

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DO SELÊNIO E VITAMINA E SOBRE O HEMOGRAMA,
PROTEÍNOGRAMA E METABOLISMO OXIDATIVO DE CORDEIROS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELO *Haemonchus Contortus*.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paula Rocha Sampaio Juchem Nicolodi

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

**EFEITO DO SELÊNIO E VITAMINA E SOBRE O
HEMOGRAMA, PROTEÍNOGRAMA E METABOLISMO
OXIDATIVO DE CORDEIROS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE PELO *Haemonchus contortus***

Por

Paula Rocha Sampaio Juchem Nicolodi

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa Pós-graduação em
Medicina Veterinária, Área de concentração em Clínica Médica, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para
obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientadora: Marta Lizandra do Rêgo Leal

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Clínica Médica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a dissertação de Mestrado

**EFEITO DO SELÊNIO E VITAMINA E SOBRE O HEMOGRAMA,
PROTRINOGRAMA E METABOLISMO OXIDATIVO DE CORDEIROS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELO *Haemonchus contortus***

Elaborada por
Paula Rocha Sampaio Juchem Nicolodi

Como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Marta Lizandra do Rêgo Leal, Dr^a., UFSM
(Presidente/orientadora)

Luiz Antônio Sangioni, Dr., UFSM

Sônia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr^a., UFSM

Santa Maria, 18 de dezembro de 2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar nesta escolha profissional a qual sou inteiramente fascinada

Especialmente aos meus pais, João Alberto e Maria da Graça, pelo amor e pela dedicação, pelo exemplo que sempre foram pra mim e pelo empenho para que eu me tornasse uma profissional bem sucedida.

Ao meu marido, Anderson, o grande amor da minha vida, que me apoiou, me deu amor e um lar seguro, para que pudéssemos manter esse carinho mesmo de longe.

Ao meu bebê, que com 9 semanas em meu ventre, já me faz sentir um amor nunca sentido antes. Todo este esforço foi pelo teu futuro, meu amor.

Ao meu irmão que confia em mim como pessoa e como profissional e que me deu um dos melhores presentes do mundo: a Isadora

A professora Marta Lizandra do Rêgo Leal, pelos ensinamentos, pelo tempo em mim dedicado e principalmente pelo exemplo profissional e pessoal.

Aos estagiários e colegas da Clínica de Ruminantes, que sempre me ajudaram sem medir esforços. Tenho certeza que ganhei mais uma família neste período de convivência.

A CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

A Universidade Federal de Santa Maria por tornar realidade mais um sonho meu.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DO SELÊNIO E VITAMINA E SOBRE O HEMOGRAMA, PROTEÍNOGRAMA
E METABOLISMO OXIDATIVO DE CORDEIROS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE PELO *Haemonchus contortus*

AUTOR: PAULA R. S. JUCHEM NICOLODI
ORIENTADORA: MARTA LIZANDRA DO RÊGO LEAL
Santa Maria, 18 de dezembro de 2008

O presente estudo descreve a avaliação da influência da suplementação com selênio e vitamina E sobre o hemograma, perfil protéico e oxidativo de cordeiros infectados experimentalmente pelo *Haemonchus contortus* (HC). Trinta cordeiros, fêmeas, foram distribuídos em quatro grupos, sendo: G1 (n = 10): animais infectados; G2 (n = 10): infectados e suplementados; G3 (n = 5): controle; G4 (n = 5): não infectados e suplementados. Os grupos 1 e 2 receberam 500 larvas de HC (L3), via oral, por um período de 20 dias, com intervalo de dois dias entre as doses. A suplementação nos grupos 2 e 4 foi realizada no dia zero com 0,1mg kg⁻¹ de Selenito de sódio (1,67%) e com 2.000 UI de vitamina E por via intramuscular (IM). Somente a vitamina E foi reaplicada no dia 30. Além das coletas de sangue para a realização do hemograma, foram determinados números de ovos por grama de fezes (OPG). Em relação ao número de hemácias, volume globular, hemoglobina, leucócitos totais e linfócitos, as principais diferenças foram observadas quando os grupos parasitados foram comparados com o grupo somente suplementado, este, mantendo valores mais elevados. Conclui-se que não há influência da suplementação dos cordeiros com vitamina E e selênio sob os parâmetros de eritograma quando estes se encontram parasitados por HC. No leucograma pôde-se observar valores mais elevados de neutrófilos segmentados nos grupos suplementados. No entanto, a vitamina E e o selênio aumentaram parâmetros hematológicos em animais não infectados com HC. Em relação aos valores de proteínas totais, albumina, betaglobulina, gamaglobulina, as principais diferenças foram observadas quando os grupos parasitados foram comparados com o grupo somente suplementado, este, mantendo valores mais elevados. Conclui-se que não há influência da suplementação dos cordeiros com vitamina E e selênio sob os parâmetros protéicos quando estes se encontram parasitados por HC. Os

animais suplementados e não parasitados mantiveram melhores valores de Glutathionaperoxidase (GSH-Px) até o 60º dia de experimento. Não houve situação de estresse oxidativo visto que, quando aumentou os teores de TBARS houve um efeito compensatório gerado pelo aumento da GSH-Px.

Palavras-chave: ovinos, *haemonchus contortus*, hemograma, proteinograma, metabolismo oxidativo

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EFFECT OF SELENIUM AND VITAMIN E ON THE HEMOGRAM, PROTEINOGRAM
AND METABOLISM OXIDATIVE OF LAMBS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH
Haemonchus contortus

AUTHOR: PAULA R. S. JUCHEM NICOLODI
ADVISOR: MARTA LIZANDRA DO RÊGO LEAL
Santa Maria, December 18, 2008

The present study describes the evaluation of the effect of supplementation with selenium and vitamin E on the hemogram and protein and oxidative profiles of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* (HC). Thirty female lambs were divided into four groups as follows: G1 (n = 10): infected animals; G2 (n = 10): infected and supplemented; G3 (n = 5): control; G4 (n = 5): non-infected and supplemented. Groups 1 and 2 received 500 HC larvae (L3) orally for a period of 20 days, with 2-day intervals between doses. Supplementation in groups 2 and 4 was performed on day zero by injecting 0.1 mg kg⁻¹ of sodium selenite (1.67%) and 2,000 IU vitamin E through the intramuscular (IM) route. Vitamin E alone was injected once again on day 30. In addition to blood collections for performing the hemograms, the numbers of eggs per grams of feces (EPG) were also determined. Considering the number of erythrocytes, volume of globular proteins, hemoglobin level, total leukocytes and lymphocytes, the main differences were observed when the parasitized groups were compared to the supplemented, non-parasitized group, the latter exhibiting higher values. It is concluded that supplementation of lambs with vitamin E and selenium has no influence on their erythrogram when they are parasitized with HC. The leukogram showed higher segmented neutrophil numbers in the supplemented groups. On the other hand, vitamin E and selenium increased hematological parameters in animals not infected with HC. In considering the levels of total proteins, albumin, beta and gamma globulins, the main differences were observed when the parasitized groups were compared to the supplemented, non-infected group, the latter exhibiting higher values. It is concluded that supplementation of lambs with vitamin E and selenium has no influence on their blood protein levels when they are parasitized with HC. The non-parasitized, supplemented animals

sustained better glutathione peroxidase (GSH-Px) values up to the 60th day of the experiment. No oxidative stress state took place since an increase in GSH-Px levels exerted a compensatory effect when thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels rose.

Keywords: sheep, *Haemonchus contortus*, hemogram, proteinogram, metabolism oxidative

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO 1

TABELA 1 (Table 1) - Means and standard deviation of red blood cell parameters of lambs infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with vitamin E and selenium. Group 1: animals only infected with larvae of the parasite; group 2: animals infected with larvae and supplemented with sodium selenite (1.67%) and vitamin E; group 3: control; and group 4: animals supplemented with sodium selenite and vitamin E.....37

TABELA 2 (Table 2) - Means and standard deviation of total leukocytes and differential counts of lambs infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with vitamin E and selenium. Group 1: animals only infected with larvae of the parasite; group 2: animals infected with larvae and supplemented with sodium selenite (1.67%) and vitamin E; group 3: control; and group 4: animals supplemented with sodium selenite and vitamin E.....38

4. CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Valores médios e desvio padrão do proteinograma e perfil oxidativo de cordeiros infectados com *C* e suplementados com vitamina E e selênio. O Grupo 1: animais somente infectado com as larvas do parasita; grupo 2: animais infectados com as larvas e suplementados com Selenito de sódio (1,67%) e vitamina E; grupo 3: controle; grupo 4: animais suplementados com Selenito de sódio e vitamina E.....54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 - O <i>Haemonchus contortus</i>	12
2.2 Os radicais livres e o metabolismo oxidativo.....	16
2.3 Vitamina E e Selênio.....	20
3. CAPÍTULO 1. EFFECT OF SELENIUM AND VITAMIN E ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF LAMBS INFECTED EXPERIMENTALLY WITH <i>Haemonchus contortus</i>	24
Abstract.....	25
Introduction.....	25
Material and Methods.....	28
Results and Discussion.....	29
References.....	33
4. CAPÍTULO 2. PERFIL ELETROFORÉTICO E OXIDATIVO EM CORDEIROS EXPERIMENTALMENTE PARASITADOS PELO <i>Haemonchus contortus</i> E SUPLEMENTADOS COM VITAMINA E E SELÊNIO.....	39
Resumo.....	40
Abstract.....	40
Introdução.....	41
Material e métodos.....	45
Resultados e discussão.....	46
Referências.....	49
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

A criação de ovinos no Rio Grande do Sul possui grande importância econômica para o estado e vêm se consolidando no agronegócio brasileiro. A ovinocultura está em franca expansão em praticamente todo o país, expandindo-se para regiões onde não havia tradição na exploração econômica de ovinos, tornando-se mais uma alternativa para o produtor rural. Tais fatos apontam para um cenário em que a tendência da atividade é aumentar a sua importância e sua efetiva participação no produto interno bruto (PIB) do país.

Na década de 90, o rebanho nacional passou por um momento difícil, quando a região sul, que detinha 56,29% de todo o rebanho, criava os animais para a produção de lã. Com o surgimento das fibras sintéticas, houve uma crise no preço, forçando produtores a diminuir seus rebanhos e mudar o perfil da criação de ovinos para a produção para carne. Durante este período, o rebanho brasileiro diminuiu seu efetivo, voltando a se reerguer paulatinamente a partir de 2002.

Segundo dados FNP-IBGE (2005) o rebanho ovino no Brasil consta com mais de 160 milhões de cabeças. Destes, 25% encontra-se no estado do Rio Grande do Sul.

Assim, os ovinocultores gaúchos têm na criação de ovinos uma alternativa rentável, já que a demanda de carne ovina supera a oferta atualmente disponível.

A produção de ovinos possui fatores limitantes, sendo a infecção por parasitas gastrintestinais o que mais se destaca. Isso se dá devido à diminuição da produtividade pela queda na produção e qualidade da lã, redução no ganho de peso, bem como morte de animais no rebanho. Os cordeiros, com idade até 7 meses e fêmeas gestantes ou no parto, são mais susceptíveis à verminose, por ainda não apresentarem completa imunidade contra os parasitas. *O Haemonchus contortus* é a espécie que mais causa prejuízos a ovinocultura nacional, já que este possui hábito hematófago, cursando com anemia, causando debilidade ao animal.

Além do uso de anti-helmínticos para controle das verminoses, é necessário o uso de nutrientes que possam ajudar o animal a se tornar menos susceptível às ações nocivas do parasita. Nos últimos anos, estudos foram realizados com o intuito de investigar a influência de macro e micro nutrientes sobre a resposta imune de ovinos e caprinos. Os resultados demonstraram que a deficiência destes nutrientes afeta negativamente a habilidade dos animais para desenvolver uma resposta imune adequada frente às enfermidades. Dentre os nutrientes, destacam-se a vitamina E e o selênio como elementos importantes na proteção de tecidos de animais, da destruição oxidativa gerada pelos parasitas, sendo estes elementos antioxidantes necessários para ativar a resposta imune (NOCKELS, 1996).

A suplementação com vitamina E e selênio é importante para manter os mecanismos de defesa do organismo, incluindo a produção de anticorpos, proliferação celular, produção de citocinas, metabolismo das prostaglandinas e função dos neutrófilos, o que pode melhorar a resposta do animal frente a uma parasitose (LIGHTBODY et al., 2001; ROOKE et al., 2004).

Face à escassez de literatura nacional a cerca de respostas hematológicas, perfil eletroforético de proteínas e do estresse oxidativo gerado pelo HC quando este entra em contato com o hospedeiro, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da administração de Selênio e Vitamina E sobre o hemograma, proteinograma e metabolismo oxidativo de ovinos infectados experimentalmente pelo *Haemonchus contortus*. Nesta dissertação o experimento foi dividido em dois artigos e serão apresentados sob a forma de capítulos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - O *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus (*H. contortus*) são parasitos de abomaso, hematófagos e facilmente identificados durante necropsia devido sua localização e morfologia. As fêmeas apresentam de 18 a 30 mm e os machos, 10 a 20 mm (UENO e GONÇALVES, 1994).

O ciclo de vida do *H. contortus* envolve uma fase livre e uma parasitária. A fase livre, que ocorre nas pastagens, é caracterizada pelo desenvolvimento dos ovos embrionados, eliminados pelas fezes de seu hospedeiro para o meio ambiente, até larvas contaminantes (L3). A fase parasitária ocorre durante a evolução das larvas infectantes ingeridas pelos animais até se tornarem adultos e produzirem ovos (ORTOLANI, 1997; MACEDO, 2008).

Segundo BOWMAN et al., (2003), a patogenicidade da haemoncose é essencialmente consequência do hematofagismo realizado pelo parasito. Cada helminto adulto remove do hospedeiro cerca de 0,05 ml de sangue por dia, em decorrência da ingestão e extravasamento de sangue das lesões do abomaso.

O *H. contortus* é considerado o parasito de maior importância econômica para rebanhos ovinos de diversas regiões agro-climáticas, principalmente tropicais e subtropicais, já com história de resistência dos parasitas ao uso de antihelmínticos (VLASSOFF, 2001). Os casos de resistência ocorreram principalmente em regiões em que o *H. contortus* era endêmico, como, África do Sul (BATH et al., 2001), Argentina (EDDI et al., 1996), Uruguai (NARI et al., 1996), Paraguai (MACIEL et al., 1996) e Brasil (ECHEVARRIA et al., 1996). No Rio Grande do Sul o *H. contortus* destaca-se, pois é favorecido pelas condições climáticas das regiões quentes e úmidas favorecendo a sua alta patogenicidade (capacidade de promover

lesões no hospedeiro) e seu poder de contaminação das pastagens, podendo uma fêmea deste parasita produzir até 5.000 ovos por dia (CARVALHO et al., 2001).

Efeitos do *Haemonchus contortus* ao hospedeiro

O principal efeito patogênico do HC ao hospedeiro está relacionado ao hábito hematófago das larvas e adulto. A perda de sangue acarreta redução nas reservas de ferro e redução da eritropoiese associada à perda de proteína, sendo a anemia a principal característica da infecção (MACEDO, 2008).

Em relação ao grau de infecção, grau de anemia e sinais clínicos, a haemoncose pode ser classificada em três formas: hiperaguda, que ocorre em infecções maciças com cerca de 30.000 helmintos. Animais aparentemente sadios podem apresentar morte súbita por gastrite hemorrágica intensa. A haemoncose aguda caracteriza-se por anemia evidente, com diminuição progressiva no hematócrito. Ocorre aumento compensatório da eritropoiese na medula óssea, o que estabiliza o hematócrito em nível baixo. No entanto, a perda contínua de ferro e proteínas no organismo leva ao esgotamento férrico na medula óssea, podendo levar o animal a óbito. A terceira forma é denominada de haemoncose crônica e ocorre quando várias centenas de helmintos estão presentes no abomaso. A reduzida e persistente carga parasitária não é suficiente para provocar anemia acentuada no hospedeiro, mas a contínua espoliação pode intensificar os efeitos de uma dieta deficiente em nutrientes; conseqüentemente os animais apresentam perda de peso progressiva e fraqueza. De acordo com o quadro clínico pode haver o aparecimento de edema submandibular e ascite em decorrência da perda de macromoléculas. (NARI; CARDOZO, 1987; URQUHART et al., 1998; RADOSTITS, et al., 2002, BOWMAN et al., 2003).

Apesar de ter sido estudada por muitos autores, a resposta leucocitária observada em ruminantes com a haemoncose é bastante variada, pois, segundo ORTOLANI (1997), as

condições experimentais de estudo foram bastante heterogêneas, no concernente a idade dos animais, número de larvas infestantes administradas, regime de infestação etc. Mesmo assim, o contato do parasita com o hospedeiro pode promover alterações associadas ao leucograma que ocorrem pelo aumento dos leucócitos totais devido à neutrofilia com desvio à esquerda, ocasionado pelas freqüentes infecções secundárias que ocorrem concomitantemente nas helmintoses (JAIN, 1993). Leucócitos que têm como mecanismo básico de ação a fagocitose e posterior destruição dos agentes estranhos via mecanismos enzimáticos ou dependentes de oxigênio, os neutrófilos, são células envolvidas nas respostas imunes não específicas e são os primeiros a chegar ao local da lesão provocada pelo parasita (FELDMAN et al., 2000 SOUZA et al., 2006). ADAMS; BEH (1981) estudaram tanto a resposta leucocitária periférica como a medular de ovinos parasitados com HC e verificaram que hematofagia, a médio prazo, provocava uma intensa resposta medular para a reposição de leucócitos a ponto de comprometer a medula e levá-la a exaustão.

Entre vários agentes químicos produzidos pelo hospedeiro contra o HC, citam-se também a produção de radicais livres (KAZURA; MESNICK, 1984), o que caracteriza um estresse oxidativo provocado pelo parasita. Freqüentemente, a destruição de microorganismos mediada pelo oxigênio é referida como “explosão respiratória”, durante a qual grande quantidade desta molécula é convertida em superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (MEYER; HARVEY, 1998) os quais são compostos tóxicos aos agentes invasores.

O hospedeiro reage a presença dos parasitas, que são confrontados por uma variedade de fatores potencialmente destrutivos, por exemplo, anticorpos, componentes do complemento, citocinas, enzimas lisossomais, bem como células fagocíticas, mesmo quando perfeitamente adaptados (WAKELIN et al., 1984). Segundo GARCIA (2003), os mamíferos respondem à infecção por nematódeos gastrintestinais com uma reação de hipersensibilidade imediata clássica, caracterizada pela secreção de imunoglobulinas E, hiperplasia de

mastócitos na mucosa e marcada eosinofilia periférica e tissular. Os anticorpos IgE tem a capacidade de ligar-se a superfície dos helmintos, depois os eosinófilos são ativados para secretar grânulos enzimáticos que destroem o parasita (ABBAS et al., 2003). O conteúdo dos grânulos inclui o superóxido, o peróxido de hidrogênio e outros radicais livres gerados pela peroxidase e pelas enzimas líticas eosinofílicas, tais como a lisofosfolipase e a fosfolipase D (TIZARD, 1998; BALIC et al., 2000;) Esta reação é induzida pela liberação de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) produzidas pelos linfócitos T da sublinhagem CD4+ou CD8+ do tipo 2 durante a resposta imune específica (MACHADO et al, 2004).

Segundo BORBA (1996) helmintos abomasais causam danos a células parietais, produzindo elevação no pH, ocasionando alterações na digestão de proteínas, na disponibilidade de aminoácidos para absorção e conseqüente alteração do apetite. Não existem muitas evidências sobre a influência do parasitismo na absorção de alguns nutrientes, porém a elevação do pH abomasal resultou em menor absorção de cobre (SOBRINHO et al, 1996). Não se conhecem os efeitos diretos do parasitismo sobre a absorção de outros elementos, porém pode-se especular sobre efeitos indiretos, visto que a suscetibilidade de animais parasitados às doenças, pode ter como co-fator a limitada utilização de nutrientes, deixando o organismo vulnerável. Deficiência de cobalto reduz a sobrevivência de cordeiros e aumenta a susceptibilidade a infecções parasitárias duradouras, enquanto o selênio tem sido associado com a melhora da resposta mediada por anticorpos (SUTTLE; JONES, 1989).

Em relação ao uso da associação de vitamina E e selênio, vários estudos foram realizados relacionando estes elementos à diminuição da ação de radicais livres sobre problemas reprodutivos em ruminantes e mastite em cabras, no entanto, pouco se sabe a cerca da ação desses elementos administrados e animais portadores de Haemoncose.

2.2 Os radicais livres e o metabolismo oxidativo

Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência (PEREIRA, 1996). Radicais livres podem ser formados pela perda de um único elétron ou pelo ganho de um elétron de uma substância não radical e, uma vez formados, buscam estabilizar-se, cedendo ou captando um elétron de espécies vizinhas (VANNUCCHI et al., 1998; SCHANAIDER, 2000). A grande maioria dos radicais livres possui como característica uma meia-vida muito curta, indo de minutos a nanossegundos, sendo capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos celulares, como as membranas. No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (VANNUCCHI et al., 1998; BARREIROS et al., 2006).

A classificação dos radicais livres se dá pelo grupo funcional presente em sua molécula, porém os processos aeróbicos que envolvem o oxigênio são os mais comuns e seus produtos são denominados de espécies reativas do oxigênio (ROS) (CHIHUAILAF et al., 2002). O organismo sofre ação constante de ROS geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou provenientes dos alimentos. As principais ROS distribuem-se em dois grupos, os radicais: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2 \cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); e os não-radicais: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (BARREIROS et al, 2006). Algumas dessas moléculas, como o radical hidroxil, são extremamente reativas, enquanto outras são menos reativas. O radical superóxido gerado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron é um radical livre, pouco reativo, porque ele tem pouca habilidade para penetrar nas membranas celulares e, portanto fica aprisionado no compartimento onde foi produzido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações em sua estrutura e permeabilidade. Esta lipoperoxidação é desencadeada pela reação do radical hidroxil com biomoléculas, onde ocorre a separação de um átomo de hidrogênio. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (malonaldeído), culminando com a morte celular. (HERSHKO, 1989; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERGER; ARNER, 2001). Evidências experimentais apontam que as ROS podem estar envolvidas com o desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos, como envelhecimento, câncer, doenças inflamatórias e aterosclerose. Por outro lado, estes compostos também podem ter efeitos considerados positivos sobre o sistema imune e exercer funções metabólicas essenciais para a homeostasia celular (CRUZAT et al., 2007).

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ROS que causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (DRÖGE, 2002). O dano ao sistema antioxidante ou o aumento da produção das ROS é responsável por alterações na estrutura celular (TIANO et al., 2000); desse modo, um desequilíbrio no *status* oxidante/antioxidante das células conduz ao estresse oxidativo determinando uma cascata de eventos que leva a oxidação de lipídios e proteínas (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000). O desequilíbrio entre a produção de ROS e a remoção dos mesmos pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado de estresse oxidativo.

O estresse oxidativo tem sido classificado em três categorias: leve, sendo aquele no qual os tecidos estão sendo constantemente expostos; moderado, causado por um aumento do estresse oriundo de fontes externas podendo levar a danos no DNA, e o estresse intenso que resulta num dano permanente, como a morte da célula (FLOYD, 1997). Algumas situações geradoras de estresse oxidativo incluem: ativação de fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos) por microorganismos, alguns xenobióticos, radiação ionizante, e situações de isquemia (YU, 1994; PEREIRA, 1994). Além dos fagócitos produzirem grandes quantidades de ROS quando são ativados, outras células como os fibroblastos, linfócitos B e células endoteliais também liberam O_2^- e H_2O_2 (PEREIRA, 1996).

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG (forma oxidada da glutathiona-reduzida (GSH)) e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de oxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo (SHAN et al., 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH. Em pulmões de ratos submetidos à hiperóxia por 48 horas, esta razão foi significativamente maior, quando comparada a do grupo controle não exposto (BEEHLER; 1989). O excesso de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível às custas da ação de compostos antioxidantes, como a GSH (GILBERT; MC LEAN, 1990).

A oxidação do eritrócito tem sido estudada como modelo para avaliar o dano oxidativo sobre as biomembranas. Quando há ataque dos radicais livres sobre as membranas dos eritrócitos ocorre oxidação dos lipídios e proteínas causando hemólise (SIES, 1993). O

eritrócito é responsável pelo transporte do oxigênio via hemoglobina, isto faz com que esta célula esteja constantemente exposta a espécies reativas do oxigênio (radicais livres) (YAMAGUSHI et al., 1998).

Sistema antioxidante

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por mecanismos chamados de sistemas antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com HALLIWELL (2000), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSHPx, entre outros. Com exceção da vitamina E (alfa-tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (ROSS; MOLDEUS, 1991; HEBBEL, 1986).

A glutathiona, um antioxidante sintetizada principalmente no fígado, é um tripeptídeo (L-glutamil-L-cisteinil-glicina), que existe no organismo em duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (HÖER et al., 2000). A GSH-Px é assinalada como a principal enzima que exerce o papel antioxidante do organismo, inativando derivados ROS do metabolismo aeróbico, sendo responsável pela proteção da membrana das células que funcionam em presença de oxigênio (MILLER et al., 1993). A GSH-Px também participa na cadeia de reações que catalizam a formação de prostaglandinas,

leucotrienos, prostaciclina e tromboxanos a partir do ácido araquidônico (STADTMAN, 1990), e está relacionada também com o funcionamento do sistema imunológico (HURLEY; DOANE, 1989). A presença de selênio na estrutura dessa enzima permite que exista uma alta relação entre a concentração sanguínea e tissular de Se com a atividade da GSH-Px. A deficiência de Se induz a uma baixa atividade da GSH-Px, deixando a célula exposta à ação nociva das ROS, o que produz alterações na estrutura de lipídios, proteínas, polissacarídeos, DNA e outras macromoléculas celulares (MILLER et al., 1993).

A vitamina E é capaz de quelar formas reativas de oxigênio, diminuindo a formação de peróxidos, já que muitas dessas moléculas são auto-tóxicas, e podem destruir neutrófilos e macrófagos. Dessa forma essa vitamina protege a membrana lipídica, receptores e outros componentes celulares envolvidos na modulação da resposta imunológica (MEYDANI et al., 1997). O selênio e a vitamina E, dois elementos quimicamente diferentes, com propriedades antioxidantes individuais, têm o mesmo objetivo no sistema biológico (UNDERWOOD; SUTLLE, 1999). A função metabólica do selênio está intimamente ligada à vitamina E. Ambos protegem as membranas celulares da degeneração oxidativa. A vitamina E e a glutatona peroxidase atuam em locais diferentes. A primeira é parte integrante das membranas lipídicas e a segunda atua no citosol. (MCDOWELL, 1996). SMITH (1986) considera que a dieta suplementada com vitamina E e selênio é importante para manter os mecanismos de defesa do organismo, incluindo a produção de anticorpos, proliferação celular, produção de citocinas, metabolismo das prostaglandinas e função dos neutrófilos.

2.3 Vitamina E e Selênio

A influência da nutrição na resposta imune vem sendo intensamente estudada nos últimos anos, sendo a deficiência de alguns elementos essenciais responsáveis por uma

resposta negativa sobre o sistema de defesa do animal. Uns dos elementos estudados com relação a este aspecto são a vitamina E e o selênio, não só em relação a incidência de casos de mastite, e problemas reprodutivos, bem como no uso combinado destes nutrientes para aumentar efetivamente a resposta imunológica dos animais frente a situações que é necessário a ativação do sistema antioxidante (FINCH; TURNER, 1996; SPEARS, 2000; LOPES, 2001).

A vitamina E (Tocoferol) é uma vitamina lipossolúvel, encontrada em grandes quantidades nos óleos vegetais e sementes oleaginosas (OLIVEIRA et al., 2005). Esta vitamina foi primeiramente descoberta em 1922, quando se observou que anormalidades reprodutivas em ratos alimentados com uma dieta básica foram corrigidas por uma substância isolada de óleos vegetais. Em 1938 uma fração quimicamente pura foi isolada e identificada como tocoferol (VASCONCELOS, 2007). Esta vitamina é considerada o antioxidante mais importante na defesa contra a peroxidação lipídica que ocorre na membrana celular de mamíferos e recentemente tem sido reconhecida como um imunomodulador (NACHBAR; KORTING, 1995; ZHENG et al., 1999). HATFIELD et al. (2000) sugeriram que a vitamina E teria seu efeito primário no sistema imune antagonizando a peroxidação do ácido aracdônico e limitando a produção de prostaglandinas. Segundo ETCHICHURY (2004) a vitamina E, além de estimular os mecanismos imunológicos do organismo, aumenta a resistência às infecções virais e bacterianas.

O selênio foi primeiramente classificado como nutriente essencial em 1957, quando SCHWARS e FOLTS associaram a sua deficiência como causadora de necrose hepática em ratos. Em 1973, descobriu-se que a glutathiona peroxidase (GSH-px) era uma seleno-enzima e foi considerada a principal forma de selênio ativo nos tecidos, tendo o poder de reduzir oxidantes, diminuindo a propagação de radicais livres e espécies de oxigênio reativo. Além disso, foi observado que este elemento reduziu hidroperóxidos intermediários da ciclo-oxigenase e lipooxigenase diminuindo a produção de leucotrienos e prostaglandinas

inflamatórias (PARNHAM; GRAF, 1987; BULGER ; MAIER, 2001). Sendo assim, o selênio possui efeito antiinflamatório, e parte disto se dá pela habilidade deste elemento em remover espécies reativas de oxigênio (ROOKE, 2004).

O selênio está envolvido em várias funções fisiológicas, possui efeito antioxidante e atua como modulador do sistema imune, incluindo nas barreiras contra infecções e o efeito sobre a ação dos macrófagos, sendo este mineral essencial para a eficiência e efetiva operação de vários aspectos da defesa imunológica tanto em animais quanto em humanos. Em casos de deficiência de selênio há uma diminuição na proliferação de linfócitos, diminuindo também os títulos de imunoglobulinas (HALLIWELL et al., 2000; ARTHUR et al., 2003).

O selênio e a vitamina E atuam em sinergismo, visto que protegem as membranas celulares contra a degeneração oxidativa. Enquanto a vitamina E age como um antioxidante lipossolúvel nas membranas, a glutathione peroxidase destrói os peróxidos antes que eles possam causar danos oxidativos (MCDOWELL, 1999). Estudos em animais domésticos demonstraram que o uso concomitante da vitamina E e do selênio resultou em uma melhora da resposta imune quando comparados a suplementação de apenas um dos elementos (FINCH; TURNER, 1996; MILAD et al., 2001; LIESEGANG et al., 2008).

Estes compostos exercem um efeito significativo na resposta imunológica, tanto na proliferação de células de defesa em casos de resistência bacteriana, quanto em relação a migração de fagócitos para o foco de inflamação ou infecção (FINCH; TURNER, 1996; SPEARS, 2000). Em estudo realizado em suínos, com deficiência em selênio e vitamina E observou-se alterações na função de células envolvidas na resposta imune, e conseqüentemente, diminuição na resistência desses animais frente à enfermidades. (LESSARD et al., 1991).

Geralmente, a deficiência de selênio e vitamina E possui um efeito sobre a magnitude do valor total ou específico de imunoglobulinas, que se encontram localizadas na fração

gamaglobulinas, nos animais domésticos. GENTRY et al. (1992) relatou que cordeiros nascidos de ovelhas suplementadas, via intramuscular, com vitamina E, possuíram maiores titulações de imunoglobulina G, quando comparados a cordeiros nascidos de fêmeas não suplementadas.

Através do proteinograma pode-se dividir as proteínas séricas do organismo em albumina e globulinas. A albumina é necessária, pois é responsável por grande parte do transporte de nutrientes, inclusive do selênio após ser metabolizado pelo fígado, e pela manutenção da pressão oncótica do sangue. As globulinas são fracionadas em alfa, beta e gamaglobulinas, sendo esta última associada ao sistema imune por incluir os diferentes tipos de anticorpos (WITTEWER, 1998; LEAL et al., 2003).

3. CAPÍTULO 1

Effect of Selenium and Vitamin E on hematological parameters of lambs infected experimentally with *Haemonchus contortus*

Paula R. S. J. Nicolodi^{1*}, Adelina Aires², Clarissa Strieder², João Fabio Soares², Vanessa Menezes², Silvia Gonzáles Monteiro³, Sonia T. A. Lopes⁴, Enrico Lippi Ortolani⁵, Marta Lizandra do Rêgo Leal⁶

(Artigo enviado para o periódico *Experimental Parasitology*, ainda em processo de análise)

¹Mestranda em Medicina Veterinária (UFSM) * Autor para correspondência: Email: paulanicolodi@hotmail.com

²Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, UFSM.

³Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM.

⁴Departamento de Clínica de Pequenos animais, UFSM.

⁵Departamento de Clínica Medica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP.

⁶Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the effect of supplementation with selenium and vitamin E on hematological parameters of lambs infected experimentally with *Haemonchus contortus* (HC). Thirty female lambs were distributed into the following four groups: G1: infected animals; G2: infected and supplemented animals; G3: control; and G4: non-infected and supplemented animals. Groups 1 and 2 received 5.000 larvae of HC (L3) orally, by animal. Supplementation in groups 2 and 4 was performed on day zero with 0.1 mg kg⁻¹ of sodium selenite (1.67%) and with 2000 IU of vitamin E, intramuscularly (im). Blood was collected for a hemogram, and parasite load was determined by counting the number of eggs per gram of feces (EPG). In relation to the number of erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, total leukocytes and lymphocytes, the principal differences were observed when the parasitized groups were compared with the group supplemented only, where the latter maintained the highest levels. It was concluded that the supplementation of lambs parasitized by HC had no influence on red blood cell parameters. With regard to the leukocyte parameters, there was a higher number of segmented neutrophils in the supplemented groups. However, vitamin E and selenium increased the hematological parameters in animals not infected with HC.

Key words: Sheep, *haemonchus contortus*, vitamin E, selenium, hematological parameter

INTRODUCTION

Worm infections represent the greatest and most serious health problem concerning sheep farming, where it can make sheep raising economically unviable (Buzzulini et al, 2007). The harmful effect of the parasites not only felt in slowed development, but also in the

production and quality of the meat and wool and can be considered the principal cause of reduced productivity, morbidity and mortality in the herd (Urquart et al., 1998). According to Fernandes et al. (2004), *Haemonchus contortus* (HC) is predominant in various regions of Brazil, where it is considered the main parasite of sheep. Weaning constitutes the age category where lambs are most afflicted by worm infections, a time at which lambs are most predisposed because of a low immune response (Echevarria et al., 1989). HC penetrates the surface of the abomasal mucosa to feed on the blood of the host (Jasmer et al., 2007). The systemic effects observed, due to infection by this nematode, are decreased levels of erythrocyte parameters and of total plasma proteins, particularly albumin (Blackburn et al., 1992).

The alterations associated with the leukocyte parameters can occur with an increase in total leukocytes due to neutrophilia with left shift, caused by the response of the immune system to the parasitic infection and also by the frequent secondary infections that occur concomitantly in helminthiasis (Jain, 1993). After contact of the parasite with the abomasal mucosa, there is a non-specific immune response by the neutrophils, where these are the first leukocytes to arrive at the site of the lesion. The basic mechanism of action of these leukocytes is phagocytosis and later destruction of the foreign particles by enzymes or oxygen-dependent mechanisms (Feldman et al., 2000). The innate immune defense related to parasitism is not the exclusive role of neutrophils. Eosinophils, another polymorphonuclear leukocyte, also performs an important parasiticide function, notably through the production of enzymes that poison and kill the helminths (Jain, 1993).

Various chemical agents are produced by the host against parasites, and these also include free radicals (Kazura & Mesnick, 1984). Free radicals can produce deleterious effects on the animal tissues if there is a deficiency of antioxidants. Vitamin E and selenium are very

important in the protection of animal tissues from oxidative destruction, where these antioxidants are necessary to activate the immune response (Nockels, 1996).

Selenium and vitamin E are chemically different, with individual antioxidant properties, but they have the same effect on biological systems (Underwood & Suttle, 1999). Both protect cell membranes from oxidative degeneration. The metabolic function of vitamin E is intimately linked to that of selenium. Vitamin E and glutathione peroxidase (an enzyme that contains selenium) act at different sites. The former is an integral part of the lipid membranes and the latter acts in the cytosol (Mcdowell, 1996). Smith (1986) believes that the diet supplemented with vitamin E and selenium is important for maintaining defense mechanisms of organisms, including the production of antibodies, cell proliferation, production of cytokines, metabolism of prostaglandins and function of neutrophils.

Studies have demonstrated that these compounds exert a significant effect on the immune response of these animals, both in the proliferation of lymphocytes in cases of bacterial resistance, and in relation to the migration of phagocytes to the focus of inflammation or infection (Lessard et al, 1991; Finch & Tuner, 1996; Spears, 2000).

This work was based on the hypothesis that the inflammatory process that occurs in parasitized animals can produce oxidative stress which can cause tissue damage and lesions, and that supplementation with vitamin E and selenium can stimulate the immune system of these animals besides maintaining red blood cells which are less susceptible to the action of free radicals. Therefore, the aim of the present work was to evaluate the erythrocyte and leukocyte profiles of lambs experimentally parasitized with *Haemonchus contortus* and supplemented with vitamin E and selenium (im).

MATERIAL and METHODS

Thirty female lambs, aged 4-5 months, were used. The animals were distributed into four experimental groups. Group 1 (n = 10): animals infected with larvae of HC; group 2 (n = 10): animals infected with larvae of HC and supplemented with 0.1 mg kg⁻¹ of sodium selenite¹ (1.67%), and 2000 IU of vitamin E² (DL- α -tocopherol acetate) given im; group 3 (n = 5): control; group 4 (n = 5): animals non-infected and supplemented with vitamin E and selenium. The doses of vitamin E and selenium were selected according to Paes et al. (2003) and Zanetti et al. (1998), respectively.

The animals remained allocated in common stalls (1 stall per group) which were located in the veterinary hospital of UFSM, for acclimation to feed and to the experimental environment. Each animal received water and comun salt ad libitum and was fed with 1.0 kg of ryegrass hay (crude protein (CP) = 8%) and 150 g of ration (CP= 21%) per day, totaling a diet with 9.6% of CP. During this period the lambs were wormed with a combination of anti-helminthics (levamisol³ + Closalben⁴ (closantel + albendazole).

Each animal of groups 1 and 2 received 500 larvae (L3) of HC orally, for a period of 20 days, with an interval of two days between doses, beginning contamination on day zero. The larvae were obtained by the technique of coproculture described by Robert & O'Sullivan (1950). Supplementation in groups 2 and 4 with selenium was carried out on day zero and vitamin E was given on days zero and 30 of the experiment.

Blood samples were collected from the jugular vein using Vacutainer® tubes, after shaving and anti-septic cleaning of the area. The specimens were obtained on days zero (T0), 20 (T1), 30 (T2), 45 (T3), 60 (T4) and 80 (T5), to carry out the hemogram. The hematological

¹ - Laboratório Merck S.A. São Paulo, Brasil.

² - Monovin E® - Laboratório Bravet Ltda. Rio de Janeiro, Brasil.

³ - Levamisol F® - Laboratório Vetbrands Saúde Animal. São Paulo, Brasil

⁴ - Closalben® - Laboratório Vetbrands Saúde Animal. São Paulo, Brasil

parameters were determined by the macrodilution technique, followed by counting the cells in a Neubauer chamber, as recommended by JAIN (1986). Hemoglobin was measured in spectrophotometer utilizing a commercial kit (Labtest[®]).

Nematode infestation of the gastrointestinal tract was determined by counting the number of eggs per gram of feces (EPG) carried out on days zero, 30 and 80. The animals were weighed for follow-up on their development and weight gain, on days zero, 30, 60 and 80. EPG was determined individually by the technique of Gordon and Whitlock (1939).

Statistical analysis was performed with the help of the program *SAS System for Windows* (Statistical Analysis System, 1995). The data were tested for normality of the residues and homogeneity of the variances. In case the data did not conform to these processes, they were transformed. The data obtained for variables that showed a normal distribution, were submitted to analysis of variance (ANOVA) and *Tukey's Studentized Range test (HSD)* for comparison between pairs of means. The data for EPG and eosinophils did not show a gaussian distribution and were therefore submitted to Log10 transformation ($\text{LOG}_{10}(\text{EPG}+1.5)$). Means were used to describe the results. The level significance utilized to reject H_0 (nul hypothesis) * $P < 0.05$.

RESULTS and DISCUSSION

The results obtained in the evaluation of the hemogram of lambs infected with HC and supplemented with vitamin E and selenium are shown in Tables 1 and 2, respectively.

For the erythrocyte parameters of the animals in the present study, there was an significant increase in the number of erythrocytes in group 4, when compared to groups 1 and 3 at T2 ($p < 0.04$) and to groups 1 and 3 at T5 ($p < 0.006$). This increase in erythrocyte count is possibly related to supplementation with vitamin E and selenium, without the influence of

parasitic stress in group 4. The antioxidant agents studied are responsible for the protection of cell membranes against oxidizing substances, which possibly made the red blood cell membrane more stable in the animals of group 4, allowing the maintenance of higher levels during the entire experiment.

HT behaved in a similar manner. Higher values were observed in group 4 in relation to group 2 at T2 ($p < 0.05$) and T3 ($p < 0.01$), and at T4 ($p < 0.0003$) and T5 ($p < 0.0002$) when compared to groups 1, 2 and 3. This difference among values can be attributed to the hematophagous habit of the parasite, resulting in the loss of blood due to hemorrhage. Taking into consideration the groups parasitized and the control (1, 2 and 3), it was noted that there was no influence of time or supplementation with selenium and vitamin E on HT level, a finding which is in line with the results obtained by Souza et al. (2006) who determined the hematological indices of naturally parasitized goats with different EPG levels.

Greater values of hemoglobin (Hb) concentration were observed in groups 3 and 4 at T4 ($p < 0.0001$), but at T5 ($p < 0.0001$) groups 1, 2 and 3 differed statistically from group 4. These results connected the two groups parasitized by HC reflecting a decrease in these levels, although they were within the physiological range for the species in study (JAIN, 1986). The same results were obtained by Louvandini et al. (2002) who determined hemoglobin levels in beefs raised on a diet low in protein and contaminated with *Haemonchus placei*. The loss of blood caused by the parasite and the low protein levels of the diet provided for the lambs were challenging factors for the erythropoiesis of these animals, which could explain the decrease in the red blood cell indices in the groups parasitized.

In relation to the leukocytes, there was a significant decrease in total numbers in group 1 at T4 ($p < 0.017$) when compared to the other groups. This finding is related to the decline in the segmented neutrophil count, at this time. At T5 ($p < 0.008$) groups 1 and 2 differed with respect to group 4. Contrarily, Feldman et al. (2000) reported an increase in total leukocytes

in animals parasitized by gastrointestinal nematodes as a result of secondary bacterial infections. In this study, no change was seen in total leukocytes count, as well as that of neutrophils, lymphocytes and monocytes. The counts obtained were consistently within the physiological range for the species in study, which were not characteristic of an infection.

Lopes (2001) studied the effect of supplementation with vitamin E in goats with mastitis induced experimentally by *Staphylococcus aureus* and showed that this compound increased the efficiency of the inflammatory response against the infection, which could have occurred in group 4. According to Oliveira-Sequeira et al. (2000) and Souza et al. (2006), parasitized animals demonstrate a local inflammatory response, mainly by phagocytic cells, which could or not lead to an increased number of these cells in the blood circulation. Since group 4 was not infected by HC, that is, without parasitic challenge, higher leukocyte counts could have been maintained through stimulation by vitamin E supplementation.

With regard to lymphocytes, group 1 at T2 ($p < 0.02$) showed lower values than those of the other groups, mainly when compared to groups 2 and 4. At T4 ($p < 0.03$) and T5 ($p < 0.02$), group 4 obtained higher values when compared to group 1. These results are in agreement with those found by Lopes et al. (2000) who detected an increase in lymphocyte count in a group of goats with mastitis and vitamin E supplementation compared to control. These authors attributed this increase in lymphocytes to the effect of vitamin E on cellular response. According to Finch & Tuner (1996), vitamin E and selenium act on the immune system, improving the response of lymphocytes and phagocytes to an inflammatory/infectious picture. There was tendency for higher lymphocyte numbers at T4 ($p < 0.058$) in the supplemented groups when compared to the other groups, suggesting that selenium and vitamin E could have induced an increased lymphocytic cell response in the lambs infected by HC.

The number of segmented neutrophils in groups 2, 3 and 4 differed from that of group 1 at T4 ($p < 0.0001$), where at this time the group infected and supplemented differed from the group only infected, demonstrating the effect of supplementation with vitamin E and selenium on the number of these leukocytes in the blood. The ability of phagocytes to migrate to the site of infection or inflammation can be affected by the status of selenium and vitamin E in the animal (Finch & Tuner, 1996). Neutrophils and macrophages destroy bacteria, generating free radicals through a respiratory explosion. This is a defense system of organisms, but cells should be capable of removing these free radicals to avoid their persistence which could result in cellular damage in the host. Glutathione peroxidase together with vitamin E is involved in the metabolism of these free radicals, and therefore, selenium and vitamin E act to improve the ability of these cells of the immune system to destroy pathogens (Rooke et al., 2004).

There were no differences observed in eosinophils in contrast to the results obtained by Souza et al. (2006) and Feldman et al. (2000) who showed an increase in circulating eosinophils in animals with different EPG counts, when evaluating the response of these cells to parasitic disease.

Groups 1, 2, 3 and 4 had mean EPG levels of 6186, 6450, 770 and 686, respectively, where the values increased at each successive sampling time. The two contaminated groups (1 and 2) differed from the other two groups not contaminated (3 and 4) at all times analyzed. The results obtained for EPG were expected, since the animals were submitted to experimental contamination.

ACKNOWLEDGMENTS

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - "National Counsel of Technological and Scientific Development"

REFERENCES

Blackburn, H.D; Rocha J.L.; Figueiredo E.P.; Berne M.E.; Vieira L.S.; Cavalcante A.R.; Rosa J.S, 1992. Interactions of parasitism and nutrition in goats effects on haematological parameters, correlations and other statistical associations. *Veterinary Parasitology* ;44:183-197.

Buzzulini, C; Sobrinho A.G.S.; Costa A.J.; Santos T. R.; Borges F.A.; Soares V.E., 2007. Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação albendazole, levamisole e ivermectina à moxidectina em ovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*; 42: 891-895.

Echevarria, F.A.M.; Pinheiro, A.C; Corrêa, M.B.C., 1989. Controle estratégico da verminose ovina no Rio Grande do Sul. In: *Curso de Parasitologia Animal*, 2, 1988, Bagé : CBPV, p. 159-163

Feldman, B.F. et al. 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*, 5.ed., Philadelphia: Williams & Wilkins.

Fernandes, L. H.; Seno M.C.Z.; Amarante A.F.T.; Souza H.; Belluzzo C.E.C., 2004. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*; 6: 733-740.

Finch, J. M; Turner, R. J. 1996. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Research in Veterinary Science*; 60: 97-106.

Gordon, H. McL., Whitlock, H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal Counc Scince Ind Australian*; 12: 50-52.

- Jain, N.C. 1986. Schalm's Veterinary Hematology. 5.Ed. Philadelphia: Lea & Febiger
- Jain, N.C. 1993. Essentials Of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Jasmer, D, P. Lahmers K.K.; Brown W.C., 2007. *Haemonchus contortus* intestine: a prominent source of mucosal antigens. Parasite Immunology; 29: 139–151.
- Kazura, J.W; Mesnick, S.R.,1984. Scavenger enzymes and resistance to oxygen mediated damage in *Trichinella spiralis*. Molecular Biochemical Parasitology;10: 1 – 10.
- Lessard, M.; Yang, W.C.; Elliott G.S, Rebar A.H.; Van Vleet V.F.; Deslauriers,N.; Brisson, G.J.; Schultz R.D.,. 1991. Cellular immune responses in pigs fed a vitamin E- and selenium-deficient diet. Journal Animal Science; 69: 1575-1582.
- Lopes, S.T.A.; Paes, P.R.O.; Kohayagawa, A.; Lopes, R.S.; Bulla, C.; Langrafe, L.; Langoni, H.; Cassatari, M.L.; Takahira, R.K.; Maltoso, C.S.B., 2000. Leucograma de cabras suplementadas com vitamina E na mastite experimentalmente induzida por *Staphylococcus aureus*. In: Congresso Brasileiro de Veterinária, Águas de Lindóia - SP. Anais ...: XXVII Congresso Brasileiro de Veterinária, V Congresso Paulista de Veterinária, IV Conferencia Anual da SPMV. v. 1.
- Lopes, S.T.A. 2001. Perfil leucocitário e atividade funcional neutrofílica, medula óssea, fibrinogênio e proteínas plasmáticas totais em cabras com mastite induzidas experimentalmente por *Staphylococcus aureus* e suplementadas com vitamina E (acetato DL-á-tocoferol). São Paulo. 195p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- Louvandini, H.; Abdalla A.L.; Coop R.L.; Mc Manus C.M.; Gennari S.M., 2002. Effect of dietary protein intake on calf resilience to *Haemonchus placei* infection. Brazilian Journal Veterinary Research, Animal Science; 39: 23-29.

- Mcdowell L. R.; Williams S. S.; Hidiroglou N.; Njeru C. A.; Hill G. M.; Ochoa L.; Wilkinson N. S., 1996. Vitamin E supplementation for the ruminant. *Animal Feed Science Technology*; 60: 273-296.
- Nockels, C. F. 1996. Antioxidants improve cattle immunity following stress. *Animal Feed Science Technology*; 62: 59-68.
- Oliveira-Sequeira, T. C. G.; Amarante, A .F .T.; Sequeira, J.L., 2000. Características parasitológicas e resposta tissular do abomaso em cordeiros infectados por *Haemonchus* spp. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*; 52:48-53.
- Paes, P.R.O.;Lopes S.T.A; Lopes R.S; Kohayagawa, A.; Takahira R.K.; Langoni H., 2003.Efeitos da administração de vitamina E na infecção mamária e na contagem de células somáticas de cabras primíparas desafiadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*; 55: 1-4.
- Roberts, F.H.S.; O'sullivan, J.P. 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Agriculture Research* 1950; 1: 99-102.
- Rooke, J, A.; Robinson J.; Arthur J.R., 2004. Effects of vitamin E and selenium on the performance and immune status of ewes and lambs. *Journal of Agricultural Science*; 142: 253–262.
- Smith, K.L. 1986. Vitamin E-enhancement of immune response and effects on mastitis in dairy cows. *Animal Nutr. Proceedings Roche Symposium*,
- Souza, C.; Lopes, S.T.S.; Batina, P.N.; 2006. Estresse parasitário em cabras saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos.. *Veterinária notícias*; 12: 26 29.
- Spears, J.W. 2000. Micronutrients And Immune Function In Cattle. *Proceedings Of The Nutrition Society* ; 59: 587–594.

Statistical Analysis System. 1985. Sas/Stat User' Guide. Cary.

Underwood, E. J.; Suttle, N.F. 1999. The Mineral Nutrition Of Livestock. 3rd Ed. Cabi Publ. Wallingford.

Urquhart, G.M.; Armour, J.; Duncan, J.L.; Dunn, A.M.; Jennings, F.W. 1998. Parasitologia Veterinária. Rio De Janeiro: Guanabara-Koogan.

Zanetti, M.A.; Paschoal J.J.; Cunha J.A., 1998. Efeito da Suplementação De Selênio E Vitamina E Em Bovinos Leiteiros. Revista Brasileira De Zootecnia; 27: 405-408.

Table 1. Means and standard deviation of red blood cell parameters of lambs infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with vitamin E and selenium. Group 1: animals only infected with larvae of the parasite; group 2: animals infected with larvae and supplemented with sodium selenite (1.67%) and vitamin E; group 3: control; and group 4: animals supplemented with sodium selenite and vitamin E.

GROUP	TIME	RBCs x 10 ⁶ /mm ³	HT %	HB g/dl	MCV fl	MCHC %
Group 1	T0	8,1 ± 0,50 ^a	37,1 ± 3,03 ^a	10,3 ± 0,65 ^a	45,8 ± 3,20 ^a	28,5 ± 2,27 ^a
	T1	7,6 ± 0,67 ^a	32,8 ± 3,29 ^a	11,6 ± 1,15 ^a	42,7 ± 3,70 ^{ab}	35,2 ± 3,26 ^a
	T2	7,3 ± 0,74 ^b	29,0 ± 2,70 ^{ab}	10,0 ± 0,77 ^a	39,2 ± 2,96 ^a	34,4 ± 1,26 ^a
	T3	7,1 ± 0,90 ^a	27,4 ± 2,54 ^{ab}	9,4 ± 0,76 ^a	38,5 ± 4,00 ^a	34,3 ± 1,51 ^a
	T4	6,7 ± 1,10 ^a	27,3 ± 2,05 ^b	9,6 ± 0,74 ^b	41,3 ± 6,02 ^a	35,2 ± 3,39 ^a
	T5	6,2 ± 0,89 ^b	27,3 ± 2,05 ^b	9,2 ± 0,73 ^b	44,4 ± 5,26 ^a	33,7 ± 1,07 ^a
Group 2	T0	7,7 ± 0,76 ^a	36,3 ± 2,66 ^a	11,0 ± 1,27 ^a	47,1 ± 2,31 ^a	28,6 ± 1,14 ^a
	T1	7,8 ± 0,54 ^a	31,5 ± 1,58 ^a	12,0 ± 1,78 ^a	40,3 ± 2,30 ^b	36,0 ± 4,73 ^a
	T2	7,5 ± 0,62 ^{ab}	27,1 ± 1,37 ^b	10,0 ± 0,73 ^a	35,9 ± 2,24 ^a	35,6 ± 3,42 ^a
	T3	6,8 ± 0,82 ^a	25,8 ± 1,75 ^b	9,3 ± 1,16 ^a	40,5 ± 7,59 ^a	35,3 ± 2,57 ^a
	T4	6,5 ± 0,89 ^a	25,4 ± 1,34 ^b	9,1 ± 0,61 ^b	39,1 ± 4,50 ^a	35,5 ± 1,89 ^a
	T5	6,2 ± 0,66 ^b	25,4 ± 2,17 ^b	9,0 ± 0,66 ^b	40,8 ± 3,00 ^a	35,1 ± 1,38 ^a
Group 3	T0	8,0 ± 2,37 ^a	37,0 ± 2,57 ^a	10,0 ± 0,93 ^a	48,3 ± 8,96 ^a	28,0 ± 1,23 ^a
	T1	7,4 ± 0,66 ^a	32,6 ± 3,84 ^a	11,9 ± 1,73 ^a	43,7 ± 3,39 ^{ab}	36,1 ± 2,74 ^a
	T2	7,4 ± 1,51 ^b	28,6 ± 6,02 ^{ab}	9,9 ± 1,83 ^a	38,5 ± 3,50 ^a	34,6 ± 3,28 ^a
	T3	7,3 ± 1,21 ^a	28,2 ± 4,54 ^{ab}	9,8 ± 1,52 ^a	38,3 ± 1,95 ^a	34,4 ± 2,30 ^a
	T4	7,5 ± 1,57 ^a	28,4 ± 3,78 ^b	11,0 ± 1,12 ^a	38,2 ± 5,12 ^a	36,0 ± 5,00 ^a
	T5	6,8 ± 1,10 ^{ab}	28,2 ± 3,11 ^b	9,8 ± 1,15 ^b	41,4 ± 5,49 ^a	35,0 ± 2,02 ^a
Group 4	T0	8,0 ± 0,95 ^a	37,6 ± 3,78 ^a	10,6 ± 1,06 ^a	47,0 ± 3,22 ^a	28,5 ± 1,51 ^a
	T1	7,7 ± 0,76 ^a	35,4 ± 3,50 ^a	12,4 ± 1,37 ^a	45,9 ± 2,94 ^a	34,6 ± 2,07 ^a
	T2	8,7 ± 0,76 ^a	31,8 ± 0,83 ^a	11,3 ± 0,96 ^a	36,4 ± 2,56 ^a	35,1 ± 2,45 ^a
	T3	8,1 ± 1,05 ^a	31,2 ± 2,28 ^a	10,7 ± 0,76 ^a	38,5 ± 3,16 ^a	34,0 ± 1,22 ^a
	T4	7,8 ± 1,13 ^a	32,0 ± 2,91 ^a	11,1 ± 0,92 ^a	40,8 ± 3,01 ^a	35,0 ± 3,88 ^a
	T5	7,8 ± 0,90 ^a	32,4 ± 2,50 ^a	11,6 ± 0,63 ^a	41,2 ± 2,97 ^a	35,8 ± 3,17 ^a

The times refer to days blood drawn: day zero (T0), day 20 (T1), day 30 (T2), day 45 (T3), day 60 (T4) and day 80 (T5),

Letters that are not the same denote a statistical difference between the values, and should be analyzed comparing the same times between different groups.

HT – hematocrit; HB – hemoglobin; MCV – mean corpuscular volume; MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 2. Means and standard deviation of total leukocytes and differential counts of lambs infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with vitamin E and selenium. Group 1: animals only infected with larvae of the parasite; group 2: animals infected with larvae and supplemented with sodium selenite (1.67%) and vitamin E; group 3: control; and group 4: animals supplemented with sodium selenite and vitamin E.

GROUP	TIME	WBCs /mm ³	SEG. NEUTR. /mm ³	LYMPHOCYTES /mm ³	MONOCYTES /mm ³	EOSINOPHILS /mm ³
Group 1	T0	8,5 ± 1,36 ^a	3,8 ± 1,28 ^a	4,5 ± 1,17 ^a	255 ± 182 ^a	98 ± 134 ^a
	T1	7,4 ± 0,91 ^a	2,8 ± 0,67 ^a	4,1 ± 1,29 ^b	201 ± 121 ^a	58 ± 84 ^a
	T2	7,4 ± 1,18 ^a	2,5 ± 0,59 ^a	4,5 ± 1,37 ^a	220 ± 137 ^a	91 ± 84 ^a
	T3	7,1 ± 1,00 ^a	2,4 ± 0,33 ^a	4,4 ± 0,68 ^a	208 ± 131 ^a	58 ± 60 ^a
	T4	6,4 ± 1,44 ^c	1,5 ± 0,25 ^c	4,6 ± 1,26 ^b	117 ± 146 ^a	72 ± 83 ^a
	T5	6,9 ± 2,01 ^b	2,1 ± 0,68 ^a	4,5 ± 1,64 ^b	96 ± 93 ^a	121 ± 134 ^a
Group 2	T0	9,6 ± 1,56 ^a	3,6 ± 0,81 ^a	5,5 ± 1,39 ^a	340 ± 193 ^a	87 ± 86 ^a
	T1	9,2 ± 1,48 ^a	3,1 ± 1,08 ^a	5,6 ± 1,20 ^{ab}	317 ± 185 ^a	40 ± 53 ^a
	T2	8,6 ± 2,10 ^a	2,8 ± 0,81 ^a	5,4 ± 1,64 ^a	297 ± 192 ^a	42 ± 73 ^a
	T3	7,4 ± 1,62 ^a	2,3 ± 0,65 ^a	4,9 ± 1,11 ^a	227 ± 153 ^a	39 ± 57 ^a
	T4	8,4 ± 1,85 ^{ab}	2,3 ± 0,71 ^{ab}	5,9 ± 1,69 ^{ab}	163 ± 121 ^a	47 ± 77 ^a
	T5	7,7 ± 1,18 ^b	2,0 ± 0,51 ^a	5,6 ± 1,46 ^{ab}	101 ± 69 ^a	54 ± 94 ^a
Group 3	M0	8,6 ± 1,35 ^a	3,2 ± 0,66 ^a	4,9 ± 1,57 ^a	321 ± 197 ^a	164 ± 72 ^a
	T1	7,7 ± 1,05 ^a	2,5 ± 0,96 ^a	5,0 ± 0,74 ^{ab}	198 ± 205 ^a	17 ± 39 ^a
	T2	8,4 ± 0,98 ^a	2,9 ± 0,71 ^a	5,1 ± 0,90 ^a	324 ± 91 ^a	18 ± 42 ^a
	T3	9,1 ± 2,08 ^a	3,1 ± 0,80 ^a	5,8 ± 1,60 ^a	121 ± 139 ^a	35 ± 79 ^a
	T4	8,1 ± 1,33 ^{ab}	2,3 ± 0,58 ^{ab}	5,4 ± 1,21 ^{ab}	109 ± 126 ^a	47 ± 44 ^a
	T5	8,8 ± 1,32 ^{ab}	2,4 ± 0,77 ^a	6,1 ± 1,67 ^{ab}	203 ± 164 ^a	39 ± 54 ^a
Group 4	T0	9,3 ± 2,09 ^a	2,8 ± 0,63 ^a	6,1 ± 1,15 ^a	154 ± 140 ^a	84 ± 60 ^a
	T1	8,5 ± 1,43 ^a	2,3 ± 0,70 ^a	5,9 ± 0,83 ^a	269 ± 224 ^a	0 ± 0 ^a
	T2	9,5 ± 2,24 ^a	2,6 ± 0,88 ^a	6,5 ± 1,52 ^a	279 ± 244 ^a	71 ± 73 ^a
	T3	8,6 ± 1,86 ^a	2,6 ± 0,80 ^a	5,7 ± 1,08 ^a	271 ± 105 ^a	48 ± 70 ^a
	T4	10,4 ± 2,07 ^a	3,1 ± 0,93 ^a	7,0 ± 1,62 ^a	146 ± 62 ^a	35 ± 48 ^a
	T5	10,6 ± 2,78 ^a	2,6 ± 1,03 ^a	7,6 ± 2,32 ^a	186 ± 118 ^a	85 ± 86 ^a

The times refer to days blood drawn: day zero (T0), day 20 (T1), day 30 (T2), day 45 (T3), day 60 (T4) and day 80 (T5)

Letters that are not the same denote a statistical difference between the values, and should be analyzed comparing the same times between different groups.

4. CAPÍTULO 2

Proteinograma e metabolismo oxidativo de cordeiros experimentalmente parasitados pelo *Haemonchus contortus* e suplementados com vitamina E e selênio

Proteinogram and metabolism oxidative of lambs experimentally parasitized with *Haemonchus contortus* and supplemented with vitamin E and selenium.

Paula R. S. J. Nicolodi¹, Emmanuel Camargo¹, Diego Zeni¹, Ricardo Rocha², Fernanda Cavallini Cyrillo³, Alice M. Melville Della Libera⁴, Carlos Bondan⁵, Marta Lizandra do Rêgo Leal⁶

Artigo à ser enviado para tradução e posterior submissão ao periódico Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.

¹Mestrando em Medicina Veterinária (UFSM) * Autor para correspondência: Email: paulanicolodi@hotmail.com

²Doutorando em Medicina Veterinária, UFSM

³Doutoranda em Medicina Veterinária. Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP

⁴Professora de Medicina Veterinária. Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP

⁵Departamento de Reprodução Animal, UPF

⁶Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da suplementação com selênio e vitamina E sobre o perfil protéico e oxidativo de cordeiros infectados experimentalmente pelo *Haemonchus contortus* (*H. contortus*). Trinta cordeiros, fêmeas, foram distribuídos em quatro grupos, sendo: G1 (n = 10): animais infectados; G2 (n = 10): infectados e suplementados; G3 (n = 5): controle; G4 (n = 5): não infectados e suplementados. Os grupos 1 e 2 receberam 500 larvas de *H. contortus* (L3), via oral, por um período de 20 dias, com intervalo de dois dias entre as doses. A suplementação nos grupos 2 e 4 foi realizada no dia zero com 0,1 mg kg⁻¹ de Selenito de sódio (1,67%) e com 2.000 UI de vitamina E por via intramuscular (IM). Somente a vitamina E foi reaplicada no dia 30. Em relação aos valores de proteínas totais, albumina, betaglobulina, gamaglobulina, as principais diferenças foram observadas quando os grupos parasitados foram comparados com o grupo somente suplementado, este, mantendo valores mais elevados. Conclui-se que não houve influência da suplementação dos cordeiros com vitamina E e selênio sob os parâmetros protéicos quando estes se encontram parasitados por *H. contortus*. Os animais suplementados e não parasitados mantiveram melhores valores de Glutationa-peroxidase (GSH-Px) até o 60º dia de experimento. Não houve situação de estresse oxidativo visto que, quando aumentou os teores de TBARS houve um efeito compensatório gerado pelo aumento da GSH-Px.

Palavras-chave: ovinos, *haemonchus contortus*, proteinograma, metabolismo oxidativo

ABSTRACT

The objective of the present study was to describe the influence of supplementation with selenium and vitamin E on the protein and oxidative profiles of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* (*H. contortus*). Thirty female lambs were divided into

four groups as follows: G1 (n = 10): infected animals; G2 (n =10): infected and supplemented; G3 (n = 5): control; G4 (n = 5): non-infected and supplemented. Groups 1 and 2 received 500 HC larvae (L3) orally for a period of 20 days, with 2-day intervals between doses. Supplementation in groups 2 and 4 was performed on day zero by injecting 0.1 mg kg^{-1} of sodium selenite solution (1.67%) and 2,000 IU vitamin E through the intramuscular (IM) route. Vitamin E alone was injected once again on day 30. In considering the levels of total proteins, albumin, beta and gamma globulins, the main differences were observed when the parasitized groups were compared to the supplemented, non-infected group, the latter exhibiting higher values. It is concluded that supplementation of the lambs with vitamin E and selenium had no influence on their blood protein parameters when they were parasitized with *H. contortus*. The non-parasitized, supplemented animals sustained better glutathione peroxidase (GSH-Px) values up to the 60th day of the experiment. No oxidative stress state took place since an increase in GSH-Px levels exerted a compensatory effect when thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels rose.

Keywords: Sheep, *Haemonchus contortus*, proteinogram, metabolism oxidative

INTRODUÇÃO

No Brasil a ovinocultura tem se mostrado como atividade promissora para médios e pequenos produtores por permitir a criação de animais em menores extensões de terra e possibilitar incremento da renda dos mesmos. Atualmente os parasitas gastrintestinais são um grande obstáculo à ovinocultura fazendo com que o resultado produtivo muitas vezes não corresponda ao potencial da espécie (Gazda, 2006). Segundo Baker (1996) o principal parasita gastrintestinal dos ovinos é o *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) sendo responsável por prejuízos econômicos na ovinocultura de diversos países de clima tropical e

temperado. Os cordeiros desmamados constituem a categoria etária mais acometida pela verminose, sendo mais predispostos pois apresentam baixa resposta imunitária (Echevarria et al., 1989)

Grande parte da patogenicidade deste parasita é proveniente de sua hematofagia. Esta perda de sangue implica também na perda de outros elementos figurados sanguíneos, macro e microelementos, vitaminas, hormônios etc. Assim, animais com intensa parasitose, principalmente jovens, podem apresentar diminuição dos valores hematológicos e perdas protéicas que caracterizam uma hipoproteinemia com hipogamaglobulinemia (Sahai, 1966; Harness et al., 1970; Adams, 1993).

Entre vários agentes químicos produzidos pelo hospedeiro contra os parasitas, citam-se também a produção de radicais livres (Kazura; Mesnick, 1984). Radicais livres são qualquer espécie química de existência independente que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Esta configuração eletroquímica muito instável confere a estas estruturas alta reatividade e vida curta. Uma vez formados os radicais livres interagem com outras moléculas através de reações de oxiredução com o propósito de estabilizar sua configuração eletrônica. A classificação dos radicais livres se dá pelo grupo funcional presente em sua molécula, porém os processos aeróbicos que envolvem o oxigênio são os mais comuns e seus produtos são denominados de espécies reativas do oxigênio (ROS) (Chihuailaf et al., 2002). Uma vez formados, os radicais livres buscam estabilizar-se, cedendo ou captando um elétron de espécies vizinhas (Schanaider, 2000). Estas, por sua vez, viram radicais livres e se estabilizam, tomando ou cedendo elétrons de outras substâncias. Cria-se uma reação em cadeia que termina por alterar a conformação, a estrutura ou as funções de proteínas, fosfolípidios de membrana, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (Riegel, 2002). Esta deteriorização oxidativa dos lipídios polinsaturados é chamada de lipoperoxidação (Nordberger ; Arner, 2001).

As espécies reativas do oxigênio (ROS) incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, entre elas: o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (Hershko, 1989).

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agente óxido-redutores (como as ROS) e o sistema de defesa antioxidante. Para proteger-se, a célula possui um sistema detoxificador do agente antes que ele cause lesão, constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. ou reparador onde há a ação do ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSH-Rd) e GSHPx, entre outros. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (Ross; Moldeus, 1991; Alonso et al., 1997).

A presença de selênio na estrutura da GSH-Px permite que exista uma alta relação entre a concentração sanguínea e tissular de Se com a atividade desta enzima. A deficiência de Se induz a uma baixa atividade da GSH-Px, deixando a células exposta a ação nociva das ROS, o que produz alterações na estrutura de lipídios, proteínas, polissacarídeos, DNA e outras macromoléculas celulares (Artur et al., 2003).

A vitamina E é capaz de quelar formas reativas de oxigênio, diminuindo a formação de peróxidos, já que muitas dessas moléculas são auto-toxicas, e podem destruir neutrófilos e macrófagos. Dessa forma essa vitamina protege a membrana lipídica, receptores e outros componentes celulares envolvidos na modulação da resposta imunológica (Meydani, 1995).

O desequilíbrio entre a produção de ROS e a remoção pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição celular

ou fisiológica de elevada concentração de ROS que causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (Dröge, 2002).

O selênio e a vitamina E, dois elementos quimicamente diferentes, com propriedades antioxidantes individuais, tem o mesmo objetivo no sistema biológico (Underwood ; Suttle, 1999). A função metabólica do selênio esta intimamente ligada à vitamina E. Ambos protegem as membranas celulares da degeneração oxidativa. A vitamina E e a glutathione peroxidase atuam em locais diferentes. A primeira é parte integrante das membranas lipídicas e a segunda atua no citosol (Mcdowell, 1996). Smith (1986) considera que a dieta suplementada com vitamina E e Selênio é importante para manter os mecanismos de defesa do organismo, incluindo a produção de anticorpos, proliferação celular, produção de citocinas, metabolismo das prostaglandinas e função dos neutrófilos. O selênio está envolvido em várias funções fisiológicas, além do efeito antioxidante, atua como modulador do sistema imune, incluindo as barreiras contra infecções e o efeito sobre a ação dos macrófagos, sendo este mineral essencial para a eficiência e efetiva operação de vários aspectos da defesa imunológica tanto em animais quanto em humanos. Em casos de deficiência de selênio há uma diminuição na proliferação de linfócitos, diminuindo também os títulos de imunoglobulinas (Halliwell et al., 2000; Arthur et al., 2003). Estudos demonstraram que o uso concomitante da vitamina E e do selênio resultou em uma melhora da resposta imune quando comparados a suplementação de apenas um dos elementos (Finch ; Turner, 1996; Milad et al., 2001; Liesegang et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com vitamina E e selênio sobre o proteinograma e metabolismo oxidativo de cordeiros parasitados experimentalmente pelo *H. contortus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 cordeiros, fêmeas, cruza texel com idade entre 4 e 5 meses. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais. Grupo 1 (n = 10): animais infectados com larvas de *H. contortus*; Grupo 2 (n = 10): animais infectados com as larvas de HC e suplementados com 0,1mg kg⁻¹ de Selenito de sódio¹ (1,67%), e 2.000 UI de vitamina E² (acetato DL- α -tocoferol) por via IM; Grupo 3 (n = 5): controle; Grupo 4 (n = 5): animais não infectados e suplementados com vitamina E e selênio. As doses da vitamina E e do selênio foram referenciadas segundo Paes et al. (2003) e Zanetti et al. (1998) respectivamente.

Os animais permaneceram alocados em baias coletivas (1 baia para cada grupo) localizadas no hospital veterinário da UFSM, para adaptação ao alimento e ao ambiente experimental. Cada animal recebeu água e sal mineral à vontade e foi alimentado com 1.0 kg de feno de azevém (Proteína bruta (PB) = 8%) e 150 gramas de ração (PB = 21%) por dia, totalizando uma dieta com 9.6% de PB. Durante este período as cordeiras foram desverminadas com a associação de anti-helmínticos (levamisol³ + Closalben⁴ (closantel + albendazole).

Cada animal dos grupos 1 e 2 recebeu 500 larvas (L3) de HC por via oral, pelo um período de 20 dias, com intervalo de dois dias entre as doses, iniciando a contaminação no dia zero. As larvas foram obtidas através da técnica de coprocultura descrita por Roberts; O'Sullivan (1950). A suplementação nos grupos 2 e 4 com selênio foi realizada no dia zero e a vitamina E foi aplicada no dia zero e 30 do experimento.

Foram realizadas coletas de amostras sanguíneas por punção da jugular, após tricotomia e anti-sepsia, pelo sistema vacutainer®. As amostras de sangue foram obtidas nos dias zero (T0), 20 (T1), 30 (T2), 45 (T3), 60 (T4) e 80 (T5). Após coleta, as amostras foram

¹ - Laboratório Merck S.A. São Paulo, Brasil.

² - Monovin E® - Laboratório Bravet Ltda. Rio de Janeiro, Brasil.

³ - Levamisol F® - Laboratório Vetbrands Saúde Animal. São Paulo, Brasil

⁴ - Closalben® - Laboratório Vetbrands Saúde Animal. São Paulo, Brasil

centrifugadas, processadas, e armazenadas a -20 °C para posterior análise. A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com o método de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Ohkawa et al. (1979). O método de determinação da GSH-Px baseou-se na redução do ditionitrobenzeno conforme descrito por Ellman (1959). O perfil eletroforético das proteínas totais e de suas frações (albumina, alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas) foi realizado de acordo com as técnicas descritas por Friedman (1961) e Kramers et al. (1967) utilizando-se fitas de acetato de celulose (Cellologel). A análise estatística foi efetuada com o auxílio de um programa computadorizado SAS System for Windows (Statistical Analysis System, 1995). Por apresentarem distribuição normal os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o teste de Duncan para comparação entre pares de médias e desvio-padrão. O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação do proteinograma e perfil oxidativo de cordeiros infectados experimentalmente pelo *H. contortus* e suplementados com vitamina E e selênio estão apresentados na tabelas 1.

Em relação aos valores de proteínas totais dos animais do presente estudo, observou-se diferença entre os grupos 1 e 2 no T1 ($p < 0.03$), e grupo 4 quando comparado aos grupos 3, 2 e 1 no tempo 4 ($p < 0.04$). No tempo 5 ($p < 0.0001$) o grupo 4 se diferencia significativamente dos demais, inclusive do controle. Sendo este o grupo suplementado com vitamina E e selênio, pode-se atribuir o uso destes nutrientes a um melhor desempenho protéico destes animais.

A porção albumina se comportou de forma semelhante a proteína total. Os grupos 2 e 3 diferiram dos grupos 4 e 1 no T2 ($p < 0.008$). Segundo Blackburn et al., (1992), alguns dos efeitos sistêmicos observados, pela infecção pelo HC são as diminuições dos componentes do eritrograma e da concentração de proteínas plasmáticas totais, notadamente a albumina sérica. No tempo 4 ($p < 0.01$) o grupo 4 se diferenciou do 1, 2 e 3, com maiores valores fração albumina acompanhando os valores de proteína total.

A porção betaglobulinas aumentou numericamente ao longo do tempo nos grupos tratados, ao contrário do que ocorreu nos grupos não suplementados, onde seus valores permaneceram praticamente iguais, porém não houve diferença estatística. Estes resultados podem estar associados ao fato de o selênio e a vitamina E são elementos metabolizados pelo fígado, e que o aumento das betaglobulinas ocorre associado ao metabolismo hepático (Rooke et al., 2004; Gierus, 2007; Paula e Silva et al., 2008). No T3 ($p < 0,04$) o grupo 4 se diferenciou estatisticamente dos grupos parasitados. No T4 ($p < 0,04$), o grupo 4 se diferenciou do grupo 1, e no T5 ($p < 0,03$) o grupo 4 apresentou valores mais elevados de betaglobulinas quando comparados aos demais grupos, demonstrando que animais tratados com vitamina E e selênio e não desfiados pela parasitose são capazes de apresentar quantidades maiores desta fração no soro.

Os valores médios obtidos para a concentração de gamaglobulinas diferiram estatisticamente somente no T4 ($p < 0,01$) quando o grupo 4 foi comparado aos grupos 1 e 2. Notou-se neste momento que o grupo suplementado e não parasitado exibiu novamente valores mais elevados. Segundo Arthur (2003) animais que possuem deficiência em selênio tem seu sistema humoral afetado, diminuindo os títulos de gamaglobulinas. Spears (2000) afirmou que a resposta de anticorpos é mais significativa quando a vitamina E e o selênio são suplementados concomitantemente, como feito no presente experimento, sugerindo que possivelmente a dose usada nos cordeiros parasitados não foi suficiente pra provocar aumento

de gamaglobulinas. Este aumento dos valores desta fração do grupo 4 no T4 pode estar relacionado ao pico de ação do selênio que, segundo Ramirez-Bribiesca et al (2005), pode ocorrer em até 60 dias.

Avaliando o perfil oxidativo dos animais do experimento pôde-se observar que os valores de TBARS e GSH-Px curiosamente se comportaram de forma semelhante. Mesmo não apresentando diferença estatística, os valores de TBARS aumentaram numericamente no T2 nos grupos parasitados. Kazura; Mesnick (1984) afirmaram que uma das reações produzidas pelo hospedeiro contra os parasitas, é a produção de radicais livres, o que foi comprovado pelo aumento da peroxidação lipídica nestes grupos. No T4 ($p < 0,01$) o grupo 4 demonstrou valores mais elevados de TBARS e GSH-Px do que os grupos parasitados. A GSH-Px aumenta na circulação sanguínea em decorrência da maior disponibilidade de selênio sanguíneo, haja vista, que é uma enzima dependente deste mineral.(Alonso et al., 1997; ROOKE, 2004;). Katamoto et al. (1998) observaram uma tendência de maior atividade da GSH-Px com a suplementação injetável de vitamina E e selênio, nas doses de: $2,72 \text{ UI kg}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente, em cabras sob estresse térmico, porém sem significância estatística, no entanto, Tauler et al. (2002) avaliaram a suplementação via oral de vitamina E na dose de 500 mg/dia , e outros agentes antioxidantes (vitamina C e beta- caroteno) na dieta de atletas verificando um aumento de 47% da atividade da GSH-Px no grupo tratado. Estes trabalhos demonstraram que a ação da GSH-Px também esta relacionada com a dose dos elementos estudados.

Os valores encontrados na análise do TBARS demonstram uma diferença estatística no T4 ($p < 0,01$) entre os grupo somente suplementados quando comparado aos dois grupos parasitados. Os valores de TBARS aumentam em situação de estresse oxidativo, onde há maior peroxidação lipídica (Vannucchi et al., 1998), porém, Paschoal et al. (2007), quando avaliaram o efeito do selênio sobre a estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas não

observaram diferença nos valores de TBARS entre o grupo tratado e o não tratado. No presente estudo pôde-se observar um possível efeito compensatório entre os valores de GSH-PX e TBARS, já que se comportam da mesma maneira, sugerindo que as doses de vitamina E e selênio usadas possam ter induzido um aumento da peroxidação lipídica no T4.

APROVADO PELO COMITÊ DE BIOÉTICA DA UFSM - 23081.013120/2008-85

AGRADECIMENTOS

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - "National Counsel of Technological and Scientific Development"

REFERÊNCIAS

- Adams, D.B. Systemic responses to challenges infection with *Haemonchus contortus* in immune merino sheep. **Veterinary Research Commuinations**, v. 17, p.23 – 35, 1993
- Alonso, M.L.; Miranda, M.; Henandez, J.; Castilho, C. Benedito, J. L. Glutatió peroxidasa (GSH-PX) em las patologias asociadas a deficiências de selênio em ruminantes. **Archive medicin veterinary**. Vol.29, n.2. Valdivia, 1997.
- Arthur, J.R.; Mckenzie, R.C.; Beckett, G.J. Selenium in the immune system. American. The journal of Nutrition, v.133, p 1457-1459, 2003.
- Baker, R. L. Characterization and utilization of sheep and goat breeds that are resistant to helminths. In: LE JAMBRE, L. F.; KNOX, M. R. Sustainable parasite control in small ruminants. **Bogor: ACIAR**, p. 172-177. (Proceedings, n. 74) 1996.
- Blackburn, H.D.; Rocha, J.L.; Figueiredo, E.P. Interations of parasitism and nutrition in goats affects on haematological parameters, correlations and other statistical associations. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.44, n.3-4, p.183-197, 1992.

- Chihuauaf, R.H., Contreras, P.A.; Wittwer, F.G. Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. **Vet. Méx.** v.33, n.3, p.265-283. 2002
- Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, v.82, p.47-95, 2002
- Echevarria, F.A.M. et al. Controle estratégico da verminose ovina no Rio Grande do Sul. In: **Curso de Parasitologia Animal**, 2. Bagé, RS: Anais...: CBPV, p.159-163, 1989
- Ellman, G.L. Tissue sulphhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 82, p. 70-77, 1959.
- Finch, J. M; Turner, R. J. 1996. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. **Research in Veterinary Science**; 60: 97-106
- Friedman, H. S. A standardized procedure for serum protein eletrophoresis on celulose acetate membrane strips. **Clinica Chimica Acta**, v. 6, p. 775-781, 1961.
- Gazda,t. L. Distribuição de larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos em pastagens tropicais e temperadas. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006
- Gierus, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural**, v. 37, n.4, p. 1212-1220, 2007.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metals íons in human disease: na overview. **Methods Enzymol**; 186: 1-85. 1999
- Harness, E.; Fitzsimmons, W.M.; Sellwood, S.A. Experimental *Haemonchus placei* infections in calves. Blood picture at three levels of infection. **Journal Comparative Phatology**, v.80, p. 173- 179, 1970
- Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol** 1989; 26: 277-85.

Katamoto H .; Fukuda, H.; Oshima, I.; Ishikawa, N.; Kanai, Y. Nitroblue tetrazolium reduction of neutrophils in heat stressed goats is not influenced by selenium and vitamin E injection. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 60, n. 11, p.1243-1249, 1998.

Kazura, J.W; Mesnick, S.R. Scavenger enzymes and resistance to oxygen mediated damage in *Trichinella spiralis*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v10, p. 1 – 10, 1984

Kremers, B.; Briere, R.; Batsakis, J. G. Reflectance densitometry of cellulose acetate protein electrophoresis. **American Journal of Medical Technology**, v. 33, n. 1, p. 28-34, 1967.

Liesegang, A.; Staub. T.; Wichert, B.; Wanner, M.; Kreuzer. M. Effect of vitamin E supplementation of sheep and goats fed diets supplemented with polyunsaturated fatty acids and low in Se. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92 (2008) 292–302

Mcdowell, L.R. et al. Vitamin E supplementation for the ruminant. **Animal Feed Science Technology**. V.60, p. 273 – 296,1996.

Meydani M. Vitamin E. *Lancet*. 345:170–175. 1995

Milad, K.; Racz, O.; Sipulova, A.; Bajova, V.; Kovac, G. Effect of vitamin E and selenium on blood glutathione peroxidase activity and some immunological parameters in sheep. **Veterinary medicine**, v.46, n.1, p 1-5, 2001.

Nordberger, J., Arner, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

Ohkawa, H. et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid

PAES, P.R.O. et al . Efeitos da administração de vitamina E na infecção mamária e na contagem de células somáticas de cabras primíparas desafiadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. , Belo Horizonte, v. 55, n. 1, 2003.

Paschoal, J. J.; Zanetti, M. A.; Del Claro, G.R.; Melo, M. P.; Pugine, S. P.; Cunha J. A. Perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas alimentadas com soja extrusada e selênio orgânico. **Pesq. agropec. bras.**, v.42, n.12, p.1793-1799, 2007.

Paula e Silva, R. O., Lopes, A.F., Faria, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**. v. 18, n. 2, p. 116-122, 2008.

Ramirez-Bribiesca, J. E.; Tórtora, J. L.; Huerta, M.; Hernández, L. M.; López, R.; Crosby, M. M. Effect of selenium-vitamin E injection in selenium-deficient dairy goats and kids on Mexican plateau. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária**, v.57, n.1, p. 77-84, 2005.

reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

Riegel, R.E. Radicais livres. In _____. **Bioquímica**. 3ª ed. São Leopoldo: Unisinos, p. 507-536, 2002

Roberts, F.H.S.; O'sullivan, J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Research**, Victoria, v.1, p.99-102, 1950.

Rooke, J, A. et al. Effects of vitamin E and selenium on the performance and immune status of ewes and lambs. **Journal of Agricultural Science** , v.142, p. 253–262, 2004.

Ross, D.; Moldeus, P. Antioxidant defense systems and oxidativestress. In Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 1991;151-70.

Sahai, B.N. Studies on blood picture in stomachworm (Haemonchus contortus and Haemonchus bispinosus mixed infection) infection in sheep and goats. **Indian Veterinary Journal**, v. 43, p.422-426, 1966

Schanaider, A. Radicais livres: vilões ainda em estudo. In: _____. **Ciência Hoje**, v. 27, n. 158, p.60-62, 2000

Smith, K.L. Vitamin E-enhancement of immune response and effects on mastitis in dairy cows. In: **Proceedings Roche Symposium**, London, 1986.

Spears, J.W. Micronutrients and immune function in cattle. Proceedings of the **Nutrition Society**, n. 59, p.587–594, 2000

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS/STAT User' Guide. Cary, 1985.

Tauler, P. Aguiló, A. Fuentespina, E. Tur, J. Pons, A. Diet supplementation with vitamin E, vitamin C and β -carotene cocktail enhances basal neutrophil antioxidant enzymes in athletes. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology** V. 443, N. 5-6, p. 791-797, 2002.

Underwood, E.J.; Suttle, N.F. The Mineral Nutrition of Livestock. 3rd ed. CABI Publ. Wallingford., 614 p. 1999

Vannucchi, H.; Moreira E., Cunha, D., Junqueira-Franco, M.; Bernardes, M., . Jordão-Jr, A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. In: Simpósio: **NUTRIÇÃO CLÍNICA**. v.31, p. 31-44, 1998.

ZANETTI, M.A. et al. Efeito da suplementação de Selênio e Vitamina E em bovinos leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.405-408, 1998.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão do proteinograma e perfil oxidativo de cordeiros infectados com *Haemonchus contortus* e suplementados com vitamina E e selênio. O Grupo 1: animais somente infectado com as larvas do parasita; grupo 2: animais infectados com as larvas e suplementados com Selenito de sódio (1,67%) e vitamina E; grupo 3: controle; grupo 4: animais suplementados com Selenito de sódio e vitamina E.

G	T	PT	Alb	Alfa	Beta	Gama	TBARS	GSH-Px
		g/dl	g/dl	g/dl	g/dl	g/dl	mda/g hb	mmol SH/L
G1	T0	6,4 ± 0,33 ^a	3,6 ± 0,27 ^a	0,35 ± 0,01 ^a	1,03 ± 0,11 ^a	1,4 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,37 ^a	8,8 ± 3,8 ^a
	T1	5,8 ± 0,46 ^a	2,9 ± 0,1 ^a	0,38 ± 0,09 ^a	1,04 ± 0,16 ^a	1,6 ± 0,15 ^a	2,9 ± 0,38 ^a	9,6 ± 4,0 ^a
	T2	5,3 ± 0,61 ^b	2,5 ± 0,3 ^b	0,43 ± 0,01 ^a	1,02 ± 0,19 ^a	1,3 ± 0,29 ^a	2,5 ± 1,09 ^a	8,3 ± 5,3 ^a
	T3	5,5 ± 1,40 ^a	3,0 ± 0,2 ^a	0,36 ± 0,05 ^a	0,99 ± 0,05 ^b	1,3 ± 0,24 ^a	2,6 ± 0,89 ^a	8,4 ± 9,2 ^a
	T4	5,5 ± 1,0 ^b	3,0 ± 0,4 ^b	0,35 ± 0,06 ^a	0,96 ± 0,11 ^b	1,2 ± 0,3 ^b	2,3 ± 0,6 ^b	7,6 ± 1,0 ^b
	T5	5,5 ± 0,4 ^c	2,6 ± 0,7 ^a	0,68 ± 0,03 ^a	0,92 ± 0,03 ^c	1,2 ± 0,5 ^a	2,3 ± 0,92 ^a	7,5 ± 3,2 ^a
G2	T0	6,5 ± 0,33 ^a	3,7 ± 0,27 ^a	0,37 ± 0,01 ^a	0,99 ± 0,14 ^a	1,4 ± 0,1 ^a	2,8 ± 0,37 ^a	9,0 ± 3,8 ^a
	T1	6,1 ± 0,46 ^a	2,8 ± 0,1 ^a	0,39 ± 0,09 ^a	1,13 ± 0,16 ^a	1,6 ± 0,15 ^a	3,1 ± 0,38 ^a	10,1 ± 4,0 ^a
	T2	6,6 ± 0,62 ^a	3,3 ± 0,3 ^a	0,41 ± 0,01 ^a	1,22 ± 0,19 ^a	1,7 ± 0,28 ^a	3,3 ± 1,09 ^a	10,7 ± 5,3 ^a
	T3	5,7 ± 1,42 ^a	3,0 ± 0,2 ^a	0,37 ± 0,05 ^a	0,95 ± 0,05 ^b	1,4 ± 0,24 ^a	2,8 ± 0,89 ^a	9,0 ± 9,2 ^a
	T4	5,9 ± 1,0 ^b	3,0 ± 0,4 ^b	0,40 ± 0,06 ^a	1,06 ± 0,11 ^{ab}	1,3 ± 0,6 ^b	2,6 ± 0,6 ^b	8,4 ± 1,0 ^b
	T5	5,9 ± 0,4 ^c	2,2 ± 0,7 ^a	0,77 ± 0,03 ^a	1,06 ± 0,08 ^b	1,8 ± 0,5 ^a	3,4 ± 0,91 ^a	11,1 ± 3,2 ^a
G3	T0	6,2 ± 0,33 ^a	3,3 ± 0,27 ^a	0,35 ± 0,01 ^a	1,09 ± 0,11 ^a	1,4 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,37 ^a	8,8 ± 3,8 ^a
	T1	5,8 ± 0,46 ^a	2,9 ± 0,1 ^a	0,43 ± 0,09 ^a	0,99 ± 0,16 ^a	1,5 ± 0,15 ^a	2,9 ± 0,38 ^a	9,4 ± 4,0 ^a
	T2	6,2 ± 0,61 ^{ab}	3,2 ± 0,3 ^a	0,44 ± 0,01 ^a	1,10 ± 0,19 ^a	1,5 ± 0,29 ^a	2,8 ± 1,09 ^a	9,2 ± 5,3 ^a
	T3	6,5 ± 1,41 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	0,43 ± 0,06 ^a	1,2 ± 0,05 ^a	1,6 ± 0,24 ^a	3,1 ± 0,89 ^a	10,0 ± 9,2 ^a
	T4	6,2 ± 1,0 ^b	3,2 ± 0,4 ^b	0,35 ± 0,06 ^a	1,07 ± 0,11 ^{ab}	1,5 ± 0,7 ^{ab}	3,0 ± 0,6 ^{ab}	9,7 ± 1,0 ^{ab}
	T5	6,6 ± 0,19 ^b	2,5 ± 0,7 ^a	0,77 ± 0,07 ^a	1,13 ± 0,15 ^{ab}	2,0 ± 0,5 ^a	4,0 ± 0,83 ^a	12,9 ± 3,2 ^a
G4	T0	6,0 ± 0,33 ^a	3,3 ± 0,27 ^a	0,34 ± 0,01 ^a	1,21 ± 0,17 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	2,2 ± 0,37 ^a	7,2 ± 3,8 ^a
	T1	6,4 ± 0,46 ^a	2,9 ± 0,1 ^a	0,46 ± 0,09 ^a	1,06 ± 0,16 ^a	1,8 ± 0,15 ^a	3,5 ± 0,38 ^a	11,3 ± 4,0 ^a
	T2	5,9 ± 0,61 ^{ab}	2,5 ± 0,3 ^b	0,43 ± 0,01 ^a	1,01 ± 0,24 ^a	1,7 ± 0,29 ^a	3,2 ± 1,09 ^a	10,6 ± 5,3 ^a
	T3	6,3 ± 1,45 ^a	2,8 ± 0,2 ^a	0,45 ± 0,06 ^a	1,30 ± 0,05 ^a	1,8 ± 0,24 ^a	3,4 ± 0,89 ^a	11,1 ± 9,2 ^a
	T4	7,7 ± 1,0 ^a	4,0 ± 0,4 ^a	0,39 ± 0,06 ^a	1,20 ± 0,11 ^a	2,0 ± 0,4 ^a	3,9 ± 0,6 ^a	12,6 ± 1,0 ^a
	T5	7,6 ± 0,4 ^c	3,2 ± 0,7 ^a	0,54 ± 0,06 ^a	1,26 ± 0,11 ^a	1,7 ± 0,5 ^a	3,3 ± 0,94 ^a	10,8 ± 3,2 ^a

Os tempos (T) se referem aos dias de coleta: Dia zero (T0), dia 20 (T1), dia 30 (T2), dia 45 (T3), dia 60 (T4) e dia 80 (T5).

Letras não coincidentes denotam diferença estatística entre os valores, e deve ser analisada comparando os mesmos momentos entre diferentes grupos.

G – Grupos; PT – Proteína total; Alb – Albumina; Alfa – Alfaglobulina; Beta – betaglobulina; Gama – Gamaglobulina; TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; GSH-Px – Glutaciona peroxidase

5. CONCLUSÕES

Nas condições que foi realizado este experimento, os resultados do presente trabalho indicam que:

CAPÍTULO 1

- Não há influência da suplementação dos cordeiros com vitamina E e selênio sob os parâmetros de eritrograma, quando estes se encontram parasitados por *Haemonchus contortus*.
- A suplementação com vitamina E e selênio mantém valores mais elevados de neutrófilos na circulação sanguínea.
- O grupo somente suplementado mostrou melhores valores de hemácias, VG, hemoglobina, leucócitos totais, e linfócitos demonstrando a ação destes elementos sobre a manutenção dos componentes sanguíneos.

CAPÍTULO 2

- Não há resposta da suplementação em relação ao proteinograma, quando estes animais encontram-se desafiados pela parasitose.
- Há aumento da atividade da GSH-Px nos grupos tratados, porem sem diferença estatística entre os grupos.

- Não há situação de estresse oxidativo visto que quando aumenta os teores de TBARS há um efeito compensatório gerado pelo aumento da GSH-Px.

6. REFERÊNCIA

ABAAS, A. K., et al. **Imunologia Celular e Molecular**, 4ª edição, Rio de Janeiro, ED. REVINTER, 2003.

ADAMS, D.B. Systemic responses to challenges infection with *Haemonchus contortus* in immune merino sheep. **Veterinary Research Commuinations**, v. 17, p.23 – 35, 1993

ADAMS, D.B.; BEH, K.J. Immunity acquired by sheep from an experimental infection with *Haemonchus contortus*. **International Journal of Parasitology**, v. 11, p.381–386, 1981

Alonso, M.L; et al. Glutati6n peroxidasa (GSH-PX) em las patologias asociadas a defici6ncias de sel6nio em ruminantes. **Archive medicin veterinary**. Vol.29, n.2. Valdivia, 1997.

ARTHUR, J. R. et al. Seleniim in the imune system. **Journal nutrition**, v.133, p 1457- 1459, 2003.

Baker, R. L. Characterization and utilization of sheep and goat breeds that are resistant to helminths. In: LE JAMBRE, L. F.; KNOX, M. R. Sustainable parasite control in small ruminants. **Bogor: ACIAR**, p. 172-177. (Proceedings, n. 74) 1996.

BALIC, A., et al. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. **Advances in Parasitology**, 45, 181–241. 2000.

BARREIROS A. L. B. S., et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

BATH, G. F., et al. Sustainable approaches for managing haemonchosis in sheep and goats. **Food and Agriculture Organization**. 129p, 2001.

BEEHLER, C. J., et al. Blood sulfhydryl level increases during hyperoxia: a marker of oxidant lung injury. **Journal Application of Physiology** , v.67 p. 1.070-1.075, 1989.

BLACKBURN, H.D.; et al. Interations of parasitism and nutrition in goats affects on haematological parameters, correlations and other statistical associations. **Veterinary Parasitology**, v.44, n.3-4, p.183-197, 1992.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. et al. Consequences of the Diabetic Status on the Oxidant/Antioxidant Balance. **Diabetes & Metabolism**, v. 26, n. 163-176, 2000.

BORBA, M.F.S. Efeitos do parasitismo gastrintestinal sobre o metabolismo do hospedeiro. **In: Nutrição de ovinos**. Jaboticabal : FUNEP, p. 213-241, 1996.

BOWMAN, D. D., et al. **Georgi's Parasitology for Veterinarians**. 8 ed. Saunders Publishing Company, St. Louis, Missouri, 2003. 422p.

BULGER, E. M. ; MAIER, R. V. Antioxidants in critical illness. **Arch Surg**, v.136, n.10, p.1201-7. 2001.

BUZZULINI, C; et al. Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação albendazole, levamisole e ivermectina à moxidectina em ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.6, p.891-895, 2007

CARVALHO, E.B., et al. Base para criação de ovinos no estado de São Paulo. São Manuel: **Associação Paulista de Criadores de Ovinos** , 2.ed., p.81, 2001.

CHIHUAULAF, R.H., et al Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. **Veterinary of México**, V.33, n.3, p.265-283. 2002.

CRUZAT, V. F. et al. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n.5, 2007.

DRÖGE, 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. **Phys. Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.

ECHEVARRIA, F.A.M. et al. Controle estratégico da verminose ovina no Rio Grande do Sul. **In: Curso de Parasitologia Animal**, 2. Bagé, RS: Anais...: CBPV, p.159-163, 1989.

EDDI, C., et al. The prevalence of anthelmintic resistance of sheep in Southern Latin America: Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 189- 197, 1996

ELLMAN, G.L. Tissue sulphhydryl groups. **Archive of Biochemistry and Biophysics.**, v. 82, p. 70-77, 1959.

ETCHICHURY, M. Efeitos da suplementação parenteral com selênio e vitamina E nos valores hemáticos e séricos de cavalos de enduro. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2004

FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's Veterinary Hematology**, 5.ed., Philadelphia: Williams & Wilkins, 1344p, 2000.

FERNANDES, L. H. et al. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, p. 733-740, 2004

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação médica brasileira*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FINCH, J. M; TURNER, R. J. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. **Research in Veterinary Science** , vol. 60, p. 97-106,1996.

FLOYD F A. The effect of peroxides and free radical on body tissues. **Journal of the American Dental Association**, v.128 p. 37- 40, 1997.

FRIEDMAN, H. S. A standardized procedure for serum protein eletrophoresis on celulose acetate membrane strips. **Clinica Chimica Acta**, v. 6, p. 775-781, 1961.

GARCIA, J.P. Aproximación al concepto de fenótipo ovino resistente a la gastroenteritis parasitaria producida por tricostrongilidos em raza churra.Capturado em 5 de agosto de 2007.

TESIS DOCTORAL, Sanidade animal, 2003. Universidad de Leon. Espana. Online. Disponível na internet. www.ovinova.com/pdf/tesisjorgeperezgarcia.pdf

GAZDA, T. L. Distribuição de larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos em pastagens tropicais e temperadas. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006

GENTRY, P. C. et al Effects of supplemental d-alpha-tocopherol on preweaning lamb performance, serum and colostrum tocopherol levels and immunoglobulin G titers. **Sheep research journal**, v. 8, n. 3, p. 95-100, 1992.

GIERUS, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural**, v. 37, n.4, p. 1212-1220, 2007.

GILBERT, H. F.; MC LEAN, V. M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.63 p.169-172, 1990.

GORDON, H. McL., WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Counc Science Ind. Australian**, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

HALLIWELL, B. et al. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? **Free Radicals Research**, v.33, n.6, p.819-30. 2000.

HARNESS, E.; et al. Experimental *Haemonchus placei* infections in calves. Blood picture at three levels of infection. **Journal Comparative Phatology**, v.80, p. 173- 179, 1970.

HATFIELD, J. T. et al. Role of supplemental vitamin E in lamb survival na production: A review. **Journal Animal Science**, v.77, p. 1-9, 2000.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 107, p. 401-404, 1986.

HERSHKO C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminary of Hematology**, v. 26 p.277-285. 1989.

HÖER, N.F., et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2000.

HURLEY, W.L.;DOANE, R.M. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.3, p.784-804, 1989.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Phidelphia: Lea & Febiger, 417p. 1993.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Phidelphia: Lea & Febiger, 1221p.1986.

JASMER, D, P. et al. *Haemonchus contortus* intestine: a prominent source of mucosal antigens. **Parasite Immunology**, n. 29, p.139–151, 2007

KATAMOTO H ,; et al. Nitroblue tetrazolium reduction of neutrophils in heat stressed goats is not influenced by selenium and vitamin E injection. **Jounal Veterinay of Medicin Science**, v. 60, n. 11, p.1243-1249, 1998.

KAZURA, J.W; MESNICK, S.R. Scavenger enzymes and resistance to oxygen mediated damage in *Trichinella spiralis*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v10, p. 1 – 10, 1984.

KREMERS, B.; et al. Reflectance densitometry of cellulose acetate protein eletrophoresis. **American Journal of Medical Technology**, v. 33, n. 1, p. 28-34, 1967.

LEAL M, L, R et al. Proteinograma sérico de bezerras sadias, da raça holandesa, no primeiro mês pós-nascimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** , v.40, n.2, 2003.

LESSARD, M.: et al. Cellular immune responses in pigs fed a vitamin E- and selenium-deficient diet. **Journal Animal Science**, vol. 69, p. 1575-1582, 1991.

LIESEGANG, A. et al. Effect of vitamin E supplementation of sheep and goats fed diets supplemented with polyunsaturated fatty acids and low in Se. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p.292–302, 2008.

LIGHTBOY, J.H. et al. Comparative aspects of plasma antioxidant status in sheep and goats, and the influence of experimental abomasal nematode infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 124, p.192-199, 2001

LOPES, S.T.A. et al. Leucograma de cabras suplementadas com vitamina E na mastite experimentalmente induzida por *staphylococcus aureus*. **In:** Congresso Brasileiro de Veterinária, 2000, Águas de Lindóia - SP. Anais ...: XXVII Congresso Brasileiro de Veterinária, V Congresso Paulista de Veterinária, IV Conferencia Anual da SPMV. v. 1.

LOPES, S.T.A. Perfil leucocitário e atividade funcional neutrofílica, medula óssea, fibrinogênio e proteínas plasmáticas totais em cabras com mastite induzidas experimentalmente por *Staphylococcus aureus* e suplementadas com vitamina E (acetato DL-á-tocoferol). São Paulo, 2001. 195p. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2001.

LOUVANDINI, H. et al. Effect of dietary protein intake on calf resilience to *Haemonchus placei* infection. **Brazilian Journal Veterinary Research**, Animal Science, vol.39 no.5 São Paulo 2002.

MACEDO, V.P. et al. Verminose ovina com ênfase em haemoncose: uma revisão. **PUBVET**, v.2, n.16, Abril, 2008.

MACHADO, P. R. L. et al . Immune response mechanisms to infections. **Anais brasileiros de dermatologia**. , Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, 2004.

MACIEL, S., et al. The prevalence of anthelmintic resistance of sheep in Southern Latin America: Paraguay. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 207-212, 1996.

MCDOWELL, L.R. et al. Vitamin E Supplementation for the ruminant. **Animal feed Science Technology**. V.60, p. 273 – 296, 1996.

MEYDANI M. Vitamin E. **Lancet**. 345:170–175. 1995

MEYDANI, S.N., et al. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects: a randomized controlled trial. **JAMA**. v. 277, n.7, p.1380-6, 1997

MEYER, D. J.; HARVEY J. W. **Veterinary Laboratory Medicine**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1998. 373p.

MILAD, K.; et al. Effect of vitamin E and selenium on blood glutathione peroxidase activity and some immunological parameters in sheep. **Veterinary medicine**, v.46, n.1, p 1-5, 2001

MILLER, J.K. t al. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2812-2823, 1993.

NACHBAR, F. E.; KORTING, H. C. The role of vitamin E in normal and damaged skin. **J. Molecular Medicine**, v.73, n.1, p.7-17. 1995.

NARI, A.; et al. The prevalence of anthelmintic resistance of sheep in Southern Latin America: Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 213-222, 1996.

NARI, A.; CARDOZO, H. Nematodos Gastrointestinales. **In.**: Enfermidades de los lanares - Tomo I. Montevideo : Editorial Agropecuária Hemisfério Sul, p.1-51, 1987.

NOCKELS, C. F. Antioxidants improve cattle immunity following stress. **Animal Feed Science Technology**. Pullman, n. 62 p.59-68, 1996

NORDBERGER, J., ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OHKAWA, H. et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry** . v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, A. C. et al. O uso do destilado da desodorização do óleo de soja como fonte alternativa de vitamina E reduziu a evolução ponderal em ratos. **Revista de nutrição**, v.18 n.5, p.693-697, 2005.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; et al. Características parasitológicas e resposta tissular do abomaso em cordeiros infectados por *Haemonchus* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. , Belo Horizonte, v. 52, n. 5, 2000.

ORTOLANI, E. L. Efeitos da suplementação dietética de molibdênio e enxofre sobre a infestação de *Haemonchus contortus*, em ovinos. Sao Paulo, 1997. Livre-docência. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

PAES, P.R.O. et al . Efeitos da administração de vitamina E na infecção mamária e na contagem de células somáticas de cabras primíparas desafiadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. , Belo Horizonte, v. 55, n. 1, 2003.

PARNHAM, M. J.; GRAF, E. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. **Biochemical Pharmacology**, v.36, n.19, Oct 1, p.3095-102. 1987

PASCHOAL, J. J.; et al. Perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas alimentadas com soja extrusada e selênio orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.12, p.1793-1799, 2007.

PAULA E SILVA, R. O., et al. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**. v. 18, n. 2, p. 116-122, 2008.

PEREIRA, B. Exercício físico como pró-oxidante. **Revista Paulista de Educação Física**, v.8, p.77-89, 1994

PEREIRA, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. **MOTRIZ**, v.2, n.2, p71-79. 1996.

RADOSTITS, O. M., et al. **Clínica veterinária – um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed. Guanabara Koogan,. 1770p. 2002.

RAMIREZ-BRIBIESCA, J. E.; et al. Effect of selenium-vitamin E injection in selenium-deficient dairy goats and kids on Mexican plateau. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.57, n.1, p. 77-84, 2005.

RIEGEL, R.E. Radicais livres. **In: Bioquímica**. 3^a ed. São Leopoldo: Unisinos, p. 507-536, 2002.

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

ROOKE, J, A. et al. Effects of vitamin E and selenium on the performance and immune status of ewes and lambs. **Journal of Agricultural Science** , v.142, p. 253–262, 2004.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. **In: VIGO-PELFREY, C. (Ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton: CRC Press., p.151-170, 1991**

SAHAI, B.N. Studies on blood picture in stomachworm (Haemonchus contortus and Haemonchus bispinosus mixed infection) infection in sheep and goats. **Indian Veterinary Journal**, v. 43, p.422-426, 1966

SCHANAIDER, A. Radicais livres: vilões ainda em estudo. **In: Ciência Hoje**, v.27, n. 158, p.60-62, 2000.

SCHWARS, K., FOLTS C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal American oh Chemistry Socite**. v. 79, p. 32- 39, 1957.

SHAN X, et al. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v.47, p. 61-71, 1990.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SMITH, K.L. Vitamin E-enhancement of immune response and effects on mastitis in dairy cows. **Animal Nutrition**, Proceedings Roche Symposium, London, 1986.

SOBRINHO, A.G.C., et al. Nutrição de Ovinos. Jaboticabal: **FUNEP**, 258p. 1996.

SOUZA, C, et al. Estresse parasitário em cabras saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. **Veterinária notícias**, v. 12, p. 26-29, 2006.

SPEARS, J.W. Micronutrients and Immune Function **In Cattle**. Proceedings Of The Nutrition Society ; 59: 587–594, 2000.

STADTMAN, E. R. Metal íon-catalized oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radical Biology & Medicine**, v.9, p.315-325, 1990.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS use's guide Statistic. Cary, **SAS**, 956p.1985.

SUTTLE, N.F.; JONES, D.G. Recent developments in trace elements metabolism and function: trace elements, disease resistance and immune responsiveness in ruminants. **Journal Nutrition**, Bethesda, v.119, n.7, p.1055-1061, 1989

TAULER, P., et al. Diet supplementation with vitamin E, vitamin C and β -carotene cocktail enhances basal neutrophil antioxidant enzymes in athletes. **Pflügers Archives European Journal of Physiology** V. 443, N. 5-6, p. 791-797, 2002.

TIANO, L. et al. Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. **Mutation Research**, v. 464, p. 269-277, 2000.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária**. 5. ed. São Paulo : Roca,. P.326–341. 1998

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3. ed. Tóquio, 84 p , 1994.

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 3rd ed. CABI Publ. Wallingford., 614 p. 1999.

URQUHART, G. M., et al. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 276 p. 1998.

VANNUCCHI et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. Ribeirão Preto, **Simpósio: Nutrição Clínica**, v. 31 p.31-44, 1998.

VASCONCELOS, F. A. G. Tendências históricas dos estudos dietéticos no Brasil. **História, ciência, saúde-Manguinhos** , v. 14, n. 1, pp. 197-219, 2007.

VLASSOFF, A.; et al. The epidemiology of nematode infections of sheep. **Veterinary Journal**, v. 49, n.6, p. 213- 221, 2001

WAKELIN, D. et al. Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. **Nature**, v.312, p.450 – 452, 1984

WITTEWER, F. Estrés oxidativo y selênio em bovinos. **In:** Gonzáles, F. H. D., et al. Anais do Seminário internacional de Deficiências Minerais em Ruminantes. UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 1998.

YAMAGUCHI, I. Activators for sistemic acquired resistance. **In:** HUTSON, D., MYAMAMOTO, J. *Fungicidal Activity*, p. 193-219, 225 p. 1998.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species **Physiological Reviews** v.74, p. 139-161, 1994.

ZANETTI, M.A. et al. Efeito da suplementação de Selênio e Vitamina E em bovinos leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.405-408, 1998.

ZHENG, K., A, et al. Effect of dietary vitamin E supplementation on murine nasal allergy. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.318, n.1, p.49-54. 1999.