

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

CAMILA DE MIRANDA E SILVA CHAVES

Dieta proteica e transcriptômica de tecidos associados à resposta imune
de ovinos infectados por *Haemonchus contortus*

Piracicaba

2021

CAMILA DE MIRANDA E SILVA CHAVES

Dieta proteica e transcriptômica de tecidos associados à resposta imune de ovinos infectados por *Haemonchus contortus*

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Helder Louvandini

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Piracicaba

2021

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Chaves, Camila de Miranda e Silva

Dieta proteica e transcriptômica de tecidos associados à resposta imune de ovinos infectados por *Haemonchus contortus* / Camila de Miranda e Silva Chaves; orientador Helder Louvandini, co-orientador Alessandro Francisco Talamini do Amarante. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

149 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

1. Expressão gênica 2. Imunidade 3. Nematóides 4. Nutrição animal 5. Parasitologia veterinária 6. Sequenciamento genético I. Título

CDU (591.53 + 575.111) : 576.89

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 201

À todos os estudantes e cientistas, por sua coragem, força e resiliência.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo por proporcionar a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pela oportunidade de dar minha contribuição à ciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo Fapesp 2017/18086-0) pela bolsa de doutorado que proporcionou minha moradia e subsistência na cidade de Piracicaba.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - Código de Financiamento 001, por três bolsas de estudo no início do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste projeto (Processo N. 420373/2016-0).

Aos meus amados pais, José Vilemar e Ormindia, por sua garra e determinação em me proporcionar boa educação, que aceitam todos os meus objetivos de bom grado e rezam pelo meu sucesso, me apoiam e incentivam incansavelmente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Helder Louvandini pela oportunidade de trabalhar em sua equipe, pela paciência, por todos os ensinamentos e pela inestimável orientação ao longo do trabalho que contribuíram para meu crescimento profissional e aprendizado ético e científico.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante pela atenção, afabilidade, por toda a inestimável colaboração ao trabalho e por seus ímpares ensinamentos em parasitologia.

Ao Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla, pelo apoio, pela generosidade e colaboração em todo o trabalho e por todos os ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Tsai Sui Mui por sua atenção e toda a colaboração para a realização deste trabalho. Assim como ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular por fornecer estrutura e uso de equipamentos para extrações de RNA, e aos técnicos Fábio e Vagner por toda a atenção.

À Dra. Patrícia Louvandini por seus ensinamentos nas técnicas genômicas, sempre tão afável e com tanta atenção.

À Prof^a. Dr^a. Luciana Morita Katiki do Instituto de Zootecnia (Nova Odessa) por todo o apoio, ensinamentos e pela generosidade e gentileza na doação de larvas de *Haemonchus contortus* para o experimento.

Ao Dr. Ricardo Lopes Dias da Costa, querido orientador do mestrado, que não somente fez a ponte para eu chegar ao doutorado, mas continua a ser uma fonte de ensinamentos e um porto seguro de seus ex-alunos.

Aos queridos colegas de equipe Adibe Filho, Alessandra Romero, Alyce Santos, Ana Maria Krüger, Beatriz Bizzuti, Carolina Jimenez, Egon Ieda, Emiliana Romagnoli, Felipe Ortiz, Gabriel Sakita, Lumena Takahashi, Murilo Fernandes, Paula Henriques, Paulo Lima, Simón Marquez, Thiago Bompadre, Vagner Ovani e Wilian da Costa, cuja contribuição intelectual e física foi fundamental e sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho. E minha gratidão principalmente pelo respaldo e cuidado durante os períodos mais estressantes e pelas deliciosas horas de convivência, nossa amizade fez muita diferença durante este doutorado.

Aos meus melhores e grandes amigos Caroline David, Edilson Isidio Júnior, Everton Araújo, Mayara Gomes, Mayra Pereira, Renan e Renato Valença, por sua amizade e por serem meus grandes incentivadores.

À Ana Claudia Albuquerque, doutoranda do Departamento de Parasitologia da Unesp, pelo auxílio nas técnicas de ELISA e medição de endoparasitos.

Ao Laboratório de Radioisótopos e à Prof^a. Dra. Elisabete Fernandes, aos técnicos Adriana Fogaça, Cláudio Gonzaga e Márcio Bacchi, e aos colegas Gabriele, Fernanda, Yuniel, Camila e Gustavo.

Ao Laboratório de Melhoramento de Plantas e aos técnicos Felipe Campana e Vlamir por todo o apoio e por terem cedido o uso de equipamentos.

Ao Centro de Genômica Funcional da Esalq e à técnica Marcela por toda a atenção na análise transcriptômica.

Ao colega Tiago Paim pela organização e análise bioinformática de dados da análise transcriptômica.

Aos técnicos e funcionários do Lana/CENA – USP.

Aos caros estagiários Alexandra Costa, Ana Júlia Campos, Arthur Pereira, Clara Quiróz, Felipe Silva, Frederico Silva, Gabriela Assalin, Gabriela Oliveira, Igor Lima, Isabela Brasil, Isabela Moraes, Luan Horta, Mayara Ikeda, Monique Mendonça, Pedro Andrade, Rafael Cesar, Rafaela Torresan, Rebeca Zen, Victor Nakaguchi, Victor Burjato, Virgílio Esteves, Yasmin Jaber e Weidy Alves por toda a ajuda no período de campo e nas análises laboratoriais realizadas com tanta atenção e cuidado.

Aos estagiários de pré-iniciação científica João Pedro Bortoleto, Gabriel Stefani, Jhonatan Valeriano, Nicolas Diehl e Renan Cunha por toda a ajuda no período de campo que representou uma imensa colaboração para o trabalho.

À Prof^a Dr^a Silvia Maria Guerra Molina, que realiza um lindo trabalho voluntário com os grupos de vivência terapêutica na Esalq, por ter me proporcionado um enorme auto-conhecimento, paz e contribuição para a minha saúde emocional durante todo o doutorado.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho e da concretização de meu sonho. É para mim um dever, mas, sobretudo, uma honra poder expressar minha sincera gratidão!

“Só um sentido de invenção e uma necessidade intensa de criar levam o homem a revoltar-se, a descobrir e a descobrir-se com lucidez”.

Pablo Picasso

RESUMO

CHAVES, Camila de Miranda e Silva. **Dieta proteica e transcriptômica de tecidos associados à resposta imune de ovinos infectados por *Haemonchus contortus***. 2021. 149 f. Tese (Doutorado em ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da proteína da dieta no desempenho animal, digestibilidade da dieta, produção de metano entérico, balanço de nitrogênio, perfil hematológico e bioquímico, detecção de Imunoglobulina G, contagem de ovos por grama de fezes (OPG), rendimento de carcaça e transcriptoma do linfonodo, em ovinos infectados artificialmente com *Haemonchus contortus*. Foram utilizados 32 cordeiros da raça Santa Inês, divididos em dois tipos de dieta (baixo teor com 12% e alto teor com 19% de proteína bruta) e dois estados sanitários (com e sem infecção por *H. contortus*), formando quatro tratamentos: alta proteína controle (AC, n=7), baixa proteína controle (BC, n=7), alta proteína infectado com *H. contortus* (AI, n=9) e baixa proteína infectado com *H. contortus* (BI, n=9), com efeito sexo testado. O experimento foi conduzido durante 89 dias. A infecção artificial com 10.000 larvas infectantes de *H. contortus* foi realizada 34 dias após o início do fornecimento das dietas. Decorridos 42 dias da infecção, 24 animais foram abatidos para obtenção dos tecidos para análise histomorfométrica do abomaso, contagem e mensuração de endoparasitos presentes no abomaso. Uma análise transcriptômica foi realizada utilizando 19 amostras de linfonodo abomasal dos ovinos. Nos resultados obtidos o tratamento AC apresentou maiores consumo de MS e consumo/PC^{0,75}, e o AI apresentou os menores valores ($P < 0,05$). Não houve diferença em peso vivo inicial, peso vivo final, ganho médio diário em peso (GMDP) e ganho total em peso (GTP) ($P > 0,05$) durante o período de desempenho pós infecção. A digestibilidade de PB foi maior para os animais AI em relação aos BI ($P = 0,0007$). A produção de metano entérico (g dia^{-1}) foi maior nos animais BI ($P < 0,05$). Os derivados de purinas na urina foram maiores nos animais controles quando comparados aos infectados. O nitrogênio consumido e retido foram maiores nos animais de alta proteína ($P < 0,05$), e os animais AC apresentaram maior valor para nitrogênio excretado quando comparados aos AI ($P < 0,05$). No hemograma e bioquímica sérica, os animais BI foram os mais afetados com valores mais baixos em comparação aos demais ($P < 0,05$). A contagem de OPG não foi diferente entre os tratamentos mas a média foi maior nos ovinos machos do que nas fêmeas. Não houve diferença no estabelecimento da infecção e contagem de endoparasitos presentes no abomaso. Nos resultados da análise histomorfométrica do abomaso os animais com baixa proteína apresentaram mucosa mais espessa quando comparados aos animais com alta proteína ($P < 0,05$). Os valores de IgG no sangue não diferiram. Um total de 95 e 75 genes foram diferencialmente expressos entre animais alimentados com alta e baixa proteína na dieta, e animais controles e infectados com *H. contortus*, respectivamente. Em conclusão, o alto teor de proteína da dieta conferiu a expressão de genes do sistema imune e permitiu aos cordeiros expressarem resiliência frente a infecção por *H. contortus*.

Palavras-chave: Cordeiro. Genes diferencialmente expressos. Hemoncose. Illumina. L₃. RNA mensageiro. Nutrigenômica. Ontologia genética. Resposta imune. RNA-Seq. Sequenciamento de nova geração. Transcriptoma. Verminose.

ABSTRACT

CHAVES, Camila de Miranda e Silva. **Proteic diet and transcriptomic associated with immune response of infected sheep tissues by *Haemonchus contortus***. 2021. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

The aim of this work was to evaluate the effects of dietary protein on animal performance, diet digestibility, enteric methane production, nitrogen balance, hematological and biochemical profile, IgG detection, faecal egg counts (FEC), carcass yield and lymph node transcriptome for sheep artificially infected with *Haemonchus contortus*. Thirty-two Santa Ines lambs, randomly distributed in two diets (low content with 12% and high content with 19% of crude protein) and two different conditions (with and without *H. contortus* infection), leading to four treatments: high protein control (HC, n = 7), low protein control (LC, n = 7), high protein infected with *H. contortus* (HI, n = 9) and low protein infected with *H. contortus* (LI, n = 9), with sex effect tested. The experiment was carried out for 89 days. The artificial infection composed by 10,000 infectious larvae of *H. contortus* was taken 34 days after diets introduction beginning. After 42 days of infection, 24 animals were slaughtered to obtain tissues samples for abomasum histomorphometric analysis, also count and measurement of endoparasites present in abomasum. Transcriptomic analysis was performed using 19 samples of sheep's abomasal lymph node. For the results obtained, the HC lambs showed the highest consumption of dry matter and metabolic weight, and the HI presented the lowest values ($P < 0.05$). The treatments showed no difference in initial live weight, final live weight, average daily weight gain (ADG) and total weight gain (TG) ($P > 0.05$) during the post infection performance period. The CP digestibility was higher for HI animals compared to LI ($P = 0.0007$). The enteric methane production (g day^{-1}) was higher for LI lambs ($P < 0,05$). Purine derivatives in urine were higher for control animals when compared to infected ones. The nitrogen consumed and retained was higher for high protein fed lambs ($P < 0.05$), and the HC lambs showed higher value for excreted nitrogen when compared to HI ($P < 0.05$). In the blood count, the LI treatment was the most affected with lower values compared to the others, mainly for packed cell volume, red blood cells, haemoglobin and platelet values ($P < 0.05$). In serum biochemistry parameters, the LI lambs were the most affected with lower values for total proteins and albumin ($P < 0.05$). The FEC was not different among treatments, but the average was higher for male than female sheep. There was no difference for the establishment of infection and count of endoparasites presents in the abomasum. For histomorphometric analysis of the abomasum, treatments with low protein showed thicker mucosa when compared to treatments with high protein ($P < 0.05$). Blood IgG values did not differ. A total of 95 and 75 genes were differently expressed between animals fed with high and low protein diet, and control animals and infected with *H. contortus*, respectively, as response to primary infection. Therefore, the high protein level of the diet promoted the immune system genes expression and allowed lambs resilience express during *H. contortus* infection.

Keywords: Differentially expressed genes. Gene ontology. Haemonchosis. Illumina. Immunology. Lamb. L₃. mRNA. Next-generation sequencing. Nutrigenomic. RNA-Seq. Transcriptome. Worms.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Linha do tempo com n amostral e dias de cada experimento realizado com cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção artificial por *H. contortus*57
- Figura 2 – Consumo de matéria seca (MS) de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus* durante ensaio de desempenho 70
- Figura 3 – Evolução do peso corporal (médias \pm DP) em cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*. Letras diferentes representam diferença a 5% de significância 71
- Figura 4 – Perfil hematológico de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*. NS = não significativo ($P > 0,05$)..... 74
- Figura 5 – Percentual de células da fração leucocitária de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*. NS = não significativo ($P > 0,05$) 75
- Figura 6 – Perfil da bioquímica sérica do sangue de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*. NS = não significativo ($P > 0,05$) 77
- Figura 7 – Médias \pm desvio padrão das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta e infectados por *Haemonchus contortus* 85
- Figura 8 – Estrutura histológica do abomaso de cordeiro. Lúmen (L), epitélio (E), glândula (G), lâmina própria (LP), camada de mucosa (M), camada submucosa (SM), muscular da mucosa (MM), H&E. Barra = 100 μ m 111
- Figura 9 – Grid contendo pontos e arcos ciclóides para cálculo da densidade de superfície da mucosa (Sv) e volume da mucosa (Vv)..... 111
- Figura 10 – Estrutura histológica do abomaso de cordeiro. Lúmen (L), epitélio (E), glândula (G), lâmina própria (LP), camada de mucosa (M), camada submucosa (SM), muscular da mucosa (MM), H&E. Barra = 100 μ m 111
- Figura 11 – Detecção de IgG (% Densidade óptica) no soro sanguíneo de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*. NS = não significativo ($P > 0,05$)..... 112
- Figura 12 – Resultados da análise de transcritos com alta e baixa expressão em cordeiros alimentados com dieta de alto versus dieta de baixo teor de proteína 116

Figura 13 – Resultados da análise de transcritos com alta e baixa expressão em cordeiros com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	117
Figura 14 – Árvore da categorização de genes em cordeiros alimentados com dieta de alto versus dieta de baixo teor de proteína.....	118
Figura 15 – Árvore de categorização de genes em cordeiros com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento experimental de cordeiros Santa Inês alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção com <i>H. contortus</i>	58
Tabela 2 – Proporção dos ingredientes e composição bromatológica com base na matéria seca a 100 °C das dietas de baixa (12%) e alta (19%) proteína	59
Tabela 3 – Abate de cordeiros Santa Inês alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção com <i>H. contortus</i>	65
Tabela 4 – Consumo de matéria seca (MS), consumo de MS em relação ao peso metabólico (CMS g kg ⁻¹ PC ^{0,75}) e peso corporal de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i> durante ensaio de desempenho (período pós-infecção artificial).....	69
Tabela 5 – Hemograma e leucograma de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i> (período pós-infecção artificial)	73
Tabela 6 – Bioquímica sérica do sangue de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i> (período pós-infecção artificial)	76
Tabela 7 – Produção de metano entérico (CH ₄) e consumo de matéria seca (MS) de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	78
Tabela 8 – Digestibilidade aparente da dieta em cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	80
Tabela 9 – Estimativa da síntese de proteína microbiana por derivados de purina da urina de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	82
Tabela 10 – Balanço de nitrogênio (N) de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	82
Tabela 11 – Rendimento de carcaça de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	84
Tabela 12 – Coloração da carne de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	84
Tabela 13 – Média ± desvio padrão da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), do número de endoparasitos machos, fêmeas e total, do comprimento de endoparasitos machos e fêmeas, do número de ovos por fêmea e do estabelecimento da infecção parasitária por <i>Haemonchus contortus</i> em cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta.....	86

Tabela 14 – Análise histomorfométrica do abomaso de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	110
Tabela 15 – Detecção de imunoglobulinas IgG pela técnica de ELISA no soro sanguíneo de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	113
Tabela 16 – Controle de qualidade, limpeza e mapeamento das reads em linfonodo de cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta, com e sem infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	115
Tabela 17 – Vias regulatórias diferencialmente expressas em cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta	130
Tabela 18 – Vias regulatórias diferencialmente expressas em cordeiros livres de endoparasitos e infectados com <i>Haemonchus contortus</i>	133
Tabela 19 – Genes com baixa expressão, localização e esembl gene ID em linfonodo de cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta.....	135
Tabela 20 – Genes com alta expressão, localização e esembl gene ID em linfonodo de cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta	138
Tabela 21 – Genes com baixa expressão, localização e esembl gene ID em linfonodo de cordeiros livres de endoparasitos e infectados com <i>Haemonchus contortus</i>	140
Tabela 22 – Genes com alta expressão, localização e esembl gene ID em linfonodo de cordeiros livres de endoparasitos e infectados com <i>Haemonchus contortus</i>	141
Tabela 23 – Genes com baixa expressão diferencialmente expressos em linfonodo de cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta	144
Tabela 24 – Genes com alta expressão diferencialmente expressos em cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta	146
Tabela 25 – Genes com baixa expressão diferencialmente expressos em cordeiros livres de endoparasitos e infectados com <i>Haemonchus contortus</i>	147
Tabela 26 – Genes com alta expressão diferencialmente expressos em cordeiros livres de endoparasitos e infectados com <i>Haemonchus contortus</i>	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Tratamento experimental: Alta Controle (sem infecção)
AI	Tratamento experimental: Alta Infectado com <i>H. contortus</i>
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
AOL	Área de olho de lombo
BC	Tratamento experimental: Baixa Controle (sem infecção)
BI	Tratamento experimental: Baixa Infectado com <i>H. contortus</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CH ₄	Metano
cm	Centímetro
Consumo/PC ^{0,75}	Consumo por peso metabólico
DA	Digestibilidade aparente
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DP	Desvio padrão
EE	Extrato etéreo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPM	Erro padrão da média
ESALQ	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
FC	Fator de correção
FD	Fator de diluição
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
fL	Fentolitro
GMDP	Ganho médio diário em peso
GTP	Ganho total em peso
g	Força gravitacional
g	Grama
g kg ⁻¹	Grama por kilograma
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
h	Hora
IAEA	International Atomic Energy Agency
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgA, D, E, G, M	Imunoglobulinas A, D, E, G e M
IL	Interleucina
INF	Interferon
kg	Kilograma
LANA	Laboratório de Nutrição Animal
L	Litro
L1, L2, L3, L4, L5	1 ^o , 2 ^o , 3 ^o , 4 ^o e 5 ^o estádios larvais de <i>Haemonchus contortus</i>
m	Metro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDP	Concentração do metabólito derivado de purina
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
M	Molar
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
mmol	Milimol
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
NGI	Nematódeos gastrintestinais
NH ₄ H ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de amônio
NM	Nitrogênio microbiano
nm	Nanômetro
NRC	National Research Council
NS	Não significativo
OPG	Contagem de ovos por grama de fezes
P	Probabilidade de significância
PB	Proteína bruta
pc	Picograma
PCF	Peso de carcaça fria
PCQ	Peso de carcaça quente
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PPR	Perdas por resfriamento
RCF	Rendimento de carcaça fria
RCQ	Rendimento de carcaça quente
RNA	Ácido ribonucleico
SAS	Statistical Analysis System
TGI	Trato gastrintestinal
TNF	Fator de necrose tumoral
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume corpuscular médio
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
µmol	Micromol

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
♀	Fêmea
♂	Macho

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Hipóteses	26
1.2 Objetivos	27
1.2.1 Objetivos específicos	27
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 Ovinocultura no Brasil	28
2.2 Parasitologia	29
2.2.1 Nematódeos gastrintestinais em ovinos	29
2.2.2 Ciclo evolutivo	31
2.2.3 Fisiopatologia e efeitos do parasitismo	31
2.2.4 Resistência parasitária aos antihelmínticos	33
2.3 Imunologia	34
2.3.1 Resposta imune do hospedeiro ovino durante a infecção	34
2.3.2 Nutrição versus resposta imune	38
2.4 Genômica	40
2.4.1 Genética molecular	40
2.4.2 Transcriptômica	41
2.4.3 Sequenciamento de RNA mensageiro (RNA-Seq)	42
2.4.4 Nutrigenômica	43
2.4.5 Expressão gênica do hospedeiro durante a infecção	44
Referências	46
3 DESEMPENHO, DIGESTIBILIDADE APARENTE DA DIETA, BALANÇO DE NITROGÊNIO E EMISSÃO DE METANO EM CORDEIROS ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA E INFECTADOS COM <i>Haemonchus contortus</i>	54
3.1 Introdução	56
3.2 Material e Métodos	56
3.2.1 Ensaio de desempenho animal	56
3.2.2 Perfil hematológico, leucocitário e bioquímico	60
3.2.3 Pesagem dos cordeiros e exame de fezes	60

3.2.4 Ensaio de produção de metano entérico	60
3.2.5 Ensaio de digestibilidade aparente das dietas	61
3.2.6 Estimativa da síntese de proteína microbiana por derivados de purina da urina	62
3.2.7 Balanço de nitrogênio.....	64
3.2.8 Abate e necropsia parasitológica	65
3.2.9 Rendimento de carcaça e coloração da carne	65
3.2.10 Endoparasitos	66
3.2.11 Análise estatística	67
3.3 Resultados	67
3.3.1 Desempenho animal	67
3.3.2 Perfil hematológico, leucocitário e bioquímico	71
3.3.3 Produção de metano entérico	77
3.3.4 Digestibilidade aparente das dietas	79
3.3.5 Estimativa da síntese de proteína microbiana por derivados de purina e balanço de nitrogênio.....	81
3.3.6 Rendimento de carcaça e coloração da carne	83
3.3.7 Endoparasitos	85
3.4 Discussão	87
3.5 Conclusão	93
Referências.....	93
4 HISTOMORFOMETRIA DE ABOMASO E TRANSCRIPTÔMICA DE LINFONODOS DE OVINOS INFECTADOS POR <i>Haemonchus contortus</i> E ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA NA DIETA	99
4.1 Introdução	101
4.2 Material e Métodos.....	101
4.2.1 Animais	102
4.2.2 Análise histomorfométrica da mucosa do abomaso	102
4.2.3 Ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA) para detecção de IgG específica para <i>H. contortus</i>	104
4.2.4 Análise transcriptômica	104
4.2.5 Análise estatística	108

4.3 Resultados	108
4.3.1 Análise histomorfométrica da mucosa do abomaso	108
4.3.2 Ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA) para detecção de imunoglobulinas IgG	112
4.3.3 Análise transcriptômica do linfonodo	114
4.4 Discussão	119
4.5 Conclusão	124
Referências.....	124
Apêndice A – Vias Regulatórias e Genes Diferencialmente Expressos.....	130

1 INTRODUÇÃO

O pecuarista enfrenta a problemática das verminoses nos rebanhos ovinos mundialmente, principalmente dos nematódeos gastrintestinais (NGI), que são responsáveis por representativas perdas do desenvolvimento animal, causam anemia, redução de ganho em peso, da qualidade de carne e lã e, em casos graves, pode levar o animal ao óbito.

A ordem Strongylida e a família Trichostrongylidae constituem os principais NGI que parasitam ovinos, sendo *Haemonchus contortus* parasita do abomaso, um dos mais importantes, que geralmente ocorre simultaneamente com outros endoparasitos acometendo os ovinos em infecções mistas (Monteiro, 2010a).

O pasto representa a principal fonte de infecção parasitária, o que possibilita a persistência no ambiente de larvas infectantes oriundas de ovos das fezes contaminadas, já que esta cobertura promove proteção contra a radiação solar e alto teor de umidade, causando infecções recorrentes nos animais mantidos em sistema de pastejo, sendo este o mais usual nas condições brasileiras, tornando-se um dos pontos críticos do manejo sanitário do rebanho (Cavalcante et al., 2005; Sotomaior et al., 2007; Pegoraro et al., 2008).

O uso de anti-helmínticos é o método mais difundido mundialmente na tentativa de controlar as verminoses. Entretanto a utilização contínua, indiscriminada e incorreta de esquemas de tratamento, culmina na eliminação dos endoparasitos mais sensíveis e seleciona dos endoparasitos mais resistentes (Costa et al., 2017). Consequentemente, os endoparasitos vêm avançando sua resistência a diversos grupos de princípios ativos, dificultando o controle e tratamento das endoparasitoses (McManus et al., 2014; Costa et al., 2017).

A seleção de populações de endoparasitos resistentes aos antiparasitários é um problema global e há relatos de resistência anti-helmíntica a praticamente todos os grupos químicos de anti-helmínticos (Kaplan; Vidyashankar, 2012), como ocorre frequentemente nas regiões tropicais e subtropicais da América Latina (Thomaz-Soccol, 2004; Costa et al., 2017; Silva et al., 2017).

O panorama mostra que este é um método pouco sustentável que apresenta falhas e, aliado a procura pela redução de resíduos químicos nos produtos de origem animal e no ambiente (Amarante, 2014), há que se buscar novos métodos para o controle parasitário ovino (Molento et al., 2013).

Embora se tenha avançado no entendimento sobre a biologia molecular e fisiológica dos ovinos, o conhecimento dos mecanismos cruciais que regulam a resistência/resiliência dos ruminantes aos endoparasitos, e a identificação precisa de genes que podem estar relacionados, ainda é escasso (Cánovas et al., 2014). Elucidar os mecanismos de regulação da resistência a endoparasitos pode fornecer caminhos para melhor compreender a problemática das verminoses e para garantir a saúde e o bem-estar dos rebanhos.

Como a nutrição apresenta grande impacto na saúde do animal, uma das alternativas para o controle de endoparasitos nos ovinos é o manejo alimentar, uma vez que os nutrientes presentes na dieta podem ter grande influência sobre o sistema imunológico, podendo também determinar o grau de infecção dos ovinos, principalmente o teor proteico (Louvandini et al., 2006). Abordagens alternativas incluem o desenvolvimento de populações geneticamente resistentes de ovinos pela identificação de genes de relevância biológica para a resposta imune do hospedeiro e potencialmente a resistência aos endoparasitos (Wilkie et al., 2017).

A nutrigenômica é a área do conhecimento que foca nas interações entre nutrientes e genoma, ou seja, como os nutrientes podem influenciar o funcionamento do genoma e como as diferenças genéticas podem impactar a resposta individual aos nutrientes. Isto é possível por meio de técnicas de última geração, como sequenciamento de genomas, análise e elucidação dos mecanismos de regulação gênica, análises de interações ambientais e epigenéticas (Tirapegui, 2013).

1.1 Hipóteses

A hipótese deste trabalho é que o teor de proteína fornecido na dieta altera a expressão de alguns genes relacionados à resposta imune, de forma a estimular a resposta imune contra endoparasitos. A utilização de manejo baseado no estudo da nutrigenômica é uma alternativa ao uso de anti-helmínticos, visto que os endoparasitos apresentam cada vez mais resistência aos medicamentos e há escassez de novos princípios ativos eficazes contra os endoparasitos resistentes.

1.2 Objetivos

Objetivou-se com este trabalho verificar se a dieta proteica altera os níveis de expressão de genes do sistema imune, que possam estar relacionados a maior resiliência à infecção por *Haemonchus contortus* em ovinos.

1.2.1 Objetivos específicos

Avaliação dos efeitos de dois teores de proteína na dieta e infecção por *H. contortus* sobre parâmetros zootécnicos de ovinos em crescimento por meio da avaliação de consumo de matéria seca, digestibilidade aparente das dietas, síntese de proteína microbiana, balanço de nitrogênio na urina, ganho em peso, rendimento de carcaça, produção de metano entérico, contagem de ovos por grama de fezes, perfil hematológico, leucocitário e bioquímico.

Avaliação da resposta imune adaptativa contra *H. contortus* com base nos níveis séricos de IgG anti-*Haemonchus*; carga parasitária total, desenvolvimento e fecundidade dos endoparasitas e análise histomorfométrica da mucosa do abomaso.

Avaliação dos efeitos das dietas e da infecção por *H. contortus* na expressão e quantificação de genes relacionados ao sistema imune através de análise transcriptômica de linfonodos de ovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovinocultura no Brasil

O Brasil possui um rebanho ovino de aproximadamente 18,94 milhões de cabeças, que estão concentradas principalmente entre os Estados da Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Sul (IBGE, 2018).

A demanda interna de carne de cordeiro tem crescido e passou a ser valorizada em alta gastronomia, obrigando o Brasil a importar carne ovina de países como Argentina e Uruguai (Viana, 2008). Deste modo, a carne antes vista como um subproduto devido à produção de lã, torna-se protagonista e considerada sofisticada (Alves et al., 2017).

Raças comerciais como Dorper, Ile de France, Suffolk e Texel, que apresentam maiores rendimento de carcaça e ganho em peso foram então introduzidas no Brasil para suprir a demanda comercial, entretanto, essas são raças mais sensíveis a infecções por nematódeos gastrintestinais quando comparadas às raças brasileiras (Amarante et al., 2009; Amarante, 2014).

A criação de ovinos está mudando e sendo cada vez mais tecnicizada. Como a pecuária constitui um elemento de forte expressão para a economia nacional, a ovinocultura apresenta potencial de exploração quando comparada a bovinos devido ao dócil temperamento e facilidade de lida, a criação não necessita de extensas áreas e as fêmeas apresentam período gestacional mais curto, assim os rebanhos ovinos proporcionam altas taxas de desfrute e uma elevada produção de carne por hectare ano (Lino; Pinheiro; Ortunho, 2016).

Países que assim como o Brasil estão em zonas tropicais e subtropicais, se destacam na agropecuária por suas características geoclimáticas, propícias ao desenvolvimento de atividades pecuárias e agrícolas. A criação de ovinos reduz o custo de produção de pequenas áreas e traz oportunidades para o país, pois, além da demanda interna, o mercado de exportação de carne ovina ocorre principalmente nos países árabes e asiáticos, como a China, que não consegue atender sua demanda interna (Sorio, 2017).

2.2 Parasitologia

Além de condições favoráveis para a produção agrícola e pecuária, os climas tropicais e subtropicais promovem condições adequadas para o desenvolvimento e sobrevivência dos nematódeos gastrintestinais que comprometem negativamente o estado sanitário dos ovinos. Além de prejuízos econômicos com tratamentos anti-helmínticos e manejo das pastagens, há prejuízos indiretos com a perda em peso, queda de fertilidade e mortalidade dos animais parasitados (Roberto et al., 2018).

Ovinos mantidos em pasto geralmente apresentam infecções mistas de endoparasitos, cuja ocorrência pode variar de acordo com a região. O abomaso pode ser parasitado pelos nematódeos *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus axei*, o intestino delgado pelo *Bunostomum trigonocephalum*, *Cooperia* spp., *Strongyloides papillosus* e *Trichostrongylus colubriformis*, e o intestino grosso por *Oesophagostomum columbianum*, *Skjabinema* spp., *Trichuris* spp. e *Trichuris globulosa* (Andriola et al., 2011). *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* são os helmintos que mais acometem os ovinos no Brasil (Amarante et al., 2009), apresentando elevada prevalência associada à forte patogenicidade (Monteiro, 2010b).

2.2.1 Nematódeos gastrintestinais em ovinos

O filo Nematelminthes possui seis classes, entretanto apenas a Nematoda contém vermes de relevância parasitária (Urquhart et al., 1996). Nematódeos são cilíndricos com extremidades afiladas, possuem boca, cavidade corporal e ânus. Seu tamanho pode variar de um milímetro até 8 metros de comprimento. Os gêneros geralmente apresentam dimorfismo sexual, são ovíparos e a infecção ocorre pela ingestão de L3 (Monteiro, 2010b).

Nematódeos possuem simetria bilateral (Monteiro, 2010b) e a cavidade corpórea (pseudoceloma) é relativamente grande e repleta por líquido sob alta pressão que pode variar uma atmosfera e meia daquela do ambiente externo. O pseudoceloma mantém a forma e turgidez do corpo e é onde estão suspensos os órgãos em sua maioria filamentosos (Bowman, 2010).

Localizada abaixo da cutícula, a hipoderme contém glicogênio, lipídeos e mitocôndrias. Logo abaixo, estão as fibras musculares que contém musculatura lisa e segmentada (Monteiro, 2010b). A musculatura se organiza de forma longitudinal, já que nematódeos não possuem musculatura circular, e se dividem em faces dorsais e ventrais por expansões laterais da hipoderme (Bowman, 2010). Para locomover-se os vermes contraem e relaxam a musculatura da face dorsal em alternância com a face ventral (Urquhart et al., 1996).

O sistema digestivo é completo contendo boca, vestíbulo oral, esôfago, faringe, intestino e ânus (Monteiro, 2010a). Os vermes podem ter um simples orifício com dois ou três lábios que terminam diretamente no esôfago ou possuir uma cápsula bucal que pode conter dentes (Urquhart et al., 1996).

Nematódeos geralmente apresentam sexos separados com órgãos sexuais que ficam livres no pseudoceloma. Os machos são menores que as fêmeas de mesma espécie. Os ovos da classe Nematoda apresentam muitas formas: ovais, redondos, subglobulares, formato de bastão, superfície lisa ou rugosa, lados diferentes ou filamentos. Comumente apresentam superfície lisa, são larvados e podem ser operculados ou bioperculados (apresentam proeminências nas extremidades) (Monteiro, 2010a).

A ordem Strongylidae é formada por quatro superfamílias: Ancylostomatoidea, Metastrongyloidea, Strongyloidea, e Trichostrongyloidea, esta última que agrupa endoparasitos capiliformes do abomaso e intestino delgado de ruminantes. Dentre os nematódeos gastrintestinais que acometem ovinos, *Haemonchus contortus* é um dos mais importantes, pois apresenta alta prevalência associada a forte patogenicidade (Monteiro, 2010b).

O gênero *Haemonchus* (pronúncia: Emôncus) tem como hospedeiros os ovinos, caprinos e bovinos. *Haemonchus contortus* é considerado o principal endoparasito da família Trichostrongylidae e é também conhecido como verme do bastão de barbeiro (Taylor; Coop; Wall, 2017). Por ser hematófago, possui uma lanceta bucal em sua extremidade anterior para sucção de sangue do hospedeiro e papilas cervicais que são projeções laterais da cutícula (Ueno; Gonçalves, 1998).

O helminto macho possui de 10 a 20 mm e possui bolsa copuladora localizada no final do corpo, com a presença de gubernáculo e dois espículos curtos em forma de cunha. A fêmea apresenta de 18 a 30 mm, no terço posterior localiza-se o apêndice vulvar; o útero é branco e repleto de ovos formando uma espiral em

torno do intestino repleto de sangue (Bowman, 2010). Os ovos são morulados (casca dupla e fina), apresentam tamanho médio de 74 μm x 44 μm , com formato de barril e numerosos blastômeros. As larvas infectantes contêm 16 células, extremidade anterior estreita e arredondada (Monteiro, 2010b).

2.2.2 Ciclo evolutivo

O ciclo evolutivo do *H. contortus* é direto (monoxeno), comumente não migratório. As fêmeas são ovíparas prolíferas. A infecção ocorre durante o pastejo quando o animal ingere larvas infectantes (L3) dos helmintos provenientes dos ovos que foram eliminados por ovino contaminado. Quando no ambiente há condições favoráveis de temperatura (18° a 30° C) e umidade (80 a 100%) ocorre o desenvolvimento dos estádios larvais: a larva de primeiro estágio (L1) eclode do ovo e evolui para o segundo (L2) e terceiro estádios (L3), que ocorrem no interior do bolo fecal no ambiente em período de cinco dias, fases em que se alimentam de microrganismos e matéria orgânica. No rúmen ocorre o desembainhamento da larva, e no interior das glândulas gástricas do abomaso esta evolui para larva de quarto estágio (L4) quando desenvolve a lanceta perfurante que lhes permite a obtenção do sangue dos vasos da mucosa, e ocorre então a última muda para o quinto estágio (L5). Ao tornar-se adulto, o nematódeo move-se livremente pela mucosa do abomaso, passa a se reproduzir e a produzir ovos. Estima-se que sua produção diária seja da ordem de 5000 a 10000 ovos (Taylor; Coop; Wall, 2017).

2.2.3 Fisiopatologia e efeitos do parasitismo

H. contortus é hematófago e pode sugar 0,05 mL de sangue do hospedeiro ao dia, provocando lesões na mucosa do abomaso e consequentemente anemia hemorrágica aguda que pode levar à morte, além de edema submandibular, diarreia, anorexia, emagrecimento, hipoproteinemia e redução na produção de leite (Urquhart et al., 1996).

A anemia é, portanto, a principal característica da infecção por *H. contortus*. Os efeitos patogênicos da infecção irão depender da capacidade do hospedeiro em compensar a perda sanguínea. Caso a quantidade de sangue perdida seja pequena

e se houver a completa restituição, a infecção não resultará em enfermidade clínica mensurável. Em uma infecção massiva, situação de nutrição inadequada ou mesmo estresse, se a taxa de perda excede a hematopoiese, uma anemia progressiva pode rapidamente levar a morte (Bowman, 2010).

Durante a infecção por *H. contortus*, ou hemoncose, ocorre uma diminuição de proteínas gerando uma diferença de pressão osmótica que leva ao extravasamento de plasma no interstício na tentativa de recuperação da pressão normal, causando anasarca, ascite e edema submandibular (Birgel, 2013).

Os animais na fase de infecção aguda são então identificados pela presença de edema, que pode apresentar graus variáveis, sendo os mais comuns a ascite e a forma submandibular. Letargia, fezes escuras e queda de lã podem ocorrer. Infecções massivas de até 30.000 endoparasitos, embora menos comuns, podem levar a morte súbita devido à gastrite hemorrágica intensa, o que é conhecido como hemoncose hiperaguda. Durante uma estação seca prolongada quando a pastagem tem déficit de nutrientes e há presença de infecção baixa, pode também ocorrer a síndrome da hemoncose crônica, quando mesmo uma pequena carga persistente de endoparasitos pode evidenciar outros sinais clínicos associados como inapetência, fraqueza e perda em peso (Taylor; Coop; Wall, 2017).

A hemoncose crônica tem forte relevância econômica devido à alta morbidade (indivíduos da mesma população que adquirem a doença) que pode chegar a 100% e uma mortalidade bastante variável de 0,5 a 20% (Monteiro, 2010b).

A necropsia parasitológica é uma possibilidade útil que fornece o real grau de infecção pela observação do abomaso, da medula de ossos longos, da presença de hidrotórax e ascite (Monteiro, 2010b). A mucosa do abomaso apresenta pequenas lesões hemorrágicas com conteúdo líquido marrom escuro devido ao sangue modificado. A carcaça é pálida e edematosa, assim como os linfonodos mesentéricos, e a medula óssea pode apresentar expansão das epífises para a cavidade medular e necrose. Quando da hemoncose aguda, sinais poderão ser observados apenas no abomaso, se o óbito ocorreu rapidamente os sinais na medula serão mínimos (Taylor; Coop; Wall, 2017).

O grau de infecção é considerado leve pela contagem de até 500 endoparasitos, infecção moderada de 500 a 1500 e, maior que 1500, a infecção é considerada intensa (Ueno; Gonçalves, 1998).

2.2.4 Resistência parasitária aos antihelmínticos

Fatores que acabam levando à maior resistência parasitária aos anti-helmínticos incluem doses incorretas, não pesando animais, subestimando o peso vivo e inferindo-o visualmente; alto número de tratamentos anuais que sejam dissociados de técnicas de manejo que auxiliam a diminuição dos endoparasitos; não realizar um rodízio anual dos grupos de anti-helmínticos e não aplicar os de pequeno espectro quando detectada a presença do *H. contortus*; utilizar apenas um princípio ativo nos tratamentos; não realizar quarentena de novos animais; negligenciar os exames laboratoriais antes do tratamento para verificar os animais que realmente necessitam ser tratados e após o tratamento para determinar o anti-helmíntico mais eficaz na propriedade (Amarante, 2014).

Enquanto os anti-helmínticos permanecem no organismo do animal tratado, há que se respeitar um período de carência para o consumo da carne e leite, dependendo do produto comercial e da via de administração. Carne e leite provenientes de animais tratados com closantel podem ser consumidos após 30 dias de carência. Já os tratados com nitroxinil, devem ter período de carência de 60 dias (Amarante, 2014).

Esses químicos também apresentam a desvantagem de deixar resíduos no ambiente, o que pode afetar especialmente comunidades de invertebrados e microrganismos que desempenham papel fundamental no solo e utilizam fezes como alimento, visto que a principal via de excreção dos anti-helmínticos é através das fezes (Amarante, 2014).

A complicação disso é que o desenvolvimento de novos medicamentos é lento e as informações não estão totalmente disponíveis por motivos comerciais. O uso de grupos anti-helmínticos de espectro mais amplo poderia retardar a resistência parasitária contanto que os órgãos regulatórios limitassem o uso em condições de campo pelos pecuaristas, alternando determinados princípios por longos períodos de tempo (Sayers; Sweeney, 2005).

Melo (2005) buscou cepas sensíveis e resistentes aos benzimidazóis no Estado do Ceará, cujas características avaliadas foram patogenicidade, poder infectante, fertilidade das fêmeas, capacidade de seus ovos de se desenvolverem até o estágio infectante L3 e sua sobrevivência em diversas condições. Das duas cepas isoladas, a sensível desenvolveu-se melhor na época de seca (32 °C) e a

cepa resistente desenvolveu-se melhor na época de chuva (23 °C). O autor concluiu que havia influências do genótipo resistente ou sensível aos benzimidazóis e da temperatura sobre as características de vida do *H. contortus*.

Haemonchus spp. foi o gênero predominante após o tratamento com albendazole, cloridrato de levamisol, moxidectina e nitroxylnil em cordeiras Corriedale no estado do Rio Grande do Sul, sendo o nitroxylnil o único efetivamente eficiente contra o gênero (Costa et al., 2018).

2.3 Imunologia

2.3.1 Resposta imune do hospedeiro ovino durante a infecção

A resposta imune é crucial na defesa do organismo e constitui a principal barreira contra infecções disseminadas de agentes patogênicos (Tizard, 2009).

A imunidade adquirida expressa naturalmente influencia significativamente a defesa e o status epidemiológico dos animais contra endoparasitos, o que é desenvolvido a partir de um antígeno produzindo respostas celulares e humorais. Essa estimulação antigênica provavelmente são produtos secretores ou excretores liberados durante o desenvolvimento das larvas do endoparasito (Urquhart et al., 1996).

No trato gastrintestinal (TGI), assim como acontece em outras áreas do organismo, há elementos que formam a primeira linha de defesa, a chamada imunidade inata. O organismo animal é capaz de ativar mecanismos de defesa inata estabelecendo uma cascata de reações denominada inflamação (Tizard, 2009). Primeiramente, há a ação de células fagocíticas. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) são as células da linhagem branca que podem estar aumentadas em determinadas situações. A presença de patógenos ativa também a ação de enzimas que formam o sistema complemento. Assim como o pH do trato gastrintestinal e o epitélio íntegro fazem parte da imunidade inata, que não sendo específica, está sempre pronta para entrar em ação (Greer et al., 2018).

Os macrófagos adjacentes às Placas de Peyer capturam o antígeno que é processado por células apresentadoras de antígenos, as células dendríticas ou macrófagos subepiteliais, e apresentado às células T, no contexto do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe II (McClure; Emmerly, 1994). Após o reconhecimento do antígeno, as células T auxiliares (CD4+) elaboram uma

resposta secretando interleucinas responsáveis por sua própria ativação e pelo estímulo de linfócitos B. Ocorre então a migração dessas células B e T nos linfonodos onde realizam a expansão clonal. Posteriormente à proliferação e diferenciação, os linfócitos B e T de memória se dirigem à lâmina própria do trato gastrointestinal pela corrente sanguínea e linfática (Tizard, 2009).

Os nematódeos, e outros endoparasitos extracelulares, induzem uma resposta mediada por linfócitos T auxiliares do tipo 2 (linfócitos Th2) dependente de anticorpos. A resistência contra os nematódeos depende da capacidade do hospedeiro em reconhecer o endoparasito e elaborar uma resposta imunológica protetora eficiente. Citocinas são produzidas por células Th2 que estimularão a proliferação de outras células inflamatórias, como eosinófilos e mastócitos, e também estimularão a produção de imunoglobulinas contra os endoparasitos. Algumas proteínas, como as lectinas (intelectinas e galectinas) também formam parte da resposta contra os nematódeos gastrintestinais, além da produção de muco (Wilkie et al., 2017).

Durante o estágio larval infeccioso do gênero *Haemonchus* spp., o acúmulo de leucócitos deve ocorrer, o que pode levar à rejeição do endoparasito no epitélio do trato gastrointestinal. O benefício de uma rápida expulsão mediada pelas células do epitélio é que não há resposta inflamatória no tecido infectado do animal. Entretanto, algumas larvas infectantes permanecem no tecido e podem produzir uma resposta inflamatória caracterizada pela presença de eosinófilos e citocinas Th2 (Meeusen et al., 2005). É nesta fase que a maioria dos hospedeiros passam a apresentar resistência à reinfeção (Gasbarre et al., 2001).

A presença e o tipo de infiltrado celular no local da infecção podem indicar os mecanismos envolvidos na defesa. Em ovinos, mastócitos e eosinófilos estão relacionados a resposta imunológica e expulsão de endoparasitos da espécie *H. contortus* (Balic et al., 2000), sendo ativados no abomaso durante a infecção primária (Balic et al., 2002). Ovinos que apresentam resistência ao *H. contortus* podem apresentar altas contagens de mastócitos e eosinófilos na mucosa do abomaso (Gill et al., 2000).

A atração de células que efetuam a fagocitose de patógenos e promovem a liberação de mediadores inflamatórios é realizada por estruturas glicoproteicas denominadas anticorpos, que são secretados pelos linfócitos B. Os anticorpos estão organizados na classe das imunoglobulinas e são de cinco tipos distintos: IgA, IgD,

IgE, IgG e IgM. Via corrente sanguínea e secreções da mucosa, os anticorpos agem de forma específica se intercambiando de acordo com a reação do sistema imune do momento (Tizard, 2009).

Já as citocinas são glicoproteínas produzidas por diferentes tipos celulares para ativar, regular ou mediar a resposta imune e podem modular a resposta de diversas células. Essas moléculas podem se dividir de acordo com sua função biológica em: interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF), interferons (IFN) e fatores de crescimento (Janeway et al., 2007).

As respostas do hospedeiro ao desafio parasitário podem variar indo da resistência, quando não ocorre o estabelecimento da infecção, ou baixo estabelecimento, passando pela resiliência onde há a presença de quantidades moderadas a altas de *H. contortus*, porém o animal consegue compensar suas ações lesivas a até a sensibilidade quando o animal não consegue controlar a infecção e sofre seus efeitos (Amarante et al., 2014). Enquanto alguns hospedeiros apresentam anemia, caquexia e alto número de ovos por grama de fezes (OPG), outros animais mantêm perfil hematológico normal sem sintomas aparentes de infecção e baixo número de OPG (Sotomaior et al., 2007).

Existem raças ovinas que apresentam maior resiliência e resistência a determinados gêneros (Hayward et al., 2014), entretanto ocorrem variações entre as raças e dentre animais da mesma raça, devido as variações genéticas entre os indivíduos. As respostas geradas são complexas e envolvem diversas vias biológicas (Ingham et al., 2008).

Para responder como os processos celulares que regem a resposta imune do hospedeiro ao nematódeo *H. contortus* são controlados por meio da regulação dos processos de transcrição, Nagaraj et al. (2012) compararam a abundância relativa de proteínas no transcriptoma de intestino de cordeiros infectados e verificaram 80 proteínas diferencialmente expressas em animais resistentes à infecção e 78 proteínas em animais susceptíveis, proteínas estas funcionalmente diversas que incluem enzimas, moléculas de sinalização, moléculas transportadoras e células hematopoiéticas. Os autores concluíram que essas proteínas diferencialmente expressas poderiam ser observadas em testes fenotípicos para identificar ovinos com maior capacidade de resistir às infecções por nematódeos.

Nos últimos anos, um fenômeno surpreendente foi observado in vitro e in vivo: algumas proteínas consideradas específicas para um tipo de célula foram

encontradas em outros tipos de células. Já é bem elucidado que proteínas de superfície se transferem entre células do sistema imunológico de forma generalizada (Davis, 2007), o que inclui a captura de imunoglobulinas de superfície de células B por células T1 e T2, a transferência de antígenos de macrófagos para células T3, a aquisição de proteínas MHC classe I e classe II de receptores em tímocitos doadores em quimeras de medula óssea e a transferência de proteína MHC de classe II de células esplênicas para clones de células T alogênicas (Davis, 2006).

Nessa revisão, o autor cita que o contato entre as células do sistema imune envolve agregados de proteínas organizados que podem ser transmitidas entre células vizinhas e até mesmo células distantes por meio de microtubos conectando essas células, a sinapse imune, pois os estudos evidenciam uma semelhança entre a sinapse neuronal e o mecanismo de defesa do sistema imune. A sinapse imune foi então definida como duas superfícies celulares em estreita proximidade com um arranjo estruturado de proteínas segregadas em uma determinada direção (Davis, 2006).

As células imunes segregam citocinas que agem não apenas na célula onde estão, mas também em células vizinhas. Considerando o conceito de sinapse, onde se poderia pensar na citocina agindo de forma e em quantidades estáveis pelo organismo, uma característica interessante do sistema imune é que uma variação pode ocorrer nos níveis de citocinas, já que é necessário que esta percorra os tecidos em busca de agentes patogênicos trocando informações entre células sobre possíveis perigos. Assim, as células imunes se comunicam por meio de canais trocando citocinas por todo o organismo (Davis, 2006).

Embora a sinapse imunológica tenha sido a primeira descrição em termos de secreção dirigida de citocinas entre células T e células apresentadoras de antígenos (APCs) (Norcross, 1984; Paul; Seder, 1994), foi a descoberta histórica do tamanho micrométrico de grupos segregados de proteínas na célula T-APC intercelular contato (Monks et al., 1998; Grakoui et al., 1999) que levou ao uso comum do conceito, e direcionou as pesquisas em busca de imagens dessas respostas imunes, já que foi verificada uma forte correlação entre padrões específicos de grupos proteicos e a proliferação de células T. Os aglomerados de proteínas observados no contato entre alvos e células Natural Killers (NK) (Davis et al., 1999) ou células B (Batista et al., 2001) exigiram que o conceito de sinapse imune fosse expandido para incluir outros efetores imunológicos. Grupos de proteínas podem impedir a ativação

de células NK em um sistema conhecido como inibidor de células NK (Batista et al., 2001; Carlin et al., 2001; Davis, 2002).

As propriedades de equilíbrio de sinal da sinapse podem atenuar as respostas ao peptídeo MHC mais abundante ou de alta qualidade, permitindo que outras células T também proliferem. Isso pode ser importante para permitir que o sistema imunológico estabeleça uma ampla resposta aos agentes patogênicos (Davis, 2004).

A variação genética modula a abundância e a organização em nanoescala dessas sinapses. Assim como o número de receptores na superfície celular varia com o genótipo, a forma como esses receptores se organizam na membrana também varia afetando a sinalização proximal à membrana e a formação das sinapses imunológicas (Kennedy et al., 2019).

2.3.2 Nutrição versus resposta imune

Com a resistência parasitária, os anti-helmínticos não funcionam mais

Animais bem alimentados apresentam, em média, maior capacidade de elaborar uma resposta imunológica efetiva, necessária para eliminar os endoparasitos ou reprimir seu desenvolvimento. Também os padrões de expressão de alguns genes podem ser influenciados pela nutrição e, conseqüentemente causar alterações fenotípicas. Dietas suplementadas com proteína podem conferir maior resiliência aos animais, uma vez que a proteína é o principal elemento das células pertencentes ao sistema imunológico (Veloso et al., 2004; Kyriazakis; Houdijk, 2006).

A nutrição influencia diretamente a resiliência do hospedeiro frente a um desafio parasitário, auxiliando o organismo a manter fisiologia normal e resultando na manutenção das características zootécnicas de interesse (Louvandini et al., 2006). A suplementação com nutrientes pode aumentar a expressão da resistência e resiliência do hospedeiro aos nematódeos porque, em períodos de escassez de nutrientes, muitas funções corporais são penalizadas, incluindo funções imunológicas, que regulam o estabelecimento, fecundidade e sobrevivência dos nematódeos gastrintestinais dentro do hospedeiro. Tem sido também sugerido que a expressão da imunidade pode ser mais penalizada do que funções produtivas, já

que a alocação de recursos nutricionais escassos pode ser priorizada para o crescimento e a reprodução (Houdijk, 2012).

Há vários anos tem sido elucidado na literatura a importância do teor de proteína da dieta para o desenvolvimento de resiliência em ovinos endoparasitados (Abbott et al., 1986). Wallace et al. (1998) suplementaram com ureia a dieta de cordeiros Hampshire Down e realizaram infecção artificial com *H. contortus* durante 10 semanas. Não houve efeito da dieta entre os grupos controle e infectado quanto a resistência à infecção (contagem de ovos nas fezes, na carga parasitária, no comprimento e no número médio de ovos por fêmea adulta). Entretanto, nos cordeiros suplementados com ureia, houve melhor resiliência, sendo que estes apresentaram maiores volume corpuscular médio (VCM), concentrações plasmáticas de albumina superiores e maior ganho em peso, assim como menor perda de apetite após a infecção.

Foi observado incremento da resposta imune de cordeiros em crescimento durante ensaios de desempenho com elevado teor de proteína na dieta pois, como qualquer função corporal, o sistema imunológico requer proteínas, energia, minerais, oligoelementos e vitaminas. O parasitismo aumenta ainda mais os requerimentos de proteína para manutenção, decorrentes do reparo do tecido lesado pelos endoparasitos e para produção dos componentes de resposta imune proteicos envolvidos na regulação do estabelecimento, fecundidade e sobrevivência dos vermes (Houdijk, 2012).

Trabalhos realizados nas condições brasileiras têm reforçado a importância da proteína frente às verminoses. Bricarello et al. (2005) alimentaram cordeiros Santa Inês e Ile de France com dietas proteicas moderadamente e altamente metabolizáveis durante infecção artificial com *H. contortus*. Ambas as raças mostraram habilidade aumentada para suportar os efeitos fisiopatológicos do *H. contortus* quando dado acesso à dieta rica em proteínas altamente metabolizável.

Louvandini et al. (2006) forneceram suplementação com baixo (11%) e alto (19%) teores de proteína para ovinos da raça Santa Inês criados em pasto e verificaram que o alto teor de proteína proporcionou ao final do período chuvoso, maior ganho em peso e menor carga parasitária nos animais, quando comparado aos animais que receberam suplementação com baixo teor de proteína.

Os efeitos fisiopatológicos de *H. contortus* foram avaliados sobre cordeiros alimentados com diferentes níveis de proteína por Khan et al. (2012). Nos animais

infectados e alimentados com baixo teor de proteína houve anemia mais grave, hipoproteinemia e hipoalbuminemia. Por outro lado, quando alimentados com alto teor de proteína, os ovinos aumentaram a ingestão de alimentos e nutrientes e apresentaram maior ganho em peso, com melhor eficiência alimentar. Os autores concluíram que cordeiros alimentados com baixo nível proteico foram menos capazes de suportar os efeitos fisiopatológicos do endoparasito.

2.4 Genômica

O projeto genoma humano, no qual um esforço mundial permitiu o sequenciamento do DNA e catalogação dos genes humanos, influenciou o sequenciamento e estudo das funções de genes de muitos microrganismos e animais especialmente favoráveis à pesquisa genética ou com interesses médicos, agropecuários e comerciais. Em 2002, foi fundado o consórcio mundial ISGC (International Sheep Genomics Consortium) para mapear e sequenciar o genoma ovino, do qual o Brasil faz parte (Snustad; Simmons, 2018).

2.4.1 Genética molecular

Genoma é o conjunto de cromossomos haploides que se refere a uma espécie como um todo e não somente a um indivíduo. Todas as células de um organismo multicelular apresentam um genoma, porém nem todos os genes serão expressos da mesma forma em todos os tecidos, o que é chamado de expressão gênica. Transcriptoma é o processo de transcrição do gene em forma de moléculas de RNA em determinado momento e condições da vida de uma célula. Além de genes transcritos e não transcritos, a célula pode expressar (dependendo do momento) determinado gene em maior quantidade. Portanto, o transcrito abrange níveis de complexidade que o estudo do genoma não consegue atingir (Adams, 2008).

A fita simples de RNA permite o pareamento intramolecular de bases, fazendo com que os RNA celulares assumam formas diferentes e passem a interagir com muitas outras moléculas. Esse processo em que o DNA é convertido em RNA denomina-se transcrição gênica, e todas as moléculas de RNA celular, isto é, RNA ribossômico (rRNA), RNA transportador (tRNA), RNA mensageiro (mRNA) além dos

microRNA e dos RNA catalisadores e regulatórios são originados nesse processo (Menck; Sluys, 2017).

O processo de síntese proteica ocorre devido aos genes determinarem as características de um organismo e direcionarem essa síntese no processo conhecido como tradução, cuja molécula carreadora responsável pela fluidez da informação genética para a produção de uma proteína é o mRNA. Assim, a informação passa dos genes, constituídos de DNA, para os polipeptídeos, compostos de aminoácidos, por meio de um intermediário, constituído de RNA (Snustad; Simmons, 2017).

Como o DNA, a molécula de RNA é um polímero de nucleotídeos mantido por ligações fosfodiéster entre nucleotídeos adjacentes. Entretanto, há diferenças marcantes entre as duas moléculas. O RNA constitui uma única cadeia polinucleotídica, em contraste com a dupla-hélice do DNA. Assim como apresenta a base nitrogenada uracila no lugar da timina. Outra exceção são os açúcares, em que a ribose difere da 2'-desoxirribose em apenas um átomo de oxigênio que faz parte da hidroxila na posição 2', o que resulta em implicações decisivas na estabilidade das moléculas, tornando o RNA suscetível à hidrólise catalisada por base (Menck; Sluys, 2017).

O DNA não apresenta atividade própria, ele codifica as informações necessárias à manutenção da célula e integridade do organismo, porém as informações nele contidas precisam se converter na molécula de RNA para exercer funções distintas, diretamente como ele mesmo ou codificando as proteínas celulares (Menck; Sluys, 2017).

2.4.2 Transcriptômica

A transcriptômica é uma técnica abrangente que pode ser utilizada para elucidar de maneira universal a resposta do animal quando aplicado algum fator ou condição, diferente de outras técnicas genômicas onde se procura DNA ou RNA específico (Li et al., 2011; Coble et al., 2014; Schmeisser et al., 2016). Assim, é possível construir um mapa completo dos genes transcritos, que permite comparações entre condições distintas ou tecidos distintos (Melé et al., 2015).

Dentre as técnicas de sequenciamento de nova geração, a análise do transcriptoma apresenta vantagens que permitem mapear regiões transcritas e

expressão gênica simultaneamente. A metodologia de RNA-Seq, quando comparada a outros métodos de identificação de transcritos, se destaca por permitir sequenciamento em larga escala e que qualquer transcrito expresso possa ser detectado, sendo possível verificar a expressão de genes desconhecidos independente de o genoma estar sequenciado e variações de sequências genômicas nas regiões transcritas (Martin; Wang, 2011).

O sequenciamento de nova geração surgiu, então, com a necessidade de maior custo benefício, rapidez e maior quantidade de leituras por máquina por tempo, permitindo o sequenciamento direto de moléculas de cDNA sem a etapa de clonagem, o que é chamado de sequenciamento de RNA ou RNA-seq. As sequências de cDNA obtidas por RNA-seq são a evidência direta de que um determinado segmento do genoma é expresso e, portanto, pode codificar um gene (Griffiths et al., 2016). Por outro lado, a interpretação desses resultados mostra-se complexa e envolve diversas vias metabólicas.

2.4.3 Sequenciamento de RNA mensageiro (RNA-Seq)

O sequenciamento do DNA é realizado para determinar a ordem das bases nitrogenadas. Ao determinar esta ordem e, conseqüentemente, dos nucleotídeos de um fragmento de DNA que formam um genoma, é possível inferir qual gene é codificado por uma determinada sequência (Griffiths et al., 2016).

Diversas técnicas em biologia molecular empregam bioquímica e biofísica para o estudo dos grandes genomas. Porém, é interessante notar que grande parte das sequências de DNA presentes nos genomas de animais e vegetais superiores não codifica proteínas. Assim, é mais fácil identificar as sequências de DNA expressas empregando bibliotecas de DNA complementar (cDNA) (Snustad; Simmons, 2017).

O objetivo da produção de bibliotecas de cDNA é dispor de todos os genes de um dado organismo ou genes que estão sendo expressos em uma condição fisiológica. No processo de construção é preciso produzir DNA a partir do RNA total do tecido de interesse (Menck; Sluys, 2017).

O sistema Illumina de sequenciamento, utilizado no RNA-Seq, é uma técnica que aproveita a incorporação de cada base dentro de uma fita que está sendo sintetizada a partir do molde de amostra de cDNA, essa mesclagem enviará um sinal

que este dispositivo reconhece para identificar a base que foi adicionada. Para garantir que todos os fragmentos da amostra sejam lidos, é necessário conectar adaptadores complementares aos primers utilizados que são ligados a estes antes do sequenciamento, homogeneizando assim a leitura de cada transcrito (Kircher; Kelso, 2010).

A plataforma RNA-seq permitiu um sequenciamento pormenorizado e altamente representativo de transcritomas em um único passo, o que reduz enormemente o custo e gera dados altamente reprodutíveis e informativos com precisão na quantificação de transcritos. Os cDNAs sintetizados a partir do mRNA celular são sequenciados em larga escala e ao final é realizada sua análise computacional (Cloonan; Grimmond, 2008; Garber et al., 2011).

Para iniciar o preparo da biblioteca é realizada a extração do RNA total do tecido a ser estudado. Uma avaliação da quantidade, qualidade e integridade do RNA obtido é importante para garantia do bom resultado do sequenciamento. O RNA total adquirido deve ser purificado pela captura do RNA mensageiro por meio da cauda poli-A, utilizando esferas magnéticas (beads) providas do oligonucleotídeo poli-T (*Illumina*), usado como iniciador na fração poli-adenilada do RNA. Após sucessivas etapas de lavagem para remoção de RNA ribossômico ou quaisquer contaminações, o mRNA é fragmentado para obtenção de sequências menores, já que longas sequências não podem ser inteiramente lidas no sequenciamento; realiza-se então a síntese das duas fitas de cDNA. A biblioteca é finalizada com o processo de adenilação, que consiste na adição de um nucleotídeo adenina na extremidade 3' das fitas de cDNA que, posteriormente se ligarão a adaptadores com nucleotídeo timina em sua extremidade. Passa-se então ao sequenciamento propriamente dito, quando sequências curtas são geradas a partir do sequenciamento de cada molécula (Snustad; Simmons, 2017; Wang; Gerstein; Snyder, 2009).

2.4.4 Nutrigenômica

No campo da nutrição, pela análise do transcriptoma é possível verificar quais são os genes influenciados pelos nutrientes, determinando as funções de cada nutriente, os efeitos colaterais prováveis e como a resposta do organismo a um

nutriente é afetada, assim como as consequências de um desbalanço nutricional gerado por dietas inadequadas (German; Young, 2004).

A interação entre genes e nutrição fornece uma compreensão de como a nutrição afeta todo o desempenho e saúde por meio da alteração da expressão gênica ou a manifestação fenotípica do indivíduo (Rutz et al., 2009). Etapas da expressão gênica podem ser alteradas de acordo com compostos bioativos dos alimentos e nutrientes fornecidos na dieta (Rist et al., 2006).

As proteínas funcionais, resultantes de uma vasta série de eventos cujo primeiro passo é a formação do RNA mensageiro, são as moléculas responsáveis pelo fenótipo das células. A interação entre o genoma e os nutrientes pode ocorrer em fases distintas da expressão gênica, o que afeta tanto os transcritos quanto as proteínas expressas (Furlan et al., 2007). Junghans et al. (2004) verificando diferentes fontes proteicas na alimentação relacionadas à expressão de genes estabeleceram relação entre nutrição e expressão genética diretamente nos tecidos.

Com o conhecimento do genoma, o estudo dos transcritos possibilita análise mais ampla e fornece caminhos de raciocínio para a nutrigenômica (Zhang et al., 2008).

2.4.5 Expressão gênica do hospedeiro durante a infecção

Após a compreensão de que fatores ambientais são capazes de influenciar a expressão gênica e com a observação da resistência e resiliência do hospedeiro durante as infecções parasitárias, decorrentes de variações genéticas entre indivíduos da mesma espécie, os estudos recentes passaram a focar na compreensão dos mecanismos regulatórios em nível molecular.

Ingham et al. (2008) utilizaram a técnica de PCR para quantificar as respostas de expressão gênica na superfície da mucosa intestinal de ovinos geneticamente resistentes e suscetíveis, após desafio com nematódeos para elucidar as diferenças entre indivíduos quanto à resistência parasitária. Os genes expressos mais abundantemente nos animais resistentes foram os marcadores de resposta inflamatória precoce, vários receptores Toll-like (TLR2, 4, 9) e genes produtores de radicais livres (DUOX1 e NOS2A). Em contrapartida, os genes em animais susceptíveis indicaram resposta prolongada e desenvolvimento de um estado inflamatório crônico, caracterizado pela expressão elevada de membros da via de

sinalização NF- κ B (IKBKB e NFKBIA) juntamente com expressão tardia de marcadores reguladores tais como IL2RA (CD25) IL10 e TGF β 2.

Periasamy et al. (2014) buscaram polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) e genes envolvidos nas principais vias imunológicas no cromossomo 3 de ovinos, e relataram que há forte relação entre a frequência de resistência parasitária nos genes da via imune.

A expressão de genes no abomaso e linfonodos abomasais foi avaliada em ovinos para determinar as diferenças de raça na expressão de genes imuno-relacionados após a infecção com *H. contortus*. Os genes que recrutaram neutrófilos (CXCL1), macrófagos (MCP1), genes associados à ativação alternativa de macrófagos (ARG-1), à ativação de eosinófilos (Gal-14), genes de remodelação dos tecidos (MMP13, PDGF) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e MCP1, foram regulados positivamente em diversos grupos analisados (Jacobs et al., 2016).

A resistência é mediada em grande parte por resposta Th2 e anticorpos IgA e IgE, e é uma característica hereditária. A polarização das células T e o desenvolvimento de respostas imunes apropriadas são controlados pelos reguladores mestres, T-bet (TBX21), GATA-3 (GATA3), ROR γ t (RORC2) e ROR α (RORA). Utilizando cordeiros selecionados com variação quanto à resistência ao endoparasito gastrointestinal *Teladorsagia circumcincta*, Wilkie et al. (2017) testaram a hipótese de associação da verminose com variações nos níveis de estrutura, sequência ou expressão de transcritos de regulação individual. O RT-qPCR identificou que o gene RORVv5 foi diferencialmente e significativamente expresso entre grupos resistentes, intermediários e suscetíveis, assim, este foi apontado como importante no controle da resposta imune protetora à infecção por *T. circumcincta* em ovinos.

Comparando o perfil do transcriptoma da mucosa do abomaso e dos tecidos dos linfonodos de cabras crioulas resistentes e suscetíveis a *Haemonchus contortus* usando sequenciamento de RNA, Aboshady et al. (2019) observaram um maior número de genes diferencialmente expressos (DEG) em animais infectados em comparação com animais não infectados na mucosa do abomaso (792 DEG) e nódulos linfáticos (1726 DEG). Houve menos DEG nos grupos resistentes versus suscetíveis (342 e 450 DEG, na mucosa abomasal e nódulos linfáticos, respectivamente). 'Ciclo celular' e 'morte celular e sobrevivência' foram as principais redes identificadas no tecido da mucosa ao comparar animais infectados com não

infectados. O gene TGF β 1 era um dos 5 principais DEG no tecido da mucosa. Esses resultados são um dos primeiros a investigar diferenças no perfil de expressão induzida pela infecção por NGI em caprinos.

Para identificar possíveis mutações causais relacionadas a resistência a NGI em ovelhas usando RNA-Seq, Chitneedi et al. (2020) utilizaram genes candidatos para resistência a *Teladorsagia circumcincta* e identificaram 111 genes relacionados ao sistema imunológico nas regiões QTL e 132 genes relacionados ao sistema imunológico dos genes candidatos inicialmente selecionados. Para esses genes relacionados ao sistema imunológico que abrigam potenciais variantes funcionais, as análises de enriquecimento realizadas destacaram termos gene ontology significativos relacionados à apoptose, adesão e resposta inflamatória em relação às variantes relacionadas ao QTL e termos relacionados à doença significativos, como inflamação, adesão e necrose, em relação à lista inicial de genes candidatos. No geral, o estudo fornece uma lista valiosa de mutações causais potenciais que podem ser consideradas mutações causais candidatas em relação à resistência a NGI em ovelhas.

Wang et al. (2019) investigaram se receptores de reconhecimento de padrões (PRR) estão envolvidos nas respostas imunes de ovinos ao *Haemonchus contortus*. Durante a alimentação de sangue, *H. contortus* secreta antígenos imunomoduladores no sangue do hospedeiro. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram estimuladas com extrato solúvel de *H. contortus* (HcAg) para verificação do perfil transcricional. HcAg regulou positivamente atenuantes da inflamação (NLRP12 e NLRC3), um receptor acoplado à proteína G com potentes efeitos antiinflamatórios (HCAR2) e diversos fatores de transcrição relacionados a resposta Th2 (ATF3, IRF4, BCL3 e NFATC). Esse estudo esclarece como o sistema imunológico inato do hospedeiro controla a imunidade tipo 2 ao *H. contortus*.

Referências

- Abbott, E. M.; Parkins, J. J.; Homes, P. H. The effect of dietary protein on the pathogenesis of acute ovine haemonchosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 20, p. 275-289, 1986.
- Aboshady, H. M.; Mandonnet, N.; Stear, M. J.; Arquet, R.; Bederina, M.; Sarry, J.; Tosser-Klopp, G.; Klopp, C.; Johansson, A. M.; Jonas, E.; Bambou, J. C. Transcriptome variation in response to gastrointestinal nematode infection in goats. **Plos One**, San Francisco, v. 14, e0218719, 2019.

Adams, J. U. Transcriptome: Connecting the Genome to Gene Function. **Nature Education**, Lakewood, v. 1, n. 1, p. 195, 2008.

Alves, L. G. F.; Silva, B. P. A.; Mineris Júnior, A. C.; Jardim, A. C. N. V.; Paula, R. S.; Brito, F. L. L. O consumo de carne ovina. In: Semana do Curso de Zootecnia - SEZUS, 2017, São Luís de Montes Belos. **Anais...** Anápolis: Universidade Estadual de Goiás, 2017.

Amarante, A. F. T.; Susin, I.; Rocha, R. A.; Silva, M. B.; Mendes, C. Q.; Pires, A. V. Resistance of Santa Inês and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematodes infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, p. 273-280, 2009.

Amarante, A. F. T. **Os parasitas de ovinos** [online]. São Paulo: Editora UNESP, 2014. p. 123-136: Anti-helmínticos. ISBN 978-85-68334-42-3.

Andriola, L. C.; Oliveira, S. V. F. B.; Pereira, J. S.; Coelho, W. A. C.; Ahid, S. M. M. Diagnóstico de principais helmintos no município de Grossos – RN. **Revista Científica de Produção Animal**, Areia, v. 13, p. 141-144, 2011.

Balic, A.; Bowles, V. M.; Meeusen, E. N. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 24, p. 39-46, 2002.

Batista, F. D.; Iber, D.; Neuberger, M. S. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. **Nature**, London, v.411, p.489–494, 2001.

Birgel, D. B. **Estudo da anemia em ovinos decorrente à verminose gastrointestinal**. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Bowman, D. D. **Parasitologia veterinária de Georgis**. 8. ed. São Paulo: Manole, 2010. cap. 4: Helmintos.

Bricarello, P. A.; Amarante, A. F. T.; Rocha, R. A.; Cabral Filho, S. L.; Huntley, J. F.; Houdijk, J. G. M.; Abdalla, A. L.; Gennari, S. M. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Inês lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, p. 99-109, 2005.

Cánovas, A.; Reverter, A.; Deatley, K.; Ashley, R. L.; Colgrave, M. L.; Fortes, M. R. S.; Islas-Trejo, A.; Lehnert, S.; Porto-Neto, L.; Rincón, G.; Silver, G. A.; Snelling, W. M.; Medrano, J. F.; Thomas, M. G. Multi-tissue omics analyses reveal molecular regulatory networks for puberty in composite beef cattle. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 7, art. 0102551, 2014.

Carlin, L. M.; Eleme, K.; Mccann, F.; Davis, D. M. Intercellular transfer and supramolecular organization of human leukocyte antigen C at inhibitory natural killer cell immune synapses. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 194, p. 1507–1517, 2001.

Cavalcante, A. C. R.; Neiva, J. N. M.; Cândido, M. J. D.; Vieira, L. S. **Produção de Ovinos e Caprinos de Corte em Pastos Cultivados sob Manejo Rotacionado**. Sobral, CE: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2005. 17 p. (Circular Técnica, 31).

Chitneedi, P. K.; Arranz, J. J.; Suárez-Vega, A.; Martínez-Valladares, M.; Gutiérrez-Gil, B. Identification of potential functional variants underlying ovine resistance to gastrointestinal nematode infection by using RNA-Seq. **Animal Genetics**, Oxford, v. 51, p. 266-277, 2020.

Cloonan, N.; Grimmond, S. M. Transcriptome content and dynamics at single-nucleotide resolution. **Genome Biology**, London, v. 9, n. 9, p. 234, 2008.

Coble, D. J.; Fleming, D.; Persia, M. E.; Ashwell, C. M.; Rothschild, M. F.; Schmidt, C. J.; Lamont, S. J. RNA-seq analysis of broiler liver transcriptome reveals novel responses to high ambient temperature. **BioMed Central Genomics**, London, v. 15, p. 1084, 2014.

Costa, P. T.; Costa, R. T.; Mendonça, G.; Vaz, R. Z. Eficácia anti-helmíntica comparativa do nitroxinil, levamisol, closantel, moxidectina e fenbendazole no controle parasitário em ovinos. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 74, n. 1, p. 72-78, 2017.

Costa, P. T.; Vaz, R. Z.; Costa, R. T.; Fernandes, T. A.; Farias, P. P. Eficácia do albendazole, cloridrato de levamisol, moxidectina e nitroxil no controle parasitário de cordeiras. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 20, n. 1, p. 62-71, 2018.

Davis, D. M. Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 23, p. 356–363, 2002.

Davis, D. M. Intrigue at the Immune Synapse. **Scientific American**, New York, v. 294, n. 2, p. 48-55, 2006.

Davis, D. M. Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 7, p. 238-243, 2007.

Davis, D. M.; Dustin, M. L. What is the importance of the immunological synapse? **Trends in Immunology**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 323-327, 2004.

Davis, D. M.; Chiu, I.; Fassett, M.; Cohen, G. B.; Mandelboim, O.; Strominger, J. L. The human natural killer cell immune synapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 96, p. 15062–15067, 1999.

Furlan, L. R.; Ferraz, A. L. J.; Bortolossi, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 331-341, 2007.

Garber, M.; Grabherr, M. G.; Guttman, M.; Trapnell, C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nature Methods**, New York, v. 8, n. 6, p. 469–477, 2011.

Gasbarre, L. C.; Leighton, E. A.; Sonstegard, T. Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 98, p. 51-64, 2001.

German, B.; Young, V. R. Nutrition and Genomics. **Nestlé Nutrition Workshop Series. Clinical & Performance Program**, v. 9, p. 243-263, 2004.

Gill, H. S.; Altmann, K.; Cross, M. L.; Husband, A. J. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Immunology**, Oxford, v. 99, p. 458-463, 2000.

Grakoui, A.; Bromley, S.K.; Sumen, C.; Davis, M.M.; Shaw, A.S.; Allen, P.M.; Dustin, M.L. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. **Science**, New York, v. 285, p. 221–227, 1999.

Greer, A. W.; Mckenzie, J. L.; Mcanulty, R. W.; Huntley, J. F.; Mcneilly, T. N. Immune development and performance characteristics of Romney sheep selected for either resistance or resilience to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 250, p. 60-67, 2018.

Griffiths, A. J. F.; Wessler, S. R.; Carroll, S. B.; Doebley, J. **Introdução à genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 760 p.

Hayward, A. D.; Nussey, D. H.; Wilson, A. J.; Berenos, C.; Pilkington, J. G.; Watt, K. A.; Pemberton, J. M.; Graham, A. L. Natural selection on individual variation in tolerance of gastrointestinal nematode infection. **Plos Biology**, San Francisco, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2014.

Houdijk, J. G. M. Differential effects of protein and energy scarcity on resistance to nematode parasite. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 103, p. 41-49, 2012.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Banco de Dados** – Efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 06 dez. 2018.

Ingham, A.; Reverter, A.; Windon, R.; Hunt, P.; Menzies, M. Gastrointestinal nematode challenge induces some conserved gene expression changes in the gut mucosa of genetically resistant sheep. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, p. 431–442, 2008.

Jacobs, J. R.; Sommers, K. N.; Zajac, A. M.; Notter, D. R.; Bowdridge, S. A. Early IL-4 gene expression in abomasum is associated with resistance to *Haemonchus contortus* in hair and wool sheep breeds. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 38, p. 333-339, 2016.

Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, W.; Sholomchik, M. J. **Imunologia**: o sistema imune na saúde e na doença. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

Junghans, P.; Kaehne, T.; Beyer, M.; Metges, C. C.; Schwerin, M. Dietary protein-related changes in hepatic transcription correspond to modifications in hepatic

protein expression in growing pigs. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 134, p. 43-47, 2004.

Kaplan, R. M.; Vidyashankar, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 186, p. 70–78, 2012.

Kennedy, P. R.; Barthen, C.; Williamson, D. J.; Pitkeathly, W. T. E.; Hazime, K. S.; Cumming, J.; Stacey, K. B.; Hilton, H. G.; Carrington, M.; Parham, P.; Davis, D. M. Genetic diversity affects the nanoscale membrane organization and signaling of natural killer cell receptors. **Science Signaling**, Washington, DC, v. 12, p. 1-18, 2019.

Khan, F. A.; Sahoo, A.; Sonawane, G. G.; Karim, S. A.; Dhakad, S.; Pareek, A. K.; Tripathi, B. N. Effect of dietary protein on responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 150, p. 143-151, 2012.

Kircher, M.; Kelso, J. High-throughput DNA sequencing - Concepts and limitations. **BioEssays**, Hoboken, v. 32, n. 6, p. 524–536, 2010.

Kyriazakis, I.; Houdijk, J. Immunonutrition: Nutritional control of parasites. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 62, p. 79–82, 2006.

Li, C.; Wang, X.; Wang, G.; Li, N.; Wu, C. Expression analysis of global gene response to chronic heat exposure in broiler chickens (*Gallus gallus*) reveals new reactive genes. **Poultry Science**, Oxford, v. 90, p. 1028-1036, 2011.

Lino, D. M.; Pinheiro, R. S. B.; Ortunho, V. V. Benefícios do bem-estar animal na produtividade e na sanidade de ovinos. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, Bauru, v. 12, p. 124-132, 2016.

Louvandini, H.; Veloso, C. F. M.; Paludo, G. R.; Dell'Porto, A.; Gennari, S. M.; McManus, C. M. Influence of protein supplementation on the resistance and resilience on young hair sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes during rainy and dry seasons. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, p. 103–111, 2006.

Martin, J. A.; Wang, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 12, p. 671–682, 2011.

McClure, S. J.; Emery, D. L. Cell Mediated Responses against Gastrointestinal Nematodes Parasites of Ruminants. In: Goddeeris, B. M. L.; Morrison, W. I. **Cellmediated immunity in ruminants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 213-228.

McManus, C.; Paim, T. P.; De Melo, C. B.; Brasil, B. S. A. F.; Paiva, S. R. Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock. **Parasite**, Paris, v. 21, p. 56, 2014.

Meeusen, E. N. T.; Balic, A.; Bowles, V. Cells, cytokines and other molecules with rejection of gastrointestinal nematode parasites. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 108, p. 121-125, 2005.

Melé, M.; Ferreira, P. G.; Reverter, F.; Deluca, D. S.; Monlong, J.; Sammeth, M.; Ypung, T. R.; Goldmann, J. M.; Pervouchine, D. D.; Sullivan, T. J.; Johnson, R.; Segrè, A. V.; Djebali, S.; Niarchou, A.; Consortium, T. G.; Wright, F. A.; Lappalainen, T.; Calvo, M.; Getz, G.; Dermitzakis, E. T.; Ardlie, K. G.; Guigó, R. The human transcriptome across tissues and individuals. **Science**, New York, v. 348, n. 6235, p. 660–665, 2015.

Melo, A. C. F. L. **Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil**. 2005. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

Menck, C. F. M.; Sluys, M. A. V. **Genética molecular básica: dos genes aos genomas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 528 p.

Molento, M. B. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 2, p. 253-263, 2013.

Monks, C. R. F.; Freiberg, B. A.; Kupfer, H.; Sciaky, N.; Kupfer, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. **Nature**, London, v. 395, p. 82–86, 1998.

Monteiro, S. G. **Parasitologia na medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. cap. 20: Classe Nematoda.

Monteiro, S. G. **Parasitologia na medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. cap. 24: Ordem Strongylida.

Nagaraj, S. H.; Harsha, H. C.; Reverter, A.; Colgrave, M. L.; Sharma, R.; Andronicos, N.; Hunt, P.; Menzies, M.; Lees, M. S.; Sekhar, N. R.; Pandey, A.; Ingham, A. Proteomic analysis of the abomasal mucosal response following infection by the nematode, *Haemonchus contortus*, in genetically resistant and susceptible sheep. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, p. 2141-2152, 2012.

Norcross, M. A. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. **Annals of Immunology**, Poznań, Poland, v. 135, p. 113–134, 1984.

Paul, W. E.; Seder, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, Cambridge, v. 76, p. 241–251, 1994.

Pegoraro, E. J.; Poli, C. H. E. C.; Carvalho, P. C. F.; Gomes, M. J. T. M.; Fischer, V. Manejo da pastagem de azevém, contaminação larval no pasto e infecção parasitária em ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 10, p. 1397-1403, 2008.

Periasamy, K.; Pichler, R.; Poli, M.; Cristel, S.; Cetra, B.; Medus, D.; Basar, M.; Thiruvankadan, A. K.; Ramasamy, S.; Ellahi, M. B.; Mohammed, F.; Teneva, A.; Shamsuddin, M.; Podesta, M. G.; Diallo, A. Candidate Gene Approach for Parasite Resistance in Sheep – Variation in Immune Pathway Genes and Association with Fecal Egg Count. **Plos One**, San Francisco, v. 9, art. e88337, 2014.

Rist, M. J.; Wenzel, U.; Daniel, H. Nutrition and food science go genomic. **Trends in Biotechnology**, Barking, v. 24, n. 4, p. 172-8, 2006.

Rutz, F.; Gonçalves, F. M.; Anciuti, M. A.; Xavier, E. G.; Gentilini, F. P.; Roll, V. F. B. Nutrigenômica na produção de aves e suínos. In: Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal – CBNA, 1., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2009.

Roberto, F. F. S.; Difante, G. S.; Zaros, L. G.; Gurgel, A. L. C. Nematoides gastrintestinais na ovinocultura de corte sob regime de pastejo. **PubVet**, Maringá, v. 12, p. 1-12, 2018.

Sayers, G.; Sweeney, T. Gastrointestinal nematode infection in sheep – a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 6, p. 159-171, 2005.

Schmeisser, J.; Séon, A. A.; Aureli, R.; Friedel, A.; Guggenbuhl, P.; Duval, S.; Cowieson, A. J.; Fru-Nji, F. Exploratory transcriptomic analysis in muscle tissue of broilers fed a phytase-supplemented diet. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 101, p. 563-575, 2016.

Sorio, A. **Diagnóstico da oferta e demanda de ovinos e caprinos para processamento de carne, pele e leite na região central do Tocantins**. Projeto de Desenvolvimento Regional Integrado e Sustentável do Tocantins – PDRIS. Palmas, TO: Secretaria do Desenvolvimento da Agricultura e Pecuária, 2017. 240 p.

Snustad, D. P.; Simmons, M. J. **Fundamentos da Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 579 p.

Sotomaior, C. S.; De Carli, L. M.; Tangleica, L.; Kaiber, B. K.; Souza, F. P. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 4, p. 397-412, 2007.

Silva, D. G.; Pilatti, J. A.; Menezes, B. M.; Brum, L. P.; Goulart Netto, C.; Martins, A. A. Eficácia anti-helmíntica comparativa entre diferentes princípios ativos em ovinos jovens. **PubVet**, Maringá, v. 11, n. 4, p. 356-362, 2017.

Taylor, M. A.; Coop, R. L.; Wall, R. L. **Parasitologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. cap. 9, p. 1660-1997: Parasitas de caprinos e ovinos.

Thomaz-Soccol, V.; Souza, F. P.; Sotomaior, C.; Castro, E. A.; Milczewski, V.; Mocelin, G.; Silva, M. C. P. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics

in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 41-47, 2004.

Tirapegui, J. **Nutrição: Fundamentos e Aspectos Atuais**. São Paulo: Atheneu, 2013. cap. 24, p. 391-410: Nutrigenética e Nutrigenômica.

Tizar, I. R. **Imunologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

Ueno, H.; Gonçalves, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.

Urquhart, G. M.; Armour, J.; Duncan, J. L.; Dunn, A. M.; Jennings, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 3-118: Helmintologia veterinária.

Veloso, C. F. M.; Louvandini, H.; Kimura, E. A.; Azevedo, C. R.; Enoki, D. R.; França, L. D.; Mcmanus, C. M.; Porto, A. D.; Santana, A. P. Efeitos da suplementação protéica no controle da verminose e nas características de carcaça de ovinos Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 5, n. 3, p. 131-139, 2004.

Viana, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Porto Alegre, v. 4, n. 12, p. 1-9, 2008.

Wallace, D. S.; Bairden, K.; Duncan, J. L.; Eckersall, P. D. The influence of dietary supplementation with urea on resilience and resistance to infection with *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, Cambridge, v. 116, p. 67-72, 1998.

Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics**. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009. doi: 10.1038/nrg2484. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949280/pdf/nihms229948.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2020.

Wang, S.; Hu, D.; Wang, C.; Tang, X.; Du, M.; Gu, X.; Suo, J.; Hu, M.; Fang, R.; Zhu, X.; Zhang, X.; Du, A.; Suo, X.; Liu, X. Transcriptional profiling of innate immune responses in sheep PBMCs induced by *Haemonchus contortus* soluble extracts. **Parasites and Vectors**, London, v. 12, p. 1-9, 2019.

Wilkie, H.; Riggio, V.; Matika, O.; Nicol, L.; Watt, K. A.; Sinclair, R.; Sparks, A. M.; Nussey, D. H.; Pemberton, J. M.; Houston, R. D.; Hopkins, J. A candidate gene approach to study nematode resistance traits in naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 243, p. 71-74, 2017.

Zhang, X.; Yap, Y.; Wei, D.; Chen, G.; Chen, F. Novel omics technologies in nutrition research. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 169-76, 2008.

3 DESEMPENHO, DIGESTIBILIDADE APARENTE DA DIETA, BALANÇO DE NITROGÊNIO E EMISSÃO DE METANO EM CORDEIROS ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA E INFECTADOS COM *Haemonchus contortus*

Resumo

Objetivou-se com este trabalho verificar o efeito de dois teores de proteína na dieta (baixo: 12% e alto: 19% de PB) e da infecção por *Haemonchus contortus* sobre o desempenho, digestibilidade aparente da dieta, balanço de nitrogênio, produção de metano entérico, contagem de ovos por grama de fezes (OPG), contagem e mensuração de parasitos presentes no abomaso, perfil hematológico e bioquímico de 32 cordeiros Santa Inês, machos e fêmeas, com peso médio inicial de $24,9 \pm 4,03$ kg (média \pm DP), distribuídos aleatoriamente em 4 tratamentos em um arranjo fatorial 2x2x2: alta proteína controle (AC - n=7), baixa proteína controle (BC - n=7), alta proteína infectado (AI - n=9) e baixa proteína infectado (BI - n=9), com o efeito sexo testado. Após 34 dias de dieta, os tratamentos infectados receberam dose única de 10.000 L3 de *H. contortus* por via oral. As pesagens dos cordeiros foram realizadas semanalmente. Após 42 dias da infecção artificial, 24 animais foram abatidos. Houve efeito de infecção e dieta sobre o desempenho dos cordeiros, com AI apresentando menores valores para consumo de matéria seca (MS) e consumo/PC^{0,75}. Não houve diferença em ganho total em peso (GTP) e ganho médio diário em peso (GMDP) ($P > 0,05$). Houve efeito da dieta sobre a digestibilidade de proteína bruta (PB) ($P < 0,05$). Houve diferença nos derivados de purinas na urina e balanço de nitrogênio, com diminuição nos tratamentos infectados ($P < 0,05$). A produção de metano entérico foi significativamente maior em animais dos tratamentos infectados ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças com relação ao rendimento de carcaça e cor da carne entre os tratamentos ($P > 0,05$). Não houve diferença entre os tratamentos infectados ($P > 0,05$) no estabelecimento da infecção, OPG, número de ovos no trato reprodutivo de endoparasitos, sexo e tamanho de endoparasitos. Todos os cordeiros, infectados e controles, apresentaram valores normais para as variáveis do hemograma e bioquímica sérica. Em conclusão, o elevado teor de proteína na dieta aumenta a resiliência de cordeiros em crescimento durante a infecção com *H. contortus* e permite que mantenham valores normais do perfil hematológico e bioquímico. A infecção reduz a utilização da proteína microbiana vinda do rúmen pelos cordeiros, bem como promove maior produção de metano entérico.

Palavras-chave: CH₄, consumo alimentar, endoparasitos, ovinos, peso corporal, mitigação de metano.

3 PERFORMANCE, APPARENT DIGESTIBILITY OF THE DIET, NITROGEN BALANCE AND METHANE EMISSION IN LAMBS FED WITH DIFFERENT PROTEIN LEVELS AND INFECTED WITH *Haemonchus contortus*

Abstract

The aim of this work was to verify the effect of two protein levels in the diet (low: 12% and high: 19% of CP) and *Haemonchus contortus* infection on animal performance, diet digestibility, nitrogen balance, enteric methane production, FEC and measurement of endoparasites presents in the abomasum, hematological and biochemical profile of 32 male and female Santa Ines lambs, with initial body weight of 24.9 ± 4.03 kg (mean \pm SD), randomly distributed in 4 treatments in a 2x2x2 factorial arrangement: high protein control (HC, n = 7), low protein control (LC, n = 7), high protein infected with *H. contortus* (HI, n = 9) and low protein infected with *H. contortus* (LI, n = 9), with sex effect test. After 34 days of diet, the infected treatments received a single dose of 10,000 L3 of *H. contortus* orally. Lambs were weighed weekly. After 42 days of artificial infection, 24 animals were slaughtered. There were effects of infection and diet on lambs performance, with HI showing lower values for dry matter intake (DM) and metabolic weight. There were no differences for total weight gain (GTP) and average daily weight gain (GMDP) ($P > 0.05$). There was an effect of the diet for the crude protein digestibility (CP) ($P < 0.05$). There were differences for purine derivatives in the urine and nitrogen balance, with decrease to infected treatments ($P < 0.05$). The enteric methane production was significantly higher in animals infected ($P < 0.05$). No differences were observed regarding carcass yield and meat color among treatments ($P > 0.05$). There was no difference between the infected treatments ($P > 0.05$) in the establishment of infection, FEC, number of eggs in the reproductive tract of endoparasites, sex and size of endoparasites. All lambs, infected and control, showed normal values for blood count and serum biochemistry variables. As conclusion, the high protein content in the diet increases the resilience of growing lambs during infection with *H. contortus* and allows them to maintain normal values of the hematological and biochemical profile. The infection reduces the use of the microbial protein from the rumen by lambs, as well as promoting greater production of enteric methane.

Keywords: body weight, CH₄, endoparasite, feed intake, methane mitigation, sheep.

3.1 Introdução

Os nematódeos gastrintestinais são responsáveis por representativas perdas do desenvolvimento de ovinos mundialmente, causam anemia, redução de ganho em peso, da qualidade de carne e lã e, em casos graves, pode levar o animal ao óbito. *Haemonchus contortus*, endoparasito hematófago do abomaso, é um dos mais importantes devido à alta prevalência e forte patogenicidade (Monteiro, 2010).

O uso de anti-helmínticos é o método mais difundido mundialmente na tentativa de controlar as verminoses em ovinos. Entretanto a utilização contínua, indiscriminada e incorreta dos antiparasitários, culmina na eliminação dos endoparasitos mais sensíveis e leva a seleção dos endoparasitos mais resistentes (Costa et al., 2017). Consequentemente, os endoparasitos vêm avançando sua resistência a diversos grupos de princípios ativos, dificultando o controle e tratamento das doenças (McManus et al., 2014; Costa et al., 2017).

A análise da alimentação é utilizada para descrever os nutrientes que possuem a capacidade de sustentar diferentes tipos e níveis de desempenho animal, combinando os componentes da dieta para alcançar um nível de produção almejado. Assim, uma das estratégias alternativas para o controle de endoparasitos nos ovinos é o manejo nutricional, uma vez que os nutrientes presentes na dieta, principalmente o teor proteico, podem ter grande influência sobre o sistema imunológico, podendo também determinar o grau de infecção dos ovinos (Louvandini et al., 2006).

Portanto, objetivou-se com este trabalho verificar o efeito do teor proteico da dieta e da infecção por *H. contortus* sobre o desempenho, digestibilidade aparente da dieta, produção de metano entérico, determinação dos derivados de purinas e balanço de nitrogênio na urina, carga parasitária, características da carcaça, perfil hematológico e bioquímico de cordeiros da raça Santa Inês.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Ensaio de desempenho animal

Este trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Energia Nuclear na Agricultura sob número CEUA – CENA 004/2017.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (LANA – CENA/USP), localizado no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil (latitude 22°43'31"S, longitude 47°38'57"W e altitude de 547 metros acima do nível do mar).

Após a estação reprodutiva e parição, os cordeiros foram acompanhados com exame de fezes desde o nascimento até o início do experimento para garantia de não terem contato prévio com endoparasitos, em baia separada do plantel. O desmame ocorreu aos 60 dias de idade. Ao início do período de adaptação, os animais foram alocados em baias individuais que mediam 1,0 m x 1,5 m providas de comedouro e bebedouro. Iniciou-se o experimento com todos os animais sob as mesmas condições parasitológicas.

O experimento foi dividido em período de adaptação à dieta e instalações (13 dias), ensaio de desempenho (59 dias), ensaio de produção de metano entérico (12 dias) e ensaio de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas (5 dias), de acordo com a Figura 1. Ao final os animais foram abatidos de acordo com as exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2018).

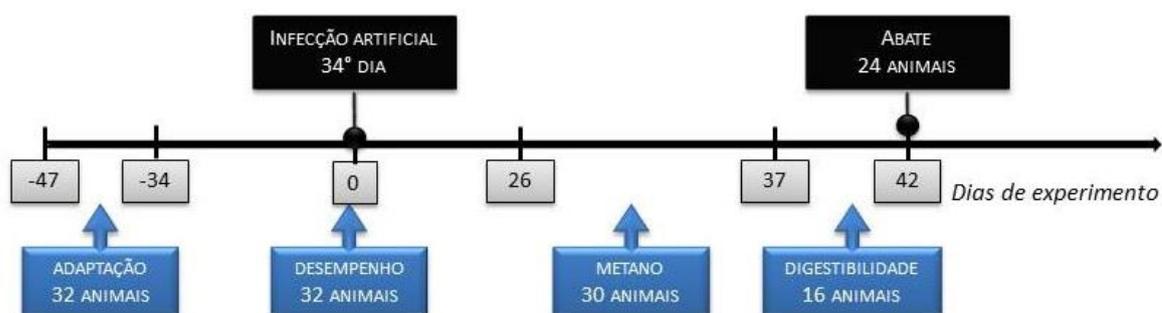


Figura 1 – Linha do tempo com n amostral e dias de cada experimento realizado com cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção artificial por *H. contortus*

O delineamento experimental utilizado foi arranjo fatorial 2x2x2 com dois tipos de dieta (alto e baixo teores de proteína) e dois estados sanitários (com e sem infecção por *H. contortus*), sendo verificado o efeito sexo (Tabela 1).

Os animais utilizados foram 32 ovinos da raça Santa Inês, 18 fêmeas não castradas e 14 machos castrados com 6 meses de idade e peso médio inicial de $24,9 \pm 4,03$ kg (média \pm DP). Os cordeiros foram divididos em machos e fêmeas e depois aleatoriamente distribuídos em quatro tratamentos, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Delineamento experimental de cordeiros Santa Inês alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção com *H. contortus*

Tratamentos		n		
		Total	♀	♂
AC	Alta proteína sem infecção	7	4	3
BC	Baixa proteína sem infecção	7	4	3
AI	Alta proteína com infecção <i>H. contortus</i>	9	5	4
BI	Baixa proteína com infecção <i>H. contortus</i>	9	5	4

O controle do consumo de alimentos foi feito diariamente, com pesagens do ofertado e das sobras. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, no período da manhã (8 h) e no período da tarde (15 h), e a água *ad libitum*. O concentrado foi fornecido sempre antes do volumoso em cocho separado, apenas após todo o seu consumo o cocho do feno era colocado dentro da baia.

Foram elaboradas dietas com baixo (12%) e alto (19%) teores de proteína de acordo com o National Research Council (2007), composta de feno de Tifton (*Cynodon dactylon*) triturado em partículas de 3 cm, e mistura concentrada de farelo de soja, grão de milho e suplemento mineral comercial. A composição do concentrado de alta proteína foi 60% de farelo de soja e 40% de milho e a do de baixa proteína foi 20% de farelo de soja e 80% de milho (Tabela 2). A relação volumoso:concentrado da dieta foi de 60:40, sendo o oferecido ajustado quinzenalmente a cada pesagem dos cordeiros, com base em 3,5% do peso vivo.

As análises bromatológicas das dietas e das sobras (Tabela 2) seguiram protocolos analíticos da Association of Official Analytical Chemists (2016) para os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados sequencialmente de acordo com Van Soest, Robertson e Lewis (1991) e adaptado por Mertens (2002).

Diariamente todas as baias foram higienizadas e cochos de água lavados com água e sabão antes da reposição para remoção da matéria orgânica. Semanalmente, as baias eram lavadas com lavadora de pressão d'água.

Finalizado o período de desempenho, 30 cordeiros foram utilizados no ensaio de produção de metano entérico. E após este, 16 cordeiros foram utilizados no ensaio de digestibilidade aparente das dietas.

Tabela 2 – Proporção dos ingredientes e composição bromatológica com base na matéria seca a 100 °C das dietas de baixa (12%) e alta (19%) proteína

Ingredientes	Tratamentos	
	Baixa proteína (12%)	Alta proteína (19%)
Ingredientes (%)		
Feno de <i>Cynodon dactylon</i>	60,00	60,00
Farelo de soja	7,50	22,50
Milho triturado	30,00	15,00
Sal mineral comercial	2,50	2,50
Composição bromatológica (%)		
Matéria seca	88,5	88,6
Matéria orgânica	92,6	92,0
Proteína bruta	12,4	19,0
Fibra em detergente ácido	28,5	30,8
Fibra em detergente neutro	50,4	53,5
Extrato etéreo	2,17	1,84
Matéria mineral	7,40	8,00
Energia bruta (MJ)	17,5	17,9

3.2.1.1 Infecção artificial

Aos 34 dias de dieta, os animais dos tratamentos infectados (AI n = 9; BI n = 9) receberam uma administração oral com aproximadamente 10.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* suspensas em água destilada através de sondagem esofágica, de acordo com as normas internacionais do “World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology” (Wood et al., 1995). Estas larvas foram cedidas pela Dra. Luciana Morita Katiki, especialista na área que mantém banco de larvas de nematódeos no Centro de Pesquisa em Genética e Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP, Brasil.

3.2.2 Perfil hematológico, leucocitário e bioquímico

Amostras de sangue foram colhidas semanalmente por venopunção da jugular utilizando-se tubos para coleta de sangue à vácuo (5 mL), sem e com EDTA (Olen, Plastilab, Roumieh, Líbano).

Imediatamente depois de colhidas, as amostras de sangue dos tubos com EDTA foram encaminhadas para a realização de eritrograma e leucograma no analisador automático Davol Poch-100iV Diff. O diferencial de leucócitos foi realizado por microscopia óptica (Nikon Eclipse E200) com a contagem de 100 células no esfregaço sanguíneo corado com corante rápido do tipo Romanowsky (Panótico rápido – Labor Clin® LTDA, Pinhais, Paraná, Brasil) de acordo com Sastry (1989).

As amostras de sangue sem anticoagulantes (5 mL) foram centrifugadas com o mesmo protocolo utilizado com as de EDTA, para obtenção do soro sanguíneo, divididas em quatro alíquotas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise bioquímica (albumina, glicose, ureia e proteínas totais) por kits Labtest® de acordo com as recomendações do fabricante e leitura em espectrofotômetro (Perkin Eusing 3lmer – Lambda EZ150 UV/Vis Spectrophotometer).

3.2.3 Pesagem dos cordeiros e exame de fezes

Os cordeiros foram pesados quinzenalmente. A primeira pesagem foi realizada antes de alocar os animais nas baias individuais para início da adaptação. Amostras de fezes foram colhidas semanalmente, desde a primeira semana após a adaptação, direto da ampola retal de todos os animais com as quais foi realizada a contagem de ovos por grama de fezes(OPG) (Whitlock, 1948).

3.2.4 Ensaio de produção de metano entérico

A quantificação da produção de CH_4 entérico *in vivo* foi iniciada aos 60 dias de experimento (Figura 1). Foram selecionados 30 animais do experimento (AC: n=6, BC: n=6, AI: n=9, BI: n=9), machos (n=14) e fêmeas (n=16), distribuídos individualmente em câmaras respirométricas semi-abertas para medição de emissão de gás de acordo com a metodologia descrita por Abdalla et al. (2012), sendo

selecionados os animais infectados com maior contagem de OPG e os controles foram selecionados aleatoriamente. A realização do ensaio foi feita com 6 animais infectados e 4 animais controles por vez, sendo realizado três vezes no tempo para completar os 30 animais, e esses grupos foram consideradas como bloco na análise estatística.

Os animais permaneceram durante quatro dias nas câmaras, dois dias para adaptação e dois dias de colheitas de amostras. O fluxo de remoção de ar, a temperatura interna e umidade nas câmaras foram medidas a intervalos regulares de quatro horas. O fluxo médio de remoção de ar é o produto entre as medidas do anemômetro (CE Instrutherm AD-250, São Paulo, Brasil) e a área da saída de ar das câmaras. A quantidade de gases eliminada e a concentração do CH₄ neste gás foram medidas durante as 48 horas (após a adaptação) para cada animal em cada tratamento. A concentração de CH₄ foi determinada em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC2010, SINC Brasil, São Paulo, Brasil) equipado com um detector de ionização de chamas (FID), com uma coluna capilar HP-Molesieve (30 m comprimento, ID 0,530 mm, Film 25.00 µm). As condições de operação do cromatógrafo foram: temperatura da coluna (isotérmica a 50 °C), injetor (47 °C), detector (280 °C), gás de arraste (Ni 4.6 FID) em fluxo constante a 25 mL/minuto, modo de injeção (Split) e tempo de corrida de 4 minutos.

Uma curva de calibração foi realizada para a determinação da concentração de CH₄ com 0, 1, 2 e 5 mL/L e padrão de metano 4.5, sendo a pureza do cilindro de 99,9%. A intensidade de emissão de CH₄ foi realizada pela metodologia de Hegarty et al. (2010) e a produção de CH₄ foi expressa em gramas/dia (g d⁻¹).

3.2.5 Ensaio de digestibilidade aparente das dietas

Após o ensaio de metano entérico, 16 animais (AC: n=3, AI: n=5, BC: n=3, BI: n=5), machos (n=9) e fêmeas (n=7), foram selecionados e distribuídos em gaiolas individuais para estudo de metabolismo durante 5 dias para determinação de digestibilidade aparente dos nutrientes, sendo, nos tratamentos com infecção, utilizados os animais com os mais elevados valores de OPG. As dietas experimentais e o manejo alimentar permaneceram os mesmos. Neste período, amostras diárias de urina foram colhidas em recipientes que continham 100 mL de

ácido sulfúrico a 10%, com volume total determinado em proveta graduada e 10% deste total foi amostrado para formação de um pool de todo o período, que foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise. Igualmente, amostras diárias de fezes e sobras do feno ofertado foram pesadas e amostras representativas de 10% do total foram congeladas (formação de um *pool* de sobras de feno e um *pool* de fezes de cada animal). Nesse período, feno e concentrado continuaram a ser ofertados em cochos separados. Para a realização da análise bromatológica, as amostras de fezes e sobras foram descongeladas, secas em estufa de ventilação forçada a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco dias e moídas a 1 mm em moinho tipo Willey (Marconi, Piracicaba – SP, Brasil), seguindo a metodologia descrita anteriormente no item 3.2.1.

A digestibilidade aparente de cada unidade dietética foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{DA de X (\%)} = [(X \text{ consumido} - X \text{ excretado}) / X \text{ consumido}] * 100$$

DA = Digestibilidade aparente

X = unidade dietética analisada

3.2.6 Estimativa da síntese de proteína microbiana por derivados de purina da urina

Um pool de 5 amostras de urina de cada cordeiro obtidas durante o ensaio de digestibilidade aparente dos nutrientes foi utilizado para a determinação dos derivados de purina. A estimativa da síntese de proteína microbiana foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme protocolo de Chen e Gomes (1992) e Makkar e Chen (2004), após extração com metodologia de Abdalla Filho et al. (2017).

As amostras de urina foram descongeladas até temperatura ambiente e homogeneizadas, procedimento realizado devido a presença de material particulado depositado no fundo dos tubos, e 5 mL destas foram centrifugados durante 20 minutos a 582 g e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Uma amostra de 2 mL da fração sobrenadante foi transferida para outro recipiente onde adicionou-se 0,25 mL de solução de oxipurinol e 2,75 mL de solução

de fosfato monobásico de amônio 0,0025 M (fase móvel A), em seguida, as amostras foram homogenizadas em vórtex e 1 mL destas amostras foram filtrados em filtro Millex® 13 mm (FTFE - 0,45 µm) com auxílio de uma seringa. As amostras foram transferidas em *vials* (Agilent 1,5 mL) e encaminhadas para análise em HPLC com a utilização de cromatógrafo Agilent 1100. Este cromatógrafo é munido de bomba quaternária, degaseificador, injetor automático de amostras, termostato, detector de arranjo de fotodiodos (UV-Vis) e coluna Zorbax ODS C18 (250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm). O sistema de eluição gradiente dos derivados de purina usou como sistema de fase móvel uma solução de fosfato monobásico de amônio (NH₄H₂PO₄) 0,0025 M (fase móvel A) e uma solução de NH₄H₂PO₄ 0,0025 M:metanol, 95:5, v/v (fase móvel B), com vazão de 1,0 a 1,2 mL/min e temperatura da coluna constante a 23 °C.

Foram injetados 20 µL de amostra. A solução de oxipurinol (500 a 1500 µM) foi adotada como padrão interno. Os comprimentos de onda 225, 254, 267 e 284 nm foram verificados para a quantificação dos compostos alantoína e creatinina, hipoxantina e oxipurinol, xantina e ácido úrico, respectivamente.

O nitrogênio microbiano (NM) absorvido no intestino delgado foi estimado de acordo com International Atomic Energy Agency (2003) pela equação:

$$\text{NM (g N/d)} = (\text{MDP} * \text{Teor de N purinas}) / (\text{Proporção N purina: N microbiano} * \text{Digestibilidade das purinas microbianas} * 1000)$$

Sendo:

NM = nitrogênio microbiano absorvido ao intestino delgado;

MDP = metabólitos derivados de purina absorvidos (mmol/d/kg^{0,75});

Teor de N purinas = 70 (mg N/mmol);

Proporção N purina:N microbiano = 0,116;

Digestibilidade das purinas microbianas = 0,83.

O valor de MDP é obtido pela seguinte equação:

$$\text{MDP} = (\text{Área do metabólito} * \text{Concentração do oxipurinol no padrão} * \text{FD}) / ((\text{FC} * \text{área do oxipurinol no padrão}) * \text{volume de urina (mL)})$$

Sendo:

MDP = concentração do metabólito derivado de purina ($\mu\text{M/L}$);

Concentração do oxipurinol no padrão = 50;

FD = fator de diluição = 2,5;

FC = fator de correção dos metabólitos de purina.

Cada metabólito tem o FC calculado pelos valores médios de injeções de padrão, conforme a equação:

$$\text{FC} = \frac{(\text{área do metabólito no padrão} * \text{concentração do oxipurinol no padrão})}{(\text{concentração do metabólito no padrão} * \text{área do oxipurinol no padrão})}$$

3.2.7 Balanço de nitrogênio

A quantificação do metabolismo proteico com a verificação da síntese proteica pode ser realizada por meio da determinação do balanço de nitrogênio, que é medido pela diferença entre o Nitrogênio (N) consumido e o N excretado pelo animal (Andriguetto, 2002), de acordo com a equação:

$$\text{N retido (g dia}^{-1}\text{)} = (\text{N consumido}) - (\text{N excretado})$$

Sendo:

N retido = quantidades médias diárias de N, proveniente das dietas e absorvido pelo animal;

N consumido = N ingerido, proveniente das dietas oferecidas;

N excretado = N excretado nas fezes e na urina.

O método micro-Kjeldahl (AOAC, 2011) foi utilizado para determinar o teor de Nitrogênio total das amostras por meio da colheita em solução de ácido bórico (H_3BO_3), destilação a vapor com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 12M e titulação com solução de H_2SO_4 0,025M. Por fim, a estimativa total de N retido foi calculada somando-se o N retido e o Nitrogênio microbiano (NM), sendo este expresso em porcentagem.

3.2.8 Abate e necropsia parasitológica

Ao final do experimento, 24 animais foram abatidos após um jejum de 15 horas (Tabela 3), sendo utilizado como critério de seleção em animais infectados as maiores contagens de OPG.

Tabela 3 – Abate de cordeiros Santa Inês alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção com *H. contortus*

Tratamentos	n		
	Total	♀	♂
AC Alta proteína sem infecção	5	2	3
BC Baixa proteína sem infecção	5	2	3
AI Alta proteína com infecção <i>H. contortus</i>	7	3	4
BI Baixa proteína com infecção <i>H. contortus</i>	7	3	4

O abate foi realizado com os animais deitados e os diferentes seguimentos do trato digestivo foram amarrados para que não houvesse movimentação de conteúdos e que estes não se misturassem entre as câmaras gástricas.

O abomaso foi aberto pela curvatura maior. A mucosa foi lavada em recipiente graduado. Foi padronizado o volume final de dois litros e retirada uma alíquota de 20% do volume obtido acrescido com formalina a 10% para fixação dos vermes presentes no conteúdo (Gennari et al., 1997; Ueno; Gonçalves, 1998).

3.2.9 Rendimento de carcaça e coloração da carne

Após os procedimentos de abate, um corte longitudinal foi feito para separar cada carcaça em duas metades na linha dorso lombar, que corresponde à coluna vertebral. Porém, para calcular o peso da carcaça quente (PCQ), as duas meias-carcaças foram pesadas. Posteriormente, as carcaças foram mantidas em câmara fria por 24 horas a 4 °C, sendo então, novamente as duas meias-carcaças pesadas, determinando o peso da carcaça fria (PCF).

Para o cálculo dos rendimentos de carcaça quente (RCQ) e fria (RCF) foram utilizadas as seguintes equações: $RCQ(\%) = (PCQ / \text{Peso vivo em jejum}) * 100$ e $RCF(\%) = (PCF / \text{Peso vivo em jejum}) * 100$ (Osório et al, 1998). A perda por

resfriamento (PPR%) foi calculada de acordo com Pérez e Carvalho (2007): $PPR(\%) = ((PCQ - PCF) / PCQ) * 100$. Todos os cordeiros foram pesados em jejum imediatamente antes do abate.

Após o estabelecimento do rigor mortis (24 horas após o abate), realizou-se um corte entre a 12^a e 13^a costelas para exposição do músculo *Longissimus lumborum* em meia-carcaça, no corte conhecido como lombo, e aguardou-se 15 minutos para a ocorrência do blooming (tempo para que a mioglobina passe de mioglobina reduzida – deoximioglobina – cor púrpura opaca – a oximioglobina – cor vermelho cereja, que acontece com a exposição da mioglobulina ao oxigênio, quando exposta ao ar) e então, realizaram-se três medidas de cor por animal através do colorímetro modelo CM-600d (Konica Minolta Optics, Inc., Japão) o qual utiliza o sistema CIELAB com coordenadas L* (luminosidade), a* (intensidade de vermelho) e b* (intensidade de amarelo).

A mesma amostra de *Longissimus lumborum* foi utilizada para mensurar a área de olho de lombo (AOL). A área da região do músculo foi desenhada colocando transparência diretamente sobre a amostra que foi depois digitalizada e, por meio do plugin CurveMeter do programa CorelDRAW® as áreas das imagens foram calculadas (cm²).

3.2.10 Endoparasitos

Com auxílio de microscópio estereoscópico, os endoparasitos recuperados foram contados, separados por sexo e armazenados em álcool etílico a 70%. Os comprimentos corporais foram mensurados utilizando uma régua comum em 5 endoparasitos fêmeas e 5 machos escolhidos aleatoriamente em cada amostra (Ueno; Gonçalves, 1998).

Posteriormente, o número de ovos das fêmeas de *H. contortus* foi determinado colocando cinco fêmeas aleatórias de cada amostra em microtubos com 950 µm de água destilada que foram trituradas em dispersor IKA Ultra Turrax T10 Basic (IKA, Germany). O cálculo do número total de ovos foi estimado contando os ovos presentes em 10 alíquotas de 10 µL (Kloosterman et al., 1978).

3.2.11 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do programa SAS[®]9.4 (SAS Institute Inc., Cary – NC, EUA). Foi utilizado o PROC MIXED para as variáveis tomadas mais de uma vez no tempo e o PROC GLM para as variáveis obtidas apenas uma vez. O efeito do sexo foi avaliado em todas as variáveis e, na produção de metano entérico as diferentes datas de colheita das amostras foram consideradas como bloco. Durante o período de 34 dias pré-infecção artificial, foram testados apenas os efeitos de dieta e sexo. Os dados de OPG e a contagem dos endoparasitos foram transformados em $\log_{10}(x+10)$. Todas as variáveis foram testadas para significância de 5% utilizando o teste pdiff.

3.3 Resultados

3.3.1 Desempenho animal

Os animais permaneceram um período de 34 dias nas dietas experimentais antes de receberem a infecção artificial de *H. contortus*, quando foram considerados apenas dois tratamentos, que consistiam em animais que consumiam alta proteína e os que consumiam baixa proteína na dieta. Neste período pré-infecção, houve efeito da dieta ($P = 0,0006$) e efeito de sexo ($P < 0,0001$) sobre o consumo diário de MS, sem interação entre eles ($P = 0,3021$). Os animais machos de alta e de baixa proteína apresentaram maior consumo diário (787 g dia^{-1} e 773 g dia^{-1} , respectivamente) quando comparados às fêmeas, sem diferença entre eles ($P = 0,0962$). Por sua vez, as fêmeas de alta proteína apresentaram maior consumo (754 g dia^{-1}) em comparação as de baixa proteína (728 g dia^{-1}) ($P = 0,0013$).

Com relação ao consumo pelo peso metabólico ($\text{consumo}/\text{PC}^{0,75}$) não houve efeito de dieta e sexo no período pré-infecção, porém houve interação entre estes ($P = 0,0033$). Os machos de alta proteína e as fêmeas de baixa proteína diferiram dos machos de baixa proteína na dieta ($P < 0,05$) que consumiram 65 g dia^{-1} , 65 g dia^{-1} e 63 g dia^{-1} , respectivamente. As fêmeas de alta proteína apresentaram $\text{consumo}/\text{PC}^{0,75}$ de 64 g dia^{-1} sem diferença com os demais grupos ($P > 0,05$).

No peso corporal médio do período pré-infecção, houve efeito de sexo ($P = 0,0052$), mas não houve diferença para dieta e interação entre dieta e sexo ($P > 0,05$). Os machos de alta e de baixa proteína apresentaram maiores valores médios

de peso vivo (28 e 28 kg, respectivamente) quando comparados as fêmeas de alta e baixa proteína (25 e 26 kg, respectivamente).

Os resultados das variáveis consumo de MS, consumo/PC^{0,75}, peso corporal, GMDP e GTP do período pós-infecção artificial para os tratamentos AC, AI, BC e BI estão apresentados na Tabela 4. Na Figura 2 estão apresentados os valores de consumo diário de MS dos quatro tratamentos no período de 30 dias antes da infecção até o final do ensaio de desempenho. Os animais do tratamento AC apresentaram maiores consumos de MS e consumo/PC^{0,75} e os AI apresentaram os menores valores.

Não houve diferença em peso vivo inicial, peso vivo final, GMDP e GTP ($P > 0,05$) durante o período de desempenho entre os tratamentos. Animais machos apresentaram maiores pesos inicial e final (27 e 35 kg, respectivamente) do que as fêmeas (24 e 31 kg, respectivamente) ($P < 0,05$). Na Figura 3 estão apresentados os valores médios de peso corporal durante todo o período de desempenho.

Tabela 4 – Consumo de matéria seca (MS), consumo de MS em relação ao peso metabólico (CMS g kg⁻¹ PC^{0,75}) e peso corporal de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus* durante ensaio de desempenho (período pós-infecção artificial)

Variáveis	Alta proteína		Baixa proteína		E.P.M.	Valor de P			
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Sexo	Dieta x infecção
Consumo de Matéria Seca (g MS)	1068 ^a	975 ^c	1052 ^a	1028 ^b	90,9	0,0376	<0,0001	<0,0001	0,0001
Consumo g kg ⁻¹ PC ^{0,75}	80,0 ^a	76,4 ^b	81,3 ^a	80,2 ^a	5,94	<0,0001	<0,0001	NS	0,0342
Peso vivo inicial (kg)	27	25	25	26	1,59	NS	NS	0,0442	NS
Peso vivo final (kg)	34	31	32	32	1,97	NS	NS	0,0306	NS
GMDP (g dia ⁻¹ animal)	129	101	125	116	11,0	NS	NS	NS	NS
GTP (kg/animal)	7,37	5,78	7,17	6,62	0,63	NS	NS	NS	NS

GMDP: ganho médio diário em peso; GTP: ganho total em peso. Letras sobrescritas diferentes representam médias diferentes a 5% de significância. NS = não significativo (P > 0,05).

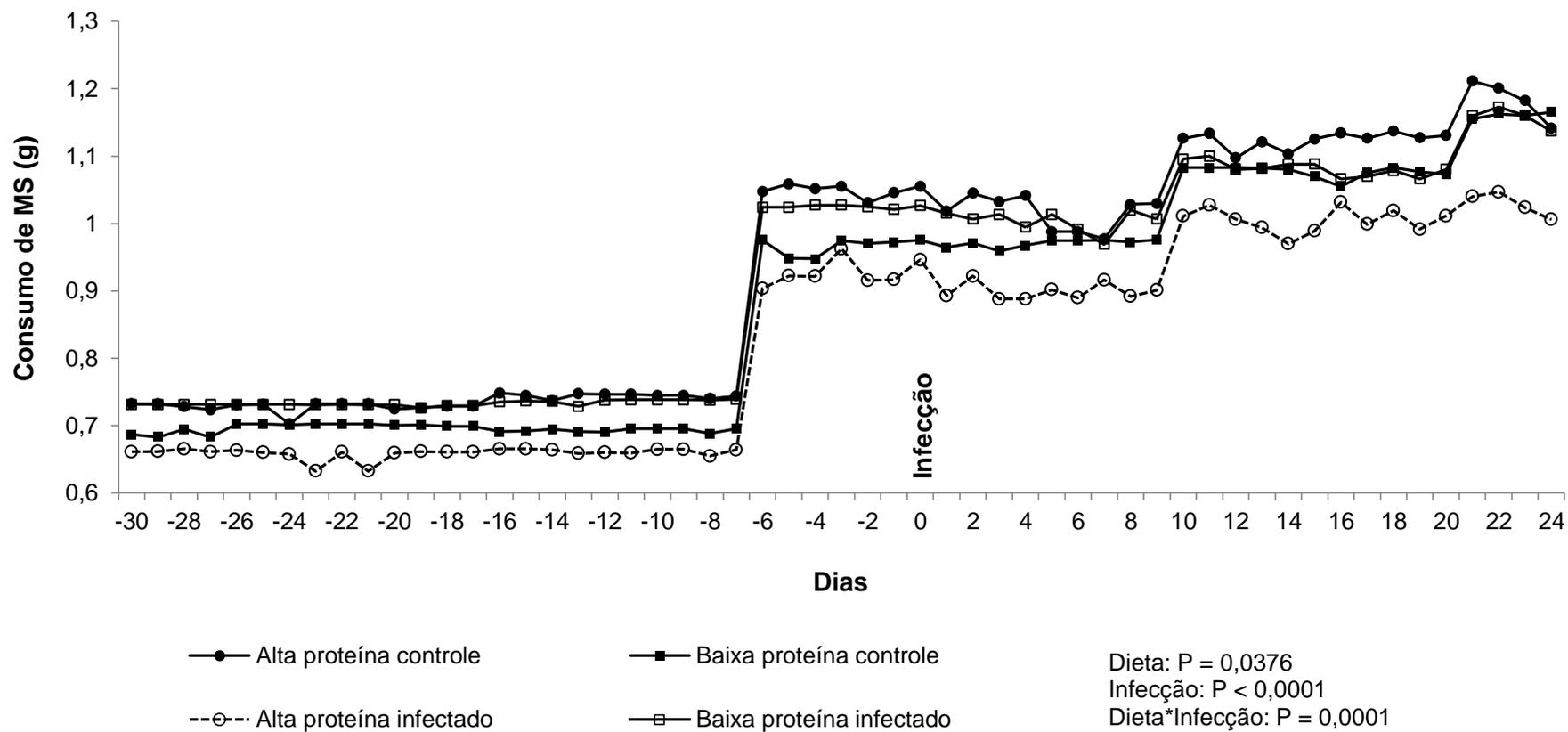


Figura 2 – Consumo de matéria seca (MS) de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus* durante ensaio de desempenho

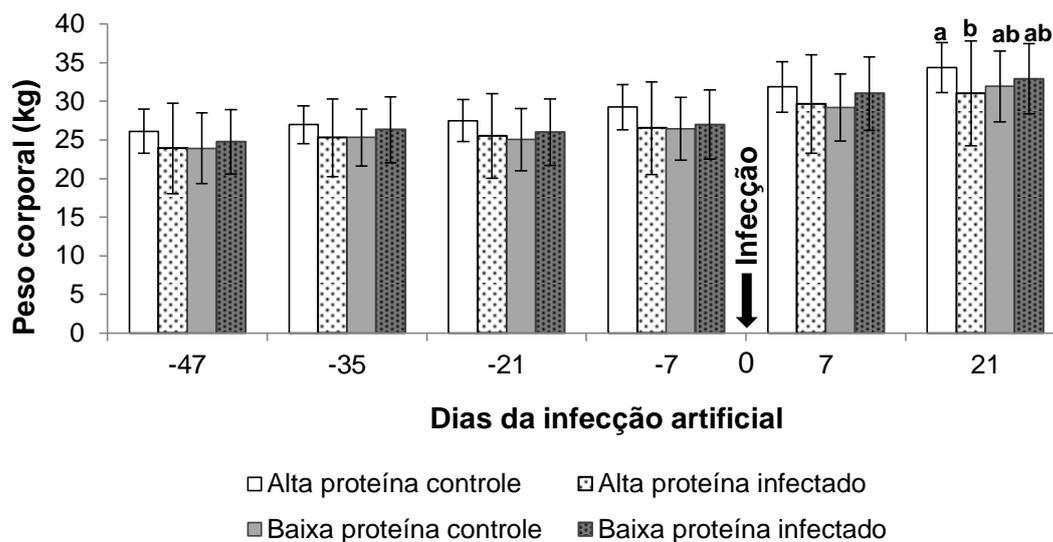


Figura 3 – Evolução do peso corporal (médias \pm DP) em cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*. Letras diferentes representam diferença a 5% de significância

3.3.2 Perfil hematológico, leucocitário e bioquímico

No período pré-infecção não houve diferença para os valores de contagens de hemácias, leucócitos, plaquetas, teor de hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM ($P > 0,05$) entre os animais dos diferentes tratamentos. Foi observado efeito de sexo ($P = 0,0198$) sobre HCM sendo os menores valores apresentados pelos animais machos de baixa proteína na dieta, sem diferenças entre os demais tratamentos ($P > 0,05$).

Na fração leucocitária, foi observado efeito de dieta ($P = 0,0072$) sobre neutrófilos, com maiores valores ($P < 0,05$) nos animais de alta proteína quando comparados aos de baixa proteína na dieta. Houve efeito de dieta também sobre linfócitos ($P = 0,0190$) com maiores valores nos animais de baixa proteína. Não houve efeitos de dieta, sexo e efeito de interação ($P > 0,05$) sobre os valores de monócitos, eosinófilos e basófilos durante o período pré-infecção. Estes resultados estão na faixa de normalidade para ovinos (Kramer, 2006).

O perfil hematológico e leucocitário do período pós-infecção estão apresentados na Tabela 5. Houve efeito da infecção sobre as variáveis de

hemograma ($P < 0,0001$), os animais BI foram os mais afetados em comparação aos demais, a partir do 21º dia pós-infecção quando tem início o período de patência da infecção, principalmente para valores de hematócrito, eritrócitos, hemoglobina e plaquetas, com valores mais baixos ($P < 0,05$). Efeito de infecção ($P < 0,0001$) também foi observado em HCM e CHCM com maiores valores para os animais infectados. Efeito da dieta foi observado nos valores de hematócrito e hemoglobina ($P < 0,05$) sendo os animais BI os mais afetados com menores valores. Já o efeito de sexo foi observado nas contagens de eritrócitos e plaquetas, sendo maiores médias observadas nos animais machos ($P < 0,05$) e em HCM e CHCM com maiores médias nas fêmeas ($P < 0,05$). Os resultados de todas as observações estão apresentados na Figura 4.

Na fração leucocitária, os animais do tratamento AI apresentaram maior valor de neutrófilos em comparação aos BI que apresentaram o menor ($P < 0,05$). Por outro lado, animais AI apresentaram o menor valor de linfócitos em comparação aos demais tratamentos ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos nas demais células da fração leucocitária do período pós-infecção (Figura 5).

Tabela 5 – Hemograma e leucograma de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus* (período pós-infecção artificial)

Variáveis	Alta Proteína		Baixa Proteína		E.P.M.	Valor de P			
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Sexo	Dieta x infecção
Hemograma									
Eritrócitos ($10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	12,1 ^a	10,9 ^b	12,2 ^a	9,95 ^c	1,29	NS	<0,0001	0,0205	0,0389
Hematócrito (%)	35,9 ^a	33,0 ^b	35,9 ^a	30,4 ^c	2,78	0,0150	<0,0001	NS	0,0246
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	12,5 ^a	11,8 ^{ab}	12,3 ^{ab}	10,8 ^b	1,13	0,0146	<0,0001	NS	NS
VCM (fL)	29,8 ^{bc}	30,7 ^{ab}	29,5 ^c	31,1 ^a	1,86	NS	0,0010	NS	NS
HCM (pg)	10,4 ^b	10,9 ^a	10,2 ^b	11,0 ^a	0,60	NS	<0,0001	0,0022	NS
CHCM (g dL ⁻¹)	34,7 ^b	35,6 ^a	34,4 ^b	35,4 ^a	1,08	NS	<0,0001	0,0054	NS
Plaquetas ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	326 ^{ab}	278 ^{ab}	347 ^a	248 ^b	114	NS	0,0016	0,0278	NS
Leucograma									
Leucócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	7,4	9,2	8,3	8,6	2,88	NS	NS	NS	NS
Neutrófilos (%)	44,9 ^b	51,8 ^a	44,5 ^{ab}	43,5 ^b	8,66	0,0256	NS	NS	0,0447
Linfócitos (%)	51,2 ^a	44,5 ^b	51,7 ^a	52,1 ^a	8,33	0,0308	NS	NS	NS
Eosinófilos (%)	0,59	0,74	0,64	0,70	0,67	NS	NS	NS	NS
Monócitos (%)	3,36	2,85	2,98	3,68	1,50	NS	NS	NS	NS
Basófilos (%)	0,022	0,018	0,080	0,017	0,16	NS	NS	NS	NS

¹Kramer (2006). VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. Letras sobrescritas diferentes representam médias diferentes a 5% de significância. NS = não significativo ($P > 0,05$).

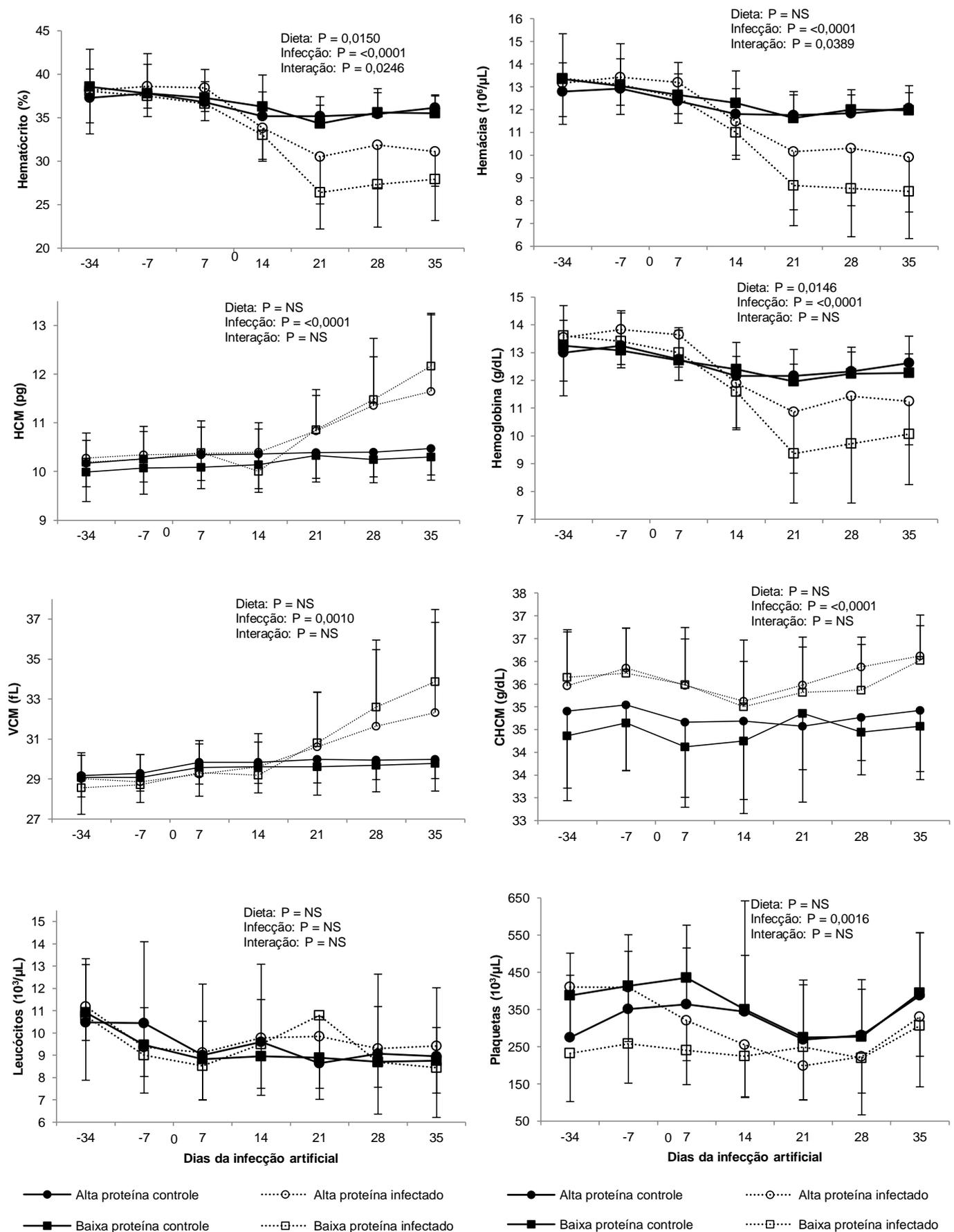


Figura 4 – Perfil hematológico de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*. NS = não significativo ($P > 0,05$)

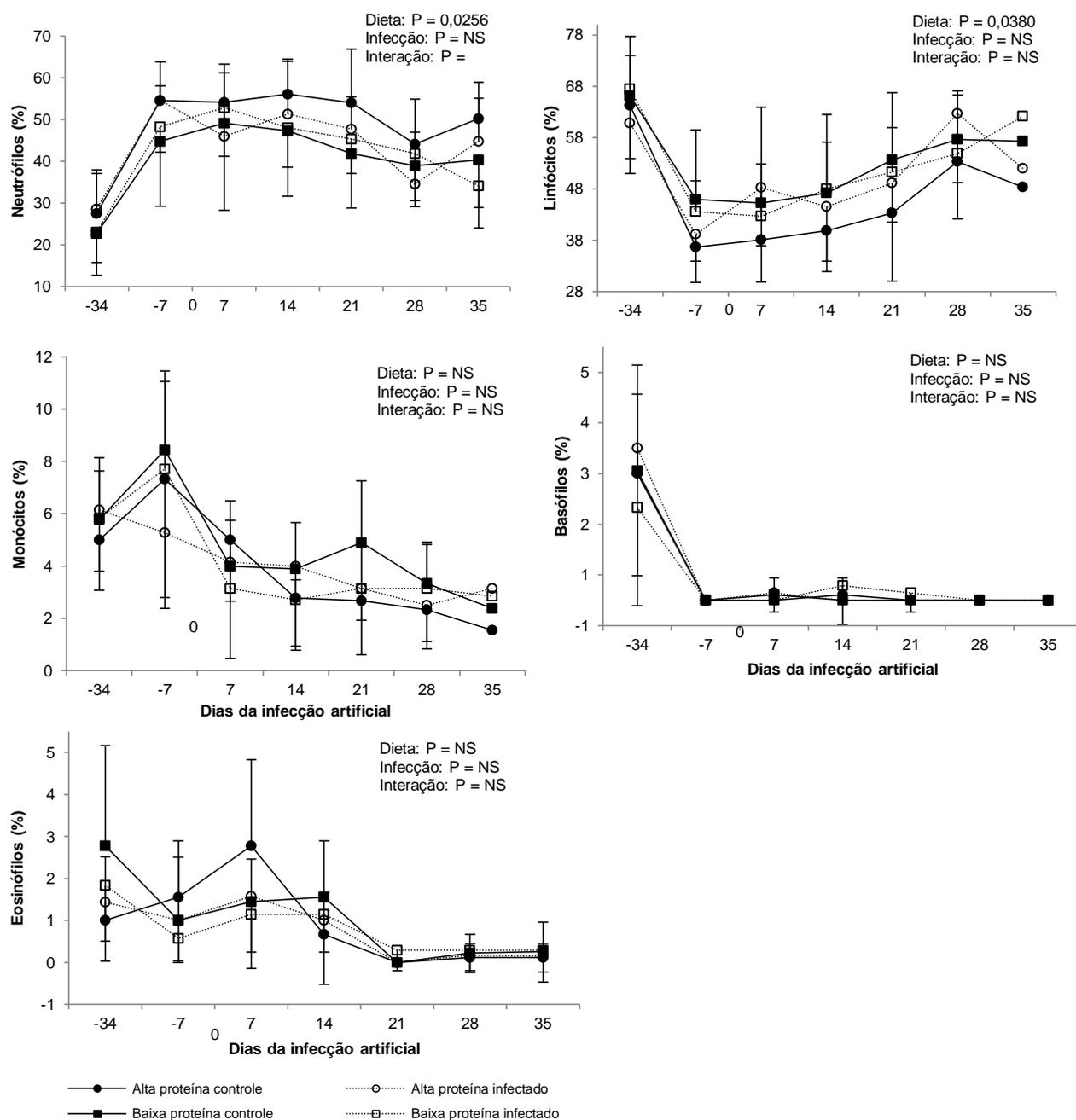


Figura 5 – Percentual de células da fração leucocitária de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*. NS = não significativo ($P > 0,05$)

Os resultados da análise bioquímica em soro de sangue do período pós-infecção artificial estão apresentados na Tabela 6. O animais do tratamento BI foram os mais afetados com menores valores de proteínas totais e de albumina ($P < 0,05$). Por outro lado, maiores valores de glicose foram observados nos animais BI e menores nos AI. Os valores de ureia foram mais altos nos tratamentos de alto teor de proteína e mais baixos nos de baixa proteína durante todo o período experimental ($P < 0,05$), conforme apresentado na Figura 6.

Tabela 6 – Bioquímica sérica do sangue de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus* (período pós-infecção artificial)

Variáveis Bioquímicas	Alta Proteína		Baixa Proteína		E.P.M.	Valor de P			
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Sexo	Dieta x infecção
Proteínas Totais (g dL ⁻¹)	6,40 ^{ab}	6,52 ^a	6,36 ^{ab}	6,10 ^b	0,50	0,0421	NS	NS	NS
Albumina (g dL ⁻¹)	3,10 ^a	2,85 ^b	2,93 ^b	2,72 ^c	0,23	0,0048	<0,0001	NS	NS
Glicose (mg dL ⁻¹)	54,7 ^b	55,5 ^{ab}	57,9 ^{ab}	59,4 ^a	6,93	0,0215	NS	0,0231	NS
Ureia (mg dL ⁻¹)	57,7 ^b	62,0 ^a	39,5 ^c	43,2 ^c	6,39	<0,0001	0,0057	NS	0,0223

¹Kaneko et al. (2008). Letras sobrescritas diferentes representam médias diferentes a 5% de significância. NS = não significativo (P > 0,05).

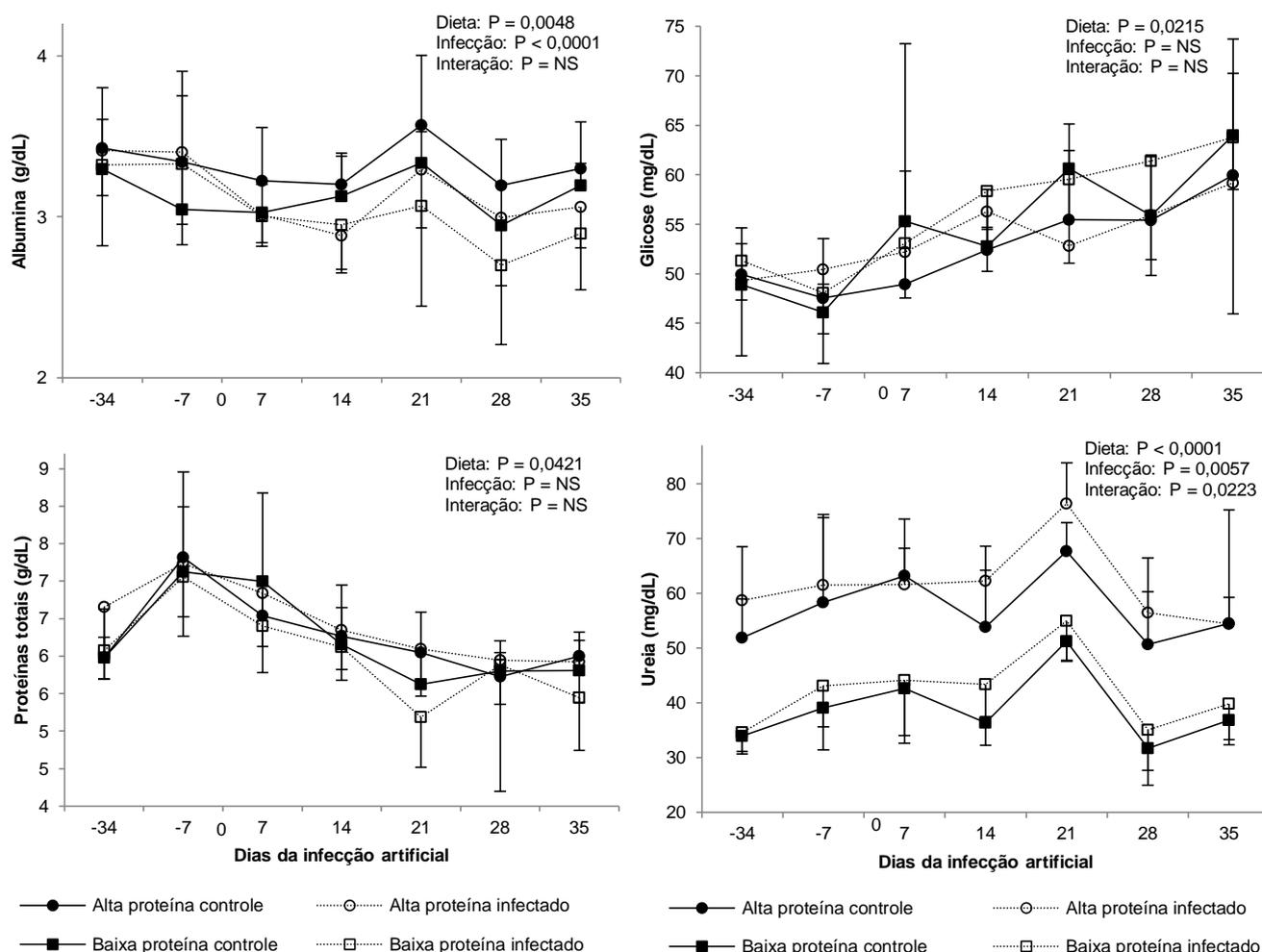


Figura 6 – Perfil da bioquímica sérica do sangue de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*. NS = não significativo ($P > 0,05$)

3.3.3 Produção de metano entérico

Os resultados obtidos durante o ensaio de produção de metano entérico com o uso das câmaras respirométricas estão apresentados na Tabela 7. Os dados foram obtidos entre 26 e 37 dias pós-infecção artificial. Houve efeito da infecção ($P < 0,05$) sobre a produção de metano (g dia^{-1}), que foi significativamente maior nos animais do tratamento BI em comparação aos demais tratamentos ($P < 0,05$).

No metano produzido (g) por MS consumida (kg) houve efeito de infecção ($P < 0,0001$), com diferença entre os tratamentos em que os animais AI e BI apresentaram maiores valores quando comparados aos animais AC e BC.

No consumo de MS durante o ensaio de produção de metano entérico, os animais AC consumiram mais que os AI. Não foram observados efeitos de interação ($P > 0,05$) entre tratamentos.

Tabela 7 – Produção de metano entérico (CH₄) e consumo de matéria seca (MS) de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

Variáveis	Alta Proteína		Baixa Proteína		E.P.M.	Valor de P			
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Sexo	Dieta x infecção
CH ₄ (g dia ⁻¹)	10,6 ^c	13,2 ^b	11,8 ^{bc}	15,6 ^a	1,79	0,0498	0,0009	NS	NS
CH ₄ (g kg MS dia ⁻¹)	10,4 ^b	14,3 ^a	11,3 ^b	15,3 ^a	1,78	NS	<0,0001	NS	NS
Consumo de MS (kg dia ⁻¹)	1,071 ^a	0,933 ^b	1,040 ^{ab}	1,026 ^{ab}	0,07	NS	0,0495	<0,0001	NS

Letras sobrescritas diferentes representam médias diferentes a 5% de significância. NS = não significativo (P > 0,05).

3.3.4 Digestibilidade aparente das dietas

As médias da digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas estão apresentadas na Tabela 8. Houve efeito da dieta com maior digestibilidade da proteína para os animais de alta proteína ($P = 0,0007$), com destaque para maior digestibilidade de PB para os AI em relação aos BI, não havendo diferença entre os demais tratamentos.

A digestibilidade de MS, MO, FDN e FDA não foram afetados pela dieta nem pela infecção ($P > 0,05$). Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) de sexo e sua interação entre os tratamentos nas variáveis analisadas.

Tabela 8 – Digestibilidade aparente da dieta em cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

Digestibilidade (%)	Alta proteína		Baixa proteína		E.P.M.	Valor de P			
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Sexo	Dieta x infecção
Digestibilidade de Matéria Seca	69,6	75,5	75,2	69,2	3,55	NS	NS	NS	NS
Digestibilidade de Matéria Orgânica	73,6	81,3	78,3	74,5	3,23	NS	NS	NS	NS
Digestibilidade de Proteína Bruta	79,4 ^{ab}	84,3 ^a	72,9 ^{ab}	67,0 ^b	2,93	0,0007	NS	NS	NS
Digestibilidade de Fibra em Detergente Neutro	61,7	73,9	66,8	61,6	5,26	NS	NS	NS	NS
Digestibilidade de Fibra em Detergente Ácido	54,8	67,0	56,2	53,0	6,77	NS	NS	NS	NS

Letras sobrescritas diferentes representam médias diferentes a 5% de significância. NS = não significativo ($P > 0,05$).

3.3.5 Estimativa da síntese de proteína microbiana por derivados de purina e balanço de nitrogênio

Os resultados dos derivados de purinas excretados na urina (mmol dia^{-1} e $\mu\text{mol dia}^{-1} \text{kg}^{0,75}$) e nitrogênio microbiano absorvido estão apresentados na Tabela 9. Foi observado efeito da infecção ($P = 0,0004$) sendo que os animais controles apresentaram maiores valores quando comparados aos infectados ($P < 0,05$). Não houve efeito da dieta, sexo ou efeito de interação ($P > 0,05$) destes sobre as variáveis analisadas.

A quantidade de nitrogênio consumido, excretado (fezes e urina) e a quantidade retida estão apresentados na Tabela 10. Houve efeito da dieta sobre o nitrogênio consumido ($P < 0,0001$) e sobre o nitrogênio retido ($P < 0,0001$). Os animais do tratamento AC apresentaram maior valor para nitrogênio excretado quando comparados aos AI ($P < 0,05$). Não foram observados efeitos de sexo e de interação sobre as variáveis analisadas ($P > 0,05$).

Tabela 9 – Estimativa da síntese de proteína microbiana por derivados de purina da urina de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

Variáveis	Alta proteína		Baixa proteína		E.P.M.	Valor P			
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Sexo	Dieta x infecção
DP (mmol dia ⁻¹)	7,84 ^a	1,87 ^b	9,89 ^a	2,56 ^b	1,48	NS	0,0004	NS	NS
DP (μmol dia ⁻¹ kg PC ^{0,75})	571 ^a	134 ^b	687 ^a	174 ^b	110	NS	0,0005	NS	NS
NM _{absorvido} (g N dia ⁻¹)	5,18 ^a	1,00 ^b	6,63 ^a	1,50 ^b	1,03	NS	0,0004	NS	NS

DP: derivados de purina excretados na urina; NM: nitrogênio microbiano.

Letras sobrescritas diferentes representam médias diferentes a 5% de significância. NS = não significativo (P > 0,05).

Tabela 10 – Balanço de nitrogênio (N) de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

Variáveis	Alta proteína		Baixa proteína		E.P.M.	Valor P			
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Sexo	Dieta x infecção
N consumido (g dia ⁻¹)	34,6 ^a	36,5 ^a	12,1 ^b	15,2 ^b	3,56	<0,0001	NS	NS	NS
N excretado (g dia ⁻¹)	13,0 ^a	10,6 ^{ab}	11,0 ^{ab}	10,1 ^b	0,98	NS	NS	NS	NS
N retido (g dia ⁻¹)	21,5 ^a	25,9 ^a	1,09 ^b	5,10 ^b	3,34	<0,0001	NS	NS	NS

Letras sobrescritas diferentes representam médias diferentes a 5% de significância. NS = não significativo (P > 0,05).

3.3.6 Rendimento de carcaça e coloração da carne

Não houve diferença entre as médias ($P > 0,05$) para PCQ, PCF, RCQ, RCF e AOL entre os tratamentos (Tabela 11).

Os resultados de cor de carne dos cordeiros encontram-se na Tabela 13. Lembrando que, os valores Minolta para L^* variam entre 1 ("puro preto") e 100 ("puro branco"). Quanto menor o valor L^* mais escura é a carne e quanto maior o valor de L^* mais pálida é a carne (Tarsitano et al., 2012).

As variáveis L^* (luminosidade da carne), a^* (intensidade de vermelho da carne) e b^* (intensidade de amarelo da carne) não foram diferentes entre os tratamentos ($P > 0,05$). Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) de dieta, infecção, sexo e efeito de interação entre os tratamentos para L^* , a^* e b^* das amostras dos cordeiros (Tabela 12).

Tabela 11 – Rendimento de carcaça de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

Variáveis	Alta Proteína		Baixa Proteína		E.P.M	Valor de P			
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Sexo	Dieta x infecção
Peso pré-abate	34,9	34,1	35,2	33,7	2,63	NS	NS	NS	NS
PCQ (kg)	16,1	16,2	15,4	15,6	2,28	NS	NS	NS	NS
PCF (kg)	16,0	15,9	15,4	15,3	2,11	NS	NS	NS	NS
RCQ (%)	46,0	47,0	43,9	46,0	1,36	NS	NS	NS	NS
RCF (%)	45,1	45,6	43,1	44,9	1,39	NS	NS	NS	NS
PPR (%)	2,04	3,11	2,04	2,26	0,95	NS	NS	NS	NS
AOL (cm ²)	14,3	13,0	13,1	12,7	1,94	NS	NS	NS	NS

PCQ: peso da carcaça quente; PCF: peso da carcaça fria; RCQ: rendimento de carcaça quente; RCF: rendimento de carcaça fria; PPR: perdas por resfriamento; AOL: área de olho de lombo; NS = não significativo (P > 0,05).

Tabela 12 – Coloração da carne de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

Variáveis	Alta Proteína		Baixa Proteína		E.P.M.	Valor de P			
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Sexo	Dieta x infecção
L*	40,4	40,2	38,5	39,8	2,11	NS	NS	NS	NS
a*	10,2	8,9	12,3	10,2	1,77	NS	NS	NS	NS
b*	10,8	10,0	11,6	10,5	1,14	NS	NS	NS	NS

L*: luminosidade da carne; a*: intensidade de vermelho da carne; b*: intensidade de amarelo da carne. NS = não significativo (P > 0,05).

3.3.7 Endoparasitos

Os ovinos foram infectados com 10000 larvas de *H. contortus* e abatidos, 42 dias após, para a recuperação dos endoparasitos presentes no abomaso. A contagem do número de fêmeas e machos de *H. contortus*, número total de endoparasitos, comprimento de fêmeas e de machos de *H. contortus*, produção de ovos por fêmea e estabelecimento da infecção (Tabela 13) não apresentaram diferença nem efeito da dieta, de sexo ou efeito de interação dessas variáveis ($P > 0,05$). A contagem do OPG (Figura 7) não foi diferente entre os tratamentos mas a média foi maior nos ovinos machos (1435 ovos) do que nas fêmeas (683 ovos) ($P < 0,05$).

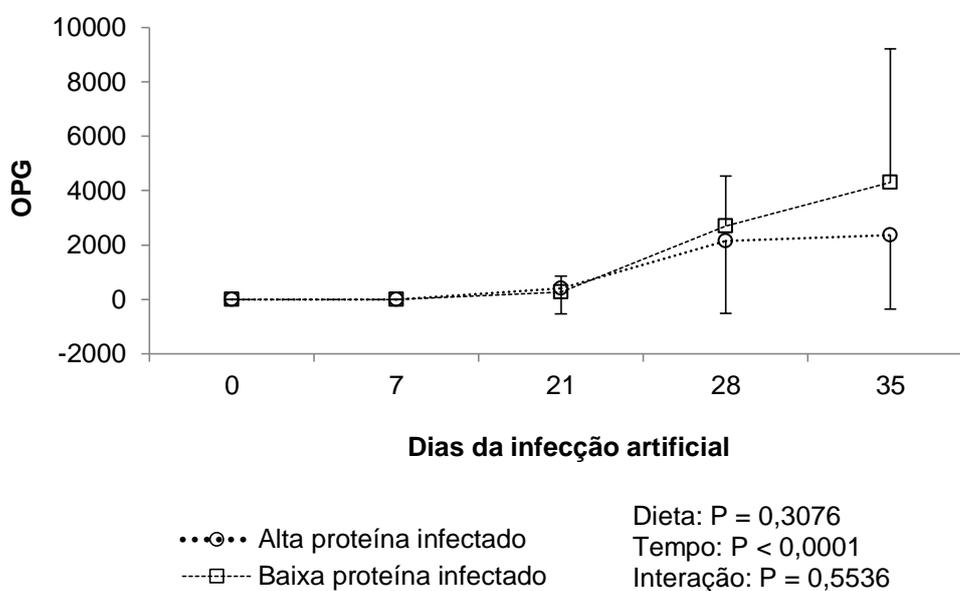


Figura 7 – Médias \pm desvio padrão das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta e infectados por *Haemonchus contortus*

Tabela 13 – Média \pm desvio padrão da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), do número de endoparasitos machos, fêmeas e total, do comprimento de endoparasitos machos e fêmeas, do número de ovos por fêmea e do estabelecimento da infecção parasitária por *Haemonchus contortus* em cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta

Variáveis	Alta proteína	Baixa proteína	E.P.M.	Valor de P		
	Infectado	Infectado		Dieta	Sexo	Dieta x Sexo
OPG	873 \pm 1874	1246 \pm 2666	257	NS	0,0415	NS
Número de fêmeas	884 \pm 987	1137 \pm 957	400	NS	NS	NS
Número de machos	683 \pm 900	906 \pm 819	344	NS	NS	NS
Número total de endoparasitos	1567 \pm 1868	2043 \pm 1763	740	NS	NS	NS
Tamanho de fêmeas (mm)	18 \pm 1,9	20 \pm 3	1,20	NS	NS	NS
Tamanho de machos (mm)	14 \pm 1,7	15 \pm 0,6	0,57	NS	NS	NS
Número de ovos por fêmea	183 \pm 142	252 \pm 126	62,4	NS	NS	NS
Estabelecimento da infecção	0,158	0,205	0,11	NS	NS	NS

Letras sobrescritas diferentes representam médias diferentes a 5% de significância. NS = não significativo ($P > 0,05$).

3.4 Discussão

A inoculação artificial de 10.000 L3 de *H. contortus* no protocolo experimental empregado resultou em infecção parasitária acima de 1000 endoparasitos contados após 42 dias na necropsia parasitológica, infecção classificada como intensa segundo Ueno e Gonçalves (1998). Sinais clínicos típicos de haemoncose, como edema submandibular e inapetência não foram observados durante os 42 dias do período pós-infecção.

Resultados semelhantes foram verificados por Hupp et al. (2018) que também realizaram inoculação artificial única de 10.000 L3 de *H. contortus* em cordeiros mestiços Santa Inês e não observaram estabelecimento de infecção severa nem sinais clínicos típicos de hemoncose. Os autores atribuíram esses resultados a resistência contra as infecções por *H. contortus*, relacionada à raça Santa Inês.

Houve alta variação na carga parasitária entre os animais AI e BI, não sendo observada diferença entre eles ($P > 0,05$). No entanto, no tratamento AI, a maioria dos animais (6) apresentou contagem de 60 a 2410 endoparasitos e apenas um animal com alta contagem de 5355 endoparasitos. No tratamento BI, os animais apresentaram contagens de 210 e 4990 endoparasitos. Essa variação é característica da imunidade inata do hospedeiro, que pode dificultar o estabelecimento das L3 ou causar a expulsão de endoparasitos adultos, mesmo em infecção primária. Deste modo, se for considerada esta variação há evidências que o teor proteico da dieta contribuiu para menor estabelecimento dos endoparasitos, conforme relatado por Abbott et al. (1985).

Ao observar os resultados das variáveis OPG, tamanho de endoparasitos e número de ovos no trato reprodutor dos endoparasitos fêmeas, verificou-se que não houve diferença entre os tratamentos AI e BI ($P > 0,05$), já que se trata de infecção primária sem infecções subsequentes que pudessem melhor desafiar o sistema imune dos cordeiros (Courtney et al., 1985). Nesse caso, as diferenças entre tratamentos poderiam ser mais pronunciadas.

Ao analisar o período total, enquanto os animais BI apresentaram aumento progressivo de OPG, os AI apresentaram diminuição após o período de pico da infecção, como já relatado na literatura (Veloso et al., 2004). Outrossim, sinais de anemia não foram verificados, caracterizando resiliência desses animais frente a

infecção. Ainda, a partir do 28º dia pós infecção, as contagens de OPG foram diminuindo gradualmente nos animais AI até o final do experimento sem observação de sinais clínicos. Estes resultados tendem a substanciar a sugestão de que os animais manifestaram sua resiliência e limitaram o desenvolvimento da infecção. Em trabalhos desenvolvidos anteriormente, ovinos da raça Santa Inês se destacaram em resistência quando comparados aos animais das raças Suffolk, Ile de France e Poll Dorset (Moraes et al., 2000; Amarante et al., 2004).

Abbott et al. (1985) não observaram diferenças no estabelecimento da infecção com *H. contortus* na raça Scottish Blackface em experimento com diferentes teores de proteína na dieta. Os autores atribuíram esse resultado à resistência da raça à infecção. Em outro experimento, os mesmos autores concluíram que quando alimentados com alto teor de proteína na dieta os cordeiros mostravam resistência a infecção, em contraste com alimentação de baixa proteína (Abbott et al., 1988).

A resistência parasitária é definida como a capacidade do hospedeiro em evitar o estabelecimento da infecção e expulsar os endoparasitos do TGI. E denomina-se resiliência a capacidade do animal em manter índices zootécnicos interessantes mesmo com a presença da infecção parasitária (Selemon, 2018). Diversos estudos verificaram a resistência e resiliência da raça Santa Inês a infecções por NGI em comparação a raças européias (Amarante et al., 2004; Bricarello et al., 2005; Retama-Flores et al., 2012). O Santa Inês possivelmente descende de ovinos submetidos durante longos períodos a processo natural de seleção para resistir a infecções por *H. contortus*, altamente prevalente em regiões tropicais como o Brasil (Amarante et al., 2004).

Os cordeiros não apresentaram diferença em ganho em peso. Esses resultados destacam o impacto substancial do parasitismo sugerindo que os animais parasitados precisariam permanecer por mais tempo no sistema para atingir o peso de abate. Por outro lado, mesmo com consumo de MS e peso corporal reduzidos no tratamento AI, a eficiência digestiva verificada na análise histomorfométrica do abomaso (discutida no capítulo 4), o perfil hematológico e o estabelecimento da infecção não foram significativamente afetados.

Os valores de consumo diário de MS dos cordeiros estão dentro do recomendado pelo NRC (2007). Porém, foi observado durante todo o período experimental que os animais AI consumiram menos ($P < 0,05$) quando comparados aos demais tratamentos. No delineamento experimental utilizado neste trabalho

todos os animais receberam dieta isoenergética, ou seja, mesmo com teores discrepantes de proteína nos tratamentos todos os cordeiros receberam das dietas condições energéticas semelhantes. Para que houvesse ganho em peso com diferença significativa entre os tratamentos, aporte energético adicional seria necessário.

Resultados semelhantes foram relatados por Abbott et al. (1988) que também não observaram maior ganho em peso em cordeiros que consumiram alta proteína na dieta durante infecção com *H. contortus*. Louvandini et al. (2006) observaram que os cordeiros alimentados com alta proteína e naturalmente infectados com *H. contortus* foram os mais afetados quando comparados aos animais infectados e alimentados com baixo teor de proteína em pastagem durante a estação seca. Os autores atribuíram essa diferença às maiores exigências de animais mais pesados durante o início do período da seca com menor disponibilidade e qualidade de forragem tornando estes animais mais vulneráveis a infecção por *H. contortus*.

Os animais BI apresentaram menor digestibilidade de PB em comparação aos AI, que pode ser explicada por uma menor digestibilidade de proteína no abomaso, já que este foi mais afetado pela infecção, como confirmam os resultados da análise histomorfométrica (discutidos no capítulo 4), somado ao já baixo teor de proteína fornecida nesse tratamento. Em meta-análise realizada por Ceï et al. (2018), os autores analisaram 101 publicações representando 466 tratamentos dietéticos e confirmaram a tendência de diminuição da digestibilidade de PB em até 7% em pequenos ruminantes parasitados com NGI. Por outro lado, o alto teor de proteína disponível permitiu aos animais AI uma maior digestibilidade de PB quando comparado ao BI.

Perdas de proteína no organismo de animais infectados por NGI estão associadas à perda de sangue decorrentes dos seguintes fatores: sangue consumido por endoparasitos hematófagos; hemorragia no abomaso, devido a lesões na mucosa; redução da digestibilidade de proteína e aumento da produção de muco (Hoste, 2016). Ao analisar a estimativa de nitrogênio microbiano absorvido, nota-se que ambos os tratamentos infectados estão comprometidos, ou seja, a contribuição de nitrogênio proveniente das bactérias no rúmen nos cordeiros infectados foi menor. Isso pode ter ocorrido por não haver condições adequadas no abomaso lesionado pela infecção para fazer a digestibilidade da proteína microbiana

que vem do rúmen, portanto animais infectados tendem a apresentar menor retenção de nitrogênio (Rowe et al., 1982; Rowe et al., 1988).

Balanço de nitrogênio (N) positivo nos ovinos de todos os tratamentos e ganho em peso demonstraram que houve equilíbrio entre proteína e energia das dietas, e que mesmo os infectados conseguiram reter N e ganhar peso. Porém, os animais AI apresentaram maior retenção de N quando comparados aos AC ($P < 0,05$). Cabe salientar que os animais eram jovens em fase de crescimento e em anabolismo. Esta proporção de retenção maior nos animais AI refletiu nos valores superiores do perfil hematológico e bioquímico do sangue em relação aos BI corroborando com a hipótese inicial deste trabalho que o teor de proteína na dieta foi determinante para aumentar a resiliência dos ovinos frente a hemoncose.

Na análise do hemograma, os cordeiros com alta e baixa proteína não apresentaram a anemia característica da infecção por *H. contortus* (Hoste et al., 2016; Issakowicz et al., 2016; Selemon, 2018). No entanto, os ovinos infectados apresentaram diminuição nas contagens de hemácias, hemoglobina e hematócrito, em comparação com os controles a partir do 14º dia pós infecção, sendo que os animais do BI apresentaram valores mais baixos que AI ($P < 0,05$), evidenciando resiliência superior dos animais que receberam maior teor de proteína na dieta (Van Houtert; Sykes, 1996).

Neste mesmo sentido outro indicador da resiliência manifestada pelos cordeiros com alta proteína, foi a contagem de hemácias com maiores volumes e concentração de hemoglobina mais baixa, resultados que poderiam sugerir a presença de reticulócitos, ou hemácias imaturas, isso somando o aumento nos valores de VCM, resultados que indicam que a medula óssea não foi exaurida durante a infecção parasitária (Andronicos et al., 2014).

Na análise do leucograma, valores mais elevados de neutrófilos foram observados no período de pico da infecção com maior valor em AI quando comparado aos demais tratamentos, entretanto esses animais também já vinham apresentando maiores valores desde o período pré-infecção. Aumento de neutrófilos tende a ocorrer já que durante a hemoncose essas são as primeiras células de defesa a atingirem o abomaso, assim esses resultados também já foram encontrados em trabalhos que estudaram o *H. contortus* em ovinos (Adams, 1993; Ortolani et al., 2013).

Cabe salientar que não foi observada diferença na contagem de eosinófilos circulantes entre os tratamentos ($P > 0,05$) o que poderia sugerir que não houve modulação da resposta celular, porém não foram analisados diferentes graus de parasitismo nem realizadas inoculações seriadas de larvas L3, que poderiam mimetizar condições de infecção em pastagem e aumentar a resposta celular a infecção. Essas células podem migrar para a mucosa do abomaso para combater a infecção. É amplamente aceito que eosinófilos periféricos são indicadores da resposta do hospedeiro em infecções por NGI, apesar de que esta condição não tenha sido observada em todos os trabalhos. Estudando a resistência ao *H. contortus* em ovelhas Merino, Gill (1991) e Adams (1993) não encontraram relação significativa entre ovelhas mais resistentes a infecção e o número de eosinófilos circulantes.

Não houve variação nos resultados de monócitos entre os tratamentos, porém nota-se menores valores a partir do dia 7 pós infecção. Esses valores se devem provavelmente a migração dessas células para o abomaso para combater as larvas do endoparasito (Smith et al., 1984).

Na análise bioquímica do sangue durante todo o período observado os níveis de ureia foram diferentes entre os tratamentos de alta e de baixa proteína ($P < 0,05$), de acordo com o imposto pela dieta. Foram observados valores normais para albumina, proteínas totais e glicose. Em infecções por *H. contortus* em ovinos, hipoalbuminemia e hipoproteinemia são comumente observadas (Bricarello et al., 2002), pois o endoparasito estimula a proliferação e reposição de células epiteliais abomasais, o que conseqüentemente leva à perda de grandes quantidades de proteínas séricas para o intestino. Além disso, a hemodiluição que ocorre após a hemorragia abomasal pode causar hipoproteinemia e hipoalbuminemia relativas (Awad et al., 2016). No entanto, esse quadro não foi observado neste trabalho. Além da capacidade de manutenção dos valores normais, nota-se na comparação entre os tratamentos infectados que AI apresentou valores superiores a BI tanto em níveis de albumina quanto proteínas totais, resultados que reforçam a hipótese de resiliência expressa pela raça Santa Inês pela condição nutricional dos animais.

Conforme observado em vários trabalhos (Armour et al., 1987; Gennari et al., 1995), o peso corporal por si muitas vezes não é um bom indicador do efeito da endoparasitose, pois pode haver alterações metabólicas com retenção líquida e o peso do animal permanece inalterado. Neste sentido, medidas da carcaça podem

ser mais indicadas para verificar alterações na composição corporal do animal. A avaliação do músculo *Longissimus lumborum* é considerada como medida representativa da musculosidade de carcaças, principalmente a partir da avaliação da área de olho de lombo e, por esta razão, tem sido utilizada para classificações e avaliação de sua qualidade e rendimento (Hashimoto et al., 2012).

Não houve diferença entre os tratamentos nas análises de rendimento de carcaça, porém observou-se menores valores para PCQ, PCF e AOL no tratamento BI em comparação aos demais tratamentos, sugerindo que houve um impacto negativo na carcaça, em concordância com outros trabalhos que observaram diferença entre tratamentos com alto e baixo teor de proteína na dieta, com um maior rendimento de carcaça nos cordeiros alimentados com alto teor proteico (Veloso et al., 2004). Seriam necessárias mais análises específicas para qualidade de carne para determinar o efeito da infecção por *H. contortus* sobre o desempenho de cordeiros, já que este não foi o foco principal deste trabalho. Além disso, análises de carcaças requerem diversas medidas para estabelecer uma linha de base para comparação.

Os ovinos infectados apresentaram maior emissão de metano em relação aos controles, indicando que a hemoncose promove perda no aproveitamento energético da dieta estando de acordo com os resultados de Fox et al. (2018). Embora a infecção por *H. contortus* ocorra no abomaso esta interfere no processo fermentativo que ocorre no rúmen. Os mecanismos envolvidos ainda não são conhecidos, o trato digestivo pode apresentar diversas alterações em decorrência das infecções parasitárias, como alterações no pH e na permeabilidade do epitélio, aumento da renovação celular, mudanças nas atividades secretoras ou mesmo inibição da produção de ácido gástrico (Li et al., 2016; Louie et al., 2007). Além disto, grande variedade de produtos secretados por nematódeos gastrintestinais pode impactar no crescimento e metabolismo das comunidades microbianas residentes e na relação entre hospedeiro e microbiota (Zaiss e Harris, 2016). Devido a complexidade da interação endoparasito-hospedeiro-microbiota, novos estudos devem ser realizados para melhor elucidar os mecanismos envolvidos na maior produção de metano nos animais infectados.

3.5 Conclusão

Em conclusão, a alta proteína da dieta confere maior resiliência a cordeiros em crescimento durante a infecção com *H. contortus* com manutenção de valores do perfil hematológico, leucocitário e bioquímico maiores em relação aos cordeiros alimentados com baixo teor de proteína. A infecção reduz a utilização da proteína microbiana vinda do rúmen pelos cordeiros, bem como promove maior produção de metano entérico.

Referências

Abdalla, A. L.; Louvandini, H.; Sallam, S. M. A. H.; Bueno, I. C. S.; Tsai, S. M.; Figueira, A. V. O. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburg, v. 44, n. 5, p. 953-964, 2012.

Abdalla Filho, A. L., Dineshkumar, D., Barreal, M., Mcmanus, C., Vasconcelos, V. R., Abdalla, A. L., Louvandini, H. Performance, metabolic variables and enteric methane production of Santa Inês hair lambs fed *Orbignya phalerata* and *Combretum leprosum*. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, New Jersey, v. 101, p. 457-465, 2017.

Abbott, E. M.; Parkins, J. J.; Holmes, P. H. Influence of dietary protein on parasite establishment and pathogenesis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection of *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 38, p. 6-13, 1985.

Abbott, E. M.; Parkins, J. J.; Holmes, P. H. Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infections. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 45, p. 41-49, 1988.

Adams, D. B. Systemic responses to challenges infection with *Haemonchus contortus* in immune Merino sheep. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 17, p. 23-35, 1993.

Amarante, A. F. T.; Bricarello, P. A.; Rocha, R. A.; Gennari, S. M. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, p. 91-106, 2004.

Andriguetto, J. M.; Perly, L.; Minardi, I.; Gemael, A.; Flemming, J. S.; Souza, G. A. de; Bona Filho, A. **Nutrição animal**. As bases e os fundamentos da nutrição animal. São Paulo: Nobel, 2002. v. 1.

Andronicos, N. M.; Henshall, J. M.; Le Jambre, L. F.; Hunt, P. W.; Ingham, A. B. A one shot blood phenotype can identify sheep that resist *Haemonchus contortus* challenge. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 205, p. 595-605, 2014.

Armour, J.; Bairden, K.; Holmes, P. H.; Parkins, J. J.; Ploeger, H.; Salman, S. K. Pathophysiological and parasitological studies on *Cooperia oncophora* infections in calves. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 42, p. 373-381, 1987.

Association of Official Analytical Chemists – AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011. 1 v.

Association of Official Analytical Chemists – AOAC. **Official methods of analysis**. 20. ed. Gaithersburg: AOAC International, VA, 2016. 3100 p.

Awad, A. H.; Ali, A. M.; Hadree, D. H. Some haematological and biochemical parameters assessments in sheep infection by *Haemonchus contortus*. **Tikrit Journal of Pure Science**, Tikrit, Iraque, v. 21, p. 11-15, 2016.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 62 de 10 de maio de 2018. Regulamento Técnico de Manejo Pré-Abate e Abate Humanitário. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 95, 18 maio 2018. Seção 1, p. 24.

Bricarello, P. A.; Gennari, S. M.; Oliveira-Sequeira, T. C. G.; Vaz, C. M. S. L.; Gonçalves de Gonçalves, I.; Echevarria, F. A. M. Response of Corriedale and Crioula Lanada sheep to artificial primary infection with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 26, p. 447-457, 2002.

Bricarello, P. A.; Amarante, A. F. T.; Rocha, R. A.; Cabral Filho, S. L.; Huntley, J. F.; Houdijk, J. G. M.; Abdalla, A. L.; Gennari, S. M. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, p. 99-109, 2005.

Ceï W.; Salah, N.; Alexandre, G.; Bambou, J. C.; Archimède, H. Impact of energy and protein on the gastro-intestinal parasitism of small ruminants: A meta-analysis. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 212, p. 34-44, 2018.

Chen, X. B.; Gomes, M. J. Estimation of Microbial Protein Supply to Sheep and Cattle Based on Urinary Excretion of Purine Derivatives. An Overview of the Technical Details. Aberdeen, UK: Rowett Research Institute, 1992.

Costa, P. T.; Costa, R. T.; Mendonça, G.; VAZ, R. Z. Eficácia anti-helmíntica comparativa do nitroxinil, levamisol, closantel, moxidectina e fenbendazole no controle parasitário em ovinos. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 74, p. 72-78, 2017.

Courtney, C. H.; Parker, C. F.; McClure, K. E.; Herd, R. P. Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 15, p. 101–109, 1985.

Fox, N. J.; Smith, L. A.; Houdijk, J. G. M; Athanasiadou, S.; Hutchings, M. R. Ubiquitous parasites drive a 33% increase in methane yield from livestock. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 48, p.1017-1021, 2018.

Gennari, S. M.; Abdalla, A. L.; Vitti, D. M. S. S.; Meirelles, C. F.; Lopes, R. S.; Vieira Bressan, M. C. R. *Haemonchus placei* in calves: effects of dietary protein and multiple experimental infection on worm establishment and pathogenesis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 59, p. 119-126, 1995.

Gennari, S. M.; Abdalla, A. L.; Bressan, M. C. R. V.; Louvandini, H. Influence of dietary protein on water metabolism in calves infected with *Haemonchus placei*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 6, p. 133-138, 1997.

Gill, H. S. Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 13, p. 617-628, 1991.

Hashimoto, J. H.; Osório, J. C. S.; Osório, M. T. M.; Bonacinam, S.; Lehmen, R. I.; Pedroso, C. E. S. Qualidade de carcaça, desenvolvimento regional e tecidual de cordeiros terminados em três sistemas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, p. 438-448, 2012.

Hegarty, R. S.; Alcock, D.; Robinson, D. L.; Goopy, J. P.; Vercoe, P. E. Nutritional and flock management options to reduce methane output and methane per unit product from sheep enterprises. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 50, p. 1026-1033, 2010.

Hoste, H.; Torres-Acosta, J. F. J.; Quijada, J.; Chan-Perez, I.; Dakheel, M. M.; Kommuru, D. S.; Mueller-Harvey, I.; Terrill, T. H. Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. In: Gasser, R. B.; von Samson-Himmelstjerna, G. (Ed.). **Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends**. Cambridge: Academic Press, 2016. p. 239-351. (Advances in Parasitology, 93).

Hupp, B. N. L.; Novaes, M. T.; Martins, M. S. S.; Hupp, A. C.; Trivilin, L. O.; Martins, I. V. F. Alterações clínicas e laboratoriais como indicadores para tratamento anti-helmíntico em ovinos experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 19, p. 1-10, 2018.

International Atomic Energy Agency. **The technique for the estimation of microbial N supply in ruminants from purine derivation in urina**. Training Package. Version 1.0. Vienna: FAO/IAEA, 2003. 1 CD-ROM.

Issakowicz, J.; Issakowicz, A. C. K. S.; Bueno, M. S.; Costa, R. L. D.; Katiki, L. M.; Geraldo, A. T.; Abdalla, A. L.; McManus, C.; Louvandini, H. Parasitic infection, reproductive and productive performance from Santa Inês and Morada Nova ewes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 136, p. 96-103, 2016.

Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. **Clínical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. 918p.

Kloosterman, A.; Albers, G. A. A.; Van Den Brink, R. Genetic variations among calves in resistance to nematode parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 4, p. 353-368, 1978.

Kramer, J. W. Normal hematology of cattle, sheep, and goats. In: Feldman, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Ames: Blackwell, 2006.

Li, R. W.; Li, W.; Sun, J.; Peng, Y.; Baldwin, R. L.; Urban, J. F. The effect of helminth infection on the microbial composition and structure of the caprine abomasal microbiome. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 1–10, 2016.

Louie, K.; Burggraaf, V. T.; Pacheco, D. A dynamic model incorporating dietary protein for predicting liveweight gain of parasitised grazing lambs. **Proceedings of New Zealand Society of Animal Production**, Palmerston North, v. 67, p. 220–223, 2007.

Louvandini, H.; Veloso, C. F. M.; Paludo, G. R.; Dell' Porto, A.; Gennari, S. M.; McManus, C. M. Influence of protein supplementation on the resistance and resilience on young hair sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes during rainy and dry seasons. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, p. 103–111, 2006.

Makkar, H. P. S.; Chen, X. B. Estimation of Microbial Protein Supply in Ruminants Using Urinary Purine Derivatives. Cham, NE: Springer, 2004.

McManus, C. M.; Paim, T. P.; de Melo, C. B.; Brasil, B. S. A. F., Paiva, S. R. Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock. **Parasite**, Issy-les-Moulineaux, v. 21, p. 56, 2014.

Mertens, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, 2002.

Monteiro, S. G. **Parasitologia na medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. cap. 24: Ordem Strongylida.

Moraes, F. R.; Thomaz-Soccol, V.; Rossi Junior, P. Susceptibilidade de ovinos das raças Suffolk e Santa Inês à infecção natural por tricostrongilídeos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 6, p. 63-69, 2000.

National Research Council - NRC. **Nutrition requirements of small ruminates: sheep, goats, cervids and world camelids**. Washington, DC: The National Academy of Science Press, 2007.

Ortolani, E. L.; Leal, M. L. R.; Minervino, A. H. H.; Aires, A. R.; Coop, R. L.; Jackson, F.; Suttle, N. F. Effects of parasitism on cellular immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 196, p. 230-234, 2013.

Osório, J. C. S.; Osório, M. T. M.; Jardim, P. O. C. **Métodos para avaliação da produção de carne ovina In vivo na carcaça e na carne**. Pelotas: Ed. UFPEL, 1998. 107 p.

Pérez, J.R.O.; Carvalho, P. A. Considerações sobre carcaças ovinas. Boletim agropecuário Lavras, 2007. Disponível em: <<http://livraria.editora.ufla.br/upload/boletim/tecnico/boletim-tecnico-61.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2021

Retama-Flores, C.; Torres-Acosta, J. F. J.; Sandoval-Castro, C. A.; Aguilar-Caballero, A. J.; Cámara-Sarmiento, R.; Canul-Ku, H. L. Maize supplementation of Pelibuey sheep in a silvopastoral system: fodder selection, nutrient intake and resilience against gastrointestinal nematodes. **Animal**, London, v. 6, p. 145-153, 2012.

Rowe, J. B.; Nolan, J. V.; Holmes, P. H. The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on nitrogen digestion in sheep. **Proceedings of the Australian Society of Animal Production**, Brisbane, v. 17, p. 464, 1982.

Rowe, J. B.; Nolan, J. V.; Chaneet, G.; Teleni, E. The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. **British Journal of Nutrition**, Oxon, v. 59, p. 125-139, 1988.

Sastry, G. A. **Veterinary clinical pathology**. 3. ed. New Delhi: CBS Publications, 1989. 25 p.

Selemon, M. Review on control of *Haemonchus contortus* in sheep and goat. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, San Diego, v. 5, p. 1139-1146, 2018.

Smith, W. D.; Jackson, F.; Jackson, E.; Williams, J.; Miller, H. R. P. Manifestations of resistance to ovine ostertagiasis associated with immunological responses in the gastric lymph. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 94, p. 591-601, 1984.

Steel, J. W.; Symons, L. E. A.; Jones, W. O. Effects of level of larval intake on the productivity and physiological and Metabolic responses of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 31, p. 821-838, 1980.

Symons, L. E. A.; Hennessy, D. R. Cholecystokinin and anorexia in sheep infected by the intestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 11, p. 55-58, 1981.

Tarsitano, M.; Bridi, A.; Fagan, E.; Bolfe, F.; Pinto, B.; Furtado, E.; Giangarelli, B.; Antunes, M. Cor do músculo semitendinosus de carcaças bovinas submetidas à estimulação elétrica. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 22., 2012, Cuiabá. **A importância da Zootecnia para a Segurança Alimentar**. Cuiabá: UFMT, 2012. 3 p. Disponível em: <<http://www.uel.br/grupo-pesquisa/gpac/pages/arquivos/ZOOTEC%202012/ZOOTEC%202012%20Cor%20do%20musculo%20semitendinosus%20de%20carcacas%20bovinas%20submetidas%20a%20estimulacao%20eletrica.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2017.

Ueno, H.; Gonçalves, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.

Van Houtert, M. F. J.; Sykes, A. R. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, p. 1151-1168, 1996.

Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

Veloso, C. F. M.; Louvandini, H.; Kimura, E. A.; Azevedo, C. R.; Enoki, D. R.; França, L. D.; McManus, C. M.; Dell'Porto, A.; Santana, A. P. Efeitos da suplementação proteica no controle da verminose e nas características de carcaça de ovinos Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 5, p. 131-139, 2004.

Whitlock, H. V. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, Melbourne, v. 21, n. 3, p. 177-180, 1948.

Wood, L. B.; Amaral, N. K.; Duncan, J. L.; Kassai, T.; Malone Junior, J. B.; Pankavich, J. A.; Reinecke, R. K.; Slocombe, O.; Taylor, S. M. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.), second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 58, p. 181-213, 1995.

Zaiss, M. M.; Harris, N. L. Interactions between the intestinal microbiome and helminth parasites. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 38, p. 5–11, 2016.

4 HISTOMORFOMETRIA DE ABOMASO E TRANSCRIPTÔMICA DE LINFONODOS DE OVINOS INFECTADOS POR *Haemonchus contortus* E ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA NA DIETA

Resumo

Haemonchus contortus é o endoparasita gastrintestinal mais predominante e patogênico na criação de ovinos. A capacidade de resistir à infecção por nematóides gastrintestinais é considerada dependente do desenvolvimento da resposta imune adquirida, que pode ser incrementada com uma dieta proteica adequada, já que a nutrição apresenta forte influência na saúde animal e permite que os danos da infecção sejam reparados pelo organismo. Objetivou-se com este trabalho, verificar diferenças na abundância de RNA mensageiro (mRNA) e vias metabólicas relacionadas à resposta imune de ovinos alimentados com alto (19%) e baixo (12%) teores de proteína na dieta após a infecção primária com *H. contortus* em 32 cordeiros Santa Inês, machos e fêmeas, distribuídos aleatoriamente em 4 tratamentos em um arranjo fatorial 2x2x2: alta proteína controle (AC - n=7), baixa proteína controle (BC - n=7), alta proteína infectado (AI - n=9) e baixa proteína infectado (BI - n=9), com o efeito sexo testado. Após 34 dias de dieta, os tratamentos infectados receberam dose única de 10.000 L3 de *H. contortus* por via oral. A contagem de OPG e colheita de sangue para detecção de IgG foram realizados semanalmente. Após 89 dias de experimento (42 dias pós-infecção), 24 animais foram abatidos para obtenção de amostras do abomaso para realização de análise histológica e 19 amostras de linfonodo abomasal foram usadas para extração de RNA, que foi purificado, fracionado e convertido para cDNA utilizando o kit TruSeq™ Stranded mRNA por enriquecimento da cauda poli A. O sequenciamento em larga escala do cDNA foi realizado utilizando a plataforma HiSeq-Illumina. Um total de 95 e 75 genes foram diferencialmente expressos entre animais alimentados com alta e baixa proteína na dieta, e animais controles e infectados com *H. contortus*, respectivamente, em resposta a infecção primária. Houve alta expressão de genes de resposta celular como fagocitose, apoptose, hematopoiese e controle do processo inflamatório. Houve efeito da dieta e da infecção sobre o abomaso dos animais BI que mostraram aumento de comprimento e volume de mucosa e de epitélio ($P < 0,05$). Os níveis de IgG não foram afetados pelos tratamentos ($P > 0,05$). Em conclusão, o alto teor de proteína da dieta incrementa a resposta imune influenciando a expressão de mRNA em cordeiros durante a infecção por *H. contortus*.

Palavras-chave: Illumina. Resposta imune. L₃. Nutrigenômica. RNA-Seq. Sequenciamento de nova geração. Transcriptoma. Verminose.

4 ABOMASO HISTOMORFOMETRY AND TRANSCRIPTOMIC OF SHEEP LYMPH NODES INFECTED BY *Haemonchus contortus* AND FEEDED WITH DIFFERENT PROTEIN CONTENT IN THE DIET

Abstract

Haemonchus contortus is the most prevalent and pathogenic gastrointestinal parasite in sheep farming. The ability to resist to infection by gastrointestinal nematodes is considered dependent on the development of the acquired immune response, which can be increased through an adequate protein diet level, since nutrition has a strong influence on animal health and allows the infection damage to be repaired by the body. The aim of this work was to verify differences for the abundance of messenger RNA (mRNA) and metabolic pathways related to the immune response of sheep fed with high (19%) and low (12%) levels of protein in diet during the first infection with *H. contortus* to 32 male and female Santa Ines lambs, randomly distributed in 4 treatments in a 2x2x2 factorial arrangement: high control protein (HC - n = 7), low control protein (LC - n = 7), high infected protein (HI - n = 9) and low infected protein (LI - n = 9), with sex effect test. After 34 days of diet, the infected treatments received a single dose of 10,000 L3 of *H. contortus* orally. The FEC and blood collection for IgG detection were performed weekly. After 89 days of experiment (42 days after infection), 24 animals were slaughtered to obtain samples from the abomasum for histological analysis and 19 abomasal lymph node samples were used for RNA extraction, which was purified, fractionated and converted for cDNA using the TruSeq™ Stranded mRNA kit by enrichment of the poly A tail. Large-scale sequencing of cDNA was performed using the HiSeq-Illumina platform. A total of 95 and 75 genes were differently expressed between animals fed with high and low protein in diet, and control animals and infected with *H. contortus*, respectively, as response to primary infection. There were high expressions of cellular response genes such as, phagocytosis, apoptosis, hematopoiesis and control of inflammatory process. There was an effect to diet and infection on the abomasum of LI animals presenting length increasement and volume of mucosa and epithelium ($P < 0.05$). IgG levels were not affected by treatments ($P > 0.05$). Therefore, the high protein content of diet increases the immune response, influencing the expression of mRNA in lambs during infection by *H. contortus*.

Keywords: Illumina. Immune response. L₃. Nutrigenomic. Next-generation sequencing. RNA-Seq. Transcriptome. Worms.

4.1 Introdução

Haemonchus contortus é o endoparasito gastrointestinal mais predominante e patogênico na criação de ovinos. O tratamento químico para o controle de nematódeos é considerado precário devido à alta incidência de resistência anti-helmíntica, além do aumento crescente de consumidores por uma produção de alimentos sustentáveis (Amarante et al., 2009).

A capacidade de resistir à infecção por nematódeos gastrointestinais é considerada dependente do desenvolvimento da resposta imune adquirida, que pode ser incrementada com uma dieta proteica adequada, já que a nutrição apresenta forte influência na saúde animal. A nutrigenômica pode elucidar os mecanismos imunológicos envolvidos no processo de infecção por nematódeos gastrointestinais (Tirapegui, 2013).

O estudo dos transcritos, com o sequenciamento de RNA (RNA-Seq), apresenta vantagens em relação a outras técnicas genômicas, como uma faixa mais ampla de análise com melhores estimativas dos níveis de expressão relativa de qualquer região genômica com maior reprodutibilidade técnica (Snustad; Simmons, 2017).

Objetivou-se com este trabalho, avaliar a resposta imune adaptativa contra *H. contortus* com base nos níveis séricos de IgG anti-*Haemonchus*; avaliar a mucosa do abomaso por meio de análise histomorfométrica e; analisar o transcriptoma para verificar diferenças na abundância de RNA mensageiro em linfonodo de ovinos alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta durante a infecção com *H. contortus* e avaliar as redes regulatórias do sistema imune no processo de infecção.

4.2 Material e Métodos

Este trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Energia Nuclear na Agricultura sob número CEUA – CENA 004/2017.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (LANA –

CENA/USP), localizado no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil (latitude 22°43'31"S, longitude 47°38'57"W e altitude de 547 metros acima do nível do mar).

4.2.1 Animais

Os animais utilizados foram 32 ovinos da raça Santa Inês, 18 fêmeas não castradas e 14 machos castrados com 6 meses de idade. Os animais são todos meio irmãos, filhos do mesmo progenitor com mães diferentes, portanto há baixa variabilidade genética. Todos os procedimentos experimentais foram descritos no item 3.2.1 do capítulo 3.

4.2.2 Análise histomorfométrica da mucosa do abomaso

Durante a necropsia realizada no abate dos 24 cordeiros, 24 amostras da região do fundo do abomaso de cada cordeiro foram retiradas e fixadas em formalina 10% durante 24 horas dentro de cassetes de histologia. Após esse período, os cassetes foram transferidos para etanol 70% e armazenados até o processamento. As amostras foram então desidratadas em etanol puro, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos histológicos obtidos foram fixados em suportes de madeira identificados de acordo com cada amostra e seccionados por navalha de aço em um micrótomo (Leica RM 2125 RT), obtendo-se cortes sequenciais de 5 µm de espessura.

As lâminas foram, então, coradas com hematoxilina e eosina de Harris (H&E), montadas com lamínulas e examinadas no microscópio de luz (Top Light B2) equipado com sistema computadorizado de análise de imagens (BEL Engineering srl — Itália) em diferentes aumentos. Foram realizadas as seguintes análises morfométricas, em aumento 100 x em microscópio, em dez imagens: comprimento total da camada de mucosa (CM), espessura da muscular da mucosa (MM), comprimento epitelial e glandular (CEG).

Também foi realizada a análise estereológica. Esta é uma técnica utilizada para calcular a densidade de superfície e o volume de um tecido de interesse. Para calcular a densidade de superfície da mucosa do abomaso (S_v) e o seu volume (V_v), foi utilizado o Grid desenvolvido por Baddeley, Gundersen e Cruz-Orive (1986).

Como o abomaso é uma superfície anisotrópica, foi necessário que a imagem fotografada estivesse colocada em um plano horizontal com o grid utilizado, neste caso, o plano horizontal considerado foi a camada muscular da mucosa. Neste grid, foram distribuídos 70 pontos e 35 arcos e a técnica consiste em sobrepor o grid nas imagens a serem analisadas e contar o número de pontos e arcos que se situam sobre a mucosa. As quantidades de pontos e arcos foram substituídas na fórmula (1), obtendo-se a densidade da superfície da mucosa, e a quantidade de pontos, na fórmula (2), para calcular o volume da mucosa. O comprimento do arco foi medido no grid, considerando a amplificação da imagem, sendo igual a 110 μm . Foram analisadas cinco imagens de cada amostra, e o número de pontos e arcos cicloides considerados de cada amostra foram utilizados nos modelos matemáticos a seguir:

$$S_v = \frac{2 \times \sum I (\text{mucosa})}{I(p) \times \sum P (\text{mucosa})}$$

Em que:

S_v = densidade de superfície da mucosa

$\sum I (\text{mucosa})$ = número de arcos cicloides do grid sobre a camada específica em análise (mucosa)

$I(p)$ = comprimento do arco cicloide

$\sum P (\text{mucosa})$ = número de pontos do sistema teste sobre a camada específica em análise (mucosa)

$$V_v = \frac{\sum P (\text{mucosa})}{\sum P (\text{volume referencial})} \times 100$$

Em que:

V_v = Volume parcial da mucosa

$\sum P (\text{mucosa})$ = número de pontos do sistema teste sobre a camada específica em análise (mucosa)

$\sum P (\text{volume referencial})$ = número total de pontos da grade (70)

4.2.3 Ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA) para detecção de IgG específica para *H. contortus*

Uma alíquota de soro sanguíneo das amostras colhidas semanalmente por punção na veia jugular utilizando-se tubos sem anticoagulante foi utilizada para dosagens de IgG pela técnica de ELISA, utilizando soro sanguíneo de 32 cordeiros. As análises foram determinadas contra antígenos de larvas de terceiro estágio (L3) e adultos (L5) de *H. contortus* segundo Silva, Basseto e Amarante (2012) com algumas modificações: as placas de microtitulação (F96 Microplaca – Maxisorp, Nunc, EUA) foram previamente sensibilizadas com 100 µL de tampão bicarbonato-fosfato (pH 9,6) contendo 2 µg/mL do antígeno *H. contortus*; cada lavagem foi feita três vezes, girando a placa 180° e lavando mais três vezes. As leituras foram realizadas a 492 nm em leitor de ELISA automático (Biotrak II, Amersham-Biosciences, UK). Os resultados foram expressos como a porcentagem do valor da densidade óptica da amostra.

4.2.4 Análise transcriptômica

4.2.4.1 Extração do RNA dos tecidos

A extração de RNA foi iniciada em amostras de linfonodo abomasal para caracterização dos genes diferencialmente expressos em 19 cordeiros abatidos de acordo com as exigências do MAPA (2018). O protocolo de extração seguido foi o do TRI Reagent (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) adaptado de Chomczynski e Sacchi (2006).

Após o abate e separação dos órgãos, uma amostra de linfonodo foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer a – 80 °C até o processamento.

Os procedimentos a seguir foram necessários para prevenção da contaminação e inativação de RNases: todos os instrumentos, cerâmicas e vidrarias utilizados foram lavados com água DEPC 0,01%, autoclavados a 120 °C durante 30 minutos e colocados na bancada de fluxo laminar vertical ultravioleta (Pachane Pa50 Eco, Brasil) durante 30 minutos; foram utilizadas pipetas de uso restrito com RNA; alíquotas dos reagentes em tubos Falcon de 50 mL; uso de luvas nitrílicas sem pó; a

bancada de trabalho foi limpa com RNase ZAP™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Lithuania) seguindo as recomendações do fabricante. Somente após o preparo da bancada e deste protocolo as amostras foram retiradas do ultrafreezer uma a uma em caixa térmica contendo nitrogênio líquido para transporte até a bancada.

Com auxílio de uma pinça, a amostra foi retirada da embalagem e colocada em um almofariz previamente resfriado com nitrogênio líquido. Um corte ao olho de aproximadamente 100 mg foi feito com lâmina de bisturi nº 21. Nitrogênio líquido foi depositado até cobrir totalmente a amostra. Utilizando um pistilo a amostra foi macerada em movimentos circulares até se tornar pó, mais nitrogênio foi acrescentado quando necessário. A amostra foi macerada até a evaporação do nitrogênio. Foram dispensados 1000 µL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) utilizando ponteira com filtro e continuada a maceração até a amostra se tornar líquida e não haver nenhum fragmento de tecido. A amostra foi transferida para um microtubo de 2 mL. Foram dispensados 200 µL de clorofórmio PA (Synth, Diadema - SP, Brasil) na amostra que foi homogeneizada, incubada 3 minutos sobre a bancada e centrifugada a 4 °C e 12000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi delicadamente pipetado e transferido para outro microtubo de 2 mL, o precipitado foi descartado. Foram dispensados 500 µL de isopropanol PA (Synth, Diadema - SP, Brasil) na amostra, que foi incubada durante 10 minutos sobre a bancada, centrifugada a 4 °C e 12.000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente pipetado e descartado. Um pellet esbranquiçado permaneceu no fundo do microtubo. Foram dispensados 1000 µL de etanol 75% preparado com água DEPC 0,01%. A amostra foi rapidamente homogeneizada em vórtex, em seguida centrifugada a 4 °C e 7500 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente pipetado e descartado. Um pellet esbranquiçado permaneceu ao fundo do microtubo. A amostra permaneceu 5-10 minutos sobre a bancada para evaporação do etanol. A amostra foi ressuspensa com 50 µL de água concentrada DEPC 0,1% e delicadamente homogeneizada até obtenção de uma solução viscosa. A amostra foi dividida em três alíquotas de segurança: uma alíquota backup, uma alíquota para verificação da quantidade e qualidade do RNA no equipamento Nanodrop e outra alíquota para verificação de qualidade em gel de agarose. Todas as alíquotas foram conservadas a – 20°C.

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese através da visualização das bandas de 18S e 28S em gel de agarose 1,5%.

A pureza e a concentração do RNA total foram determinados em espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies), a qualidade do RNA foi verificada através da razão OD260/OD280.

Ao término das extrações, as 19 amostras de RNA do linfonodo abomasal foram encaminhadas ao laboratório multiusuário (Centro de Genômica Funcional) do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP. A integridade do RNA foi confirmada pelo Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Para início do sequenciamento, 1 µg do RNA total de cada amostra foi utilizado para preparação da biblioteca. O RNA foi purificado, fracionado, e convertido para cDNA (Cánovas et al., 2014). A construção das bibliotecas de sequenciamento do transcriptoma (RNA-Seq), foi realizada utilizando o kit TruSeq™ Stranded mRNA Sample Prep LS Protocol (Illumina) por meio da captura do RNA mensageiro (RNAm) pela cauda poli-A utilizando microesferas magnéticas para a separação do RNA ribossômico (Illumina, San Diego, CA, USA), conforme orientações do fabricante. O mRNA purificado foi fragmentado em torno de aproximadamente 200 pares de bases com o mix Fragment, Prime, Finish Mix presente no kit Illumina.

A síntese da primeira fita de cDNA a partir do RNAm foi realizada com a enzima *Superscript II*® *Reverse Transcriptase*, Invitrogen™ e o mix *First Strand Synthesis Act D Mix* (Illumina). Já para a síntese da segunda fita de cDNA foi utilizado uma enzima que vem com o reagente *Second Strand Master Mix* presente no kit.

Após a obtenção do cDNA dupla fita purificado, foi feito o reparo das extremidades das fitas. Nesse reparo, as extremidades das moléculas foram tratadas com um mix que continha exonucleases e polimerases, com o intuito de remover os nucleotídeos que estavam em excesso na extremidade 3' e preencher a sequência na extremidade 5', respectivamente.

Na adenilação, foi adicionado um nucleotídeo adenina em cada extremidade 3' dos fragmentos para auxiliar na ligação dos adaptadores (que possui um nucleotídeo timina em sua extremidade). Para finalizar, foi feito a ligação dos adaptadores nos fragmentos que são complementares às sequências ligadas na *flow cell*, possibilitando a realização do sequenciamento.

Após a preparação da biblioteca, foi realizado a validação para verificação da qualidade e comprimento das bibliotecas usando o chip DNA 1000 no Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Em seguida, foi feito PCR quantitativa (qPCR) no equipamento LightCycler® da Roche para quantificação individual das bibliotecas utilizando o kit KAPA Library Quantification Kit. Foi gerado um valor de Ct ("*CycleThreshold*") sendo possível realizar a quantificação relativa do cDNA de cada uma das amostras.

Para que as bibliotecas fossem seqüenciadas, foi feita a clusterização das amostras com o intuito de aumentar a densidade de fragmentos (clones) de cada biblioteca. Essa etapa foi realizada no equipamento cBot-HS (Illumina – San Diego, EUA) utilizando o TruSeq PE Cluster Kit v4 (Illumina – San Diego, EUA). A alta densidade dos clusters possibilita que o sinal de fluorescência gerado no próximo passo com o sequenciamento tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. O sequenciamento em larga escala do cDNA foi realizado utilizando o HiSeq SBS Kit v.2 (500 cycles) (Illumina, San Diego, CA, USA) na plataforma HiSeq-Illumina.

Nos dados transcriptômicos obtidos no sequenciamento do RNA, primeiramente foi realizada uma verificação da qualidade das bibliotecas utilizando a ferramenta FASTQC (Brabham Bioinformatics, UK), disponível em <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, que permite verificações de controle de qualidade, fornecendo uma visão geral além de informar em quais áreas pode haver problemas.

Com o software SeqyClean, disponível em <https://github.com/ibest/seqyclean>, foi então realizada uma limpeza dos dados com remoção de adaptadores, duplicações e retirada de trechos de RNA de baixa qualidade para o preparo das bibliotecas de cDNA (Zhbannikov et al., 2017). Em Seguida, a qualidade das bibliotecas foi novamente verificada pelo FASTQC.

Com as sequências livres de artefatos, foi feito o alinhamento das leituras de sequenciamento do RNA contra o genoma de referência de ovinos (Oar_rambouillet_v1.0_genome released in 2017) por meio do software STAR, disponível em <https://code.google.com/archive/p/rna-star/> (Dobin et al., 2013).

A identificação dos possíveis termos do Gene Ontology (GO) e análises de anotação funcional enriquecidos para os genes diferencialmente expressos e vias

metabólicas foram realizadas pelo ShinyGO v0.61, disponível em <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/> (Ge; Jung; Yao, 2020).

4.2.5 Análise estatística

Os dados da análise histomorfométrica e ELISA foram analisados por meio do programa SAS[®]9.4 (SAS Institute Inc., Cary – NC, EUA). Foi utilizado o PROC MIXED para as variáveis tomadas mais de uma vez no tempo e o PROC GLM para as variáveis obtidas apenas uma vez. O efeito do sexo foi avaliado em todas as variáveis. Todas as variáveis foram testadas para uma significância de 5% utilizando o teste pdiff.

Os dados dos transcritos diferencialmente expressos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) por meio do programa R (v.4.0.; 2020). Os dados foram normalizados com a função "calcNormFactors", a matriz foi estabelecida com a função "model.matrix" e posteriormente ANOVA foi realizada com a função "glmQLFTest". Para identificar os genes diferencialmente expressos em cada contraste foi utilizado o teste de máxima verossimilhança (likelihood ratio test) usando a função "glmLRT" utilizando o pacote "edgeR" (Robinson et al., 2010; McCarthy et al., 2012), disponível em <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>.

4.3 Resultados

4.3.1 Análise histomorfométrica da mucosa do abomaso

Nos resultados da análise histomorfométrica do abomaso (Tabela 14), os animais dos tratamentos com baixa proteína apresentaram mucosa do abomaso mais espessa quando comparados aos animais com alta proteína ($P < 0,05$).

Houve efeito da dieta e da infecção sobre as variáveis comprimento epitelial e glandular (CEG), comprimento total da camada de mucosa (CM) e volume (Vv) (Figuras 8, 9 e 10), mas não houve efeito de interação, com valores mais baixos para os tratamentos de alta proteína em comparação aos de baixa proteína, e maiores para infectados em comparação com controles ($P < 0,05$). Em espessura da

muscular da mucosa (MM) houve apenas efeito da infecção com maior camada muscular para os infectados em relação aos controles ($P < 0,05$). Em densidade de superfície (Sv) não houve diferenças entre os tratamentos e nenhuma interação ($P > 0,05$). O tratamento AC apresentou mucosa abomasal mais fina. Os tratamentos de baixa proteína e infectados apresentaram mucosa mais espessa.

Tabela 14 – Análise histomorfométrica do abomaso de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

Variáveis	Alta proteína		Baixa proteína		E.P.M.	Valor de P		
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Dieta x infecção
Comprimento epitelial e glandular (μm)	306,0 ^b	372,1 ^b	365,5 ^b	440,16 ^a	27,4	0,0282	0,0168	NS
Espessura da muscular da mucosa (μm)	19,2	22,14	18,50	23,16	1,94	NS	0,0379	NS
Comprimento total da camada de mucosa (μm)	324,6 ^b	394,1 ^b	383,5 ^b	462,6 ^a	31,6	0,0328	0,0147	NS
Densidade de superfície da mucosa ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$)	0,011	0,010	0,011	0,010	0,0002	NS	NS	NS
Volume da mucosa (%)	32,2 ^b	39,7 ^b	39,0 ^b	46,6 ^a	3,73	0,049	0,0316	NS

Letras sobrescritas diferentes representam médias diferentes a 5% de significância. NS = não significativo ($P > 0,05$).

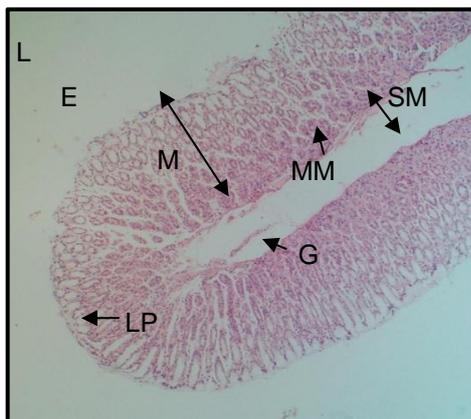


Figura 8 – Estrutura histológica do abomaso de cordeiro. Lúmen (L), epitélio (E), glândula (G), lâmina própria (LP), camada de mucosa (M), camada submucosa (SM), muscular da mucosa (MM), H&E. Barra = 100 μ m

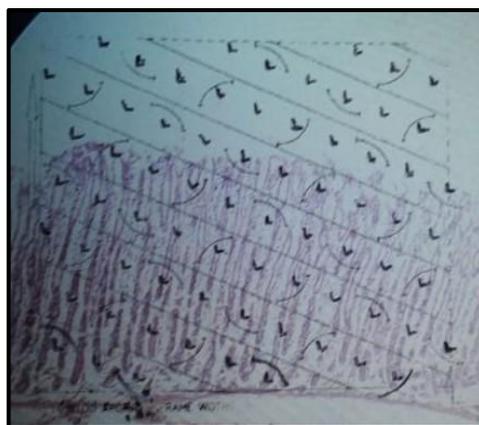


Figura 9 – Grid contendo pontos e arcos ciclóides para cálculo da densidade de superfície da mucosa (Sv) e volume da mucosa (Vv)

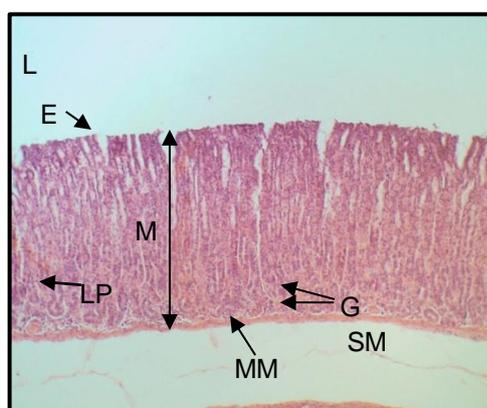


Figura 10 – Estrutura histológica do abomaso de cordeiro. Lúmen (L), epitélio (E), glândula (G), lâmina própria (LP), camada de mucosa (M), camada submucosa (SM), muscular da mucosa (MM), H&E. Barra = 100 μ m

4.3.2 Ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA) para detecção de imunoglobulinas IgG

No período pré-infecção artificial, não foi verificado efeito de dieta e sexo, nem interações entre estes sobre os valores de IgG nos tratamentos alta e baixa proteína ($P > 0,05$).

Não houve diferença entre os tratamentos para os resultados dos níveis de IgG no período pós-infecção artificial (Tabela 15). Os resultados em todas as colheitas de sangue estão apresentados na Figura 11.

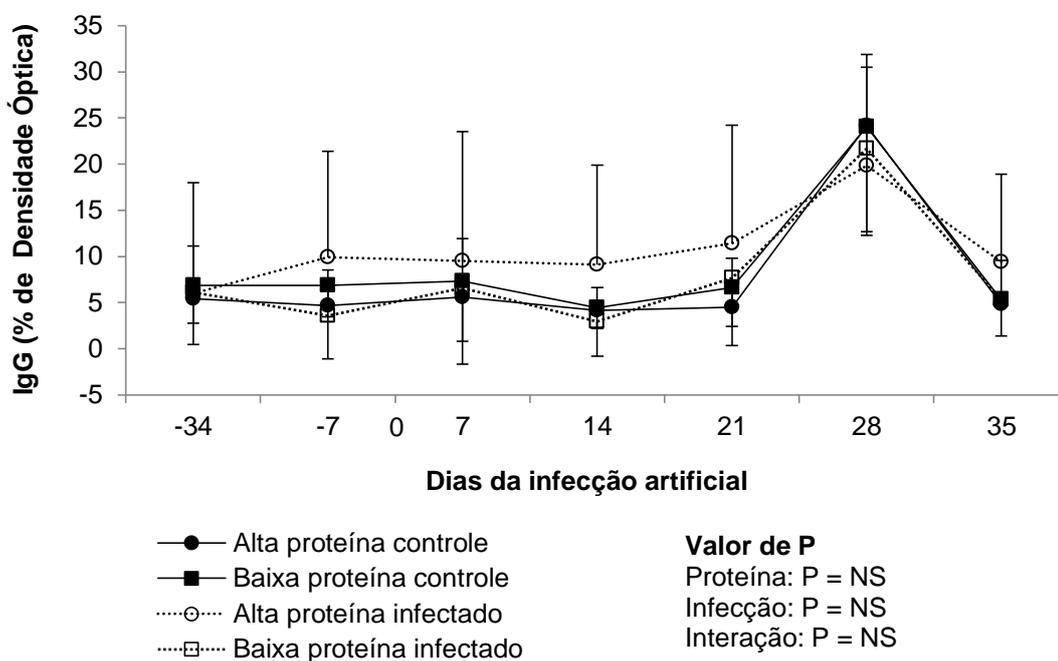


Figura 11 – Detecção de IgG (% Densidade óptica) no soro sanguíneo de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*. NS = não significativo ($P > 0,05$)

Tabela 15 – Detecção de imunoglobulinas IgG pela técnica de ELISA no soro sanguíneo de cordeiros alimentados com alto e baixo teores de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

Variáveis	Alta proteína		Baixa proteína		E.P.M.	Valor de P			
	Controle	Infectado	Controle	Infectado		Dieta	Infecção	Sexo	Dieta x infecção
IgG (D.O.)	8,56	11,70	9,47	8,68	1,1	NS	NS	NS	NS

D.O.: densidade óptica. Letras sobrescritas diferentes representam médias diferentes a 5% de significância. NS = não significativo ($P > 0,05$).

4.3.3 Análise transcriptômica do linfonodo

A extração de RNA total foi realizada a partir do linfonodo abomasal de forma padronizada em todos os animais abatidos. Assim, 19 animais foram selecionados para o preparo das bibliotecas de sequenciamento, sendo considerado como critério de escolha os animais infectados com os mais altos valores de OPG.

A confirmação da integridade das amostras realizada em espectrofotômetro Bioanalyzer indicaram que as amostras não estavam degradadas e o valor médio do número de integridade do RNA (RIN) foi igual a 5.

Após a avaliação da qualidade das reads (Tabela 16), limpeza dos dados, triagem para localizar possíveis duplicações e alinhamento com o genoma de ovinos, os resultados mostraram 30 vias enriquecidas para animais dos tratamentos alto vs baixo teor de proteína na dieta (Apêndice A, Tabela 17) e 27 vias enriquecidas para animais dos tratamentos infectados vs controles (Apêndice A, Tabela 18).

A análise estatística dos dados de genes diferencialmente expressos nessas vias funcionais identificou um total de 62 genes com baixa expressão (Apêndice A, Tabelas 19 e 23) e 33 com alta expressão (Apêndice A, Tabelas 20 e 24) para a análise dos tratamentos de alto em comparação ao baixo teor de proteína na dieta. Foram identificados 16 genes com baixa expressão (Apêndice A, Tabelas 21 e 25) e 59 genes com alta expressão (Apêndice A, Tabelas 22 e 26) ao analisar os tratamentos infectados em comparação aos controles.

As funções, vias metabólicas, localização, dentre outras características dos genes diferencialmente expressos foram buscadas em bancos de dados de diferentes organismos, sendo os principais ovino, bovino, humano e camundongos (ShinyGO – <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>; NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; GeneCards – <http://www.genecards.org/>).

Tabela 16 – Controle de qualidade, limpeza e mapeamento das reads em linfonodo de cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta, com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

Amostra	Tratamento	Contagem bruta das reads	Contagem das reads pós limpeza	% Citosina Guanina	% de transcritos mapeados
1702	AC	13899583	2629298	51	53,14
1705	AC	12871303	4856580	50	51,58
1739	AC	11440095	1528691	52	42,52
1721	AC	11005865	1103364	51	47,79
1733	AC	11996892	2220041	53	45,88
1710	AI	14953125	3614380	51	46,42
1712	AI	12532021	1075251	49	4,97
1727	AI	10117359	400216	46	5,45
1732	AI	12856289	5869778	53	59,34
1706	AI	13596920	4017718	53	2,00
1707	BC	13825293	2016350	48	24,67
1725	BC	12131537	4675122	51	48,01
1731	BC	14994612	3965409	53	45,01
1704	BC	13826314	2094247	52	46,53
1711	BI	13779330	6562710	52	65,28
1716	BI	15721149	2231739	53	53,40
1701	BI	10812139	1520086	53	7,49
1708	BI	14093884	3326526	54	47,99
1720	BI	11487338	4387878	53	47,50

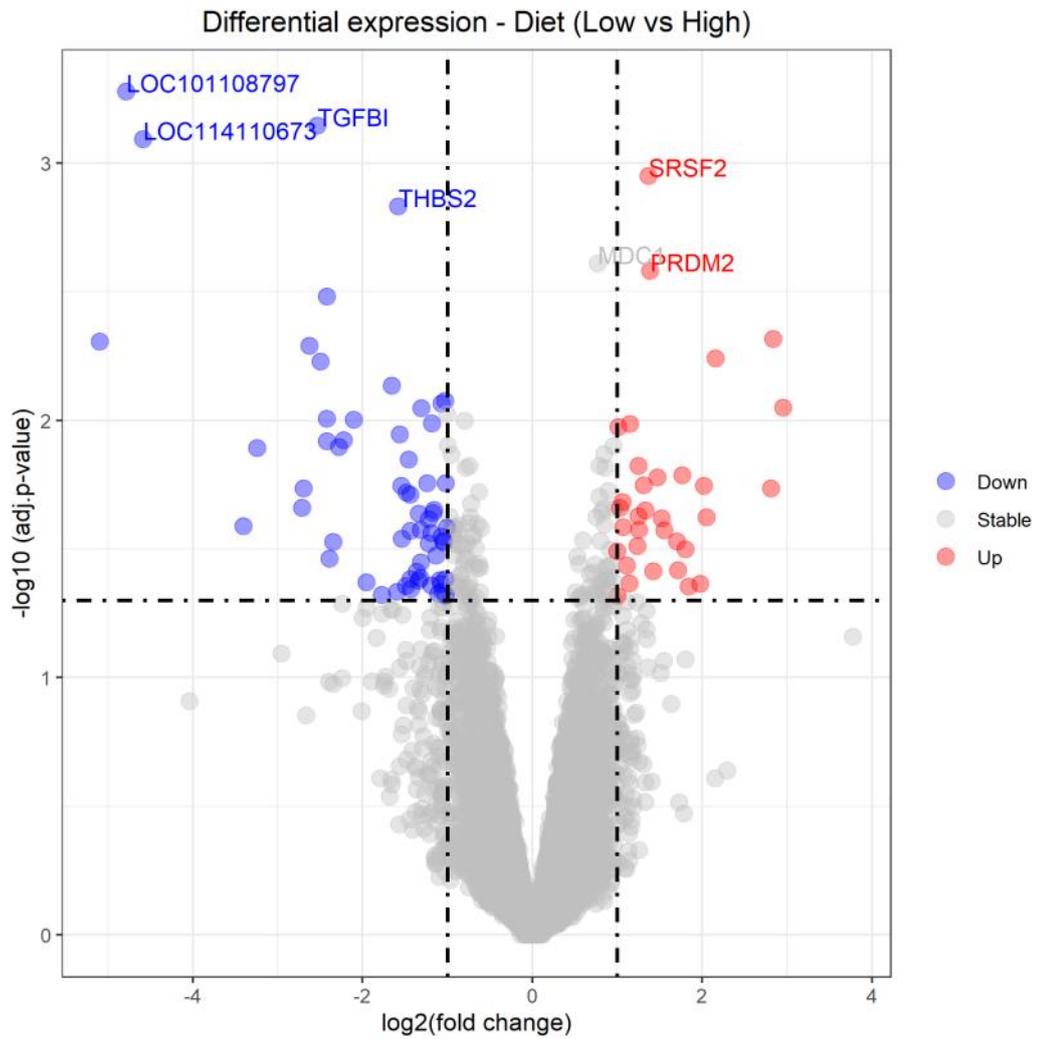


Figura 12 – Resultados da análise de transcritos com alta e baixa expressão em cordeiros alimentados com dieta de alto versus dieta de baixo teor de proteína

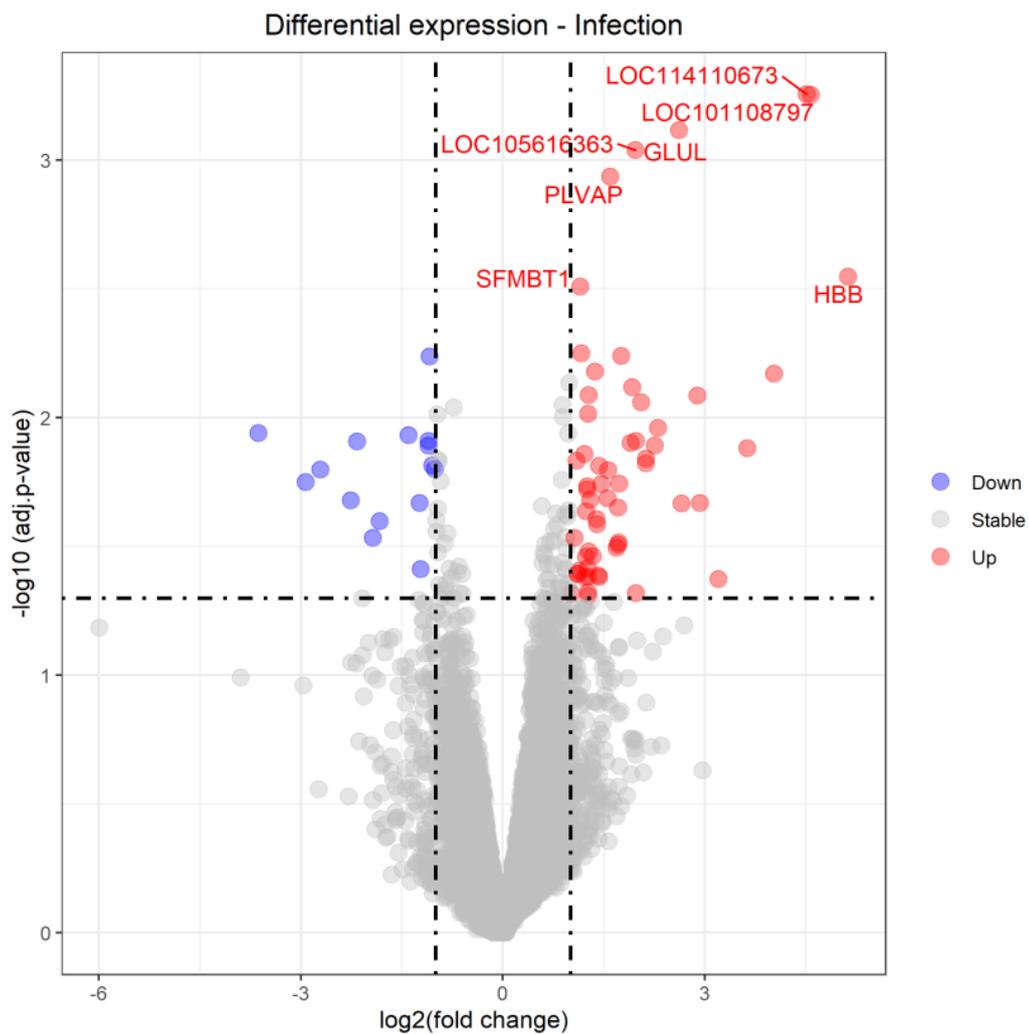


Figura 13 – Resultados da análise de transcritos com alta e baixa expressão em cordeiros com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

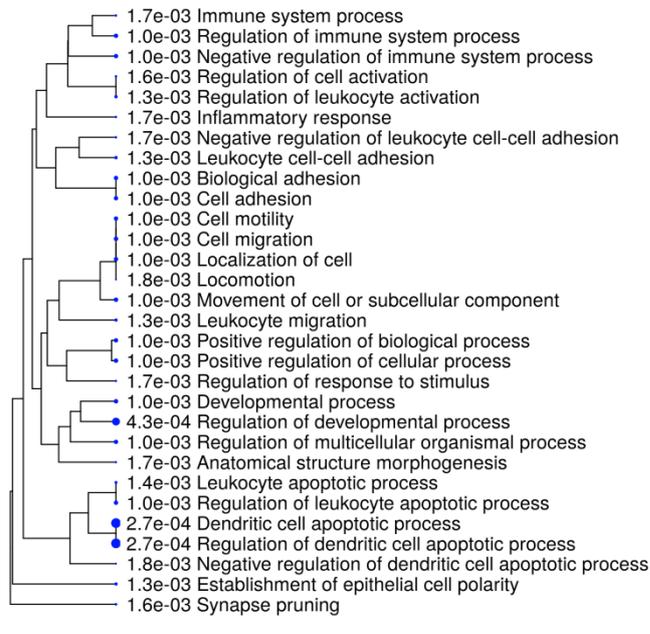


Figura 14 – Árvore da categorização de genes em cordeiros alimentados com dieta de alto versus dieta de baixo teor de proteína

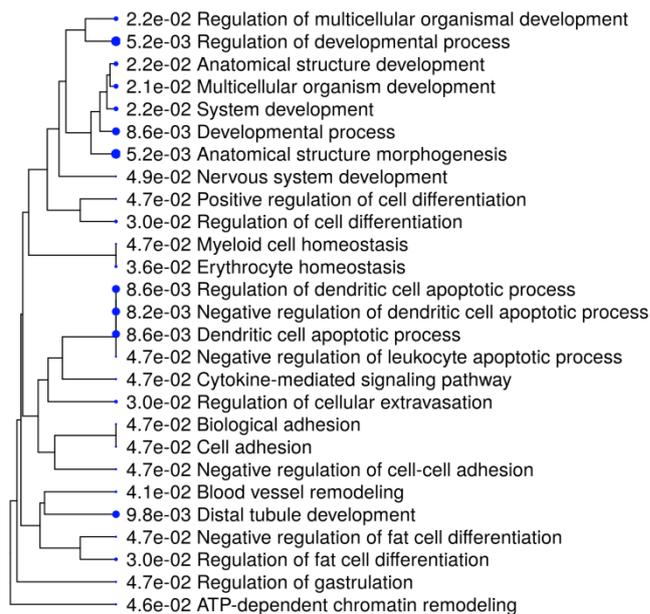


Figura 15 – Árvore de categorização de genes em cordeiros com e sem infecção por *Haemonchus contortus*

4.4 Discussão

Este trabalho foi realizado para compreender como o teor de proteína fornecido na dieta de cordeiros em crescimento pode influenciar a expressão de genes relacionados à resposta imune durante a primeira infecção parasitária por *H. contortus* e realizar a quantificação de RNA mensageiro para identificar quais são as vias regulatórias envolvidas no padrão de expressão gênica da imunidade.

A análise histomorfométrica do abomaso dos cordeiros evidenciou aumento do comprimento total da camada de mucosa no tratamento BI em comparação ao AI ($P < 0,05$). Foi verificado aumento no comprimento da camada epitelial e glandular e no volume de superfície do tratamento BI ($P < 0,05$), o que ocorre em consequência do processo inflamatório causado pela infecção, que resulta em necrose das regiões vizinhas ao local de penetração do endoparasito com destruição tecidual e hiperplasia de glândulas gástricas (Rashid; Irshadullah, 2014).

Estas alterações no abomaso devem-se ao fato da mucosa responder à infecção aumentando as contrações na tentativa de eliminar os endoparasitos. Além disso, a ação da bradicinina liberada durante a inflamação e presente no muco do abomaso promove vasodilatação e contração do músculo liso (Diez-Tascon et al., 2005; Hassam et al., 2011; Williams, 2012).

Os danos causados por *H. contortus* nos animais estão associados à perda sanguínea devido a hematofagia do endoparasito, a danos na mucosa e ao aumento da produção de muco (Hoste et al., 2016), o que resulta em diminuição da digestibilidade da dieta, afetando a absorção de nutrientes (Besier et al., 2016; Hoste et al., 2016). Os resultados da análise histomorfométrica estão de acordo com os da digestibilidade da PB na qual também houve diferença entre AI e BI ($P < 0,05$) (discutido no capítulo 3).

Nos níveis de IgG do soro sanguíneo testado pela técnica de ELISA não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$), como não houve uma segunda infecção que pudesse reestimular o sistema imune (Gaba et al., 2006) e evidenciar ação do teor proteico da dieta, tal efeito não fora verificado.

O presente estudo confirmou a hipótese inicial de que os níveis de expressão de mRNA que codificam genes relacionados a resposta imune são expressos em cordeiros que consomem alto teor de proteína na dieta em comparação aos cordeiros alimentados com baixo teor durante a infecção com *H. contortus*. Muitos

trabalhos observaram incremento da resposta imune de cordeiros em crescimento durante ensaios de desempenho com elevado teor de proteína na dieta nas últimas décadas (Abbott et al., 1985; Abbott et al., 1988; Khan et al., 2012; Louvandini et al., 2006) e, em decorrência do aumento de requerimentos durante o processo de infecção, muitos autores discutiram não somente a importância da proteína mas também da energia na dieta para uma resposta adequada do sistema imune (Houdijk, 2012). A análise dos transcritos preenche essa lacuna na literatura, mostrando as vias regulatórias enriquecidas em decorrência da suplementação proteica com dietas isoenergéticas, e permitindo compreender de que forma essa proteína consumida é distribuída nas funções do organismo.

A alta expressão dos genes receptor da tirosino-quinase (AXL), quimiocina CXC 12 (CXCL12), glutamato-amônia ligase (GLUL) e heme oxigenase - 1 (HMOX1) nos animais alta proteína e infectados ($P < 0,05$), pode explicar os resultados observados nas análises histomorfométrica do abomaso e maiores valores de células do leucograma, sugerindo como os animais foram capazes de expressar a resiliência frente a hemoncose.

O gene AXL está envolvido com diversas respostas celulares, como proliferação, adesão, migração, autofagia, invasão, angiogênese, agregação plaquetária e diferenciação celular das células natural killer (Lemke, 2013). Além disso, é um potente regulador negativo das respostas imunes inatas, protegendo assim contra uma resposta inflamatória hiperativa (Lemke; Rothlin, 2008). A sinalização do AXL é particularmente importante durante a inflamação, porque os agentes pró-inflamatórios aumentam a expressão de AXL, mediando especificamente a fagocitose de células apoptóticas. Para evitar a necrose do tecido, fagocitose de células apoptóticas e debris celulares é um processo crucial necessário (Di Stasi et al., 2020). Portanto, sua alta expressão pode estar relacionada ao comprimento epitelial e glandular assim como a densidade da mucosa do abomaso não terem sido diferentes ($P > 0,05$) nos animais AI em relação aos animais controles, devido a eficiência das células fagocíticas associada ao controle de intensidade do processo inflamatório.

O CXCL12 é um fator importante nos processos fisiológicos e patológicos, incluindo embriogênese, angiogênese, hematopoiese e inflamação, pois ativa e/ ou induz a migração de células progenitoras hematopoéticas e células-tronco, células endoteliais e a maioria dos leucócitos. Citocinas quimiotáticas ou quimiocinas são

um grande grupo de proteínas de baixo peso molecular que promovem a migração e adesão de suas populações de células-alvo. CXCL12 cumpre suas funções em condições homeostáticas e patológicas interagindo com seus receptores CXCR4 e receptor atípico de quimiocina 3 (ACKR3) e ligando-se a glicosaminoglicanos (GAG) em tecidos e no endotélio permitindo passagem adequada de leucócitos. Na medula óssea, CXCL12 é responsável pela retenção de células progenitoras hematopoiéticas e células-tronco (Janssens et al., 2018). Sua alta expressão pode explicar os valores de leucócitos estarem na faixa da normalidade para ovinos, já que os animais AI apresentaram altas contagens de leucócitos sem diferenças com os animais dos demais tratamentos. Ademais, a presença de reticulócitos e maiores valores de VCM sugerida nas análises de hemograma podem estar relacionadas a função de hematopoiese do CXCL12.

O transcrito HMOX1 catalisa a clivagem oxidativa das moléculas heme do tipo b para produzir quantidades equimolares de biliverdina IX α , monóxido de carbono (CO) e ferro. Este desempenha um papel crítico em pelo menos dois processos fisiológicos importantes: (1) reciclagem de moléculas de ferro (principalmente de eritrócitos senescentes) para eritropoiese e, (2) manutenção de células homeostase em condições estressantes. Sua ativação, dentre outros, ocorre por fatores de estresse, como a sinalização de citocinas inflamatórias (Katayama et al., 2015).

Trabalhos relatam que ferro é fundamental durante a hemoncose para manutenção da homeostase em ovinos (Casanova et al., 2018). A reciclagem de ferro poderia explicar a efetiva resposta da medula óssea nos animais infectados, já que a infecção estimulou a alta expressão desse transcrito, garantindo a homeostase principalmente em animais AI.

O gene GLUL regula a permeabilidade da membrana intestinal catalisando a conversão de amônia e glutamato em glutamina. Sua função está ligada a sinalização celular, desintoxicação de amônia, fluxo de nitrogênio entre órgãos e homeostase ácido-base. Assim, as condições em que níveis diminuídos de glutamina sintetase intestinal estão presentes podem levar a níveis baixos de glutamina disponível e aumento da permeabilidade da membrana intestinal (Zhou et al., 2010).

A glutamina é, portanto, um componente essencial para nutrir e reparar tecidos diversos por meio da liberação de microvesículas pela membrana celular, que podem ser micropartículas ou exossomos, em um mecanismo de comunicação

que entrega moléculas a células e tecidos (Zhou et al., 2010), fundamental para a sinalização da presença do endoparasito no TGI e desencadear a resposta inflamatória local.

Dois genes expressos estão relacionados à estrutura e função do músculo liso entérico. O transcrito ACTL6A, proteína semelhante à actina 6A e também conhecido como BAF53A, altamente expresso em precursores epiteliais em proliferação (Bao et al., 2013; Panatta et al., 2020), que neste estudo foi altamente expresso em animais infectados. E o gene TAGLN, que embora não tenha sido diferencialmente expresso apresenta-se estável nos animais de alta proteína, é uma proteína do citoesqueleto também conhecida como SM22- α , WS3-10 e p27, que é expressa abundantemente nas células do músculo liso visceral e vascular (Lees-Miller et al., 1987; Thweatt et al., 1992). Foi relatado que o TAGLN se liga diretamente aos filamentos de actina, e seu possível papel está na organização das relações espaciais dos filamentos de actina nas células musculares lisas (Shapland et al., 1993). A expressão positiva simultânea de ambos os genes sugere que os cordeiros podem ter apresentado aumento da motilidade entérica, ancorando assim as alterações observadas na mucosa do abomaso que aumenta as contrações na tentativa de eliminar os endoparasitos.

O sistema complemento atua contra infecções produzindo quadros de inflamação, cuja função está relacionada a liberação de mediadores inflamatórios, células fagocíticas, atuando também nos resíduos endógenos. C1Q é uma molécula de reconhecimento da via do sistema complemento e é conhecida por ter um papel fundamental na encruzilhada entre a imunidade adaptativa e inata, cuja cadeia é codificada pelos genes C1QA e C1QC (Schejbel et al., 2011), que apresentaram alta expressão nos animais de alta proteína.

Na via de sinalização clássica do sistema complemento, C1Q reconhece patógenos ligados a anticorpos, reconhecimento padrão de IgG, anticorpos ligados a antígenos e uma variedade de ligantes na superfície de antígenos. Autores sugeriram que a deficiência dessa molécula pode estar associada a uma capacidade diminuída de manipulação de imunocomplexos, regulação deficiente de linfócitos B e subsequente produção de anticorpos, sua alta expressão, portanto, poderia explicar os níveis semelhantes de IgG observados entre os tratamentos (Botto; Walport, 2002; Korb; Ahearn, 1997; Lood et al., 2009; Nauta, et al., 2002; Vandivier et al., 2002; Truedsson et al., 2007).

Os animais de alta proteína apresentaram alta expressão do transcrito Sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) que tem função essencial na regulação da saída de linfócitos dos nódulos linfóides para o sangue periférico (Healy; Antel, 2016), dependente de um gradiente S1P entre o tecido linfóide e o plasma. Assim, o transcrito S1PR1 tem sido usado como marcador no diagnóstico de doenças do TGI em humanos e está fortemente relacionado a resposta imune Th 17 (Abarca-Zabalía et al., 2020).

Linfócitos T CD 4⁺ helper 17 (Th17) estão relacionados a patogênese de doenças inflamatórias autoimunes intestinais em humanos (Abarca-Zabalía et al., 2020). Porém, até o momento, não está claro o que distingue as células Th17 inflamatórias induzidas por patógenos e as homeostáticas residentes no tecido induzidas por comensais. No entanto, as células Th17 induzidas por infecção mostraram extensa plasticidade em direção a citocinas pró-inflamatórias, disseminadas amplamente na periferia e envolvidas na glicólise aeróbica, além da fosforilação oxidativa típica para células efetoras inflamatórias (Omenetti et al., 2019).

Estudando genes de resistência em ovinos Blackface com abomaso acometido por *Teladorsagia circumcincta*, Gossner et al. (2012) relataram a ativação diferencial de respostas polarizadas Th17, que estão associadas a superfícies mucosas, especialmente gastrintestinais (Bettelli et al., 2006), com função de proteger o epitélio da invasão de patógenos. A indução de Th17 tem função inflamatória importante através da expressão de interleucinas como IL1 β , IL6, IL17A, IL21 e TNF α (Korn et al., 2009; Peck et al., 2010).

Estudando as diferenças de expressão gênica no duodeno de ovinos suscetíveis e resistentes a NGI por microarray, Diez-Tascón et al. (2005) identificaram mais de cem genes diferencialmente expressos, cujos resultados corroboram com os deste trabalho. Foram expressos os genes SUSD3, TAGLN, receptor homeostático de quimiocina (CXCR4), ZFP36L2 e SLC35D2, confirmando que cordeiros com expressão de genes relacionados ao MCH de classe II, como o CXCR4, tendem a apresentar resposta imune inata eficaz durante infecção por NGI.

4.5 Conclusão

A dieta proteica altera a expressão de genes relacionados à resposta imune de cordeiros contra infecção primária por *H. contortus*, com alta expressão em linfonodo de vias relacionadas a hematopoiese, organização de tecidos, fagocitose, apoptose, adesão celular e controle de intensidade do processo inflamatório.

A dieta proteica conferiu menor resposta inflamatória da mucosa do abomaso em cordeiros infectados, bem como não influenciou o nível de IgG no sangue.

Referências

Abarca-Zabalía, J.; García, M. I.; Ros, A. L.; Marín-Jiménez, I.; Martínez-Ginés, M. L.; López-Cauce, B.; Martín-Barbero, M. L.; Salvador-Martín, S.; Sanjurjo-Saez, M.; García-Domínguez, J. M.; Fernández, L. A. P. Differential Expression of SMAD Genes and S1PR1 on Circulating CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis and Crohn's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, p. 676, 2020.

Abbott, E. M.; Parkins, J. J.; Holmes, P. H. Influence of dietary protein on parasite establishment and pathogenesis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection of *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 38, p. 6-13, 1985.

Abbott, E. M.; Parkins, J. J.; Holmes, P. H. Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infections. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 45, p. 41-49, 1988.

Amarante, A. F. T.; Susin, I.; Rocha, R. A.; Silva, M. B.; Mendes, C. Q.; Pires, A. V. Resistance of Santa Inês and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, p. 273-280, 2009.

Baddeley, A. J.; Gundersen, H. J.; Cruz-Orive, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 142, p. 259-76, 1986.

Bao, X.; Tang, J.; Lopez-Pajares, V.; Tao, S.; Qu, K.; Crabtree, G. R.; Khavari, P. A. ACTL6a enforces the epidermal progenitor state by suppressing SWI/SNF-dependent induction of KLF4. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 12, p. 193-203, 2013.

Besier, R. B.; Kahn, L. P.; Sargison, N.D.; Van Wyk, J. A. Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. In: Gasser, R. B.; von Samson-Himmelstjerna, G. (Ed.). **Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends**. Cambridge: Academic Press, 2016. p. 181-238. (Advances in Parasitology, 93).

Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T. B.; Oukka, M.; Weiner, H. L.; Kuchroo, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, London, v. 441, p. 235–238, 2006.

Botto, M.; Walport, M. J. C1q, autoimmunity and apoptosis. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 205, p. 395–406, 2002.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 62 de 10 de maio de 2018. Regulamento Técnico de Manejo Pré-Abate e Abate Humanitário. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 95, 18 maio 2018. Seção 1, p. 24.

Cánovas, A.; Reverter, A.; Deatley, K.; Ashley, R. L.; Colgrave, M. L.; Fortes, M. R. S.; Islas-Trejo, A.; Lehnert, S.; Porto-Neto, L.; Rincón, G.; Silver, G. A.; Snelling, W. M.; Medrano, J. F.; Thomas, M. G. Multi-tissue omics analyses reveal molecular regulatory networks for puberty in composite beef cattle. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 7, art. 0102551, 2014.

Casanova, V. P.; Aires, A. R.; Collet, S. G.; Krause, A.; Moresco, R. N.; Bochi, G. V.; Silva, A. S.; Leal, M. L. R. Iron supplementation for lambs experimentally infected by *Haemonchus contortus*: response to anemia and iron store in the bone marrow. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 1543-1548, 2018.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 2, p. 581-585, 2006.

Di Stasi, R.; De Rosa, L.; D'andrea, L. D. Therapeutic aspects of AXL/Gas6 molecular system. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 25, p. 2130-2148, 2020.

Diez-Tascon, C.; Keane, O. M.; Wilson, T.; Zadissa, A.; Hyndman, D. L.; Baird, D. B.; McEwan, J. C.; Crawford, A. M. Microarray analysis of selection lines from outbred populations to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. **Physiological Genomics**, Rockville, v. 21, p. 59-69, 2005.

Dobin, A.; Davis, C. A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T. R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, p. 15-21, 2013.

Ge, S. X.; Jung, D.; Yao, R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. **Bioinformatics**, Oxford, v. 36, p. 2628-2629, 2020.

Gossner, A. G.; Venturina, V. M.; Shaw, D. J.; Pemberton, J. M.; Hopkins, J. Relationship between susceptibility of Blackface sheep to *Teladorsagia circumcincta* infection and an inflammatory mucosal T cell response. **Veterinary Research**, London, v. 43, n. 1, p. 26, 2012.

Hassam, M.; Good, B.; Hanrahan, J. P.; Campion, D.; Sayers, G.; Mulcahy, G.; Sweeney, T. The dynamic influence of the DRB1*1101 allele on the resistance of

sheep to experimental *Teladorsagia circumcincta* infection. **Veterinary Research**, London, v. 42, art. 46, 2011.

Healy, L. M.; Antel, J. P. Sphingosine-1-Phosphate Receptors in the Central Nervous and Immune Systems. **Current Drug Targets**, Sharjah, Emirates, v. 17, p. 1841–1850, 2016.

Hoste, H.; Torres-Acosta, J. F. J.; Quijada, J.; Chan-Perez, I.; Dakheel, M. M.; Kommuru, D. S.; Mueller-Harvey, I.; Terrill, T. H. Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. In: Gasser, R. B.; von Samson-Himmelstjerna, G. (Ed.). **Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends**. Cambridge: Academic Press, 2016. p. 239-351. (Advances in Parasitology, 93).

Houdijk, J. G. M. Differential effects of protein and energy scarcity on resistance to nematode parasite. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 103, p. 41-49, 2012.

Janssens, R.; Struyf, S.; Proost, P. The unique structural and functional features of CXCL12. **Cellular and Molecular Immunology**, London, v. 15, p. 299-311, 2018.

Katayama, Y.; Yokota, T.; Zhao, H.; Wong, R. J.; Stevenson, D. K.; Taniguchi-Ikeda, M.; Nakamura, H.; Lijima, K. Association of HMOX1 gene promoter polymorphisms with hyperbilirubinemia in the early neonatal period. **Pediatrics International**, Carlton South, v. 57, p. 645-649, 2015.

Khan, F. A.; Sahoo, A.; Sonawane, G. G.; Karim, S. A.; Dhakad, S.; Pareek, A. K.; Tripathi, B. N. Effect of dietary protein on responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 150, p. 143-151, 2012.

Korb, L. C.; Ahearn, J. M. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 158, p. 4525–4528, 1997.

Korn, T.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 27, p. 485–517, 2009.

Lees-Miller, J. P.; Heeley, D. H.; Smillie, L. B. An abundant and novel protein of 22 kDa (SM22) is widely distributed in smooth muscles. Purification from bovine aorta. **Biochemical Journal**, London, v. 244, p. 705–709, 1987.

Lemke, G.; Rothlin, C. V. Immunology of the TAM receptors. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, p. 327-336, 2008.

Lemke, G. Biology of the TAM receptors. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 11, art. 009076, 2013.

Lood, C.; Gullstrand, B.; Truedsson, L.; Olin, A. I.; Alm, G. V.; Rönnblom, L.; Sturfelt, G.; Eloranta, M.-L.; Bengtsson, A. A. C1q inhibits immune complex-induced

interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v. 60, p. 3081–3090, 2009.

Louvandini, H.; Veloso, C. F. M.; Paludo, G. R.; Dell'Porto, A.; Gennari, S. M.; McManus, C. M. Influence of protein supplementation on the resistance and resilience on young hair sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes during rainy and dry seasons. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, p. 103–111, 2006.

McCarthy, D. J.; Chen, Y.; Smyth, G. K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. 10, p. 4288-4297, 2012. doi: 10.1093/nar/gks042.

Nauta, A. J.; Trouw, L. A.; Daha, M. R.; Tijjsma, O.; Nieuwland, R.; Schwaeble, W. J.; Gingras, A. R.; Mantovani, A.; Hack, E. C.; Roos, A. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 32, p. 1726–1736, 2002.

Omenetti, S.; Bussi, C.; Metidji, A.; Isepon, A.; Lee, S.; Tolaini, M.; Li, Y.; Kelly, G.; Chakravarty, P.; Shoaie, S.; Gutierrez, M. G.; Stockinger, B. The Intestine Harbors Functionally Distinct Homeostatic Tissue-Resident and Inflammatory Th17 Cells. **Immunity**, Cambridge, v. 51, p. 77-89, 2019.

Panatta, E.; Lena, A. M.; Mancini, M.; Smirnov, A.; Marini, A.; Ponti, R. D.; Botta-Orfila, T.; Tartaglia, G. G.; Mauriello, A.; Zhang, X.; Calin, G. A.; Melino, G.; Candi, E. Long non-coding RNA uc.291 controls epithelial differentiation by interfering with the ACTL6A/BAF complex. **Embo Reports**, London, v. 21, p. 1-14, art. e46734, 2020.

Rashid, S.; Irshadullah, M. Partial characterization of superoxide dismutase activity in the Barber pole worm – *Haemonchus contortus* infecting *Capra hircus* and abomasal tissue extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Hainan, v. 4, p. 718-724, 2014.

Robinson, M. D.; McCarthy, D. J.; Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.

Schejbel, L.; Skattum, L.; Hagelberg, S.; Åhlin, A.; Schiller, B.; Berg, S.; Genel, F.; Truedsson, L.; Garred, P. Molecular basis of hereditary C1q deficiency—revisited: identification of several novel disease-causing mutations. **Genes and Immunity**, Hampshire, v. 12, p. 626-634, 2011.

Shapland, C.; Hsuan, J. J.; Totty, N. F.; Lawson, D. Purification and properties of transgelin: a transformation and shape change sensitive actin-gelling protein. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 121, p. 1065–1073, 1993.

Silva, B. F.; Bassetto, C. C.; Amarante, A. F. T. Immune responses in sheep naturally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) and gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, p. 120-126, 2012.

Snustad, D. P.; Simmons, M. J., 2018. **Fundamentos da Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 579 p.

Thweatt, R.; Lumpkin Junior, C. K.; Goldstein, S. A novel gene encoding a smooth muscle protein is overexpressed in senescent human fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 187, p. 1–7, 1992.

Tirapegui, J. **Nutrição: Fundamentos e Aspectos Atuais**. São Paulo: Atheneu, 2013. cap. 24, p. 391-410: Nutrigenética e Nutrigenômica.

Truedsson, L.; Bengtsson, A. A.; Sturfelt, G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, Oxford, v. 40, p. 560–566, 2007.

Vandivier, R. W.; Ogden, C. A.; Fadok, V. A.; Hoffmann, P. R.; Brown, K. K.; Botto, M et al. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, p. 3978–3986, 2002.

Williams, A. R. Short communication: some observations on the role of Bradykinin in immunity to *Teladorsagia circumcincta* in sheep. **Journal of Parasitology Research**, London, v. 2012, p. 1-4, 2012.

Zhbannikov, I. Y.; Hunter, S. S.; Foster, J. A.; Settles, M. L. 2017. SeqyClean: A Pipeline for High-throughput Sequence Data Preprocessing. In: ACM International Conference on Bioinformatics, Computational Biology, and Health Informatics - ACM-BCB '17, 8., 2017, New York. **Proceedings...** New York: ACM, 2017. p. 407-416. DOI: <https://doi.org/10.1145/3107411.3107446>.

Zhou, Q.; Souba, W. W.; Croce, C. M.; Verne, G. N. MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome. **Gut**, London, v. 59, p. 775-784, 2010.

APÊNDICE

Apêndice A – Vias Regulatórias e Genes Diferencialmente Expressos

Tabela 17 – Vias regulatórias diferencialmente expressas em cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta

(Continua)

Vias regulatórias	Valor de p	Número de genes	Genes
Immune system process	1,7E-03	14	CXCL12 VSIR AXL C1QC C1QA LST1 FCER1G S1PR1 GOLPH3 IL1R1 LGMN ADORA2A HMOX1 NCK2
Regulation of immune system process	1,0E-03	11	CXCL12 VSIR AXL C1QC C1QA LST1 FCER1G IL1R1 LGMN ADORA2A NCK2
Negative regulation of immune system process	1,0E-03	7	CXCL12 VSIR AXL C1QC LST1 FCER1G ADORA2A
Regulation of cell activation	1,6E-03	7	VSIR AXL C1QA LST1 FCER1G ADORA2A NCK2
Regulation of leukocyte activation	1,3E-03	7	VSIR AXL C1QA LST1 FCER1G ADORA2A NCK2
Inflammatory response	1,7E-03	7	AXL C1QA FCER1G IL1R1 ADORA2A HMOX1 PPARA
Negative regulation of leukocyte cell-cell adhesion	1,7E-03	4	CXCL12 VSIR ADORA2A PPARA
Leukocyte cell-cell adhesion	1,3E-03	6	CXCL12 VSIR GOLPH3 ADORA2A PPARA NCK2
Biological adhesion	1,0E-03	11	CXCL12 VSIR AXL S1PR1 GOLPH3 ADORA2A NEDD9 TGFBI DSP PPARA NCK2
Cell adhesion	1,0E-03	11	CXCL12 VSIR AXL S1PR1 GOLPH3 ADORA2A NEDD9 TGFBI DSP PPARA NCK2
Cell motility	1,0E-03	12	CXCL12 PTK7 VSIR AXL FCER1G S1PR1 GOLPH3 IL1R1 LGMN NEDD9 HMOX1 GLUL
Cell migration	1,0E-03	12	CXCL12 PTK7 VSIR AXL FCER1G S1PR1 GOLPH3 IL1R1 LGMN NEDD9 HMOX1 GLUL

(Continuação)

Vias regulatórias	Valor de p	Número de genes	Genes
Localization of cell	1,0E-03	12	CXCL12 PTK7 VSIR AXL FCER1G S1PR1 GOLPH3 IL1R1 LGMN NEDD9 HMOX1 GLU
Locomotion	1,8E-03	12	CXCL12 PTK7 VSIR AXL FCER1G S1PR1 GOLPH3 IL1R1 LGMN NEDD9 HMOX1 GLUL
Movement of cell or subcellular component	1,0E-03	14	CXCL12 PTK7 VSIR AXL FCER1G S1PR1 GOLPH3 IL1R1 LGMN NEDD9 DSP HMOX1 KIF23 GLUL
Leukocyte migration	1,3E-03	6	CXCL12 FCER1G S1PR1 GOLPH3 IL1R1 LGMN RAPGEF2 CXCL12 ZC4H2 PTK7 PTH1R VSIR AXL C1QA
Positive regulation of biological process	1,0E-03	25	MTPN FCER1G PRDM2 S1PR1 GOLPH3 IL1R1 LGMN PLGRKT ADORA2A NEDD9 SH3BP2 TELO2 PAOX HMOX1 KIF23 PPARA NCK2
Positive regulation of cellular process	1,0E-03	24	RAPGEF2 CXCL12 AXL FCER1G RAPGEF2 ZNF277 NOTCH3 ZC4H2 PTK7 PTH1R VSIR AXL
Developmental process	1,0E-03	25	C1QC C1QA LST1 FCER1G PRDM2 S1PR1 UGDH LGMN PRKACB NEDD9 TGFBI DSP ULK2 HMOX1 GLUL MYO9A PPARA
Regulation of developmental process	4,3E-04	17	RAPGEF2 ZNF277 NOTCH3 ZC4H2 PTK7 VSIR AXL C1QC C1QA S1PR1 LGMN PRKACB NEDD9 ULK2 HMOX1 GLUL PPARA
Regulation of multicellular organismal process	1,0E-03	17	RAPGEF2 ZC4H2 PTK7 VSIR AXL C1QC C1QA MTPN FCER1G S1PR1 IL1R1 LGMN PRKACB DSP ULK2 HMOX1 GLUL
Anatomical structure morphogenesis	1,7E-03	15	RAPGEF2 PTK7 AXL LST1 S1PR1 UGDH PRKACB NEDD9 TGFBI DSP ULK2 HMOX1 GLUL MYO9A PPARA
Leukocyte apoptotic process	1,4E-03	4	RAPGEF2 CXCL12 AXL FCER1G
Regulation of leukocyte apoptotic process	1,0E-03	4	RAPGEF2 CXCL12 AXL FCER1G
Dendritic cell apoptotic process	2,7E-04	3	RAPGEF2 CXCL12 AXL

(Conclusão)

Vias regulatórias	Valor de p	Número de genes	Genes
Regulation of dendritic cell apoptotic process	2,7E-04	3	RAPGEF2 CXCL12 AXL
Negative regulation of dendritic cell apoptotic process	1,8E-03	2	CXCL12 AXL
Establishment of epithelial cell polarity	1,3E-03	3	PTK7 GOLPH3 MYO9A
Synapse pruning	1,6E-03	2	C1QC C1QA

Tabela 18 – Vias regulatórias diferencialmente expressas em cordeiros livres de endoparasitos e infectados com *Haemonchus contortus*

(Continua)

Via regulatória	Valor de p	Número de genes	Genes
Regulation of multicellular organismal development	2,2E-02	10	SFMBT1 MUSTN1 AXL JAG1 TGIF2 HMOX1 CDK6 GLUL NIN IL1RN
Regulation of developmental process	5,2E-03	14	SFMBT1 MUSTN1 JDP2 AXL EPB41L3 JAG1 MBNL3 DKKL1 TGIF2 HMOX1 CDK6 GLUL NIN IL1RN
Anatomical structure development	2,2E-02	18	SFMBT1 MUSTN1 AXL SPTBN2 LST1 EPB41L3 JAG1 MBNL3 TGFB1 KLHL3 TGIF2 DSP HMOX1 CDK6 GLUL NIN
Multicellular organism development	2,1E-02	17	SFMBT1 MUSTN1 AXL SPTBN2 LST1 EPB41L3 JAG1 TGFB1 KLHL3 TGIF2 DSP HMOX1 CDK6 GLUL NIN ACTL6A
System development	2,2E-02	16	SFMBT1 MUSTN1 AXL SPTBN2 LST1 EPB41L3 JAG1 TGFB1 KLHL3 TGIF2 DSP HMOX1 CDK6 GLUL NIN ACTL6A
Developmental process	8,6E-03	20	SFMBT1 MUSTN1 JDP2 AXL SPTBN2 LST1 EPB41L3 JAG1 MBNL3 DKKL1 TGFB1 KLHL3 TGIF2 DSP HMOX1 CDK6 GLUL NIN ACTL6A IL1RN
Anatomical structure morphogenesis	5,2E-03	14	AXL SPTBN2 LST1 EPB41L3 JAG1 TGFB1 KLHL3 TGIF2 DSP HMOX1 GLUL NIN ACTL6A IL1RN
Nervous system development	4,9E-02	9	AXL SPTBN2 LST1 EPB41L3 JAG1 TGIF2 CDK6 NIN ACTL6A
Regulation of cell differentiation	3,0E-02	9	MUSTN1 JDP2 AXL JAG1 MBNL3 DKKL1 TGIF2 CDK6 NIN
Myeloid cell homeostasis	4,7E-02	3	AXL HMOX1 CDK6
Erythrocyte homeostasis	3,6E-02	3	AXL HMOX1 CDK6
Regulation of dendritic cell apoptotic process	8,6E-03	2	CXCL12 AXL
Negative regulation of dendritic cell apoptotic process	8,2E-03	2	CXCL12 AXL

Via regulatória	Valor de p	Número de genes	Genes
Dendritic cell apoptotic process	8,6E-03	2	CXCL12 AXL
Negative regulation of leukocyte apoptotic process	4,7E-02	2	CXCL12 AXL
Cytokine-mediated signaling pathway	4,7E-02	4	CXCL12 AXL PLVAP IL1RN
Regulation of cellular extravasation	3,0E-02	2	CXCL12 PLVAP
Biological adhesion	4,7E-02	7	CXCL12 AXL JAG1 TGFBI DSP CDK6 IL1RN
Cell adhesion	4,7E-02	7	CXCL12 AXL JAG1 TGFBI DSP CDK6 IL1RN
Negative regulation of cell-cell adhesion	4,7E-02	3	CXCL12 JAG1 IL1RN
Blood vessel remodeling	4,1E-02	2	AXL JAG1
Distal tubule development	9,8E-03	2	JAG1 KLHL3
Negative regulation of fat cell differentiation	4,7E-02	2	JDP2 JAG1
Regulation of fat cell differentiation	3,0E-02	3	JDP2 JAG1 DKKL1
Regulation of gastrulation	4,7E-02	2	TGIF2 IL1RN
ATP-dependent chromatin remodeling	4,6E-02	2	SMARCAD1 ACTL6A

Tabela 19 – Genes com baixa expressão, localização e esembl gene ID em linfonodo de cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta

(Continua)

Gene	Nome do gene	Localização (cromossomo)	Esembl Gene ID
LOC101121563	Não mapeado	-	Não mapeado
LOC114115224	Não mapeado	-	Não mapeado
PRKACB	Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Beta	1	ENSOARG00000013816
LOC101114226	Não mapeado	-	Não mapeado
S1PR1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1	1	ENSOARG00000010691
FCER1G	Fc fragment of IgE receptor Ig	1	ENSOARG00000009800
FCGR3A	Fc fragment of IgG receptor IIIa	-	Não mapeado
NOTCH3	Notch receptor 3	5	ENSOARG00000003966
C1QC	Complement C1q C chain	2	ENSOARG00000007991
C1QA	Complement C1q A chain	2	ENSOARG00000008001
IL1R1	Interleukin 1 receptor type 1	3	ENSOARG00000013144
PLXNC1	Plexin C1	3	ENSOARG00000015895
HMOX1	Heme Oxygenase 1	3	ENSOARG00000018475
LOC105612575	Não mapeado	-	Não mapeado
ZNF277	Zinc finger protein 277	4	ENSOARG00000002557
LOC101122689	Não mapeado	-	Não mapeado
LRRC25	Leucine rich repeat containing 25	5	ENSOARG00000012307
BST-2B	Bone marrow stromal cell antigen 2B	-	Não mapeado
ZFR2	Zinc finger RNA binding protein 2	5	ENSOARG00000011529
PHYKPL	5-phosphohydroxy-L-lysine phospho-lyase	5	ENSOARG00000006386
TGFBI	Transforming growth factor beta induced	5	ENSOARG00000015081
LOC114115272	Não mapeado	-	Não mapeado
SH3BP2	SH3 domain binding protein 2	6	ENSOARG00000014948

(Continuação)

Gene	Nome do gene	Localização (cromossomo)	Esembl Gene ID
MYO9A	Myosin IXA	7	ENSOARG00000018863
MARCKS	Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	-	Não mapeado
IFNGR1	Interferon gamma receptor 1	8	ENSOARG00000000510
THBS2	Thrombospondin 2	-	Não mapeado
GPRC5C	G protein-coupled receptor class C group 5 member C	11	ENSOARG00000012646
FADS6	Fatty acid desaturase 6	-	Não mapeado
HEXIM2	HEXIM P-TEFb complex subunit 2	11	ENSOARG00000009856
ULK2	Unc-51 like autophagy activating kinase 2	11	ENSOARG00000017770
ZNF624	Zinc finger protein 624	11	ENSOARG00000016837
LOC100101238	Não mapeado	-	Não mapeado
TNFRSF25	TNF receptor superfamily member 25	12	ENSOARG00000012170
GLUL	Glutamate-ammonia ligase	12	ENSOARG00000018757
PCMTD2	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2	-	Não mapeado
GGT7	Gamma-glutamyltransferase 7	13	ENSOARG00000010514
FBX017	F-box protein 17	-	Não mapeado
AXL	Tirosine-quinase receptor	14	ENSOARG00000007525
LOC101117272	Não mapeado	-	Não mapeado
HBB	Hemoglobin subunit beta	-	Não mapeado
SELENOP	Selenoprotein P	-	Não mapeado
LOC101104528	Não mapeado	-	Não mapeado
RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor 2	17	ENSOARG00000002302
ADORA2A	Adenosine A2a receptor	17	ENSOARG00000014207
LGMN	Legumain	18	ENSOARG00000013162
PTH1R	Parathyroid hormone 1 receptor	19	ENSOARG00000006638
PTK7	Protein tyrosine kinase 7	20	ENSOARG00000005665

(Conclusão)			
Gene	Nome do gene	Localização (cromossomo)	Esembl Gene ID
LST1	Leukocyte specific transcript 1	20	ENSOARG00000008167
LOC101108171	Não mapeado	-	Não mapeado
LOC114109518	Não mapeado	-	Não mapeado
NEDD9	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	20	ENSOARG00000014849
PAOX	Polyamine oxidase	22	ENSOARG00000018365
HAUS1	HAUS augmin like complex subunit 1	23	ENSOARG00000002975
LOC114110673	Não mapeado	-	Não mapeado
LOC101108797	Não mapeado	-	Não mapeado
TELO2	Telomere maintenance 2	24	ENSOARG00000015764
VSIR	V-set immunoregulatory receptor	25	ENSOARG00000006883
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12	25	ENSOARG00000002991
CFP	Complement factor properdin	X	ENSOARG00000012877
LOC114111346	Não mapeado	-	Não mapeado
LOC114112133	Não mapeado	-	Não mapeado

Tabela 20 – Genes com alta expressão, localização e esembl gene ID em linfonodo de cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta

(Continua)

Gene	Nome do gene	Localização (cromossomo)	Esembl Gene ID
RCAN1	Regulator of calcineurin 1	-	Não mapeado
LOC101114408	Não mapeado	-	Não mapeado
PLGRKT	Plasminogen receptor with a C-terminal lysine	2	ENSOARG00000013500
GFPT1	Glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1	3	ENSOARG00000019823
RAB1A	Não mapeado	-	Não mapeado
NCK2	NCK adaptor protein 2	3	ENSOARG00000020923
PRR13	Proline rich 13	3	ENSOARG00000016479
ARFGAP3	ADP ribosylation factor GTPase activating protein 3	3	ENSOARG00000019057
PPARA	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	3	ENSOARG00000019427
MTPN	Myotrophin	4	ENSOARG00000009665
TPK1	Thiamin pyrophosphokinase 1	4	ENSOARG00000018504
CCL25	Não mapeado	-	Não mapeado
PNP	Não mapeado	-	Não mapeado
LOC101105064	Não mapeado	-	Não mapeado
UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase	6	ENSOARG00000011880
KIF23	Kinesin family member 23	7	ENSOARG00000018647
WIPI1	Não mapeado	-	Não mapeado
SRSF2	Não mapeado	-	Não mapeado
LRRC59	Leucine rich repeat containing 59	11	ENSOARG00000004440
LOC1141008771	Não mapeado	-	Não mapeado
PRDM2	PR/SET domain 2	12	ENSOARG00000010675
LOC114117553	Não mapeado	-	Não mapeado
MMP24OS	MMP24 opposite strand	-	Não mapeado

(Conclusão)			
Gene	Nome do gene	Localização (cromossomo)	Esembl Gene ID
LGALS4	Galectin 4	14	ENSOARG00000005839
MTCH2	Mitochondrial carrier 2	15	ENSOARG00000007337
GOLPH3	Golgi phosphoprotein 3	16	ENSOARG00000012312
ARFIP1	ADP ribosylation factor interacting protein 1	17	ENSOARG00000003643
SBNO1	Strawberry notch homolog 1	17	ENSOARG00000004404
DSP	Desmoplakin	20	ENSOARG00000017552
PAPSS2	Não mapeado	-	Não mapeado
CCDC186	Coiled-coil domain containing 186	22	ENSOARG00000013882
GLUD1	Não mapeado	-	Não mapeado
ZC4H2	Zinc finger C4H2-type containing	X	ENSOARG00000004902

Tabela 21 – Genes com baixa expressão, localização e esembl gene ID em linfonodo de cordeiros livres de endoparasitos e infectados com *Haemonchus contortus*

Gene	Nome do gene	Localização (cromossomo)	Esembl Gene ID
KCNN3	Potassium calcium-activated channel subfamily N member 3	1	ENSOARG00000002973
USP13	Ubiquitin specific peptidase 13	1	ENSOARG00000020687
GNLY	Granulysin	-	Não mapeado
LOC101112474	Não mapeado	-	Não mapeado
GALM	Galactose mutarotase	3	ENSOARG00000008843
LOC105615229	Não mapeado	-	Não mapeado
CRYBG1	Crystallin beta-gamma domain containing 1	8	ENSOARG00000011149
LACTB2	Lactamase beta 2	9	ENSOARG00000004110
KRT19	Keratin 19	-	Não mapeado
TGIF2	TGFB induced factor homeobox 2	13	ENSOARG00000015887
LGALS4	Galectin 4	14	ENSOARG00000005839
TBCEL	Tubulin folding cofactor E like	-	Não mapeado
LOC114108618	Não mapeado	-	Não mapeado
DSP	Desmoplakin	20	ENSOARG00000017552
YES1	YES proto-oncogene 1, Src family tyrosine kinase	23	ENSOARG00000009530
CLDN4	Claudin 4	-	Não mapeado

Tabela 22 – Genes com alta expressão, localização e esembl gene ID em linfonodo de cordeiros livres de endoparasitos e infectados com *Haemonchus contortus*

(Continua)

Gene	Nome do gene	Localização (cromossomo)	Esembl Gene ID
SH3D21	SH3 domain containing 21	1	ENSOARG00000019685
LOC114115224	Não mapeado	-	Não mapeado
TENT5C	Terminal nucleotidyltransferase 5C	-	Não mapeado
ACTL6A	Actin like 6A	1	ENSOARG00000020696
MTX2	Metaxin 2	2	ENSOARG00000017452
IGFBP5	Insulin like growth factor binding protein 5	-	Não mapeado
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist	3	ENSOARG00000020828
NPFF	neuropeptide FF-amide peptide precursor	3	ENSOARG00000016425
SRGAP1	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1	3	ENSOARG00000003915
HMOX1	Heme oxygenase 1	-	Não mapeado
HEBP1	Heme binding protein 1	3	ENSOARG00000020830
LOC105612575	Não mapeado	-	Não mapeado
TNRC6B	Trinucleotide repeat containing adaptor 6B	3	ENSOARG00000017238
CDK6	Cyclin dependent kinase 6	4	ENSOARG00000018572
MEST	Mesoderm specific transcript	4	ENSOARG00000005539
PLVAP	Plasmalemma vesicle associated protein	5	ENSOARG00000016828
FSD1	Fibronectin type III and SPRY domain containing 1	5	ENSOARG00000010222
ZFR2	Zinc finger RNA binding protein 2	5	ENSOARG00000011529
TGFB1	Transforming growth factor beta induced	5	ENSOARG00000015081
KLHL3	Kelch like family member 3	5	ENSOARG00000015370
SMARCAD1	SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box 1	6	ENSOARG00000017851

(Continuação)

Gene	Nome do gene	Localização (cromossomo)	Esembl Gene ID
SLC7A7	Solute carrier family 7 member 7	7	ENSOARG00000019424
NIN	Ninein	7	ENSOARG00000020672
NPC2	NPC intracellular cholesterol transporter 2	7	ENSOARG00000001076
JDP2	Jun dimerization protein 2	7	ENSOARG00000001796
FADS6	Fatty acid desaturase 6	-	Não mapeado
MPP3	Membrane palmitoylated protein 3	11	ENSOARG00000006016
LOC105616363	Não mapeado	-	Não mapeado
GIT1	GIT ArfGAP 1	11	ENSOARG00000007782
GLUL	Glutamate-ammonia ligase	12	ENSOARG00000018757
JAG1	Jagged Canonical Notch Ligand 1	13	ENSOARG00000010523
ITGB1	integrin subunit beta 1	-	Não mapeado
ANKRD16	Ankyrin repeat domain 16	13	ENSOARG00000007810
ST3GAL2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2	14	ENSOARG00000005098
LRP3	LDL receptor related protein 3	14	ENSOARG00000004396
AXL	Receptor tirosino-quinase	14	ENSOARG00000007525
LOC114117998	Não mapeado	-	Não mapeado
DKKL1	dickkopf like acrosomal protein 1	14	ENSOARG00000012927
LOC101106542	Não mapeado	-	Não mapeado
HBB	Hemoglobin subunit beta	-	Não mapeado
SELENOP	Selenoprotein P	-	Não mapeado
SFMBT1	Scm like with four mbt domains 1	19	ENSOARG00000000458
MUSTN1	Musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1	19	ENSOARG00000000606
LST1	Leukocyte specific transcript 1	20	ENSOARG00000008167
TMEM86A	Transmembrane protein 86A	21	ENSOARG00000009340
SPTBN2	Spectrin beta, non-erythrocytic 2	21	ENSOARG00000007959

(Conclusão)			
Gene	Nome do gene	Localização (cromossomo)	Esembl Gene ID
LIPA	Lipase A, lysosomal acid type	-	Não mapeado
LOC101103461	Não mapeado	-	Não mapeado
EPB41L3	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3	23	ENSOARG00000010473
LOC114110673	Não mapeado	-	Não mapeado
LOC101108797	Não mapeado	-	Não mapeado
ITGAD	Integrin subunit alpha D	-	Não mapeado
ASL	Argininosuccinate lyase	-	Não mapeado
CCL26	C-C motif chemokine ligand 26	-	Não mapeado
LOC101117299	Não mapeado	-	Não mapeado
CXCL12	Quimiocina CXC 12	25	ENSOARG00000002991
MCPH1	Microcephalin 1	-	Não mapeado
CFP	Complement factor properdin	X	ENSOARG00000012877
MBNL3	Muscleblind like splicing regulator 3	X	ENSOARG00000012405

Tabela 23 – Genes com baixa expressão diferencialmente expressos em linfonodo de cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta

(Continua)

Gene	Expressão	Log2 (fold change)	Log CPM	Valor de P
LOC101121563	Down	-1,218375034	2,815299	0,030228
LOC114115224	Down	-2,712670474	6,938114	0,021965
PRKACB	Down	-1,312357647	3,450948	0,035764
LOC101114226	Down	-2,103213814	3,973663	0,009961
S1PR1	Down	-1,188243157	1,893192	0,043848
FCER1G	Down	-1,485685436	5,074933	0,044023
FCGR3A	Down	-2,344408424	4,341083	0,029708
NOTCH3	Down	-1,130185204	3,418681	0,033688
C1QC	Down	-2,62509911	7,464562	0,005142
C1QA	Down	-2,420131114	6,524633	0,009888
IL1R1	Down	-1,319393171	2,744562	0,041048
PLXNC1	Down	-1,952599412	2,785776	0,042666
HMOX1	Down	-2,689513301	6,771234	0,018404
LOC105612575	Down	-3,239917539	3,961197	0,012855
ZNF277	Down	-1,177769567	2,647031	0,010328
LOC101122689	Down	-2,385326426	5,128889	0,034521
LRRC25	Down	-1,768388157	2,901121	0,047714
BST-2B	Down	-1,537148491	2,727655	0,028872
ZFR2	Down	-2,273489438	2,97233	0,012756
PHYKPL	Down	-1,075767471	3,099686	0,043319
TGFBI	Down	-2,529020537	4,874907	0,000719
LOC114115272	Down	-1,557887795	2,522432	0,011367
SH3BP2	Down	-1,433677024	4,811632	0,026926
MYO9A	Down	-1,454166226	3,204046	0,014268
MARCKS	Down	-1,311827933	5,468482	0,026701
IFNGR1	Down	-1,016979003	3,305636	0,017588
THBS2	Down	-1,578865453	2,162335	0,001476
GPRC5C	Down	-1,214582505	2,672879	0,024282
FADS6	Down	-1,541402002	3,542913	0,018007
HEXIM2	Down	-1,005037785	2,83267	0,026194
ULK2	Down	-1,476406522	4,586113	0,01914
ZNF624	Down	-1,041770014	2,178702	0,029899
LOC100101238	Down	-2,414871536	5,921747	0,012116
TNFRSF25	Down	-1,430606239	2,902758	0,045356
GLUL	Down	-2,416935354	7,131744	0,003305
PCMTD2	Down	-1,166766446	2,969143	0,023021
GGT7	Down	-1,107098533	2,962212	0,047426
FBX017	Down	-1,357923302	2,058876836	0,038834718
AXL	Down	-1,5930966	3,28798142	0,04635939
LOC101117272	Down	-1,357923302	2,058877	0,038835
HBB	Down	-1,59309657	3,287981	0,046359
SELENOP	Down	-1,05737778	3,942263	0,04644
LOC101104528	Down	-5,094949447	6,585997	0,004968

(Conclusão)

Gene	Expressão	Log2 (fold change)	Log CPM	Valor de P
RAPGEF2	Down	-1,653767922	2,645855	0,00734
ADORA2A	Down	-1,088565317	3,106247	0,041953
LGMN	Down	-1,335520531	5,176825	0,023067
PTH1R	Down	-1,069008588	4,989277	0,02838
PTK7	Down	-1,302937424	2,816535	0,00898
LST1	Down	-3,402650532	4,155349	0,025792
LOC101108171	Down	-1,434166596	7,33844	0,041469
LOC114109518	Down	-1,01955512	7,46398	0,047934
NEDD9	Down	-1,024275608	3,427005	0,041507
PAOX	Down	-1,065954929	4,549407	0,008637
HAUS1	Down	-1,234316124	2,209333	0,017612
LOC114110673	Down	-4,583852103	6,510681	0,00081
LOC101108797	Down	-4,779706814	6,269608	0,000528
TELO2	Down	-1,021599009	3,699525	0,008406
VSIR	Down	-1,153948266	4,39036	0,02233
CXCL12	Down	-1,434181927	5,699071	0,019544
CFP	Down	-2,493069043	4,738729	0,005934
LOC114111346	Down	-1,189383955	3,699618	0,027493
LOC114112133	Down	-1,332720352	3,042891	0,042051

Tabela 24 – Genes com alta expressão diferencialmente expressos em cordeiros alimentados com alto e baixo teor de proteína na dieta

Gene	Expressão	Log2 (fold change)	Log CPM	Valor de P
RCAN1	Up	1,706827449	3,946887477	0,029602487
LOC101114408	Up	2,810851377	5,126097499	0,018402857
PLGRKT	Up	1,843450431	2,410902946	0,044333032
GFPT1	Up	1,25643717	4,704789094	0,026767669
RAB1A	Up	1,718959378	3,445938174	0,038368279
NCK2	Up	1,25168823	2,926058909	0,023699493
PRR13	Up	1,554552021	5,014394412	0,02680531
ARFGAP3	Up	1,426736389	3,800650997	0,038723705
PPARA	Up	1,770429783	2,768570842	0,016410201
MTPN	Up	1,253385616	3,971118925	0,01505483
TPK1	Up	1,146389194	2,915476822	0,04314254
CCL25	Up	1,013486897	2,619036254	0,010672674
PNP	Up	2,055318362	2,452596685	0,02385969
LOC101105064	Up	1,316927911	4,022032323	0,017921873
UGDH	Up	2,837720962	4,044914537	0,004842504
KIF23	Up	1,474637638	2,120560845	0,016686916
WIPI1	Up	1,111995823	3,240523426	0,036719838
SRSF2	Up	1,368832998	3,612465554	0,001127612
LRRC59	Up	1,000971159	4,223294201	0,048170258
LOC1141008771	Up	1,333616212	2,391832424	0,02248843
PRDM2	Up	1,388025949	2,752846018	0,00262817
LOC114117553	Up	1,977974977	3,23595774	0,043396206
MMP24OS	Up	1,067130909	2,288603014	0,020817217
LGALS4	Up	2,959049943	4,604759368	0,0089401
MTCH2	Up	1,149712821	4,903937724	0,010375564
GOLPH3	Up	1,073163188	2,899160508	0,026096001
ARFIP1	Up	1,032508793	2,421531593	0,021969239
SBNO1	Up	1,001103087	2,754871589	0,032329152
DSP	Up	2,02629693	2,900049105	0,017989731
PAPSS2	Up	2,161602673	2,967845558	0,00576106
CCDC186	Up	1,524081768	2,780505393	0,024068235
GLUD1	Up	1,806320493	4,175132897	0,031766358
ZC4H2	Up	1,236754087	2,033211917	0,03082515

Tabela 25 – Genes com baixa expressão diferencialmente expressos em cordeiros livres de endoparasitos e infectados com *Haemonchus contortus*

Gene	Expressão	Log2 (fold change)	Log CPM	Valor de P
KCNN3	Down	-1,088314216	3,608037003	0,005782247
USP13	Down	-1,049618407	2,405002557	0,015305457
GNLY	Down	-2,088075124	3,420226232	0,048883708
LOC101112474	Down	-1,103978272	4,429881021	0,012332924
GALM	Down	-1,829393179	3,357576939	0,025212683
LOC105615229	Down	-1,397150184	2,118378646	0,011696726
CRYBG1	Down	-1,237181796	2,76773067	0,021392889
LACTB2	Down	-2,712467631	1,669986334	0,015913659
KRT19	Down	-3,625962167	3,262031144	0,010248141
TGIF2	Down	-1,10234273	3,112297672	0,012810745
LGALS4	Down	-2,931024055	4,588708788	0,016524371
TBCEL	Down	-1,006344463	2,886403352	0,015821452
LOC114108618	Down	-2,167363232	5,45468345	0,011763392
DSP	Down	-1,93004327	2,896643275	0,029252304
YES1	Down	-2,255694404	2,589189511	0,020973338
CLDN4	Down	-1,218337044	2,294219629	0,038817165

Tabela 26 – Genes com alta expressão diferencialmente expressos em cordeiros livres de endoparasitos e infectados com *Haemonchus contortus*

(Continua)

Gene	Expressão	Log2 (fold change)	Log CPM	Valor de P
SH3D21	Up	1,402563653	3,256854049	0,025979366
LOC114115224	Up	2,655192837	6,931344054	0,020273839
TENT5C	Up	1,688716611	3,766360204	0,03166233
ACTL6A	Up	1,13924745	2,435760366	0,039314962
MTX2	Up	1,268481933	2,025762885	0,049062289
IGFBP5	Up	1,758101904	4,515344761	0,00573953
IL1RN	Up	1,717847724	2,777113253	0,030589814
NPFF	Up	1,017033493	2,251672621	0,048351006
SRGAP1	Up	1,210313309	2,829856917	0,013830298
HMNOX1	Up	2,895002547	6,764306746	0,007612743
HEBP1	Up	1,976196303	4,182576416	0,011807654
LOC105612575	Up	2,93465402	3,954554622	0,019753102
TNRC6B	Up	1,169176012	3,425040775	0,005629767
CDK6	Up	1,096667067	4,133428164	0,014730733
MEST	Up	1,259768729	1,875334728	0,038429235
PLVAP	Up	1,594031725	5,964910112	0,001160924
FSD1	Up	1,431551193	2,521464449	0,041640681
ZFR2	Up	2,302438162	2,96699867	0,010865085
TGFBI	Up	2,053506886	4,869400093	0,008248401
KLHL3	Up	1,368690667	3,672853645	0,00663747
SMARCAD1	Up	1,239677992	2,069921449	0,023129438
SLC7A7	Up	1,110380243	4,955769954	0,040392789
NIN	Up	1,397304097	2,93386521	0,024802802
NPC2	Up	1,256362299	5,179403697	0,018438831
JDP2	Up	1,252929339	1,896310296	0,019015813
FADS6	Up	1,566484325	3,537594786	0,015989151
MPP3	Up	1,730774581	2,393717003	0,018060596
LOC105616363	Up	1,971721951	1,770312978	0,000914407
GIT1	Up	1,23792092	2,101618931	0,034709675
GLUL	Up	2,61935718	7,12611984	0,000716146
JAG1	Up	1,339071488	3,325189947	0,034455717
ITGB1	Up	1,463037296	3,731509286	0,018118624
ANKRD16	Up	1,114911634	2,517053377	0,040442175
ST3GAL2	Up	1,430376179	4,040725813	0,015369747
LRP3	Up	1,717187542	3,344571697	0,02225336
AXL	Up	1,903807949	3,282642745	0,012529806
LOC114117998	Up	1,222189135	2,153395035	0,041769561
DKKL1	Up	1,275805034	3,146157991	0,008154668
LOC101106542	Up	1,980815281	2,710425778	0,047682691
HBB	Up	5,131188225	6,581194875	0,002377278
SELENOP	Up	2,12429698	5,540785829	0,014206611
SFMBT1	Up	1,15460766	2,225313295	0,003095949

(Conclusão)

Gene	Expressão	Log2 (fold change)	Log CPM	Valor de P
MUSTN1	Up	2,126962201	3,802493561	0,013833788
LST1	Up	3,637219431	4,148812855	0,011591643
TMEM86A	Up	1,923029539	3,008068381	0,007618727
SPTBN2	Up	1,066306019	2,273971443	0,029289519
LIPA	Up	1,269165882	5,978223026	0,047218672
LOC101103461	Up	1,716063521	2,713961881	0,03120229
EPB41L3	Up	1,416659297	3,893886639	0,040957214
LOC114110673	Up	4,511795363	6,505660243	0,000474993
LOC101108797	Up	4,574819563	6,2645855	0,000477232
ITGAD	Up	3,203145625	4,33520951	0,03839325
ASL	Up	1,279037081	5,215682473	0,032916754
CCL26	Up	4,026520611	3,405819562	0,005530973
LOC101117299	Up	1,269098997	4,211024243	0,009655475
CXCL12	Up	1,272032824	5,693400795	0,041133012
MCPH1	Up	1,298653525	3,276648243	0,020841745
CFP	Up	2,260715343	4,732212004	0,012081399
MBNL3	Up	1,560365416	2,308969827	0,020594078