extravasamento de albumina para o lúmen (ROSS & TODD, 1965; ANDERSON *et al.*, 1966; SOUZA, 2013). A absorção de proteínas e nutrientes é comprometida, levando o hospedeiro a um quadro de hipoproteinemia, hipofosfatemia, diarreia, perda de peso, anorexia e, possivelmente, morte (HERLICH, 1962; HERLICH & DOUVRES, 1977; VIVEIROS, 2009).

3.2 Nematodas gastrointestinais de bovinos com importância no Brasil central

Iniciados os anos 70, uma equipe de parasitologistas implementou uma investigação helmintológica em 54 municípios do Brasil Central. Recorrendo à necropsias e exames coproparasitológicos, acharam no trato gastrointestinal dos bovinos os seguintes nematodas: *Haemonchus similis*, *Haemonchus contortus*, *Cooperia pectinata*, *Cooperia punctata*, *Bunostomum phlebotomum*, *Oesophagostomum radiatum* e *Trichuris* (PIMENTEL NETO & SOUZA, 1971; GRISI, L. & NUERNBERG, 1971). No decorrer dos anos, outros inquéritos parasitológicos foram executados, empregando-se a contagem de ovos e larvas. Apontaram *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *O. radiatum* e *Trichostrongylus* spp. como os parasitos gastrointestinais mais prevalentes na bovinocultura desta localidade (MAIA & MATTOS, 2020).

Dos helmintos anteriormente citados, *Haemonchus* sp. e *Oesophagostomum* sp. são os que apresentam a maior produção de ovos, atingindo um valor máximo de 10.000 e 12.000 ovos por dia, respectivamente (MAIA & MATTOS, 2020). A quantidade diária dos demais transcorre entre 100 e 200 ovos por fêmea (UENO & GUTIERREZ, 1983).

Além disso, são dois gêneros que podem ocasionar patogenia severa nos hospedeiros. *H. placei*, habitante do abomaso, apresenta ao redor de 30 dias de período pré-patente, sendo conhecido por causar anemia acentuada em bezerros devido à intensidade do seu hábito hematófago.

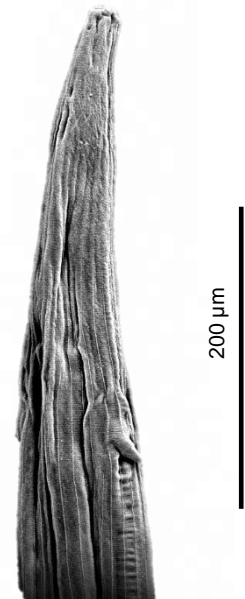


Figura 1. Imagem em Microscopia Eletrônica de Varredura da porção anterior de *H. placei*.

Em contrapartida, larvas de *O. radiatum* realizam profunda penetração na mucosa do intestino grosso, causando inflamação com nódulos visíveis a olho nu, dependendo

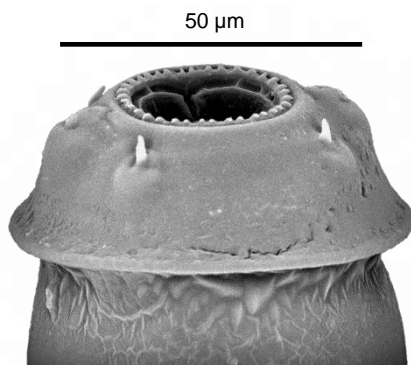


Figura 2. Imagem em Microscopia Eletrônica de Varredura da porção anterior de *O. radiatum* evidenciando abertura oral e papilas.

do número de infecções prévias. Seu período pré-patente é também ao redor de 32 dias. (PAIVA, 2002; MAIA & MATTOS, 2020). As particularidades indesejáveis destas duas espécies impulsionam a utilização de drogas antiparasitárias, resultando em maior pressão de seleção e surgimento de linhagens resistentes (SOUZA *et al.*, 2008).

3.3 Mecanismos imunológicos frente a esses parasitos

Um recente estudo de Rickard *et al.* (2021) expôs os principais elementos da resposta imune dos bovinos aos NGI: a resposta inflamatória, produção de anticorpos, resposta celular, carga parasitária e a nutrição do animal. Com o avançar dos estudos, viu-se que os bovinos têm um sistema imunológico eficiente contra NGI, incluindo a imunidade inata e a adaptativa. Ele também é orquestrado mutuamente por inúmeros elementos estruturais, como a pele e membranas mucosas; elementos celulares, tais como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos; e moleculares, citando os anticorpos e interleucinas. Esta liga defensiva faz-se explícita nas infecções helmínticas, em que o sistema imune emprega diversos mecanismos para superar o tamanho e a complexidade antigênica dos parasitas (MACHADO *et al.*, 2004; ANTHONY *et al.*, 2007). Apesar da abundância em colágenos estruturais, a cutícula dos nematódeos não são expostas ao sistema imune do hospedeiro (BEHNKE, 1990). Contudo, alguns mecanismos são ativados por moléculas antigênicas excretadas pelos parasitas - também conhecidas como produtos de excreção e secreção, E/S. Os PAMP's - Padrões Moleculares Associados a Patógenos – dos helmintos interagem com as Células Apresentadoras de Antígeno (APC) e Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR) do hospedeiro, viabilizando a ativação das células T helper tipo 2 (Th2). A partir desta ativação, células do tipo B produzirão imunoglobulinas específicas – IgE e IgG. Uma função comum destas duas imunoglobulinas é cobrir todo o invólucro do helminto e compor receptores para eosinófilos, que são as células protetivas de maior eleição contra helmintoses (MELNEK

et al., 2014). Por sua vez, irão degranular-se e provocar injúrias diretas ao revestimento do parasita. Em resposta à infecção, a IgA presente na superfície da mucosa intestinal tem seus títulos elevados, fornecendo uma proteção eficaz contra os patógenos. Porém, essas taxas declinam rapidamente em alguns meses, ao contrário da IgG, que pode durar anos na circulação (MIMS, 1987; ADA, 1999, PLOTKIN & ORENSTEIN, 1999). As imunoglobulinas locais também podem ligar-se diretamente aos produtos de secreção e neutralizá-los (DAY & SCHULTZ, 2014). Neste cenário o processo inflamatório estará presente, ocasionando elevação da permeabilidade vascular. Com isso, a IgG - imunoglobulina mais predominante no soro - sai da circulação e consegue alcançar o espaço extracelular do tecido (DAY & SCHULTZ, 1960).

Kloosterman *et al.* (1984) e Frankena (1987) fizeram ensaios com *Ostertagia ostertagi* e *Cooperia oncophora*. Após aplicação de teste estatístico, os primeiros autores viram correlação negativa entre os bovinos que apresentavam títulos de IgG mais proeminentes e nematodas de menor tamanho e em menores quantidades, sendo que as fêmeas reduziram a vulva e a quantidade de óvulos no útero. Já o segundo autor constatou a elevação da quantidade de células contendo imunoglobulina G na mucosa do abomaso e intestino delgado durante as duas infecções em que submeteu alguns bezerros. Estas alterações também são percebidas no tamanho e peso dos linfonodos regionais que drenam o abomaso, atingindo um volume de 20 a 30 vezes maior que em animais não infectados. O crescimento se dá pelo aumento na produção de linfócitos parasita-específicos (GASBARRE, 1986, 1994; CANALS *et al.*, 1997).

Nishi *et al.* (2002) buscaram avaliar a dinâmica da IgG em bezerros naive submetendo-os a duas infecções consecutivas com *H. placei*. Viram que na sétima semana pós-infecção os anticorpos atingiram seu pico e, ao final do experimento na décima semana, sua taxa ainda estava elevada, concedendo aos bezerros resistência à reinfeção e relevante diminuição de OPG. Ulteriormente, Martins (2018) comprovou que animais que possuem menores contagens de OPG apresentam maiores títulos de anticorpos, principalmente, os da classe IgG. Estes testes e resultados sobre a IgG frente a helmintos gastrointestinais nos conduzem para análises mais aprofundadas dos mecanismos que medeiam a resposta imune em bovinos, sendo, portanto, a imunoglobulina estabelecida para protagonizar o presente trabalho.

De acordo com Roberts & Swanson (1981), a contagem de ovos é uma estimativa da carga parasitária, pois as fêmeas de helmintos produzem um número previsível de ovos por unidade de tempo. No entanto, a contagem de ovos pode subestimar a carga

parasitária em animais que têm baixa excreção de ovos, mas ainda estão infectados. Além disso, em animais com uma grande carga parasitária, a contagem de ovos pode superestimar a carga real, pois pode haver saturação da capacidade de produção de ovos dos helmintos. Gordon & Gardiner (1981) também abordam a relação entre contagem de ovos e número de parasitos em helmintos de ruminantes, afirmando que a contagem de ovos nas fezes é uma técnica útil de diagnóstico, mas deve ser interpretada com cuidado, levando em consideração fatores como a espécie do helminto, a idade do animal, o nível de imunidade e o tipo de tratamento antiparasitário utilizado.

Um estudo realizado por Jabbar *et al.* (2015) investigou a resposta imune celular de bovinos infectados com *Ostertagia ostertagi*, outro parasita importante em bovinos. O estudo mostrou que a infecção com *O. ostertagi* induz a produção de células T reguladoras, que inibem a resposta imune do hospedeiro, permitindo que o parasita se estabeleça no trato gastrointestinal. Anos depois, Gossner *et al.* (2018) investigaram as alterações na expressão gênica em bovinos infectados com *Haemonchus contortus*. O estudo mostrou que uma infecção por *H. contortus* induz alterações na expressão de genes relacionados à resposta inflamatória, defesa antioxidante e resposta imune adaptativa.

Mais adiante, Bertagnon *et al.* (2019) buscaram avaliar a interferência do grau de infecção parasitária estimado pelo OPG de *Haemonchus contortus* sobre o leucograma e metabolismo oxidativo parasitário em ovinos com hemonose. Dividiram 39 machos adultos em 4 grupos de acordo com o grau de infecção. Após análise do soro e fezes notaram estatisticamente uma menor quantidade de neutrófilos naqueles animais com menor OPG. E os que apresentavam maior OPG apresentaram menores quantidades de eosinófilos.

Durante o parasitismo, os tricostrongilídeos secretam uma diversidade de enzimas. Roeber *et al.* (2019) investigaram a natureza e a função daquelas oriundas de larvas de tricostrongilídeos em resposta a diferentes condições ambientais. O estudo mostrou que as larvas de *H. contortus* secretam proteases, fosfolipases e hialuronidases, que podem estar envolvidas na fertilização e também na migração nos tecidos do hospedeiro. Adiante, Wang *et al.* (2020) investigaram a expressão gênica de enzimas degradativas em *H. contortus* e concluíram que a expressão de proteases, lipases e nucleases é regulada durante diferentes fases do ciclo de vida do parasita. Já as larvas de *H. placei* secretam proteases e fosfatases, que podem estar envolvidas na penetração e migração no tecido do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2020).

Embora muitos tricostrongilídeos sejam conhecidos por secretar enzimas degradativas para digerir tecidos do hospedeiro, alguns estudos têm mostrado que nem todos as secretam. Por exemplo, um estudo realizado por Oliveira-Sequeira *et al.* (2005) explorou a presença de enzimas degradativas em duas espécies de tricostrongilídeos, *Cooperia punctata* e *C. oncophora*, que parasitam bovinos. O estudo mostrou que esses parasitas não secretam enzimas degradativas como proteases, fosfatases e esterases, indicando que eles têm mecanismos diferentes para se manter no hospedeiro. Redman *et al.* (2018) verificaram a expressão de genes relacionados à digestão de proteínas em *Ostertagia ostertagi*, outro tricostrongilídeo encontrado em bovinos. O estudo mostrou que essa espécie tem um número reduzido de genes para proteases e que a expressão desses genes é relativamente baixa, sugerindo que o parasita pode ter uma estratégia diferente para se nutrir.

Recentemente, um estudo identificou o complexo de glicoproteína *Haemonchus* galactose (H-gal-GP) como um antígeno oculto presente em *H. contortus*, atuando na digestão da albumina e hemoglobina sem que seja detectado, além de ser considerado de alta imunogenicidade. A análise demonstrou que essa proteína suprime a resposta imunológica do hospedeiro, permitindo que o parasita continue a se reproduzir e causar danos. Esse achado sugere que a capacidade do H-gal-GP de suprimir a resposta imune pode ser explorada no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratar a infecção por *H. contortus* (SMITH *et al.*, 2021).

3.4 Imunização de ruminantes contra helmintos

Processos de imunização contra helmintos constituem-se em um desafio enorme, pois estes seres são multicelulares, com uma diversidade de produtos antigênicos, complexos mecanismos fisiológicos e com variadas interações imunológicas com o hospedeiro (HERLICH & DOUVRES, 1977). Ao longo das últimas décadas experimentos foram desenvolvidos com o intuito de avaliar a dinâmica dos antígenos em variados gêneros de helmintos com a pretensão de se obter apenas um imunógeno capaz de imunizar os hospedeiros frente às espécies mais importantes de helmintos parasitas de ruminantes. No fim dos anos 50 foi desenvolvida por Jarret *et al.* (1958) uma vacina que passou a ser comercializada com o nome de Dictol®, atualmente conhecida por Bovilis Huskvac®. Nesta vacina é empregada a irradiação em larvas infectantes de *Dictyocaulus viviparus*, de tal forma que elas não percam a infectividade e ainda permaneçam viáveis. Assim, a resposta imune do hospedeiro é eficiente para impedir

novas infecções. Entre os aspectos limitantes a este método apresenta-se a necessidade de animais doadores para produção de larvas infectantes, o tempo curto de estocagem, a viabilidade das larvas no momento da aplicação e um potencial veículo para patógenos virais e bacterianos.

Nos anos seguintes, muitos pesquisadores se dedicaram a estudar as dinâmicas das infecções parasitárias em bovinos e possíveis imunógenos capazes de proporcionar alguma resposta imunológica satisfatória (DOUVRES, 1962; HERLICH, 1962; SOULSBY, 1963; HERLICH, 1967; DENHAM, 1969). Herlich (1973) desenvolveu uma pesquisa visando determinar a imunogenicidade de extratos obtidos de diversos estágios de *O. radiatum* cultivados *in vitro*, inoculados parenteralmente em bovinos. Os animais não desenvolveram imunidade quando submetidos às injeções subcutâneas. Porém, apresentaram resposta imune protetiva quando sujeitados às injeções intraperitoneais.

Na segunda metade da década de 70, Munn (1976, 1977) estudou a contortina, um polímero com estrutura helicoidal, presente no lúmen intestinal dos helmintos, sugerindo capacidade de induzir resposta imune protetora, pois exerce contato direto com o sangue ingerido pelos parasitas. Então, Munn (1987) elaborou um extrato enriquecido com contortina obtida de espécimes adultos de *Haemonchus contortus* e injetou em 19 cordeiros. Depois, submeteu-os ao desafio com 20.000 – 25.000 larvas infectantes de *H. contortus* em dose única. Por meio da imunoeletroforese foi confirmada a presença de anticorpos para a contortina em 18 cordeiros. O único animal testado que não desenvolveu anticorpos morreu de haemoncose, assim como a maioria dos representantes do grupo controle.

Gasbarre & Canals (1989) investigaram antígenos somáticos extraídos de espécimes adultos de *O. radiatum*, a fim de avaliar o potencial imunológico protetivo em bezerros. Constataram grande redução na quantidade de vermes e correlação entre o *status* imunitário e anticorpos IgG₂ específicos para o parasita. No entanto, relatam perda de peso nos animais submetidos à imunização.

Duas vacinais experimentais foram elaboradas por Boisvenue *et al.* (1991) e aplicadas em ovinos com aproximadamente 1 ano de idade, criados em ambiente livre de helmintos. A primeira era composta por peptídeo sintético de colágeno cuticular 18AA. A segunda foi desenvolvida a partir do colágeno cuticular de larvas de terceiro e quarto estágio de *H. contortus*. Ambas induziram a produção de anticorpos reativos aos antígenos dos colágenos cuticulares, porém, não foram satisfatórias em induzir proteção reprodutível contra infecções por *H. contortus*.

Em ensaio no qual bezerros foram submetidos à vacinação com extrato obtido do intestino de *H. placei*, observou-se redução na quantidade de fêmeas adultas e larvas de quarto estágio, redução na quantidade de ovos no útero dos espécimes e na contagem de OPG (SIEFKER e RICKARD, 2000a). Em outro ensaio foi testado o mesmo imunógeno, porém, os bezerros foram desafiados com *Ostertagia ostertagi*, e não observaram diferença significativa entre o grupo vacinado e o controle (SIEFKER e RICKARD, 2000b).

À procura de um composto imunogênico comum a vários gêneros de helmintos, Smith *et al.* (1993) formularam um extrato à base de intestino de *H. contortus* e inocularam em cordeiros. O inóculo foi eficaz contra *H. contortus* em animais jovens, porém não verificaram proteção cruzada contra *Ostertagia circumcincta* ou *Nematodirus battus*. Após purificarem a molécula H-gal-GP, Smith *et al.* (1994) imunizaram cordeiros desafiados com *H. contortus*. Houve até 72% de redução na carga parasitária e 93% de eliminação de ovos nas fezes. Porém, quando Smith & Smith (1996) fracionaram H-gal-GP em subunidades não observaram eficácia na imunização contra *H. contortus*, com exceção da molécula H-sialgal-GP, quando Smith *et al.* (2000) imunizaram ovinos e notaram diminuição de 86 % de eliminação dos ovos nas fezes (OPG) e redução de 52% dos parasitos adultos, demonstrando um resultado parecido com o da molécula integral.

No ano seguinte, Smith *et al.*, (2001) investigaram glicoproteínas de membrana de *H. contortus* e *Teladorsagia circumcincta* e encontraram algumas proteínas antigênicas em comum para as duas espécies. Então, produziram uma vacina experimental composta por proteases de *Haemonchus contortus*, inoculando-a em um grupo de ovinos. Obtiveram 99% de redução na eliminação de ovos e 92% na redução dos adultos no abomaso, quando comparados ao grupo controle. No entanto, não proporcionou proteção cruzada contra *T. circumcincta*, *Trichostrongylus axei* ou *Cooperia oncophora*. Em estudos futuros com a H-gal-GP identificou-se 4 metaloendopeptidases de zinco – MEP1, MEP2, MEP3, MEP4 – e uma aspartil protease. Estas frações isoladas do complexo não conferiram proteção significativa (SMITH *et al.*, 2003a; Smith *et al.*, 2003b).

Sobre as moléculas alvo das pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra a haemoncose em ruminantes, também há a TSBP que é uma proteína de ligação de tiol sefarose capaz de se ligar a compostos que contenham grupos sulfidríla (-SH), como a glutatona, um importante antioxidante celular. Acredita-se que a TSBP esteja envolvida na proteção do parasita contra o estresse oxidativo gerado pelo sistema imunológico do hospedeiro (LI *et al.*, 2020). Já foi demonstrado que a vacinação com TSBP pode induzir

uma resposta imunológica protetora em ovinos e bovinos, reduzindo a carga parasitária e melhorando a saúde dos animais (WANG *et al.*, 2019). Além disso, a TSBP tem sido avaliada como um possível biomarcador para a detecção de infecções por *H. contortus* em ruminantes (RASHIDI *et al.*, 2018). Redmond e Knox (2004) conduziram um experimento relacionado à fração da membrana de ligação de tiol Sefarose (TSBP) de *H. contortus* adultos. Viram que esta fração de TSBP possuía grande atividade enzimática exercida pelas cisteínas proteinases, que são enzimas antigênicas expressas na superfície microvilar das células intestinais do parasita (KNOX *et al.*, 1995; SKUCE *et al.*, 1999; SMITH, 1999). Conseguiram identificar 3 cisteínas proteinases do tipo B (hmcp1, hmcp2 e hmcp6). Então, a purificação das cisteínas proteinases foi realizada por cromatografia de afinidade, usando cistatina recombinante de *H. contortus*. Após os ajustes de concentração, o preparo foi inoculado em ovelhas, no qual se observou níveis significativos de proteção nos animais quando submetidos ao desafio, reduzindo a contagem de ovos e carga parasitária em 28% e 46%, respectivamente. No ano seguinte, Knox *et al.* (2005) deu continuidade aos estudos com TSBP, usando a cromatografia por troca aniônica para fracioná-la ainda mais. Uniu as frações a 3 bases. A primeira base continha protease ativa, a segunda apresentava um peptídeo não-protease e a terceira, material não ligante à coluna. Somente o material enriquecido com protease conferiu imunidade protetora, estimulando resposta com predominância de imunoglobulinas do tipo IgG2.

Ainda há a globina dos nematódeos, que é uma proteína hemoglobínica presente no fluido celômico destes, podendo ser reconhecida pelo sistema imunológico do hospedeiro como antígeno. Estudos recentes demonstraram que a globina pode ter uma função importante na sobrevivência do parasita, pois é capaz de neutralizar os radicais livres produzidos pelo sistema imunológico do hospedeiro. Tornou-se um alvo potencial para a imunização de ruminantes contra estas infecções (YANG *et al.*, 2016). No trabalho de Clarebout *et al.* (2005) a globina foi obtida da purificação do extrato total de espécimes adultos de *Ostertagia ostertagi*, sendo associada com adjuvante de Freund ou Quil A. Inocularam em bezerros e avaliaram sua capacidade protetiva. Os animais vacinados apresentaram títulos mais elevados de anticorpos específicos para globina quando comparados aos não vacinados. Um ensaio posterior realizado com *Trichostrongylus colubriformis* mostrou que a proteína de globina recombinante TcGST-Glb1 induziu uma resposta imune protetora em ovinos contra a infecção por este verme. A proteína TcGST-Glb1 é uma proteína quimérica que consiste em uma porção da proteína de globina de

T. colubriformis e uma porção da proteína glutathiona-S-transferase (GST), que é capaz de induzir uma resposta imune contra o parasita (ZHOU *et al.*, 2016). Outra proteína utilizada como antígeno para imunização é a recombinante TCI-HcGbR, que apresenta características semelhantes à globina de *H. contortus*. Já foi demonstrada que a vacinação de ovinos com esta partícula conferiu proteção significativa contra a infecção por *H. contortus* (TUO *et al.*, 2018).

Kabagambe *et al.* (2000) realizaram o primeiro experimento usando H11 e H-gal-Gp como imunógenos. São glicoproteínas integrais presentes na membrana intestinal de *H. contortus* adultos. Um grupo de ovelhas foi vacinado com este composto. Adjuvante e solução salina foram administrados em um segundo e terceiro grupo, respectivamente. Os grupos foram monitorados quanto à contagem de OPG, volumes celulares compactados (PCV) e níveis de anticorpos. Todos os índices expressaram diferenças significativas no grupo dos animais vacinados. Smith e Zarlenga (2006) e LeJambre *et al.* (2008) estimaram a eficácia destes antígenos frente às infecções naturais e obtiveram resultados semelhantes. No Brasil, Basseto (2011) avaliou a eficácia da vacina constituída de glicoproteínas obtidas da membrana do intestino de *Haemonchus contortus*, inoculando-a em dois grupos de bezerros, após desafio com 8000 larvas infectantes de *H. contortus*, e outro grupo com a mesma quantidade de larvas infectantes de *H. placei*. Nos dois grupos foi observada diminuição significativa nas contagens de OPG, redução na carga parasitária e aumento na titulação de anticorpos no soro. E aqueles desafiados com *H. contortus* não eliminaram ovos nas fezes. Em outubro de 2014 foi lançada comercialmente a primeira vacina do mundo para o controle de *H. contortus*, a Barbervax®, sendo comercializada na África do Sul com o nome de Wirevax® e na Austrália como Wormvax®. Essa vacina também foi testada em alpacas (BASSETTO *et al.*, 2018; VANHOY *et al.*, 2018; LONG *et al.*, 2020). A partir de então, muitos experimentos foram conduzidos com a Barbervax® na Austrália, Nova Zelândia, Escócia e Argentina (BESIER *et al.*, 2015; BESIER *et al.*, 2017; STEAR *et al.*, 2018; COBB *et al.*, 2020; FIEL *et al.*, 2021). Um estudo controlado na Escócia avaliou a eficácia da vacina Barbervax® em uma propriedade com histórico de infecção por *H. contortus*. Ocorreu uma redução significativa na carga de vermes adultos no abomaso dos ovinos vacinados, em comparação com os ovinos não vacinados. Além disso, a vacinação com Barbervax® foi associada a um aumento significativo na produção de lã, devido à melhora na condição corporal dos ovinos (FORBES, 2019).

Outro relato de sucesso de uma vacina em bovinos naturalmente expostos à infecção por qualquer parasito nematoda foi consagrado por Basseto *et al.* (2014), que testou em bezerros uma formulação composta por glicoproteínas de membrana integral do intestino de *H. contortus*. Estes animais estavam naturalmente infectados por *H. placei*, *H. similis* e outros nematodas gastrointestinais. Ao fim do protocolo de vacinação atestaram a diminuição na produção de ovos de *Haemonchus* spp. e diminuição na quantidade *H. placei* e *H. similis*, concluindo que esta vacina poderia reduzir consideravelmente a transmissão de *H. placei* e *H. similis*, bem como conferir benefícios de proteção.

É importante citar que existe a vacina para prevenção de equinococose, denominada Providean Hidatil EG95. O estudo fundamental que levou à descoberta da proteína EG95 e seu potencial como alvo vacinal demonstrou sua eficácia na proteção de ovinos contra a infecção por *Echinococcus granulosus* (Lightowlers *et al.*, 2003). Desde então, estudos com esta molécula continuaram para avaliar sua eficácia em diferentes populações e em combinação com outras terapias, sendo experimentada em ovinos, cães e em humanos (Heath *et al.*, 2017; Gavidia *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2019)

Ainda há uma vacina baseada em antígenos expressos no intestino de *Ancylostoma* spp. que está em testes clínicos de Fase I, denominada Na-APR-1 (ou Necator americanus-Aspartic Protease-1) (DIEMERT *et al.*, 2018).

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Na Suécia dos anos 30, um cientista chamado Tiselius (1930) dedicou-se à construção de um aparato - um tubo em forma de U - que promovia a migração de proteínas de uma extremidade à outra em solução tamponada. Doravante, desenvolveu o método de limite móvel, capaz de fracionar globulinas obtidas a partir do soro humano, introduzindo e aperfeiçoando a eletroforese como diagnóstico clínico (TISELIUS, 1937, 1938). Nas décadas seguintes, outros métodos eletroforéticos foram desenvolvidos, aprimorando também, os meios de suporte. O papel filtro, grãos de amido de batata e gel de amido eram os meios de suporte mais utilizados, porém, apresentavam limitações, como dificuldades de padronização da técnica e a não-absorção de algumas proteínas pelo papel filtro (KUNKEL & TISELIUS, 1951; KUNKEL & SLATER, 1952; TISELIUS, 1953; SMITHIES, 1955).

Raymond e Weintraub (1959) descreveram pela primeira vez a utilização da poliacrilamida como matriz de suporte para eletroforese. A poliacrilamida é um composto originado da polimerização de ligação cruzada entre os monômeros orgânicos acrilamida e N, N¹-metilenobisacrilamida. O produto da reação é um gel estável, translúcido e resistente, porém flexível e elástico, sendo insolúvel em água após completa constituição. A eletroforese em gel de poliacrilamida tem como premissa o fracionamento de proteínas e enzimas por meio da carga elétrica e do peso molecular. Esta condição permite a versatilidade do seu uso quando se procedem os ajustes necessários nas concentrações do gel, originando exemplares com diferentes tamanhos de poros. Sendo assim, é possível confeccionar géis personalizados para substâncias com distintas faixas de pesos moleculares. Dentre outras vantagens para a utilização do gel de poliacrilamida, Raymond e Weintraub (1959) citam a redução da largura e da formação de cauda das bandas quando comparadas às outras técnicas de visualização existentes naquele tempo.

Em medicina veterinária, a eletroforese em gel de poliacrilamida é usada amplamente para diversas finalidades de estudos genéticos, fisiológicos e bioquímicos, sendo ainda considerada uma das principais ferramentas existentes para fracionar proteínas (ALVES *et al.*, 2010; PATITUCCI *et al.*, 2020). Alguns parasitologistas têm lançado mão do seu uso, contribuindo com o registro dos pesos moleculares de grupos polipeptídicos provenientes de extratos totais e produtos de excreção e secreção de helmintos (EAST & BERRIE, 1986; SCHALLIG *et al.*, 1996; PAIVA, 2002).

3.6 Western Blot

Western Blot é o nome dado ao método concebido por Towbin *et al.*, (1979) e é reconhecido por transpor proteínas de géis de poliacrilamida para membranas úmidas adsorventes, como as de nitrocelulose ou de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Além de detectar diversas proteínas, também permite caracterizá-las e quantificá-las, até mesmo aquelas que estão em menores frações (KURIEN & SCOFIELD, 2003, 2006). É muito sensível e específico para reconhecimento de proteínas de microrganismos infecciosos e detecção de anticorpos animais, sendo empregado atualmente no imunodiagnóstico de doenças e descoberta de proteínas para produção de vacinas (COOLEY *et al.*, 2001; TALMI-FRANK *et al.*, 2006; MARIPANDI & Al-SALAMAH, 2010).

Escrevendo sobre fasciolose, Echevarria (2004) observou alguns testes de *Western Blot* sugerindo que algumas bandas de antígeno – 12, 17, 63 e 105 KDa - são precursoras de infecção, com a expectativa de o antígeno Fh 17 ser um indicador de sucesso para o tratamento da fasciolose.

Em outro trabalho, Freschi *et al.*, (2005) caracterizaram antígenos de *Toxoplasma gondii* extraídos do soro de cães e também compararam o resultado do diagnóstico com as técnicas RIFI e ELISA-teste. Visualizaram 16 bandas com pesos variando entre 220 KDa e 30 KDa. Respectivamente, 25 % e 10,71 % dos animais que manifestaram resultados negativos para RIFI e ELISA apresentaram-se reagentes quando submetidos ao *Western Blot*.

Para verificar o compartilhamento de antígenos entre *Angiostrongylus* spp. e outros helmintos, Cognato (2013) obteve um macerado de exemplares adultos selecionados, submetendo tais antígenos às técnicas de eletroforese uni e bidimensional e *Western Blot*. Todos os antígenos foram reconhecidos pelo soro de pacientes infectados com *Angiostrongylus* spp. e 14 bandas se apresentaram.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Com o propósito de contextualizar a origem dos soros empregados na eletroforese e no *Western Blot*, após revisão e reanálises das etapas executadas no estudo de Martins (2018), foram descritas algumas etapas executadas em seu trabalho, bem como os resultados alcançados nas análises de contagem de OPG e nas reações sorológicas (ELISA).

4.1. Área de estudos, delineamento e coleta de dados

As amostras foram coletadas em duas propriedades comerciais localizadas nos municípios de Miranda e Corumbá, Mato Grosso do Sul. A região possui um clima tropical de savana (cerrado) de acordo com a classificação de Koppen (OMETTO, 1981), com temperaturas médias acima de 17°C nos meses mais frios e em torno de 25°C nos meses mais quentes.

As propriedades seguem um sistema completo de produção com predominância da raça Nelore e cruzamentos industriais (Brangus x Nelore), em manejo extensivo com suplementação mineral e identificação individual através do sistema SISBOV. Foram selecionados aleatoriamente de 200-300 animais por categoria (pré-desmama, desmamados, sobreanos e adultos) durante os meses de abril e maio de 2016 e 2017, épocas correspondentes ao manejo geral dos animais nas propriedades. As idades dos animais nas diferentes categorias eram: pré-desmame (cinco a 10 meses), desmamados (11 a 17 meses), sobreanos (18 a 24 meses) e adultos (mais de 30 meses).

Os exames de fezes pela técnica Mc Master modificada (Gordon & Whitlock, 1939), coproculturas (Roberts & O'sullivan, 1950) e as reações pelo ELISA foram realizados por Martins, 2018, cujos resultados foram reanalisados para o presente estudo.

4.2. Produção de antígenos totais

Para a produção de antígenos totais das espécies *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum* utilizou-se dois bezerros, previamente preparados e mantidos na área da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ/UFMS). Os espécimes coletados, identificados e separados pelas respectivas espécies, foram transferidos para placas de Petri com solução de NaCl 0,8% para limpeza, em seguida lavados em solução de PBS estéril por duas vezes. Cada espécie de parasito foi processada individualmente em tubo homogeneizador tipo Plotter, com embolo de nylon,

previamente resfriados, adicionado com solução de PBS, e submetidos à desintegração por aproximadamente 5 minutos com o embolo acoplado em um motor de velocidade ajustável, sendo centrifugada após homogeneização. O sobrenadante foi liofilizado, reconstituído e suspenso em solução de Tris-EDTA a 1mM, como inibidor de proteases. As proteínas totais foram quantificadas por espectrofotometria em sistema Nanodrop 2000/Spectrophotometer (Thermo Scientific), usando absorvância A280 no modo Abs1.

4.3. Processamento das amostras em SDS

4.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas totais (AT) das espécies alvo

Para caracterização inicial das proteínas AT foram realizados processos em gel de poliacrilamida em diferentes concentrações e gradientes, na presença de duodecil sulfato sódio (SDS), de forma a evidenciar o perfil proteico presente nas preparações. Para tal foi empregado o sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Mini Trans-Blot® Module (Bio-Rad Laboratories, Inc).

Géis com diferentes concentrações de acrilamida (entre 5 % a 13 %) foram preparados com a seguinte composição: solução estoque com 29 % de acrilamida (p/v), 30 % de glicerol (v/v) e 1 % de bis acrilamida (N,N'-metileno-bis-acrilamida, p/v) em tampão Tris HCl (pH 8,8 para gel de corrida e pH 6,8 para o gel de empilhamento), acrescido de 0,1 % de SDS (p/v). As soluções de persulfato de amônio a 0,1 % e TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) a 0,04 % foram adicionados ao preparo para desencadear a cascata de polimerização.

As amostras foram aplicadas em três diferentes concentrações: para AT de *H. placei* 57,2; 41,6 e 31,2 µg; e em relação à *O. radiatum* 46,3; 33,6 e 25,2 µg. Estas concentrações foram as que manifestaram visualmente melhor expressividade observadas nos ensaios realizados no decorrer do experimento, sendo portanto, escolhidas para aplicação experimental. Todas as amostras de AT foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 5 mM pH 6,8, SDS 0,25 %, glicerol 10 %, EDTA 0,5 mM, azul de bromofenol 0,05 % e β-mercaptoetanol 2,5 %) e incubadas em termobloco a 95 °C por 5 minutos. Após a incubação, adicionou-se as respectivas concentrações nas canaletas do mini-gel, este procedimento foi para avaliar a melhor concentração para a visualização das frações em cada AT considerado. O Gel foi preparado em 1 mm de espessura.

Os padrões de pesos moleculares utilizados (Low Molecular Weight SDS Calibration Kit, GE Healthcare) foram: fosforilase b (PM = 97 kDa), albumina (PM = 66 kDa), ovoalbumina (PM = 45 kDa), anidrase carbônica (PM = 30 kDa), inibidor de tripsina (PM = 20,1 kDa) e α -lactalbumina (PM = 14,4 kDa).

As corridas eletroforéticas foram efetuadas em tampão Tris(hidroximetil)aminometano, glicina e SDS 0,1 %, tendo o pH ajustado para 8,8, e voltagem estabelecida em 90 V. Após completa saída do corante azul de bromofenol do *running* gel cronometrou-se 30 minutos e desligou-se a corrente. Findada esta etapa, os géis foram impregnados por prata, exceto aqueles destinados à transferência para membrana de nitrocelulose e posterior imunoblotes, que foram processados em concentrações diferentes e com o pente contínuo, sem canaletas individuais.

4.3.2 Coloração dos géis com nitrato de prata

Ao término da corrida eletroforética os géis foram colocados em placas de petri sobre placa agitadora e imersos durante 30 minutos em uma solução de fixação composta por 50 % de metanol, 12 % de ácido acético, 0,5 % formaldeído e água qsp. Na sequência, permaneceram 20 minutos em solução a 50 % de etanol absoluto e água qsp. Em seguida, imersos em solução com 0,02 g de tiosulfato de sódio e 100 mL de água. Logo após, foram impregnados por 0,2 g de nitrato de prata combinados com 70 μ L de formaldeído e 100 mL de água (qsp). Para proceder a revelação utilizou-se 6 g de carbonato de sódio, 50 μ L de formaldeído e 0,4 mg de tiosulfato de sódio diluídos em água (qsp 100 mL). Os géis ficaram imersos na solução até que as respectivas bandas pudessem ser visualizadas de forma evidente. Para interromper a revelação, fez-se lavagem com solução preparada com 50 mL metanol, 30 mL ácido acético e água (qsp 100 mL), por aproximadamente 10 segundos. A lavagem final foi realizada em solução de metanol a 50 % em água. Entre cada troca de solução os géis eram lavados com água ultrapura Milli-Q®. Ao concluir as etapas de coloração foram submetidos ao registro fotográfico em sistema GelDoc Go Gel Imaging System & Lab Touch Software (Bio-Rad Laboratories, Inc) e posterior análises pelo mesmo sistema.

4.3.3 Western Blot

Em continuidade ao processo de eletroforese, as frações proteicas presentes nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose de acordo com técnica descrita

por Towbin *et al.* (1979) a 15 V por 25 minutos em sistema semiúmido Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc). Antes de iniciar o processo, os limites dos géis foram demarcados com lápis. A confirmação da transferência foi feita através de coloração com Ponceau Red (Ponceau S a 0,2 % p/v em ácido tricloroacético a 1 %) por 3 minutos seguidos de lavagem com água fria. Para descolorir e proceder a continuação dos *immunoblots* foi feita lavagem em água a 45 °C. Após retirada do corante, as membranas foram bloqueadas em tampão composto por Quench Buffer pH 9,0 (Tris 20 mM + NaCl 0,9 % p/v) e leite desnatado 5 % p/v overnight a 4 °C. Terminado o período de bloqueio, as membranas foram lavadas 2 vezes com um preparo à base de PBS, Tween 20 e Triton X-100. Depois, 1 vez somente com PBS. Foram secas em temperatura ambiente e, posteriormente, processada a reação de *Western Blot* em Mini-PROTEAN II Multiscreen Apparatus System (Bio-Rad Laboratories, Inc) com capacidade para até 40 reações simultâneas. Em cada canaleta os soros eram aplicados diluídos 1:100 em solução de aplicação (PBS pH7,2 + 1,25 % gelatina p/v). Após três horas de incubação com os respectivos soros, foram lavadas com PBS 7,5 com Triton X 100 a 0,05% durante 15 minutos por duas vezes; e outras duas vezes apenas com PBS, para remover o detergente.

Como Anti-IgG's de bovinos foi empregado anticorpo de cabras conjugados a peroxidase (KPL®, Sinapse Biotecnologia) diluídos em PBS com 1,25% de gelatina, na concentração de 1:1000 e incubados por 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida lavados duas vezes em solução de PBS pH 7,5 com Triton X a 0,005%, por 15 minutos, e mais uma vez com PBS, apenas para remover o detergente.

A revelação foi realizada com 6 mg de 4 cloro naftol (4CN), diluído em 2mL Metanol acrescidos de 10 mL da solução de Tris 20mM , NaCl 500mM com pH7,5 e 6 µL de H₂O₂. Mantido ao abrigo da luz e examinado em intervalos com poucos minutos. Após o aparecimento de reação colorimétrica, a membrana foi lavada em água destilada para interromper o processo.

4.3.4 - Análises

Foram conduzidas análises estatísticas comparativas para avaliar as diferentes categorias animais e a distribuição das contagens de OPG. A amplitude de classes foi calculada usando a fórmula de Sturges (1926), e as análises comparativas das médias de OPG entre as categorias foram realizadas por Análise de Variância (one way ANOVA)

com pós-teste de Tukey, após a transformação logarítmica dos resultados para normalização. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

Para a análise das Densidades Ópticas, gráficos Box Plot foram empregados para representa-los sob a forma de estatísticas descritivas. A correlação de Pearson foi usada para avaliar relações entre variáveis. A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. A Análise de Variância (one way ANOVA) com pós-teste de Tukey foi aplicada após calcular o *cut off* e o Índice de Reatividade para cada amostra. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. As análises foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.3 (<https://www.mamiraua.org.br/downloads/programas/>).

4.3.5 - Aspectos Éticos

O experimento atendeu aos princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, protocolo 786/2016.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil da contagem de ovos nas fezes nas diferentes categorias animais

No estudo conduzido por Martins (2018), foram comparados os resultados das contagens de ovos em amostras de fezes coletadas de um total de 1147 bovinos. Esses animais estavam divididos em quatro categorias distintas, com base em suas faixas etárias: pré-desmame, desmamados, sobreanos e adultos. Os resultados revelaram variações significativas na contagem de OPG entre as diferentes categorias (Tab. 1, Fig. 3). Notavelmente, as amostras provenientes dos indivíduos pertencentes à categoria pré-desmame exibiram valores mais elevados de OPG em comparação com os outros grupos. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Além disso, as amostras dos bovinos desmamados também apresentaram contagens superiores ($p < 0,05$) quando comparadas aos grupos de sobreanos e adultos. Essas observações destacam a influência da faixa etária na contagem de ovos nas fezes dos bovinos. Esses resultados fornecem *insights* importantes sobre a dinâmica das infecções por parasitos gastrointestinais em diferentes estágios de vida dos bovinos, de forma inversa à idade.

Tabela 1. Média, desvio padrão, amplitude e mediana das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) em diferentes categorias de bovinos naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, em duas propriedades comerciais no Mato Grosso do Sul, no período entre 2016 e 2017 (MARTINS, 2018)

Categorias	Contagem de Ovos por Grama de Fezes (OPG)				
	N	Média Desvio Padrão ± (Amplitude)	Mediana	Média ajustada* Desvio Padrão ± (Amplitude)	Mediana*
Pré-desmame	288	372,91 ± 436,50 (0- 2950)	250	2,1027 ± 0,93 (0- 3,47) ^a	2,4
Desmamados	205	222,19 ± 323,13 (0- 1700)	100	1,5791 ± 1,11 (0- 3,23) ^b	1
Sobreanos	343	57,72 ± 115,49 (0- 850)	0	0,7469 ± 1,01 (0- 2,93) ^c	0
Adultos	311	39,54 ± 67,52 (0- 550)	0	0,7931 ± 0,9 (0- 2,74) ^c	0
Total	1147	161,33 ± 301,11 (0- 2950)	50	1,2486 ± 1,15 (0- 3,47)	1,71

* Média e Mediana dos valores ajustados por $\text{Log}_{10}(X+1)$. Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

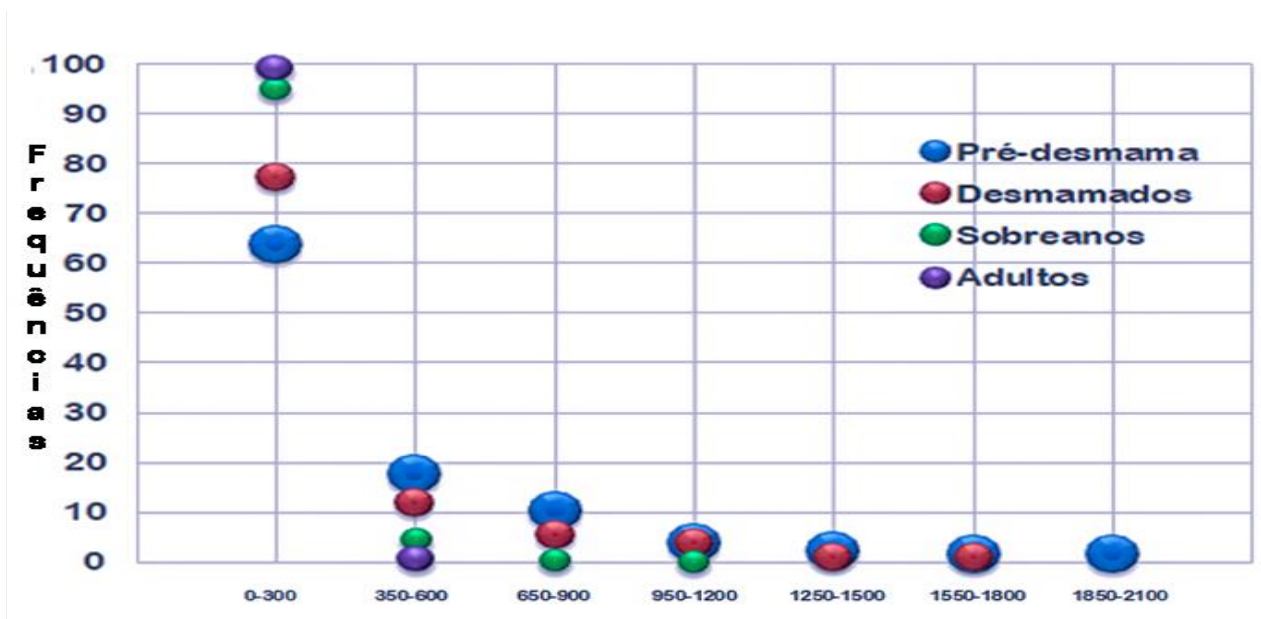


Figura 3. Representação gráfica da dispersão das frequências relativas nas contagens de ovos por grama de fezes (OPG) por categoria (pré-desmama, desmamados, sobreano e adulto), discriminando as classes calculadas pelo método de Sturges (1926) em bovinos de corte, naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, em duas propriedades comerciais no Mato Grosso do Sul, Brasil, no período entre 2016 e 2017 (adaptado de MARTINS, 2018)

Dos gêneros identificados nas coproculturas, os mais predominantes foram *Haemonchus* sp. e *Cooperia* sp, respectivamente em todas as categorias (fig. 4), sendo *Strongyloides* sp. observado apenas na categoria pré-desmama e *Oesophagostomum* sp. apenas em sobreanos. Tais perfis já foram reportados por Bianchin *et al.* (2007), exceto pelo não encontro do gênero *Trichostrongylus* sp.. Assim, como também, por Feliz (2011) e Heckler (2015), em relatos sobre resistência anti-helmínticas em bovinos na mesma região.

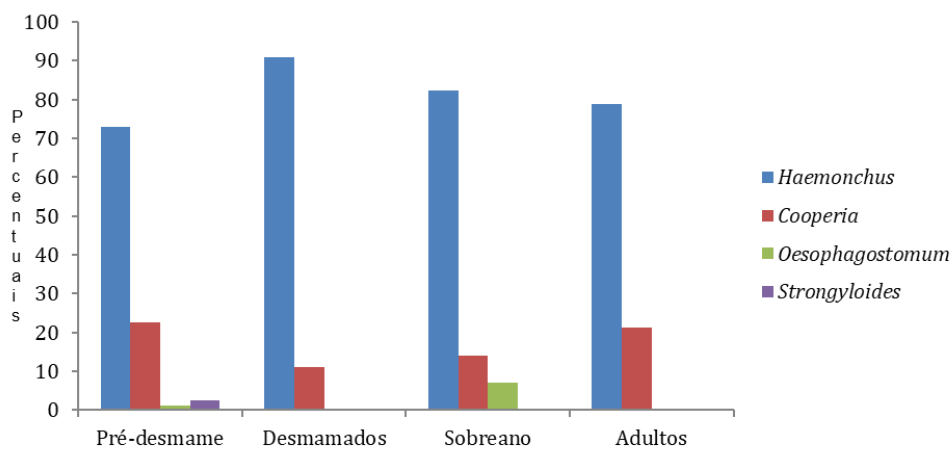


Figura 4. Distribuição dos gêneros das larvas infectantes recuperadas nas coproculturas, em cada categoria de bovinos naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, em propriedades comerciais de Mato Grosso do Sul, no período 2016-2017. (adaptado de Martins, 2018)

Quando os resultados das contagens dos OPGs, distribuídos pelas amplitudes de classes, calculadas usando a fórmula de Sturges (1926), é patente que os animais mais velhos, sobreanos e adultos, apresentam as contagens restritas às classes de menor quantidade, em especial aos animais adultos, nos quais 99,4% estão restritos à primeira classe (0-300); e os animais mais jovens (pré-desmama e desmamados) se distribuem de formas semelhantes e/ou aproximadas em todas as classes (fig. 3).

Essa mesma tendência para a diminuição do OPG, devido ao desenvolvimento de imunidade adquirida, pode ser inferida em estudos similares conduzidos na mesma localidade, conforme demonstrado por pesquisas anteriores (MELO & BIANCHIN, 1977; BIANCHIN *et al.*, 1990).

Esses resultados robustecem a estreita relação entre a intensidade da infestação parasitária e a faixa etária dos hospedeiros. Evidencia-se uma maior prevalência e incidência de infecções helmínticas em bovinos com até 2 anos de vida (ROBERTS *et al.*, 1952; TONGSON E BALEDIATA, 1972; COSTA *et al.*, 1979; JASMER e MCGUIRE, 1996; WYMANN *et al.*, 2007; JIMÉNEZ *et al.*, 2010). Das décadas que se passaram desde as primeiras investigações sobre a prevalência de helmintos gastrointestinais em bovinos até as recentes de Gunathilaka *et al.* (2018) e Martins (2018) corroboraram que os padrões das infecções parasitárias em relação à idade mantêm semelhança com os delineamentos prévios, destacando o processo de resistência dos animais às infecções subsequentes, permitindo vislumbrar a implantação de processos para antecipar o *status* imunológicos dos animais.

O uso da técnica McMaster modificada de Gordon e Whitlock (1939), apesar de sua concepção antiga, ainda se mantém eficaz para a avaliação da intensidade da infestação parasitária em bovinos de diferentes idades e pode ser confiavelmente realizada de forma econômica.

5.2 Reações sorológicas

Todos os soros bovinos amostrados por ELISA apresentaram reatividade para anticorpos séricos da classe IgG total quando expostos aos AT de *H. placei* e *O. radiatum*. Nos valores obtidos pelas densidades ópticas (DO) referentes aos AT de *H. placei* tendem a apresentar padrões semelhantes entre as duas classes de OPG (alto e baixo), bem como entre todas as categorias etárias. As maiores e menores dispersões de dados são visualizadas na categoria dos adultos com alto OPG e nos animais de sobreanos com baixo OPG, respectivamente (fig. 5); assim como é possível notar as diferenças nas medidas centrais entre todas as categorias.

Legenda:

1 – Pré-desmame baixo OPG 3 – Desmamados baixo OPG 5 – Sobreanos baixo OPG 7 – Adultos baixo OPG
2 – Pré-desmame alto OPG 4 – Desmamados alto OPG 6 – Sobreanos alto OPG 8 – Adultos alto OPG

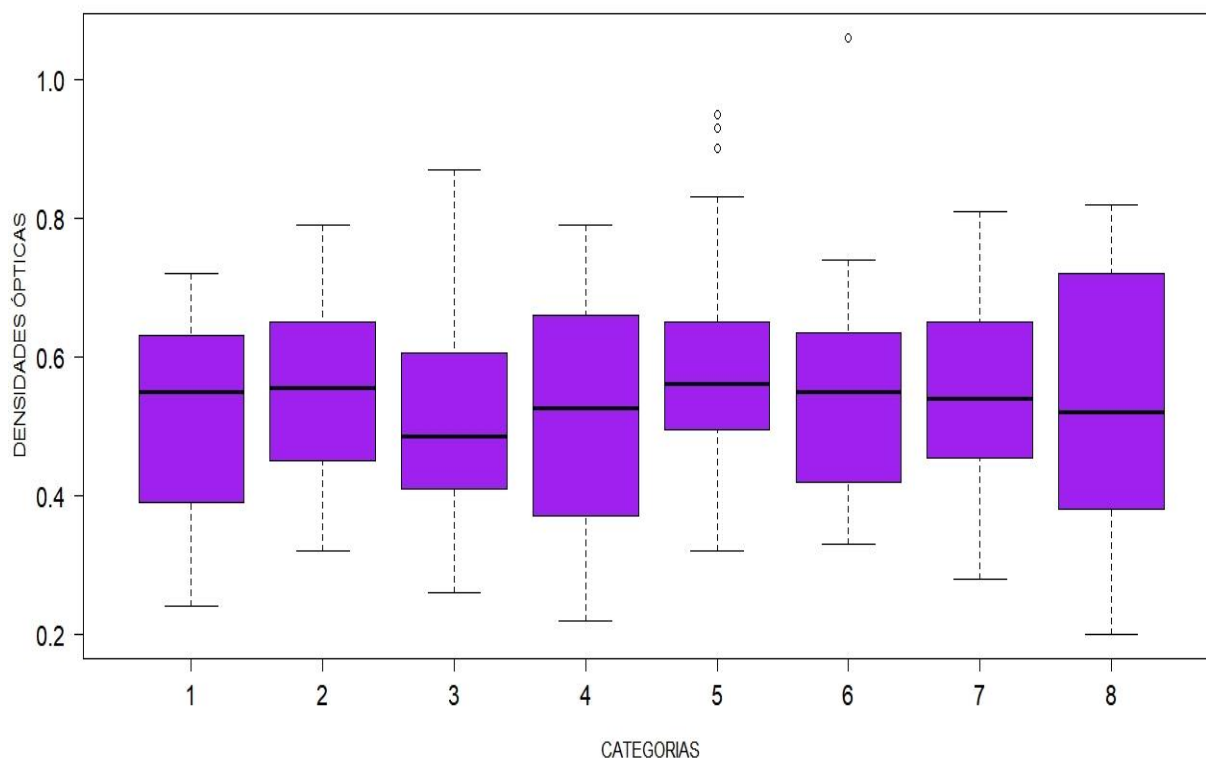


Figura 5. Distribuição das densidades ópticas (DO) para antígenos totais de *Haemonchus placei* em soros de bovinos de corte pertencentes à diferentes categorias etárias (pré-desmame, desmamados, sobreanos e adultos), naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, em duas propriedades comerciais em Mato Grosso do Sul, Brasil, entre os anos de 2016 e 2017 (Adaptado de Martins, 2018)

Em relação às densidades ópticas obtidas a partir do AT de *O. radiatum*, observam-se diferenças entre os valores em algumas categorias, destoando do padrão homogêneo observado pelo AT de *H. placei*. Nota-se uma similaridade de dados entre os animais das categorias pré-desmame com baixo OPG, pré-desmame com alto OPG, desmamados com baixo OPG e, nos desmamados com alto OPG (fig. 6). A maior dispersão de dados é percebida na categoria dos adultos com alto OPG.

Legenda:

1 – Pré-desmame baixo OPG 3 – Desmamados baixo OPG 5 – Sobreanos baixo OPG 7 – Adultos baixo OPG
2 – Pré-desmame alto OPG 4 – Desmamados alto OPG 6 – Sobreanos alto OPG 8 – Adultos alto OPG

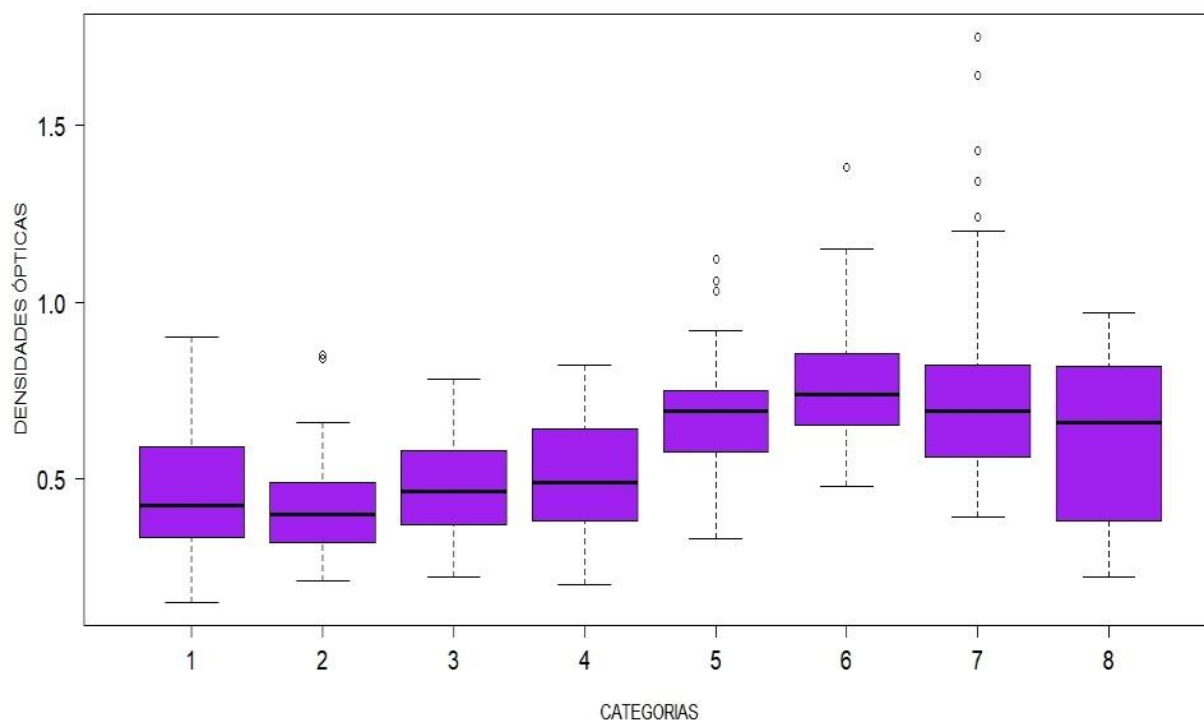


Figura 6. Distribuição das densidades ópticas (DO) para antígenos totais de *Oesophagostomum radiatum* em soros de bovinos de corte pertencentes à diferentes categorias etárias (pré-desmame, desmamados, sobreanos e adultos), naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, em duas propriedades comerciais em Mato Grosso do Sul, Brasil, entre os anos de 2016 e 2017 (Adaptado de Martins, 2018)

Quando são comparados os valores das densidades ópticas entre as categorias e classes dos soros bovinos que foram submetidos à avaliação por AT de *O. radiatum*; é possível que as médias se apresentaram da seguinte forma: nas categorias pré-desmame e desmamados são próximas ($p > 0,05$), porém, diferem-se das médias das outras duas categorias. Por sua vez, os valores médios nas categorias sobreanos e adultos. Também são aproximados, e com diferença estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação as duas categorias mais jovens, pré-desmame e sobreanos. Dessa forma, é possível observar a formação de dois padrões mediais distintos, no qual, os grupos representados pelos boxes de 1 à 4 se mostram com os menores índices e os dos boxes de 5 à 8, os maiores (Figura 6).

A partir dos resultados extraídos das densidades ópticas e índices de reatividade observa-se que, quanto mais jovens são os animais, pré-desmame por exemplo, maiores são as contagens de OPG e menor é o IR. O inverso é observado na categoria dos adultos: animais mais velhos apresentam menor contagem de OPG e maior IR, quando a exposição foi para AT de *Oesophagostomum radiatum* (Fig. 7). Porém, os perfis do índice de reatividade à *H. placei* não seguiram esta tendência (Fig. 8).

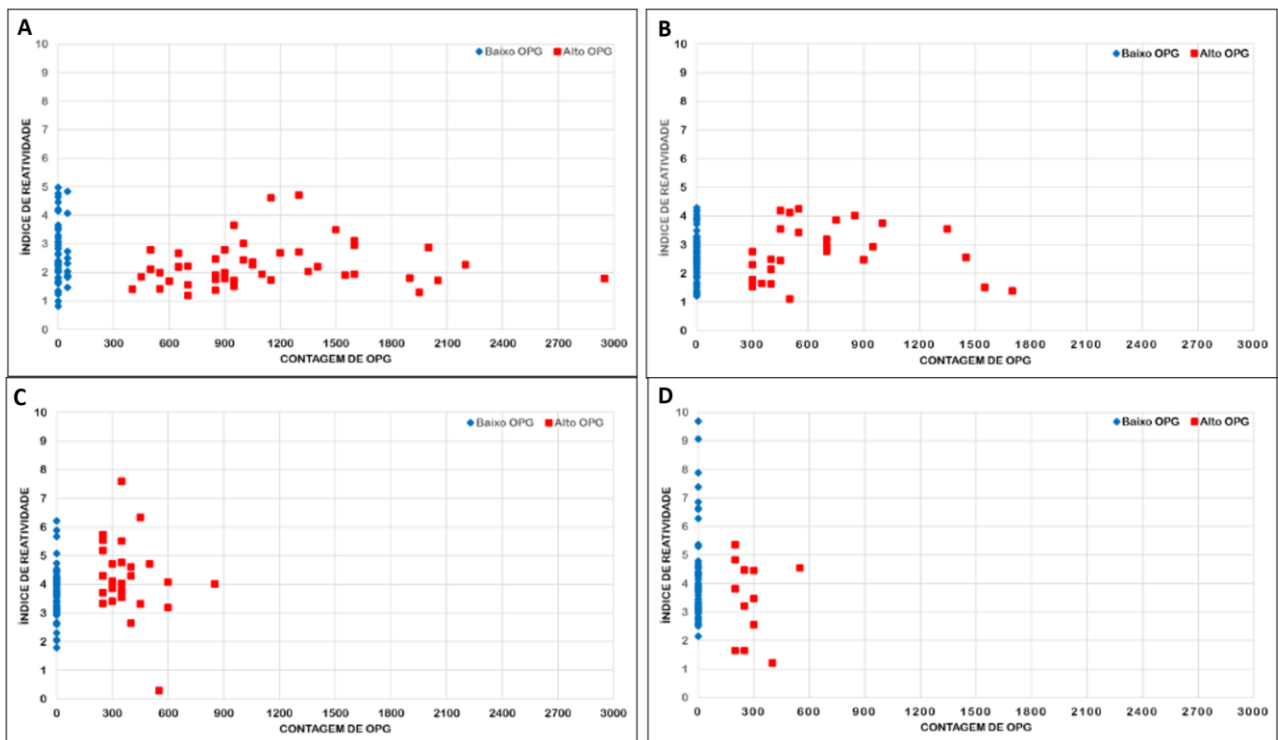


Figura 7. Índice de Reatividade (IR) aos antígenos totais (AT) de *Oesophagostomum radiatum* de soro de bovinos de corte pertencentes à diferentes categorias etárias (A: pré-desmame, B: desmamados, C: sobreanos e D: adultos) e distribuído segundo as respectivas classes das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), calculadas segundo Sturges (1926); representados segundo os dados de Martins, (2018)

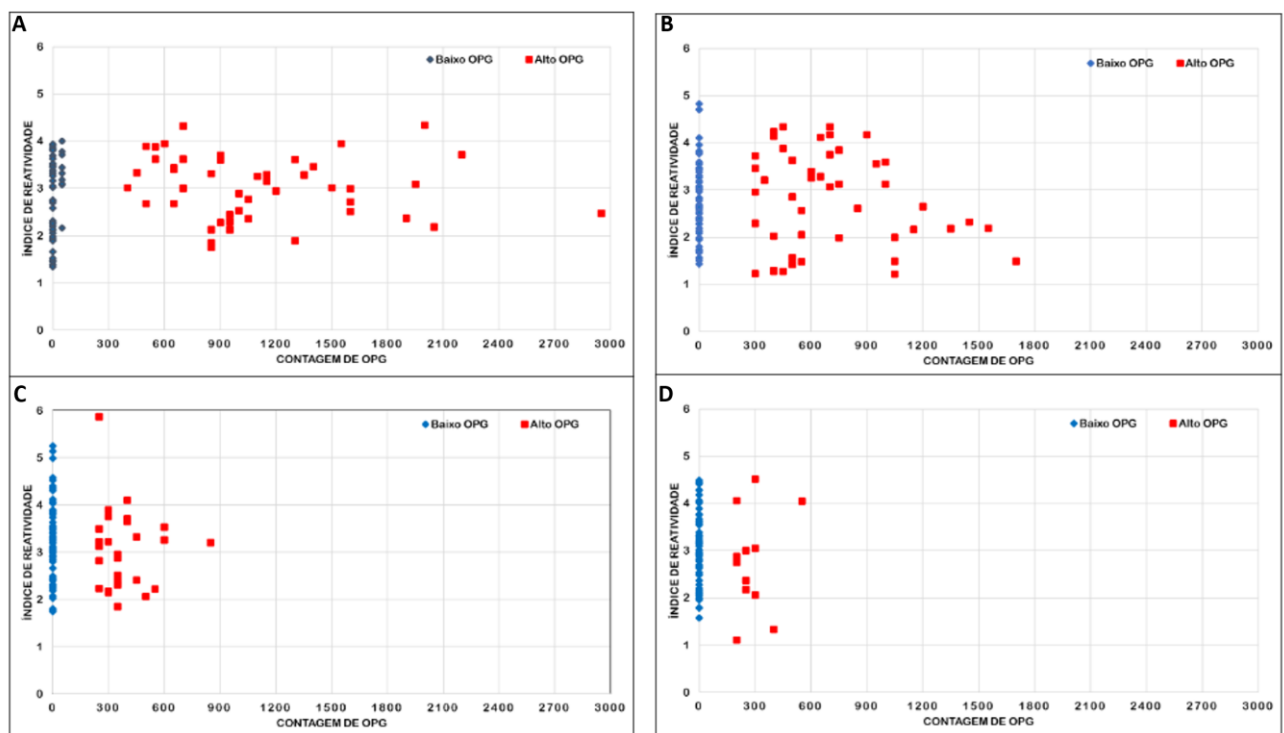


Figura 8. Índice de Reatividade (IR) aos antígenos totais (AT) de *Haemonchus placei* de soro de bovinos de corte pertencentes à diferentes categorias etárias (A: pré-desmame, B: desmamados, C: sobreanos e D: adultos) e distribuído segundo as respectivas classes das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), calculadas segundo Sturges (1926); representados segundo os dados de Martins (2018)

Para as densidades ópticas obtidas, empregando o AT de *H. placei*, a maior média é observada na categoria sobreanos (0,57), sendo a única a apresentar diferença estatística em relação às médias das demais categorias ($p < 0,05$); e em relação aos AT de *O. radiatum* observa-se diferenças significativas nas categorias sobreanos e adultos, com médias 0,71 e 0,74 respectivamente, em relação às demais categorias ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Média, desvio padrão e amplitude das densidades ópticas obtidas por ELISA, empregando IgG total sobre antígenos totais de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum*, em reações com amostras de soros de bovinos de corte naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, distribuídos em diferentes categorias etárias (pré-desmame, desmamados, sobreanos e adultos), em duas propriedades comerciais no Mato Grosso do Sul, Brasil, no período entre 2016 e 2017 (MARTINS, 2018)

Categorias	Densidades Ópticas (D.O)			
	<i>Haemonchus placei</i>		<i>Oesophagostomum radiatum</i>	
	N	Média ± Desvio Padrão (Mínimo-Máximo)	N	Média ± Desvio Padrão (Mínimo-Máximo)
Pré-desmame	97	0,53 ± 0,14 (0,24-0,79) ^a	97	0,45 ± 0,17 (0,15-0,90) ^a
Desmamados	106	0,51 ± 0,16 (0,22-0,87) ^a	106	0,49 ± 0,16 (0,20-0,82) ^a
Sobreanos	95	0,57 ± 0,15 (0,32-1,06) ^b	95	0,71 ± 0,17 (0,33-1,38) ^b
Adultos	71	0,54 ± 0,15 (0,20-0,82) ^a	71	0,74 ± 0,28 (0,22-1,75) ^b
Total	369	0,54 ± 0,15 (0,20-1,06)	369	0,58 ± 0,23 (0,15-1,75)

Teste de ANOVA seguido pelo teste *pos hoc* de Tukey. Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Não foram avaliadas as diferenças entre as Densidades Ópticas aos antígenos totais de *H. placei* e *O. radiatum*.

Ao se comparar apenas as classes com altos e baixos OPG's, sem considerar as categorias respectivas, para o AT de *H. placei* não apresenta diferenças significativas entre as duas, mas em relação ao AT de *Oesophagostomum radiatum* é expressiva e estatisticamente significativa a diferença ($p > 0,05$) (Tab. 3).

Diante desses resultados, no que diz respeito às respostas sorológicas, a variabilidade abrangente dos valores sugere a presença de uma diversidade considerável de antígenos protetores envolvidos na determinação do estado imunológico dos bovinos, não só do IgG total, como aqui testado. Esses antígenos podem estar relacionados com as diferentes fases parasitárias dos helmintos, conforme observado por HERLICH & DOUVRES (1977).

Tabela 3. Média, desvio padrão e amplitude das densidades ópticas obtidas por ELISA, empregando IgG total sobre antígenos totais de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum*, em reações com amostras de soro de bovinos de corte naturalmente infectados por nematodas gastrointestinais, classificados em função da contagem do OPG (alto x baixo), em duas propriedades comerciais no Mato Grosso do Sul, Brasil, no período entre 2016 e 2017 (MARTINS, 2018)

OPG	Densidades Ópticas (D.O)			
	<i>Haemonchus placei</i>		<i>Oesophagostomum radiatum</i>	
	N	Média ± Desvio Padrão (Mínimo-Máximo)	N	Média ± Desvio Padrão (Mínimo-Máximo)
OPG BAIXO	237	0,54 ±0,14 (0,24-0,95) ^a	237	0,60 ±0,23 (0,15-1,75) ^a
OPG ALTO	132	0,53 ±0,16 (0,20-1,06) ^a	132	0,55 ±0,22 (0,20-1,38) ^b
Total	369	0,54 ±0,16 (0,20-1,06)	369	0,58 ±0,23 (0,15-1,75)

Teste de ANOVA *pos hoc* Tukey. Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Não foram consideradas as diferenças entre as Densidades Ópticas aos antígenos totais de *H. placei* e *O. radiatum*.

Bricarello *et al.* (2008) conduziram uma pesquisa com bovinos da raça Nelore, dividindo-os em dois grupos: resistentes (baixos valores de OPG) e suscetíveis (altos valores de OPG). E nela, relataram que os animais considerados os mais resistentes apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG contra antígenos de *C. punctata*. Em um estudo similar, Zaros *et al.* (2010) avaliaram os níveis de anticorpos IgG em relação aos antígenos de *H. placei*; e os resultados indicaram que os valores mais elevados de densidade óptica estavam associados ao grupo de animais considerados resistentes. Esses relatos reforçam a relação antagônica entre os níveis de OPG e a concentração de IgG, corroborando os resultados aqui analisados e aqueles de Martins (2018), que identificou uma correlação negativa entre essas variáveis em relação aos antígenos de *O. radiatum*.

Ao examinar os mecanismos de proteção contra infecções por *O. radiatum* em bezerras, Gasbarre e Canals (1989) confirmaram que tal proteção estava associada aos anticorpos da classe IgG₂. Além disso, observou-se que animais com contagens mais elevadas de OPG apresentam níveis mais baixos de IgG contra os antígenos de *H. placei* (SEÓ *et al.*, 2015), como observado no trabalho de Martins (2018), no qual os indivíduos jovens apresentam as contagens mais elevadas de OPG. Tais inferências sustentam os resultados obtidos por Martins (2018) ao avaliar as densidades ópticas (Tabs. 2 e 3) e os índices de reatividade aos antígenos de *O. radiatum* em soros de bovinos. É plausível também sugerir que bovinos mais velhos apresentem índices mais elevados de IgG em relação a antígenos de alguns gêneros de helmintos gastrointestinais, o que possivelmente reflete uma maior proteção contra as infecções parasitárias.

5.3 Perfil eletroforético dos Extratos Totais de *H. placei* e *O. radiatum*

No fracionamento dos antígenos totais (AT) de *Haemonchus placei*, as colunas apresentaram similaridades entre as diferentes quantidades aplicadas, exceto uma fração identificada como 74,7 kDa, que foi visível apenas na canaleta que recebeu maior quantidade de AT (57,2 µg). Foram discriminadas um total de 14 frações, considerando o gel na concentração de 12%, a qual foi apontada como a que melhor discriminava as frações detectadas (Fig. 9). Quando da análise constatou-se que há quatro grupos distintos entre as frações: um isolado (97 kDa), outros dois compreendendo as frações destacadas nas regiões de 74 a 37,9, e 29 a 25 kDa, o quarto com as frações menores nas regiões 19 a 14 kDa. As regiões com as bandas mais expressivas foram as de 97, 55,1 e 20 kDa.

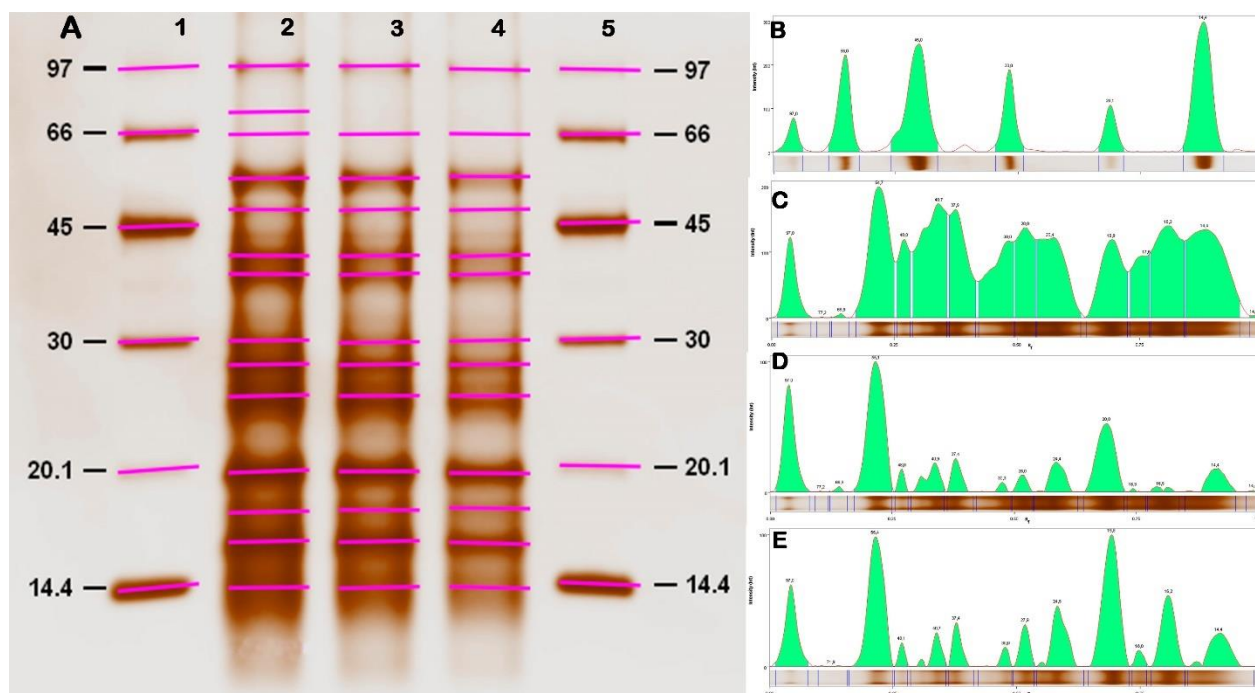


Figura 9. Perfil eletroforético de Proteínas Totais (AT) de *Haemonchus placei*, em A: as colunas 1 e 5, são os perfis do padrão de referência de peso molecular (kDa). Nas colunas 2, 3 e 4 são amostras de AT nas concentrações de 57,2, 41,6 e 31,2 µg, respectivamente. Em B, perfil do padrão de referência para as comparações das amostras; em C, perfil da amostra da coluna 2, destacando os 4 conjuntos de frações principais; em D, perfil da coluna 3 destacando as frações isoladas, e em E, o perfil da coluna 4 na qual foi aplicada a menor quantidade de AT.

As preparações com AT de *Oesophagostomum radiatum*, nas mesmas condições daquelas utilizadas para *H. placei* resultaram em um conjunto maior de bandas; mesmo assim também destacam-se quatro conjuntos: o primeiro compreendido entre 109 e 97

kDa; o segundo, de 80 a 36; o terceiro, de 30 a 20 e o último, 16 a 15 kDa. Apenas duas bandas não foram visualizadas na menor concentração (103 e 97 kDa). Na concentração intermediária (33,6 µg), a de peso 103 kDa também não foi vista.

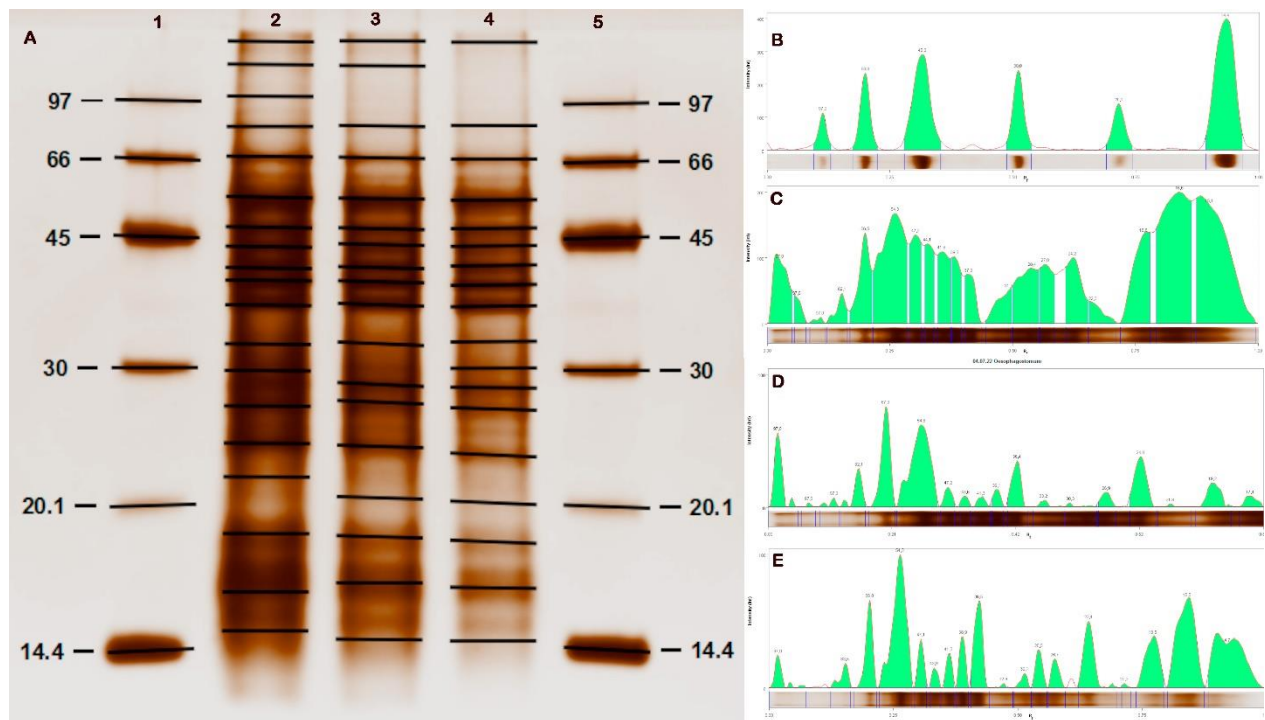


Figura 10. Perfil eletroforético de Proteínas Torais (AT) de *Oesophagostomum radiatum*, em A: as colunas 1 e 5, são os perfis do padrão de referência de peso molecular (kDa). Nas colunas 2, 3 e 4 são amostras de AT nas concentrações de 46,3; 33,6 e 25,2 µg, respectivamente. Em B, perfil do padrão de referência para as comparações das amostras; em C, perfil da amostra da coluna 2, destacando os 4 conjuntos de frações principais; em D, perfil da coluna 2 destacando as frações isoladas, e em E, o perfil da coluna 4 na qual foi aplicada a menor quantidade de AT.

Comparando-se os resultados dos perfis em SDS-PAGE dos dois AT's utilizados, verifica-se que apenas três (97; 40 e 27 kDa) apresentam alguma similaridade em tamanho, os quais podem ter alguma homologia. Enquanto *H. placei* apresentou 14 frações visíveis, naquelas de *O. radiatum* destacaram 20 bem individualizadas e separadas (Tab. 54). É digno de nota que durante os processamentos, várias concentrações de géis foram testadas e adoptou-se aquelas que promoveram uma melhor separação das frações proteicas e com visualização mais nítida das bandas. As amostras proteicas também foram testadas em várias concentrações e foram selecionadas aquelas que manifestaram melhor expressividade visual.

Schallig *et al.* (1996) relataram a identificação de grupos distintos de polipeptídeos com pesos aproximados de 10 a 16, 24 a 40 e um com peso de 45 a 60 kDa nas frações de excreção/secreção das formas adultas de *Haemonchus placei*; no entanto não foi

possível observar todas elas, visto que a menor observada foi de 14Kda. Os mesmos autores afirmam que essas proteínas possivelmente apresentam similaridade ou até mesmo homologia com as proteínas observadas em *O. radiatum*, fato este não totalmente similar ao presente ensaio. Paiva (2002) destacou que na faixa 14 e 20 kDa há um conjunto de bandas, seguido por um segundo grupo de três bandas na faixa de 23 a 26 kDa. Um terceiro grupo, menos pronunciado, apresenta-se na região de 33 a 41 kDa, e ainda três bandas em torno de 49, 55 e 84 kDa, respectivamente. No entanto, nas preparações deste estudo, não foram exatamente iguais; nas preparações examinadas houve uma distribuição das bandas de forma mais ampla.

Diante das resoluções obtidas, podemos inferir que os procedimentos adotados, em relação a produção, conservação e processamento das eletroforeses podem assegurar bons modelos de estudo e que devem ser seguidos.

Tabela 4. Comparação entre os perfis de antígenos totais (AT) de *Haemonchus placei*, nas concentrações de 57,2; 41,6 e 31,2 µg, e de *Oesophagostomum radiatum*, nas concentrações de 46,3; 33,6 e 25,2 µg; respectivamente nas colunas 2 a 4 relativas a cada espécie; submetidos à eletroforese em SDS-PAGE a 12%. As colunas 1 são os perfis do padrão de referência de peso molecular (kDa). As frações destacadas em amarelo são aquelas cujas estimativas de peso molecular são próximas ou iguais.

<i>Haemonchus placei</i>					<i>Oesophagostomum radiatum</i>				
Band no.	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4	Band No.	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4
1	97	97	97	96,73	1	97	109	109	109
2	66	74,7	-	-	2	66	103	103	-
3	45	65,62	65,75	65,87	3	45	97	-	-
4	30	54,65	54,6	54,98	4	30	82,1	81,82	82,51
5	20,1	48,01	47,87	47,73	5	20,1	66,54	67,08	66,85
6	14,4	40,41	40,3	40,19	6	14,4	53,34	53,6	53,86
7		37,87	37,77	37,67	7		46,78	46,96	46,73
8		29,96	29,74	29,87	8		43,65	43,75	43,86
9		27,8	27,75	27,71	9		40,88	40,98	41,09
10		25,22	25,16	25,11	10		39,34	39,23	39,12
11		19,94	19,89	19,74	11		36,85	36,95	36,85
12		17,78	17,83	17,88	12		31,28	32,24	32,35
13		16,36	16,32	16,19	13		-	-	29,82
14		14,4	14,4	14,4	14		28,58	28,67	28,46
					15		27,15	27,22	27,02
					16		24,24	24,17	23,48
					17		22,32	22,14	20,41
					18		18,62	18,49	18,36
					19		16,89	16,76	16,63
					20		15,19	15,25	15,13

5.4 Western Blot

Após a padronização das condições de eletroforese em SDS-PAGE, foram preparadas as transferências para membrana de nitrocelulose, cujas efetividades foram confirmadas pela coloração com Ponceau Red. Nas preparações com AT de *Oesophagostomum radiatum* foram observadas reações visualmente tênues nas posições correspondentes às proteínas com 109, 97, 82, 67 e 55 kDa; resultados estes que não possuem correspondência com aqueles anteriormente descritos na literatura (EAST & BERRIE, 1986; GASBARRE & CANALS, 1989, e PAIVA 2002).

Outro aspecto, a despeito da fraca reatividade, foi a constatação de que os soros reagentes, predominantemente, foram aqueles com IR mais elevados (> 2,6) e assim como, a maioria estava classificada como de baixo OPG. E entre os reagentes, predominaram as categorias mais velhas, sobreano e adultos. Desta forma a despeito das fragilidades consideradas, pode se afirmar que a reatividade às frações dos AT de *Oesophagostomum radiatum* foi observada em animais mais velhos e com baixo OPG; mesmo não tendo sido possível estabelecer significância conforme proposto por Taylor et al. (2013).

Em relação às frações de AT de *Haemonchus placei* não foram observadas reações de reconhecimento para as diferentes frações caracterizadas pelo SDS-PAGE; considerando tal resultado, pode se atribuir à alguma etapa ou insumo empregado que não se apresentava adequado.

Diante dos resultados, mesmo que tendo algum êxito com os AT de *O. radiatum*, urge rever a estratégia e reavaliar outros delineamentos, tais como emprego de colunas de afinidades para diferentes imunoglobulinas (IgA, IgG e IgE, por exemplo) para selecionar em cromatografia aquelas frações reconhecidas e retidas pelos respectivos Ig's, conforme já executado por Paiva, 2002.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados podemos concluir, segundo cada uma das etapas e processos:

6.1 Perfil das contagens de ovos nas fezes nas diferentes categorias animais

- Os bovinos tendem a reduzir significativamente a contagem de OPG, após os dois anos de idade. De tal forma que os animais na categoria pré-desmame apresentaram os valores mais elevados de OPG, seguidos pelos desmamados, sobreanos e adultos.

- Os gêneros de nematodas predominantes nas amostras foram *Haemonchus* sp. e *Cooperia* sp., com algumas variações nas categorias, mas de maneira geral, os perfis foram consistentes com estudos anteriores.

- Pelas análises das contagens de OPG, por categorias, foram observados dois padrões: animais mais velhos têm contagens restritas às classes de menor quantidade de OPG, enquanto animais mais jovens apresentam distribuições mais uniformes em todas as classes.

6.2 Reações sorológicas

- Os soros bovinos, submetidos ao ELISA reagiram aos anticorpos séricos IgG total quando expostos a antígenos totais de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum*.

- Houve diferenças nas densidades ópticas (IR) entre as categorias e as respectivas classes de OPG para os anticorpos contra *O. radiatum*, sugerindo variações nas respostas imunológicas desses animais, relacionáveis a contagem dos OPGs.

- Os resultados indicam que bovinos mais jovens têm maiores contagens de OPG e menor índice de reatividade (IR) contra antígenos de *O. radiatum*, enquanto bovinos mais velhos têm menor contagem de OPG e maior IR.

- A relação entre níveis de OPG e concentração de IgG foi inversa, reforçando a ideia de que a resposta imunológica está, em parte, relacionada com a resistência à infecções parasitárias.

6.3 Perfil Eletroforético dos Extratos Totais de *H. placei* e *O. radiatum*

- Os perfis eletroforéticos dos antígenos totais de *H. placei* e *O. radiatum* revelaram bandas distintas em gel de SDS-PAGE.

- As frações com bandas mais intensas variaram entre as duas espécies, sugerindo variações nas composições proteicas desses parasitas.

6.4 Western Blot

- A análise das reações por *Western Blot* apresentou resultados variados, com reações tênues em algumas frações dos antígenos totais de *O. radiatum*.

- Mesmo com reações fracas, pode se observar uma tendência de maior reatividade em soros de bovinos mais velhos e com baixo OPG em relação aos antígenos de *O. radiatum*.

Em resumo, o estudo destaca a influência da faixa etária na contagem de ovos nas fezes de bovinos, com animais mais jovens apresentando maiores contagens. As reações sorológicas evidenciam a complexidade das respostas imunológicas dos bovinos em relação a diferentes antígenos parasitários. Além disso, os perfis eletroforéticos revelam diferenças nas composições proteicas de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum*. O estudo enfatiza a importância de continuar investigando esses aspectos para compreender melhor a dinâmica das infecções parasitárias em bovinos.

De qualquer forma, o caminho é longo e não devemos abandonar aqueles que indicam alguma direção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC). (2020). Relatório Anual 2020. Recuperado em 25 de novembro de 2021, de <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>.

ADA, G. The immunology of vaccination. In Plotkin, S. A., and Orenstein, W. A., eds., *Vaccines*, 3d ed., pp. 28–39. **W. B. Saunders**, Philadelphia, 1999.

ALVES, A.E.; RIBEIRO, A.P.C.; DI FILIPPO, P.A.; APPARICIO, M.F.; FAGLIARI, J.J.; VICENTE, W.R.R. Leucogram and serum acute phase protein concentrations in queens submitted to conventional or videolaparoscopic ovariectomy. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.1, p.86-91, 2010.

AMARANTE, A.F.T.; MOLENTO, M.B.; BRESCIANI, K.D.S.; SOUTELLO, R.V.G.; AMADEU, V.S.; SILVA, L.F.L.; BARBOSA, T.R. Resistência de nematóides a anti-helmínticos em bovinos: uma questão global. **Jornal de Pesquisa em Parasitologia**, 2016.

AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M.; CHAGAS, A.C.S. Efeitos da infecção por nematóides gastrointestinais na produção de leite em vacas leiteiras: uma meta-análise. **Journal of Dairy Science**, v.101, n.12, p.11102-11112, 2018.

ANDERSON, N.; ARMOUR, J.; EADIE, R.M.; JARRETT, W.F.H.; JENNINGS, F.W.; RITCHIE, J.S.D.; URQUHART, G.M. Experimental Ostertagia ostertagi infections in calves: Results of single infections with five graded dose levels of larvae. **Amer. J. Vet. Res.** v.27, p.1259. 1966

ANTHONY, R.M.; RUTITZKY, L.I.; URBAN, J.F.JR.; STADECKER, M.J.; GAUSE, W.C. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Rev Immunol.** v.7, n.12, p.975–987, 2007.

ARAÚJO, J.V.; ASSIS, R.C.L.; CAMPOS, A.K.; MOTA, M.A. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p.373-380, 2006.

BANKS, D.J.D.; SINGH, R.; BARGER, I.A.; PRATAP, B.; LE JAMBRE, L.F. Development and survival of infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in a tropical environment. **Int. J. Parasitol.** v.20, p.155–160, 1990.

BASSETTO, C.C.; SILVA, B.F.; NEWLANDS, G.F.J.; SMITH, W.D.; AMARANTE, A.F.T. Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. **Parasite Immunology**, v. 33, p.377–381, 2011.

BASSETTO, C.C.; SILVA, M.R.L.; NEWLANDS, G.F.J.; SMITH, W.D.; RATTI JÚNIOR J.; MARTINS, C.L.; AMARANTE, A.F.T. Vaccination of grazing calves with antigens from

the intestinal membranes of *Haemonchus contortus*: effects against natural challenge with *Haemonchus placei* and *Haemonchus similis*. **Int J Parasitol**, v.44, p.697–702, 2014.

BASSETTO, C.C.; ALMEIDA, F.A.; NEWLANDS, G.F.J.; SMITH, W.D.; CASTILHOS, A.M.; FERNANDES, S.; SIQUEIRA, E.R.; AMARANTE, A.F.T. Trials with the *Haemonchus* vaccine, Barbervax®, in ewes and lambs in a tropical environment: nutrient supplementation improves protection in periparturient ewes. **Vet. Parasitol.**264, 52–57, 2018.

BEHNKE, J.M. Parasites: immunity and pathology: The consequences of parasitic infection in mammals. London. New York. Philadelphia, 1990.

BERTAGNON, H.G.; PONTAROLO, D.V.; RECK, A.M.; NASCIMENTO, Y.T.H.; CONEGLIAN, M.M.; SEKI, M.C.; COELHO, A.M.; ARTNER, B. Efeito do parasitismo por *Haemonchus contortus* sobre o metabolismo oxidativo de leucócitos de ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.20, p.1-8, 2019.

BERTONE, M.; GREEN, J.; WASHBURN, S.; POORE, M.; SORENSON, C.; WATSON, D.W. Seasonal activity and species composition of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae and Geotrupidae) inhabiting cattle pastures in North Carolina. **Annals of Entomological Society of America**, v.98, n.3, p.309-321, 2005.

BESIER, B.; KAHN, L.; SARGISON, N. Evaluation of the Barbervax vaccine against *Haemonchus contortus* in sheep in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.214, n.1-2, p.144-153, 2015.

BESIER, B.; LOVE, S.; VARADY, M.; JABBAR, A. Evaluation of the Barbervax® vaccine against *Haemonchus contortus* in naturally infected sheep in an endemically affected region in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.245, p.104-112, 2017.

BIANCHIN, I.; HONER, M.R.; NASCIMENTO, Y. A. The epidemiology of helminths in Nellore beef cattle in the cerrado of Brazil. In: Symposium "Epidemiology of bovine nematode parasites in the Americas". Eds. J. Guerrero and W.H.D. Leaning. **XVI World Buiatrics Congress**, Salvador, Bahia, Brazil, 1990, p.41-47

BIANCHIN, I; HONER, M.R.; NUNES, S.; NASCIMENTO, Y.A. The effect of stocking rates and treatment schemes on the weight gain of weaned Nellore steers in the Brazilian savanna. **Tropical Animal Health and Production**, v. 27, p.1-8, 1995.

BOISVENUE, R.J.; STIFF, M.I.; TONKINSON, L.V.; COX, G.N. Protective studies in sheep immunized with cuticular collagen proteins and peptides of *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v.13, p.221-240, 1991.

BORGSTEEDE, F.H.M. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of herbivorous animals in Europe. In: Resistance of parasites to antiparasitic drugs: Round Table Conference, 7, 1990, Paris. **ICOPA VII Paris 1990**. Paris: Merck & Co. Inc., 1990. p. 81-87.

BRICARELLO, P.A.; ZAROS, L.G; COUTINHO, L.L.; ROCHA, R.A.; SILVA, M.B.; KOOYMAN F.N.J.; VRIES, E; YATSUDA, A.P; AMARANTE, A.F.T. Immunological

responses and cytokine gene expression analysis to *Cooperia punctata* infections in resistant and susceptible Nelore cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 95-103, 2008.

BRITTON, C.; CANTO, G.J.; URQUHART, G.M.; KENNEDY, M. Characterization of excretory-secretory products of adult *Dictyocaulus viviparus* and the antibody response to them in infection and vaccination. **Parasite Immunology**, v.15, p.163-174, 1993.

CANALS, A.; ZARLENGA, D.S.; ALMERIA, S.; GASBARRE, L.C. Cytokine profile induced by a primary infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.58, p.63–75, 1997.

CANCADO, P.H.D.; CATTO, J.B.; SOARES, C.O.; MIRANDA, P. de A.B.; VALENTIM, T.F.; PIRANDA, E.M. Controle parasitário de bovinos de corte em sistemas de integração. In: Embrapa Gado de Corte. Capítulo em livro científico (ALICE), 2019.

CLAEREBOUT, E.; SMITH, W.D.; PETTIT, D.; GELDHOF, P.; RAES, S.; GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J. Protection studies with a globin-enriched protein fraction of *Ostertagia ostertagi*. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.299–307, 2005.

CLAEREBOUT, E.; GELDOPH, P. Helminth Vaccines in Ruminants From Development to Application. **Vet Clin Food Anim**, v.36,p.159–171, 2020.

COBB, R., PRICKETT, J., & SYKES, A. Evaluation of the Barbervax® vaccine against *Haemonchus contortus* in naturally infected goats in New Zealand. **Veterinary Parasitology**, v.278, 109022, 2020.

COGNATO, B. B. **Estudo do compartilhamento de antígenos entre *Angiostrongylus* spp. e outros helmintos.** 2013. 73p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - **FACULDADE DE BIOCÊNCIAS, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, RS, 2013.**

COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.244, p.7-1, 2017.

COOLEY, W.A.; CLARK, J.K.; RYDER, S.J.; DAVIS, L.A.; FARRELLY, S.S.J.; STACK, M.J. Evaluation of a Rapid Western Immunoblotting Procedure for the Diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in the UK. **Journal of Comparative Pathology.** Edinburgh. v.125, n.1, p.64-70, 2001.

COSTA, A. J. Helmintos parasitos de bezerros do Município de Uruana – Goiás, Brasil. **Arquivos da Escola de Veterinária**, v. 31, n. 1, p. 33-36, 1979.

DAY, M.J.; SCHULTZ, R.D. Veterinary immunology: principles and practice. 2^a ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2014.

DENHAM, D. A. The immunity of lambs against *Trichostrongylus colubriformis*. **J. Comp. Path.** v.79, p.1-6, 1969.

DIEMERT, D.J.; BOTTAZZI, M.E.; PLIESKATT, J.; HOTEZ, P.J.; BETHONY, J.M. Lições ao longo do caminho crítico: desenvolvimento de vacinas contra helmintos humanos. **Tendências em Parasitologia**. v.34, n.9, p.747–58, 2018. pmid: 30064902

DOUVRES, F. W. The in vitro cultivation of *Oesophagostomum radiatum* the nodular worm of cattle. II. The use of this technique to study immune responses of host tissue extracts against the developing nematode. **J. Parasit.** V.48, p.852-864, 1962.

EAST, I.J. & BERRIE, D.A. Antigenic differences among the life cycle stages of *Oesophagostomum radiatum*. **Research in Veterinary Science**, 41(1): 129-130, 1986.

ECHEVARRIA, F. Fasciolose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.100-102, 2004.

FELIZ, D.C. Resistência a anti-helmínticos em nematodas gastrointestinais de bovinos de corte, no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)**. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

FIEL, C. A.; BURGOS, L.; ALVAREZ, L.; ELISSONDO, C.; SAUMELL, C. Efficacy of the Barbervax® vaccine in the control of *Haemonchus contortus* infection in naturally infected sheep in Argentina. **Veterinary Parasitology**, 291, 109375, 2021.

FORBES, A. A trial of Barbervax vaccine in Scotland. In Proceedings of the Sheep Breeders Round Table (Vol. 30, pp. 17-20). Sheep Breeders Round Table. 2019.

FRANKENA, K. (1987). The interaction between *Cooperia spp.* and *Ostertagia spp.* (Nematoda: Trichostrongylidae) in cattle (PhD thesis). Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. (p. 101).

FRESCHI, C. R.; HIGA, A. C.; TINUCCI COSTA, M.; PANCRACIO, H. P.; MACHADO, R. Z. Caracterização de antígenos de *Toxoplasma gondii* pela técnica de “Western Blotting” em soros de cães com sinais clínicos suspeitos de toxoplasmose. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, SP, v.21, n.2, p.265-271, 2005.

GASBARRE, L.C. Limiting dilution analyses for the quantification of cellular immune responses in bovine Ostertagiasis. **Vet. Parasitol.** v.20, p.133–147, 1986.

GASBARRE, L. C.; CANALS, A. Induction of Protective Immunity in Calves Immunized with Adult *Oesophagostomum radiatum* Somatic Antigens. **Veterinary Parasitology**, v.34, p.223-238, 1989.

GASBARRE, L.C. *Ostertagia ostertagi*: changes in lymphoid populations in the local lymphoid tissues after primary or secondary infection. **Vet. Parasitol.** v.55, p.105–114, 1994.

GASBARRE, L.C. Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. **Vet. Parasitol.**, 72(3-4): 327-37; discussion 337-43, 1997.

GASBARRE, L.C.; LEIGHTON, E.A.; SONSTEGARD, T. Role of the immune system and fenome in resistance to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.98, p.51-64, 2001.

GAVIDIA, C.M.; VERASTEGUI, M.R.; BARRON, E.A.; GARCIA, H.H.; GILMAN, R.H.; SAENZ, P. Prevention of human hydatidosis by vaccination with a recombinant antigen. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.108, n.3, p.247-254, 2014.

GORDON, H.M.C.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Commonwealth Science and Industry Research Organization**, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

GORDON, H. M.; GARDINER, C. H. (1981). Production and economic implications of helminth infections in ruminants. In H. W. Norton (Ed.), *Advances in veterinary science and comparative medicine* (Vol. 25, pp. 77-118). Academic Press.

GÓRNIK, S.L. Consumo de colostro por bezerros recém-nascidos: uma revisão. **J. Appl. Anim. Res.**, v.44, n.1, p.1-9, 2016.

GOSSNER, A.G.; VENTURINA, V.M.; SHAW, R.J.; MELLENCAMP, M.A.; LEARMONT, L.J.; PIGHETTI, G.M.; PERKINS, N.R. Transcriptional profiling of cattle infected with the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* reveals predominance of genes regulating host responses. **Parasites & vectors**, v.11, n.1, p.1-17, 2018.

GRISI, L.; NUERNBERG, S. Incidência de nematódeos gastrointestinais de bovinos, no Estado de Mato Grosso. **Pesq. Agropec. Bras.**, Sér.Vet. 6, p.145-9, 1971.

GRISI, L., LEITE, R. C., MARTINS, J. R. D. S., BARROS, A. T. M. D., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P. H. D., LEÓN, A.A.P; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUNATHILAKA, N.; NIROSHANA, D.; AMARASINGHE, D.; UDAYANGA, L. Prevalence of Gastrointestinal Parasitic Infections and Assessment of Deworming Program among Cattle and Buffaloes in Gampaha District, Sri Lanka. **BioMed Research International**, v.2018, p.1-10, 2018.

HECKLER, R. P. Epidemiologia e controle estratégico da verminose em bovinos de corte. 2015.121p. **Tese (Doutorado em Ciência Animal)**. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

HERLICH, H. Age resistance of cattle to nematode of the gastrointestinal tract. **Journal of Parasitology**, v.46, p.392-397, 1960.

HERLICH, H. Studies on calves experimentally infected with combinations of four nematode species. **Amer. J. Vet. Res**, v.23, p.521, 1962.

HERLICH, H. Effects of *Cooperia pectinata* on calves: Two levels of repeated oral inoculation. **Amer. J. Vet. Res**, v.28, p.71, 1967.

HERLICH, H; DOUVRES, F.W.; ROMANOWSKI, R.D. Vaccination against *Oesophagostomum radiatum* by Injecting Killed Worm Extracts and In-vitro-Grown Larvae into Cattle. **The Journal of Parasitology**, v.59(6), p. 987-993, 1973.

HERLICH, H.; DOUVRES, F.W. Parasitism and calfhoo d diseases. **Journal of Dairy Science**, v.60(2), p.283-288, 1977.

HOLSBACK, L.; LUPPI, P.A.R.; SILVA, C.S.; NEGRÃO, G.K.; CONDE, G.; GABRIEL, H.V.; BALESTRIERI, J.V.; TOMAZELLA, L. Anthelmintic efficiency of doramectin, fenbendazole, and nitroxy nyl, in combination or individually, in sheep worm control. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v.25, n.3, p. 353-358, jul.-set. 2016.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M.; HOSKIN, S.O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v.22, n.6, p.253-261, 2006.

JABBAR, A.; KREHBIEL, C.R.; JOHNSON, Z.B.; NISBET, D.J. Immunological regulation of *Ostertagia ostertagi* infection in cattle: a review. **Journal of animal science and biotechnology**, v.6, n.1, p.1-9, 2015.

JARRET, W.F.H.; JENNINGS, F.W.; MARTIN, B.; MCINTYRE, W.I.M.; MULLIGAN, W.S.; SHARP, N.C.C.; URQUHART, G.M. A field trial of a parasitic bronchitis vaccine. **Vet. Record**, v.70, p.451-462, 1958.

JASMER, D.P.; MCGUIRE, T. C. Antigens with application toward immune control of blood-feeding parasitic nematodes. **British Vet Journal**, v. 152, n. 3, p. 251-268, 1996.

JIANG, W. Y.; WEN, H.; LI, J.; XUE, Z. Q.; YANG, G. J. Immunogenicity and efficacy of a recombinant *Echinococcus granulosus* antigen (EG95) in dogs. **Veterinary parasitology**, v.266, p.55-60, 2019.

JIMÉNEZ, A.E.; FERNÁNDEZ, A.; ALFARO, R.; DOLZ, G.; VARGAR, B.; EPE, C.; SCHNIEDER, T. A cross-sectional survey of gastrointestinal parasites with dispersal stages in feces from Costa Rican dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v.173(3-4), p.236-246, 2010.

KABAGAMBE, E.K.; BARRAS, S.R.; LIA, Y.; PEÑA, M.T.; SMITH, D.; MILLER, J.E. Attempts to control haemonchosis in grazing ewes by vaccination with gut membrane proteins of the parasite. *Veterinary Parasitology*, v.92, p.15-23, 2000.

KEITH RK. Studies on *Cooperia pectinata*. *Vet Rec.* 1967 Aug 26;81(9):209-10. doi: 10.1136/vr.81.9.209.

KLOOSTERMAN, A., ALBERS, G.A.A.; VAN DEN BRINK, R. Negative interactions between *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. **Veterinary Parasitology**, v.15, p.135-150, 1984

KNOX, D.P.; REDMOND, D.L.; JONES, D.G. Characterization of proteinases in extracts of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode. **Parasitology**, v,106, p.395-404, 1993.

KNOX, D.P.; SMITH, S.K.; SMITH, W.D.; REDMOND, D.L., MURRAY, J.M. **Vaccines against helminthic parasites: thiol binding proteins**. International Patent #WO 95/26402, 1995.

KNOX, D.P.; SMITH, S.K.; REDMOND, D.L.; SMITH, W.D. Protection induced by vaccinating sheep with a thiol-binding extract of *Haemonchus contortus* membranes is associated with its protease components. **Parasite Immunology**. v.27, p.21–126, 2005.

KUNKEL, H.G.; SLATER, R.J. Zone electrophoresis in a starch supporting medium. **Proc Soc Exp Biol Med** 80:42–44, 1952.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Protein blotting: a review. **Journal of Immunological Methods**. Amsterdam. v.274, p.1-15, 2003.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. *Western Blotting*. Methods. San Diego. v.38, p.283-293, 2006.

LeJAMBRE, L.F.; WINDON, R.G.; SMITH, W.D. Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.302-312, 2008.

LIMA, M. C.; AIELLO JUNIOR, R.; LINHARI, C. O.; OYAMA, S. M. R.; CHAYA, A. Y. Controle de Parasitas Gastrointestinais em Ovinos de uma Criação Semi-Confinada na Região de Campo Limpo Paulista -SP. RECIMA21 - **Revista Científica Multidisciplinar** - ISSN 2675-6218, 3(1), e311070, 2022.

LIGHTOWLERS, M.W.; JENSEN, O.; FERNANDEZ, E.; IRIARTE, J.; WOOLLARD, D.; GAUCI, C.G.; GOTTSTEIN, B. Echinococcus granulosus EG95, a novel coronavirus-like protein from *Echinococcus granulosus*: vaccine efficacy of recombinant protein in mice and sheep. **Vaccine**, v.21, n.25-26, p.508-518, 2003.

LI, X.; XU, L.; LI, K.; LI, X.; SONG, X.; YANG, X.; FU, Y.; LIU, X.; GU, X.; YAN, R. Thiol-Sepharose binding proteins from *Haemonchus contortus* adult worms induce an immune protective response in sheep. **Parasites & Vectors**, v.13, n.1, p.1-11, 2020.

LONG, S.A.; CARMAN, M.; REED, S.M.; JENNINGS, R.; MARSH. A.E. Comparative H-gal-GP and H11 specific antibody binding in equine cyathostomins. **Veterinary Parasitology**,v.286, p.1-7, 2020.

MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.C.E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. An bras Dermatol, Rio de Janeiro, v.79, n.6, p.647-664, nov/dez. 2004.

MARIPANDI, A.; AL-SALAMAH, A. A. Analysis of Salmonella enteritidis outer membrane proteins and lipopolysaccharide profiles with the detection of immune dominant proteins. **American Journal of Immunology**. v. 6, n. 1, p. 1-6, 2010.

MARTINS, M.S.S. **Contagem de ovos nas fezes versus resposta imune: relação ou ilusão? Dissertação de Mestrado**. 2018. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS**, 2018.

MELO, H. J. H.; BIANCHIN, I. Estudos epidemiológicos de infecções por nematódeos gastrointestinais de bovinos de corte em zona de cerrado de Mato Grosso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 12, p. 205-216, 1977.

MELNEK, F.M.; CAMARGO, S.; WELLINGTON, A.; LOPES, W.D.Z.; CARDOZO, R.M.; MARTINS, R.R.; FERRARO, G.C. Relação entre a parasitose por nematódeos e a eosinofilia em ovinos da região de Umuarama - PR. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v.1, n.2, p.72, 2014.

MENINO, A.R.; PASTORI, R.L.; OKINO, C.H.; FARIAS, S.T.; SALES, E.B.; ROSSI, R.S.; MARCHIORI, C.H.; FERREIRA, H.F.D.; MADUREIRA, K.M.C. Evaluation of the humoral and cellular immune response in calves vaccinated with a *Mycoplasma bovis* bacterin. **Vet. World**, v. 13, n. 2, p. 320-324, 2020.

MICHEL, J.F. The phenomenon of host resistance and the course of infection of *Ostertagia ostertagi* in calves, **Parasitology**, v.53, p.63-84, 1963.

MICHEL, J.F.; LANCASTER, M. B.; HONG, C. *Ostertagia ostertagi*: protective immunity in calves. **Experimental Parasitology**, v.33, p.179-86, 1973.

MIMS, C.A. The Pathogenesis of Infectious Disease. **Academic Press**, 3d ed., London, 1987.

MUNN, E.A. The structure of the extracellular polymeric protein, contortin, and its mode of attachment to the plasma membrane. **Proceedings of the Vth European Congress of Electron Microscopy**, Jerusalem, p.515-16, 1976.

MUNN, E.A. A helical, polymeric extracellular protein associated with the luminal surface of *Haemonchus contortus* intestinal cells. **Tissue and Cell**, v.9, p.23-34, 1977.

MUNN, E.A.; GREENWOOD, C.A.; COADWELL, W.J. Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v.94, p.385-397, 1987.

NISHI, S.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; GENNARI, S.M. Serum IgG level in calves experimentally infected with *Haemonchus placei*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 2, 2002.

OLIVEIRA, L.S.; SANGIONI, L.A.; POTTER, L.; RIBAS, H.O.; FELIPPELLI, G.; VOGEL, F.S.F.; OLIVEIRA, C.M.C.M.; ZANETTE, R.A.; KESSLER, T.A.; KLEIN, T.A.; LOPES, L.S. Perdas econômicas em bovinos de corte devido à infecções por nematoides gastrointestinais no sul do Brasil. **Tropical Animal Health and Production**, v.52, n.1, p.209-216, 2020.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T.; FERRARI, T.B.; NUNES, L.C.; ARAUJO, J.V. Absence of digestive enzymes in *Cooperia punctata* and *Cooperia oncophora* (Nematoda: Trichostrongylidae). **Veterinary parasitology**, v.127, n.1, p.101-105, 2005.

PAIVA, F. **Cultivo 'in vitro' de *Oesophagostomum radiatum*, em grande escala, para recuperação dos produtos de excreção/secreção**. 2002. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

PATITUCCI, L.T.; AZEREDO, M.V.; VERÍCIMO, M.A.; ALMOSNY, N.R.P.; CASTRO, M.C.N. Electrophoretic analysis (sds-page) of canine urinary proteins according to the stage of chronic kidney disease. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.72, n.4, p.1185-1196, 2020.

PLOTKIN, S.A.; ORENSTEIN, W.A. Vaccines, **W. B. Saunders**, 3d ed. Philadelphia, 1999.

PIMENTEL NETO, M; SOUZA , A. R. Dosificação estratégica anual para controle de helmintoses gastro-intestinal de bovinos em Mato Grosso. Campo Grande, IPEAO, 1971. (IPEAO, Indicação de Pesquisa, 3).

PRESTON, J.M.; ALLONBY, E.W. The influence of breed on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infection in Kenya. **Research in Veterinary Science**, v.26, p.134-9, 1979.

RASHIDI, M.; EHSANI, P.; HAJIHOSSEINLO, A.; KHODAKARAM-TAFTI, A. Thiol-Sepharose binding protein (TSBP): A potential biomarker for diagnosis of *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.56, p.1-5, 2018.

RAYMOND, S.; WEINTRAUB, L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. **Science**, v.130, p.711–712, 1959.

REDMAN, E.M.; GASBARRE, L.C.; GILLEARD, J.S.; SKUCE, P.J. The challenge of anthelmintic resistance in cattle: what have we learnt from *Ostertagia ostertagia*. **Parasites & vectors**, v.11, n.1, p.1-12, 2018.

REDMOND, D.L.; KNOX, D.P. Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. **Vaccine**, v.22, p.4252–4261, 2004.

RICKARD, M.D.; SARGISON, N.D.; JACKSON, F.; BARTLEY, D.J.; CLAEREBOUT, E. The immunology of nematode infections in ruminants: a review. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.231, 110171, 2021.

RITCHIE, J.D.S.; ANDERSON, N.; ARMOUR, J.; JARRETT, W.F.H.; JENNINGS, F.W.; URQUHART, G.M. Experimental *Ostertagia ostertagi* infections in calves: Parasitology and pathogenesis of a single infection. **Amer. J. Vet. Res.** v.27, n.659, 1966.

ROEBER, F.; JEX, A.R.; GASSER, R.B.; ELLIS, J.T. Current progress in the characterization of enzymes secreted by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus spp.* for their potential as recombinant vaccines. **Biotechnology advances**, v.37, n.6, 107348, 2019.

ROBERTS, F.H.S.; O’SULLIVAN, J.P.; RIECK, R.F. The epidemiology of parasitic gastro enteritis of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.3, p. 187-226, 1952.

ROBERTS, F. H.; SWANSON, R. S. (1981). Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Editora Agronômica Ceres.

ROSS, J.G.; TODD, J.R. Biochemical, serological and haematological changes associated with infections of calves with the nematode parasite, *Ostertagia ostertagi*. **Br. Vet. J.** v.121, n.55. 1965.

SCHALLIG, H.D.; MOYO, D.Z.; HENDRIKX, W.M.; EYSKER, M. Bovine humoral immune responses to *Haemonchus placei* excretory secretory antigens. **Veterinary Parasitology**, v.65(34), p.289-296, 1996.

SEÓ, H. L.; PINHEIRO MACHADO FILHO, L. C.; HONORATO, L. A.; SILVA, B. F.; AMARANTE, A. F, BRICARELLO, P. A. The effect of gastrointestinal nematode infection level on grazing distance from dung. **PLoS One**, v. 10, n. 6, 2015.

SIEFKER, C.; RICKARD, L.G. Vaccination of calves with *Haemonchus placei* intestinal homogenate. **Vet Parasitol**, v.88(3-4), p.249-60, 2000a.

SIEFKER, C.; RICKARD, L.G. *Ostertagia ostertagi* challenge of calves vaccinated with *Haemonchus placei* intestinal homogenate. **Veterinary Parasitology**, v.90, p.103-110, 2000b.

SILVA, F.L.; CHAGAS, A.C.S.; CARVALHO, L.R.; PIRES, K.M.P.; CARVALHO, N.M. Enzymatic activity of *Haemonchus placei* excretory-secretory products on artificial substrates. **Veterinary Parasitology**, v.277, 109019, 2020.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal - Mercado Veterinário. São Paulo, 2018.

SKUCE, P.J.; REDMOND, D.L., LIDDELL, S.; STEWART, E.M; NEWLANDS, G.F.; SMITH, W.D.; KNOX, D.P. Molecular cloning and characterization of gut-derived cysteine proteinases associated with a host protective extract from *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v.119(4), p.405–12, 1999.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochem J**, v.61, p.629–641, 1955.

SMITH, S.K.; SMITH, W.D. Immunisation of sheep with an integral membrane glycoprotein complex of *Haemonchus contortus* and with its major polypeptide components. **Research in veterinary science**, v.60, n.1, p.1–6, 1996.

SMITH, T.S.; COTTERILL, S.E.; ASTLE, A.A.; CHAUHAN, S.; JACKSON, F.; GILLEARD, J.S. *Haemonchus contortus* Galactose-Containing Glycoproteins are an Antigenic Subgroup of “Hidden” Proteins. **Journal of Proteome Research**, v.20, n.2: 1109-1122, 2021.

SMITH, W.D. Protection in lambs immunised with *Haemonchus contortus* gut membrane proteins. **Research in Veterinary Science**, v.54(1), p.94-101, 1993.

SMITH, W.D. Prospects for vaccines against helminth parasites of grazing ruminants. **Vet Parasitol**, v.29(1), p.17–24, 1999.

SMITH, W.D.; NEWLANDS, G.F.J.; SMITH, S.K.; PETTIT, D.; SKUCE, P.J. Metalloendopeptidases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. **Parasite Immunology**, v.25, n.6, p.313–323, 2003b.

SMITH, W.D.; PETTIT, D.; SMITH, S.K. Cross-protection studies with gut membrane glycoprotein antigens from *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. **Parasite Immunology**, v.23, p.203-211, 2001.

SMITH, W.D.; SKUCE, P.J.; NEWLANDS, G.F.J.; SMITH, S.K.; PETTIT, D. Aspartyl proteases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. **Parasite Immunology**, v.25, n.11-12, p.521–530, 2003a.

SMITH, W. D.; SMITH, S. K.; MURRAY, J. M. Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v.16, n.5, p.231–241, 1994.

SMITH, W.D.; SMITH, S.K.; PETTIT, D.; NEWLANDS, G.F.; SKUCE, P.J. Relative protective properties of three membrane glycoprotein fractions from *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v.22, n.2, p.63–71, 2000.

SMITH, W.D.; ZARLENGA, D.S. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.139, n.4, p.347–359, 2006.

SOUZA, A.P.; RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; SCHELBAUER, C.A. Resistência de helmintos gastrointestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.38, p.1363-1367, 2008.

SOUZA, M.F. Recuperação de larvas infectantes, carga parasitária e desempenho cordeiros terminados em pastagens com distintos hábitos de crescimento. 2013.107 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013

STEAR, M. J.; BOAG, B.; CATTADORI, I.; MURPHY, L.; FAIRLIE-CLARKE, K. J. The effectiveness of the Barbervax® vaccine for the control of *Haemonchus contortus* in Scotland. **Veterinary Parasitology**, v.249, p.61-68, 2018.

STURGES, H. The choice of a class-interval. **Journal of American Statistical Association**, v. 21, p. 65-66, 1926.

SUTHERLAND, I. A.; LEATHWICK, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue?. **Trends in Parasitology**, v.27, n.4, p.176-181, 2011.

TALMI-FRANK, D.; STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BANETH, G. Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative *Western Blot* analysis and antigen specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**. Oxford. v.13, n.2, p. 271–276, 2006.

TAYLOR SC, BERKELMAN T, YADAV G, HAMMOND M. A defined methodology for reliable quantification of *Western Blot* data. **Mol Biotechnol**. 2013 Nov;55(3):217-26.

TISELIUS, A. Nova Acta Soc. **Sci. upsal.**, series IV, v.7, n.4, 1930.

- TISELIUS, A. Trans. **Faraday Soc.**, v.33, n.524, 1937.
- TISELIUS, A. Kolloidzschr., v.85, n.129, 1938.
- TISELIUS, A. Disc. Faraday Soc., n. 13, p. 29, 1953.
- KUNKEL, H.G.; TISELIUS, A. Electrophoresis of proteins on filter paper. **J Gen Physiol** n.35, p.89–118, 1951.
- TONGSON, M.S.; BALEDIATA, E. Epidemiology of bovine parasitic gastroenteritis. **Journal of Veterinary Medicine**, v.11, p.63-72, 1972.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.76(9), p.4350-4354, 1979.
- TUO, W.; YAN, R.; SONG, X.; XU, L.; WANG, X.; GAO, X.; LI, K.; LI, X. Protective efficacy of a recombinant globin of *Haemonchus contortus* (rHcGbR) in murine and ovine models. **Veterinary Parasitology**, v.252, p.103-109, 2018.
- UENO, H.; GUTIERRES, V.C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Porto Alegre, RS. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1983.
- VAN DIEMEN, P.M.; PLOEGER, H.; NIEUWLAND, M.G.B.; RIETVELD, F.W.; EYSKER, M.; KOOYMAN, F.; KLOOSTERMAN, A.; PARMENTIER, H. Low molecular weight *Cooperia oncophora* antigens. Potential to discriminate between susceptible and resistant calves after infection. **International Journal for Parasitology**, v.27(5), 587-93, 1997.
- VANHOY, G.; CARMAN, M.; HABING, G.; LAKRITZ, J.; HINDS, A.C.; KAPLAN, R.M.; MARSH, A.E. Safety and serologic response to a *Haemonchus contortus* vaccine in alpacas. **Vet. Parasitol.** v.252, p.180–186, 2018.
- VAN WYK, J.A. Occurrence and dissemination of anthelmintic resistance in South Africa, and Management of resistant worm strains. In: Resistance of parasites to antiparasitic drugs: Round Table Conference, 7, 1990, Paris. **ICOPA VII Paris 1990**. Paris: Merck & Co. Inc., 1990. p.103-113.
- VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; RANGLES, J.L. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? **Veterinary Parasitology**, v.70(1-3), p.111-122, 1997.
- VIDOTTO, O. Estratégias de combate aos principais parasitas que afetam os bovinos. In: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. Anais do Sul - Leite. Maringá, 2002. p.192-212.
- VIVEIROS, C. T. Parasitoses gastrointestinais em bovinos na ilha de S. Miguel, Açores – Inquéritos de exploração, resultados laboratoriais e métodos de controlo. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária. 2009.

WANG, F.; LU, M.; SONG, X.; LI, X.; XIE, Y.; DANG, Z.; YAN, R. Thiol-Sepharose Binding Protein (TSBP) vaccine conferred significant protection against *Haemonchus contortus* challenge in goats. **Parasites & Vectors**, v.12, n.1, p.1-11, 2019.

WANG, Z.; FU, Y.; XIE, Y.; LIU, X.; GU, X.; SONG, X.; WANG, X.; YAN, R. RNA sequencing and transcriptome analysis of *Haemonchus contortus*. **Parasite**, v.27, n.8, 2020.

WYMANN, M.N.; BONFOH, B.; TRAORE, K.; TEMBELY, S.; ZINSSTAG, J. Species diversity and acquisition of gastrointestinal parasites in calves aged 0–13 months in periurban livestock production in Mali. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.1, p.67–73, 2007.

YANG, Y.; ZHAN, S.; YANG, J. Advances in nematode globin research. **Parasitology Research**, v.115, n.5, p.1675-1684, 2016.

ZAROS, L. G., BRICARELLO, P. A.; AMARANTE, A. F. T.; ROCHA, R. A; KOOYMAN, F. N. J.; VRIES, E. Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p.68–73, 2010.

ZHOU, S.; YANG, Y.; XIA, C.; ZHAO, Y. Molecular characterization and protective efficacy of a *Trichostrongylus colubriformis* abundant larval transcript (ALT) protein. **Parasitology Research**, v.115, n.1, p.277-283, 2016.